



Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Células Estaminais Dentárias

Alguns Aspetos

João Filipe Brochado Martins

Orientador: Professora Doutora Maria Helena Figueiredo

Co-Orientador: Mestre Paulo Palma

Coimbra, 2013

Células Estaminais Dentárias

Alguns Aspetos

Martins J. *, Palma P.**, Figueiredo H.***

*Aluno do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC

**Assistente Convidado no Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC

***Professora Associada no Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC

Área de Medicina Dentária, FMUC, Coimbra - Portugal
Av. Bissaya Barreto, Blocos de Celas, 3000-075 Coimbra
joao_13martins@hotmail.com

Abreviaturas

BMMSCs *Bone marrow mesenchymal stem cells*

CD *Cluster of differentiation*

DFSCs *Dental follicle stem cells*

DPSCs *Dental pulp stem cells*

DSP *Dentin sialoprotein*

ESC *Embryonic stem cells*

FACS *Fluorescence activated cell sorting*

FGF-R3 *Fibroblast growth factor, receptor 3*

hTERT *Human telomerase reverse transcriptase*

iPS *Induced pluripotent stem cells*

MACS *Magnetic activated cell sorting*

MEPE *Matrix extracellular phosphoglycoprotein*

MSC *Mesenchymal stem cells*

MUC 18 *Melanoma associated glycoprotein*

PD *Population doubling*

PDLSCs *Periodontal ligament stem cells*

SCAPS *Stem cells from apical papilla*

SHEDs *Stem cells from exfoliated deciduous tooth*

TGF- β RIII *Transforming growth factor β, receptor III*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

Resumo

As células estaminais constituem a salvaguarda da homeostasia dos tecidos e o garante da sua reparação durante toda a vida do indivíduo. Compreende-se, pois, que estas células estejam na base de quase todos os processos de regeneração de tecidos. As descobertas recentes têm levado a uma percepção bastante otimista da versatilidade destas células e do modo como podemos pô-las ao nosso serviço.

Parece ainda ser cada vez mais evidente que as células estaminais, presentes nos tecidos adultos, podem ser bem mais versáteis do que inicialmente se pensava. A descoberta recente de uma tecnologia eficiente capaz de reprogramar células somáticas em células estaminais pluripotentes, designadas por células estaminais induzidas, conhecidas pela sigla iPS abre uma janela de oportunidades aos processos regenerativos. Assim, as iPS parecem apresentar-se como substitutos ideais das células estaminais embrionárias, podendo constituir no futuro, uma importante fonte de células para a reparação de outros tecidos que não os de origem.

A decisão entre a escolha de uma via de autorrenovação e o início de um processo de diferenciação é muitas vezes determinado pelo microambiente que rodeia as células estaminais. De facto, as células estaminais encontram-se geralmente associadas a outras células diferenciadas e a estruturas constituintes da matriz extracelular, formando no seu todo um compartimento especializado designado por nichos (*stem cells niches*).

Estes nichos constituem, assim, “entidades” anatómicas especializadas que abrigam as células estaminais, criando um ambiente que condiciona a sequestração destas células, num estado quiescente, inibindo a sua diferenciação, mas conservando a sua capacidade de autorrenovação (mantendo assim as suas características e propriedades de células estaminais).

Não existe ainda um procedimento reconhecido e recomendado como específico e seletivo que permita de uma forma rigorosa a deteção, isolamento e purificação das células estaminais. No entanto, considerando que cada tipo de células apresenta um arranjo próprio de antigénios na sua superfície, geralmente proteínas, constituindo conjuntos de diferenciação (*clusters of differentiation - CD*), que as tornam distintas umas das outras, continuam a ser investidos grandes esforços nas metodologias de análise imunofenotípica destas células com base em anticorpos que reconhecem especificamente estes antigénios.

Atualmente, as células estaminais podem ser detetadas e isoladas, a partir de uma população celular heterogénea, com base numa das seguintes técnicas: a) marcação imunocitoquímica; b) separação de células ativadas por fluorescência, num

processo designado por *fluorescent antibody cell sorting* (FACS); c) seleção imunomagnética, num processo designado por *magnetic antibody cell sorting* (MACS); d) estabelecimento de culturas e sub-culturas celulares (com análise morfológica, avaliação do crescimento/proliferação, tempo de duplicação e caracterização do perfil imuno-fenotípico das colónias).

O desenvolvimento de estudos de investigação experimental permitiu demonstrar a existência, na polpa de dentes adultos, na polpa de dentes decíduos esfoliados, no ligamento periodontal e na papila apical, de nichos de células estaminais pós natais, capazes de levar por diante um processo de autorrenovação, proliferação e diferenciação em várias linhagens celulares.

As células estaminais dentárias são consideradas células estaminais de natureza mesenquimatosas (MSCs) com grande capacidade proliferativa e grande versatilidade e, embora representem somente 1 a 4% da população celular total, podem originar uma multidão de células amplificadoras altamente diferenciadas. Aliadas a estas características, a sua facilidade de obtenção e de preservação, faz com que estas células possam representar uma fonte ideal de células estaminais, com múltiplas possibilidades de aplicação em processos de regeneração quer em medicina quer em medicina dentária.

As células estaminais da polpa dentária (DPSC e SHED) apresentam perfis de expressão génica e capacidade proliferativa e de diferenciação semelhante às das células mesenquimatosas indiferenciadas presentes na medula óssea. Em condições apropriadas podem evoluir para células da linha osteogénica, condrogénica, adipogénica, miogénicas e neurogénicas. Porém a sua principal característica reside no seu potencial de diferenciação odontoblástico, quer *in vivo* quer *in vitro*, estando ativamente envolvidas na formação de dentina reparadora. De referir ainda que as DPSC expressam também marcadores típicos de células da crista neural, traduzindo a manutenção de características de células derivadas do ectomesênquima.

Recentemente, a papila apical tem assumido uma importância crescente devido à existência de uma população de células estaminais designadas por células estaminais da papila apical (SCAPs). Em comparação com as DPSCs/SHEDs, as SCAPs apresentam maior número de células positivas para o STRO-1, maior velocidade de proliferação (3 vezes superior), maior número de *populations doubling* e maior capacidade de regeneração dentinária *in vivo*, parecendo constituir a principal fonte de odontoblastos primários responsável pelo desenvolvimento da dentina radicular. Além disso, possuem grande atividade telomérica (característica das células embrionárias) sugerindo tratar-se de uma fonte de células estaminais muito

imatura e, por isso, com potencialidades imensas na regeneração do complexo pulpo-dentinário e desenvolvimento da raiz.

Também o ligamento periodontal contém uma população de células muito heterogénea, consideradas como células estaminais mesenquimatosas do ligamento periodontal (PDLSCs), capaz de se diferenciar em fibroblastos e em células formadoras de cimento e de matriz óssea, visando a formação de uma estrutura semelhante ao periodonto. Importa salientar ainda que, as PDLSCs, em relação às demais células estaminais dentárias, podem constituir uma população muito particular, por apresentarem uma expressão positiva para marcadores específicos de tendão.

Por sua vez, o folículo dentário pode constituir também uma fonte de células estaminais (DFSCs) com grande potencial nos processos de regeneração dentária, com particular enfoque para os tecidos periodontais.

Uma nota final para referir que, embora nos encontremos ainda algo distantes de conseguirmos desenvolver órgãos dentários completos a partir de células estaminais, é possível, no entanto, a sua utilização com sucesso em terapias regenerativas endodônticas e periodontais. As células estaminais abrem novas perspectivas a toda uma possibilidade de tratamentos em que o objetivo final será a recuperação *ad integrum* da estrutura dentária original.

Palavras-chave: “células estaminais”, “células estaminais dentárias”, “terapias regenerativas”, “métodos de isolamento”, “perfil imunofenotípico”

Abstract

Stem cells are the safeguarding of tissue homeostasis and ensures their repair throughout the life of the individual. It is understandable therefore that these cells are the basis of almost all processes of tissue regeneration. Recent discoveries have led to a rather optimistic perception of the versatility of these cells and how we can put them to our service. Still seems to be clear that stem cells, present in adult tissues, can be much more versatile than initially thought. Thus, stem cells collected directly from adult tissues promise to be useful for the repair of tissues other than the source.

The decision between choosing a path of self-renewal and the beginning of a process of differentiation is often determined by the microenvironment surrounding stem cells. In fact, stem cells are generally associated with other differentiated cells and the extracellular matrix structures, forming a whole in a specialized compartment called stem cell niches.

The recent discovery of an efficient technology capable of reprogramming somatic cells into pluripotent stem cells, called induced pluripotent stem cells, known as iPS, opens a window of opportunity for regenerative procedures. Thus, iPS seems to be ideal substitutes of embryonic stem cells and in the future may be an important source of cells for the repair of other tissues than their source.

The decision between the choice of self-renewal and the beginning of the differentiation process is often determined by the microenvironment surrounding the stem cells. In fact, the stem cells are generally associated with other differentiated cells and the extracellular matrix structures, forming as a whole a compartment designated by stem cell niche. These niches are thus "entities" that house specialized anatomical stem cells, creating an environment that affects the sequestration of these cells in a quiescent state, inhibiting their differentiation, but preserving their ability to self renew (thus keeping their characteristics and stem cell properties).

So far, no stable model has been set up to isolate, detect and purify MSCs for the lack of specific cell surface markers. However, since each cell type has a specific arrangement of antigens on their surface, proteins generally, forming clusters of differentiation (CD), which make them distinct from one another, continue to be invested great efforts on immunophenotypic analysis of these cells based on antibodies which specifically recognize these antigens.

Currently, the stem cells can be detected and isolated from a heterogeneous cell population on the basis of the following techniques: a) immunocytochemistry labeling, b) fluorescent antibody cell sorting (FACS); c) magnetic antibody cell sorting (MACS), d) establishment of cell cultures and sub-cultures.

The development of studies of experimental research has demonstrated the existence of several niches of postnatal stem cells in the dental tissues like on pulp of adult teeth (DPSCs), exfoliated deciduous teeth stem cells (SHEDs), periodontal ligament stem cells (PDLSCs), dental follicle stem cells (DFSCs) and the stem cells from apical papilla (SCAPs). All of these are capable of carrying on a process of self-renewal, proliferation and differentiation in several cell lines.

Dental stem cells are considered mesenchymal stem cells (MSCs) with high proliferative capacity and great versatility. Even though they represent only 1-4% of the total cell population they can lead to a multitude of highly differentiated amplifying cells. Allied to these features, the ease of obtaining and preservation, makes these cells an ideal source of stem cells, with multiple possibilities for application in regenerative medicine either in or in dentistry.

The dental pulp stem cells (DPSC and SHED) have gene expression profiles, proliferative and differentiation capacity similar to that of undifferentiated mesenchymal

cells present in bone marrow (BMMSCs). Under appropriate conditions DPSCs and SHEDs have the potential to differentiate into osteogenic, chondrogenic, adipogenic, myogenic and neurogenic. But its main feature is odontoblastic differentiation, either *in vivo* or *in vitro*, and is actively involved in the formation of reparative dentin. Also note that the DPSC also express typical markers of neural crest cells, reflecting the maintenance of the characteristics of cells derived from ectomesenchyme.

Recently, the apical papilla has assumed increasing importance due to the existence of a stem cell population designated stem cell apical papilla (SCAPs). It was found that SCAPs in comparison with DPSCs / SHEDSs showed a significantly greater number of positive cells for the STRO-1 and present both a higher proliferation rate and population doubling. SCAP also have a greater ability to dentin regeneration *in vivo* and seems to be the main source of primary odontoblasts that are responsible for the development of root dentin. Furthermore, SCAPs express a higher level of *survivin* than DPSC and are positive for hTERT. This evidence suggest that SCAPs derived from a developing tissue may represent a population of stem cells which may be a superior cell source in the regeneration of dentin/pulp complex and root development.

Periodontal ligament contains a very heterogeneous population (stem cells from periodontal ligament –PDLSCs) of cells able to differentiate into fibroblasts and cementum/bone-forming cells in order to form a structure similar to the cementum- and periodontal- *like* tissue. The presence of multiple cell types within periodontal ligament suggests that this tissue contains progenitor cells that maintain tissue homeostasis and regeneration of periodontal tissue. It should also be noted that the PDLSCs, compared to other dental stem cells may constitute a very particular population, for presenting a positive expression of specific marker of tendon.

Dental follicle can also be a source of stem cells (DFSCs) with great potential in dental regenerative procedures, with particular focus on the periodontal tissues.

Although in the present we are still far from developing complete dental organs, from stem cells, it is now possible, however, its use in endodontic and periodontal therapies. The viability of using adult stem cells of dental origin can be an alternative to tissue regeneration. Due to the ease of obtaining and maintaining these cells, they may represent an ideal source of stem cells to repair dental structures compromised or participate in regeneration processes. Stem cells open new perspectives to all the possibility of therapies and treatments in which the ultimate goal is the *restitum ad integrum* of the original tooth structure.

Keywords: “stem cells”, “dental pulp stem cells”, “regenerative therapies”, “ isolation approach”, “immunophenotypic analysis”

Índice

| | |
|--|----|
| Parte I | 10 |
| 1. Introdução..... | 10 |
| 2. Células Estaminais..... | 11 |
| 2.1 Introdução Geral..... | 11 |
| 3. Características das células estaminais | 15 |
| 4. Nichos de células estaminais..... | 19 |
| 5. Métodos de Isolamento de Células Estaminais..... | 21 |
| 5.1. Marcação imunocitoquímica | 22 |
| 5.2. Fluorescent antibody cell sorting (FACS) | 23 |
| 5.3. Separação imuno-magnética (<i>Magnetic activated cell sorting</i> - MACS) | 25 |
| 5.4 Culturas Celulares | 26 |
| Parte II | 28 |
| 1. Células Estaminais Dentárias | 28 |
| 1.1 Células Estaminais Pulpares | 29 |
| 1.1.1. Células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs) | 29 |
| 1.1.2. Células estaminais da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHEDs)..... | 32 |
| 1.2. Células estaminais da papila apical (SCAPs) | 34 |
| 1.3. Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) e do folículo dentário (DFSCs) | 39 |
| Parte III | 42 |
| 1. Considerações Finais..... | 42 |
| 2. Agradecimentos | 45 |
| 3. Bibliografia | 46 |

Parte I

1. Introdução

A descoberta das células estaminais nos tecidos de origem dentária veio, de certo modo, revolucionar muitos dos conceitos em que assentavam os mecanismos de homeostasia e renovação de muitas das estruturas constituintes dos órgãos dentários.

Com efeito, apesar de se verificarem substanciais avanços de natureza instrumental e tecnológica aliados ao desenvolvimento de fármacos de grande eficácia, os princípios básicos em que assenta a maioria dos procedimentos terapêuticos, em medicina dentária, não são drasticamente diferentes dos tratamentos introduzidos no século passado. Porém, as terapêuticas inovadoras com base na utilização de células estaminais parecem ter conduzido a uma mudança radical quer na compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na manutenção da homeostasia dos tecidos, quer na resolução de situações clínicas até ao momento impossíveis de resolver. Com efeito, a deteção, isolamento e manipulação das células estaminais têm despertado cada vez mais maior interesse e atenção, considerando os resultados encorajadores decorrentes de estudos de investigação experimental, particularmente no campo da engenharia dos tecidos e regeneração tecidular.

Tendo em mente todos estes conceitos e considerando que esta metodologia tem grande potencial para vir a ser aplicada no futuro, pareceu-nos pertinente e justificado traçar uma panorâmica geral sobre alguns aspetos morfofuncionais das células estaminais em geral, com particular incidência para as células estaminais de origem dentária.

Este trabalho apresentado sob a forma de artigo de revisão, englobando contudo uma contribuição pessoal, encontra-se organizado em três partes distintas.

A **primeira parte**, após uma breve introdução e justificação do tema, inclui uma breve exposição sobre algumas características gerais e métodos de isolamento das células estaminais.

Na **segunda parte**, compreende uma panorâmica geral sobre a origem, localização e caracterização dos diferentes tipos de células estaminais dentárias.

A **terceira e última parte** engloba toda a bibliografia consultada.

2. Células Estaminais

2.1 Introdução Geral

A grande maioria dos tecidos que constituem os organismos pluricelulares, ainda que formados por células altamente especializadas apresenta, todavia uma alta capacidade de renovação. A ocorrência de processos de renovação, cicatrização, reparação e regeneração tecidual quer de uma forma fisiológica quer em resposta a estímulos externos, pressupõe a existência de células muito indiferenciadas. Estas células, designadas por células estaminais, são células que apresentam uma grande capacidade de autorrenovação e proliferação, associada a um vasto potencial de diferenciação, representando por este motivo a salvaguarda da homeostasia dos tecidos onde se encontram e o garante da sua reparação (1).

Compreende-se, pois, que estejam na base de quase todos os processos de regeneração tecidual e de engenharia de tecidos. Dado o crescente interesse da medicina e medicina dentária pelas terapias regenerativas, é cada vez mais importante a otimização e desenvolvimento de possíveis metodologias de identificação, isolamento e amplificação das células estaminais, bem como um conhecimento pormenorizado das suas características biológicas, funcionais e plásticas.

Estudos recentes têm levado a uma perceção bastante otimista da versatilidade destas células e do modo como podemos pô-las ao nosso serviço (2).

De acordo com a sua origem e plasticidade (capacidade de originar células diferenciadas características de outros tecidos que não os de origem), as células estaminais podem ser divididas em células estaminais embrionárias (ESC) e células estaminais pós-natais ou somáticas (3, 4).

As células estaminais embrionárias têm um potencial de diferenciação quase ilimitado, podendo dar origem a todos (totipotentes) ou quase todos (pluripotentes) os diferentes tipos de células que constituem o organismo adulto. Em condições favoráveis podem ser mantidas em cultura, quase indefinidamente, sem se diferenciarem conservando, no entanto, todo o seu ilimitado potencial de desenvolvimento. Com efeito, se forem novamente injetadas num “ambiente” embrionário primitivo podem originar todos os tipos de linhas celulares, incluindo células germinativas.

As células estaminais embrionárias podem ser isoladas a partir da massa interna do blastocisto, com 16 a 32 células, apresentando neste caso capacidade para dar origem a todas as linhagens celulares presentes no embrião, incluindo os tecidos

extra-embrionários, sendo pois consideradas células totipotentes (4, 5). Os embriões com 32 a 64 células podem gerar apenas as células constituintes dos 3 principais folhetos embrionários – ectoderme, mesoderme e endoderme, com exceção da placenta e anexos embrionários, sendo designadas por células pluripotentes (5). Estas células apresentam-se, no seu conjunto, como uma reserva potencialmente inesgotável que poderá ser utilizada nos processos de reparação e regeneração de qualquer tecido lesado. No entanto, a sua aplicação é, atualmente, muito controversa. De facto, as implicações éticas e legais em torno da sua utilização têm limitado a sua aplicação clínica (6, 7). Para além disso, apresentam uma certa instabilidade genética, obrigatoriedade de transplantação para hospedeiros imunocomprometidos, alto potencial neoplásico e metastático e fácil contaminação em cultura, o que dificulta também a sua manipulação clínica.

As células estaminais pós-natais estão presentes nos tecidos e órgãos fetais e adultos, constituindo um grupo heterogéneo de células com diferentes proveniências, desde as isoladas a partir do cordão umbilical e placenta até às provenientes de tecidos mais especializados (8, 9). Em comparação com as células embrionárias, as células estaminais pós-natais têm um potencial de diferenciação mais reduzido. De facto, contrariamente ao espectro totipotente/pluripotente das células estaminais embrionárias as células estaminais pós-natais geram apenas um número restrito de linhas celulares sendo, por este motivo, designadas por multipotentes (3). Embora não incorrendo em limitações morais, as células estaminais pós-natais, encontram-se em pequena percentagem nos tecidos (10) apresentando, por isso, maior dificuldade de isolamento.

Por outro lado, apresentam uma capacidade de divisão mais limitada, designada por *Hayflick limit* (11). Este limite representa o número de vezes que uma população celular consegue entrar em mitose, antes de parar de se dividir. O número de divisões possível está relacionado com o comprimento dos seus telómeros, essenciais para a estabilização dos cromossomas e processos de replicação (12). Cada vez que a célula se divide o comprimento dos seus telómeros diminui e, quando atinge um ponto crítico a célula fica incapaz de se dividir. A isto chama-se senescência replicativa (13). Assim, as células estaminais embrionárias, por possuírem atividade telomerásica(14), apresentam uma muito maior possibilidade de autorrenovação do que as células estaminais pós natais e, por sua vez, as células estaminais do adulto vão perdendo, com o avançar da idade, as suas capacidades de proliferação e diferenciação (15).

Tradicionalmente, a plasticidade das células estaminais embrionárias parecia ser muito maior do que a de células estaminais pós-natais. Porém, é cada vez mais

evidente que as células estaminais pós-natais presentes nos tecidos adultos podem ser bem mais versáteis do que inicialmente se pensava.

A descoberta recente de uma tecnologia eficiente (16) capaz de reprogramar células somáticas em células estaminais pluripotentes, designadas por células estaminais induzidas, conhecidas pela sigla iPS abre uma janela de oportunidades aos processos regenerativos. As iPS são definidas como células somáticas diferenciadas que são reprogramadas em células com propriedades semelhantes às das células estaminais embrionárias, pluripotentes, podendo ser geradas a partir de células adultas de quaisquer tecidos acessíveis (17). Yan 2011 refere que para a obtenção de iPS, por mecanismos de engenharia genética, é necessária pelo menos a utilização de quatro fatores de transcrição: c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2 ou Lin28/Nanog/Oct4/Sox2 (4, 17-20).

A figura 1 inclui uma síntese das diferentes características apresentadas pelas células pós-natais ou somáticas e pelas células estaminais induzidas, após terem sido submetidas a um processo de reversão, de células completamente diferenciadas a células com capacidade de diferenciação pluripotencial(21).

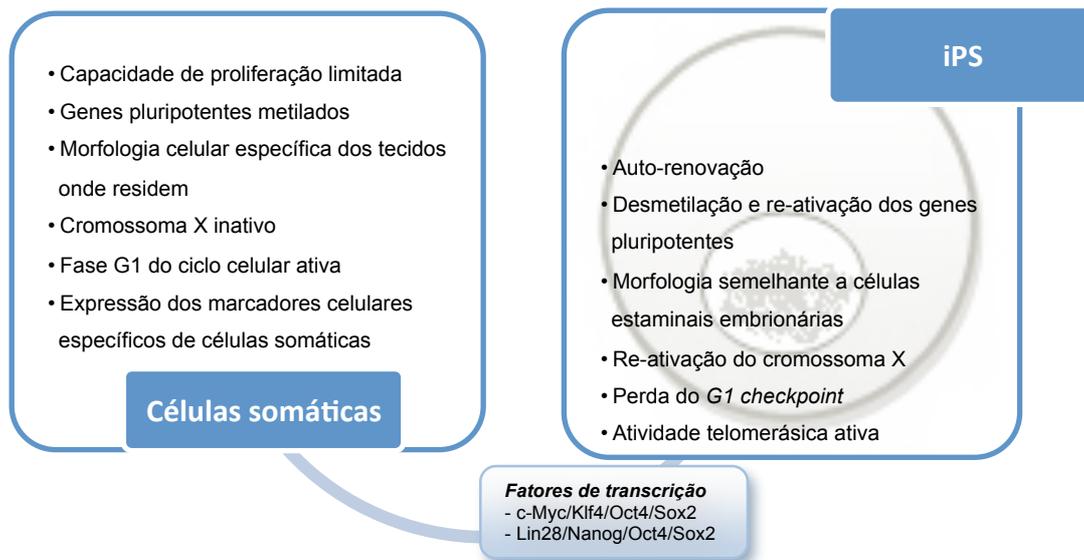


Figura 1 - Esquema representativo das principais diferenças verificadas nas células somáticas após serem revertidas a células pluripotenciais induzidas.

De referir, no entanto, que problemas técnicos enormes devem ser superados antes de devolver células adultas a um estágio embrionário de maior versatilidade. Entre os problemas mais complexos é de salientar o facto de alguns dos fatores de transcrição (como por exemplo o c-Myc) utilizados na reprogramação destas células serem reconhecidamente oncogenes, para além dos riscos intrínsecos da utilização de retrovírus (17).

De qualquer modo, as iPS parecem apresentar-se como substitutos ideais das células estaminais embrionárias, podendo constituir no futuro uma importante fonte de células, para reparação de inúmeros outros tecidos que não os de origem (17, 22, 23).

Dentro do espectro das células estaminais pós-natais as células estaminais derivadas da mesoderme, habitualmente designadas por células estaminais mesenquimatosas (MSC) são as células com maior potencial de utilização em medicina e medicina dentária, pelo que serão as únicas células estaminais abordadas neste estudo.

A caracterização das células estaminais mesenquimatosas assenta muitas vezes na observação da sua morfologia (células com reduzido volume), capacidade seletiva de adesão a superfícies plásticas, capacidade clonogénica, ciclo celular lento, estado indiferenciado e grande potencial de diferenciação (24-26). Porém, nenhum destes critérios é considerado como específico, (25, 27) permanecendo a identificação das células estaminais mesenquimatosas ainda pouco concisa, devido à ausência de marcadores específicos (25). No entanto, considerando que cada tipo de células apresenta um arranjo próprio de antigénios na sua superfície, geralmente proteínas, constituindo conjuntos de diferenciação (*clusters of differentiation* - CD), que as tornam distintas umas das outras, continuam a ser investidos grandes esforços nas metodologias de análise imunofenotípica destas células com base em anticorpos que reconhecem especificamente estes antigénios.

Atualmente são aceites três critérios mínimos, definidos pela *Internacional Society for Cellular Therapy* para identificação das células estaminais mesenquimatosas multipotentes: (i) a positividade destas células para a expressão dos marcadores moleculares CD73, CD90 e CD 105 e negatividade para CD34, CD45, CD14 e HLA-DR; (ii) capacidade de aderência a superfícies plásticas e (iii) potencial de diferenciação *in vitro* em pelo menos três linhas celulares condroblastos, osteoblastos e adipócitos (4, 28). Todavia, está também demonstrada a possibilidade de diferenciação noutros fenótipos incluindo miócitos, células do estroma do tecido conjuntivo, células endoteliais e células neurais (29).

Na procura de uma fonte acessível de células estaminais mesenquimatosas os tecidos dentários têm despertado particular interesse. De facto, a alta capacidade de proliferação e grande potencial de crescimento e diferenciação das células estaminais de origem dentária, aliada à sua fácil acessibilidade fazem dos tecidos dentários uma fonte muito atrativa de células estaminais com possíveis aplicações em mecanismos de regeneração tecidular particularmente importantes em medicina e medicina dentária.

3. Características das células estaminais

Aquando da divisão por mitose cada célula estaminal dá origem a duas células, uma célula que permanece indiferenciada conservando o *status* de célula estaminal (autorrenovação) e outra que passa por um ciclo de etapas de proliferação e diferenciação(8, 13).

Por sua vez, existem duas possibilidades (fig. 2) para que uma célula estaminal possa produzir duas células-filhas com destinos diferentes. Uma das vias possíveis está relacionada com uma assimetria provocada pelo microambiente que rodeia a células estaminal. Assim, as células-filhas (de uma mesma célula estaminal) são inicialmente semelhantes, sendo posteriormente direcionadas em sentidos fenotípicos diferentes, de acordo com as influências do ambiente que atuam sobre elas. Tal como está representado na figura 2A, células irmãs e iguais, à partida, tornam-se distintas pela exposição a diferentes sinais ambientais. Esta alternativa é de longe a mais comum (13).

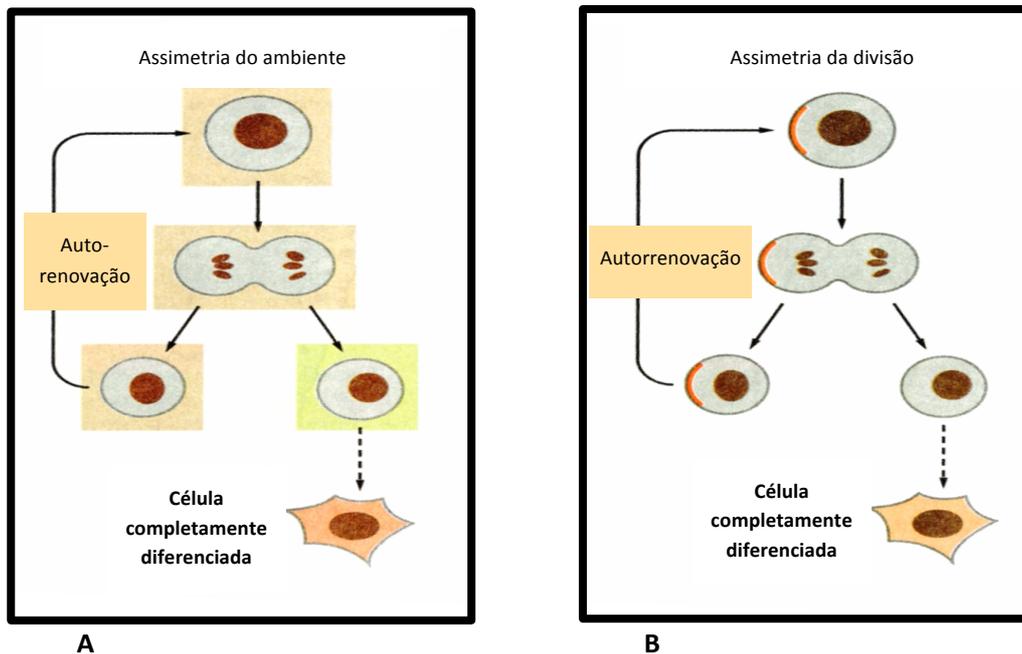


Figura 2 - Representação esquemática das duas alternativas possíveis para uma célula estaminal dar origem a células filhas com fenótipos e destinos diferentes. Adaptada de Alberts *et al.*, 2002 (13).

Em contrapartida pode verificar-se um outro mecanismo, com base na assimetria de divisão. Neste caso, a célula estaminal apresenta desde logo uma assimetria interna, dividindo-se de tal maneira que as suas células filhas ficam dotadas de características e capacidades distintas no momento em que são formadas. Neste processo, ilustrado na figura 2B, um conjunto significativo de moléculas adquire uma distribuição desigual entre as duas células filhas, na hora da divisão. O arranjo assimétrico destes elementos moleculares atua, desde logo, como um fator determinante que irá resultar em diferentes padrões de expressão génica.

De um modo geral, as células que se encontram “comprometidas” com um processo de diferenciação passam por uma série de divisões (fig.3) antes de chegar a células maduras designando-se no seu conjunto por células amplificadoras transitórias(10, 13). Transitórias porque estão em trânsito entre célula mãe e célula diferenciada e amplificadoras porque os ciclos de divisão pelos quais passam têm o efeito de amplificar o número final de células que resultam de uma única divisão da célula estaminal. Deste modo, as células estaminais em processo de diferenciação, antes de atingir o seu estágio final de maturação, geram um grande número de células. As células progenitoras são então células parcialmente diferenciadas que por divisão celular originam, apenas, células diferenciadas. (30)

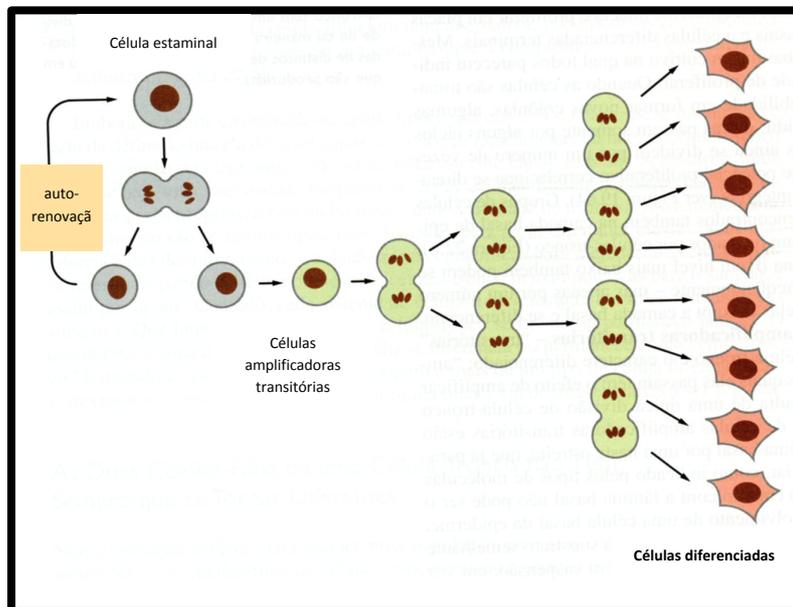


Figura 3 - Esquema representativo da formação de células amplificadoras transitórias, com origem numa célula estaminal, por um processo de proliferação levando ao aparecimento de células maduras. Adaptada de Alberts *et al.*(13).

Convém sublinhar aqui que a grande capacidade mitótica das células estaminais não significa que estas células se dividam muito rapidamente. Este baixo índice mitótico poderá ser visto como uma estratégia de preservação e proteção destas células, com o intuito de evitar a acumulação de possíveis mutações (31). Todavia, este aspeto é compensado pelas divisões de amplificação das células progenitoras comprometidas, permitindo assim a redução do número de ciclos de divisão que as próprias células mãe têm de sofrer ao longo da sua vida e, desta forma, reduzir o risco de senescência replicativa e de mutações prejudiciais(10, 32).

No âmbito das suas propriedades de autorrenovação e proliferação importa referir que uma das mais importantes características das células estaminais é a sua capacidade clonogénica ou crescimento clonal. Deste modo, quando em cultura, uma única célula é capaz de dar origem a um grupo de células geneticamente idênticas.

Considerando o seu grande potencial de diferenciação, a presença de determinados fatores de crescimento/diferenciação no meio em que são cultivadas pode induzir e orientar a sua posterior diferenciação. Todavia, as células estaminais pós-natais quando em culturas a longo prazo e após um certo número de passagens, podem perder algumas das suas capacidades intrínsecas de diferenciação (33).

A principal fonte de células estaminais de natureza mesenquimatosa nos organismos humanos adultos é a medula óssea, constituindo geralmente uma referência em relação às quais as restantes células conjuntivas são comparadas(17, 34).

As células estaminais mesenquimatosas foram primariamente identificadas com base na presença de um antigénio específico na superfície das células do estroma da medula óssea (STRO-1) (35). Porém depressa se verificou que as células STRO-1 positivas representavam, apenas, uma pequena proporção das células estaminais. Isoladamente o STRO-1 não é suficiente para obter uma população pura de células estaminais sendo, por isso, frequentemente utilizado em associação com outros anticorpos (10). Vários conjuntos de anticorpos têm sido frequentemente aplicado para detetar e separar populações de células estaminais com alto potencial clonogénico e de diferenciação multicelular.

Neste grupo está incluída a utilização de anticorpos que reconhecem recetores de adesão celular como a molécula de adesão vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VACAM-1), o CD44 (glicoproteína transmembranar expressa na matriz extracelular e na superfície de células endoteliais, mesenquimatosas e

hematopoiéticas), o CD146 (marcador específico de células endoteliais) e o 3G5 (marcador de pericitos) (20).

Importa referir a este respeito que como não existe ainda uma informação segura acerca da localização e distribuição das células estaminais mesenquimatosas, este conjunto de marcadores vem reforçar, como será referido em parágrafos posteriores, a proximidade das células estaminais às regiões perivasculares, bem como a sua grande semelhança com os pericitos.

4. Nichos de células estaminais

As células estaminais pós-natais encontram-se distribuídas pelos tecidos adultos em compartimentos especializados designados por nichos (*stem cells niches*). Estes nichos constituem “entidades” anatómicas especializadas que abrigam as células estaminais, criando um ambiente altamente controlado que condiciona a sequestração destas células, num estado quiescente (30, 32). De facto, o micro ambiente criado nestes locais regula e condiciona o destino final das células estaminais (36) protegendo-as de estímulos que induzam a sua diferenciação e proliferação descontrolada, ou mesmo a sua apoptose. Moléculas solúveis como *Wnt*, FGF e proteínas *hedgehog* constituem importantes fatores de regulação autócrina e parácrina da função das células estaminais, com capacidade para induzir mecanismos de proliferação e diferenciação, quando necessários (31).

De referir ainda que nestes nichos (fig. 4) as células estaminais se encontram geralmente associadas a outras células mais diferenciadas e a estruturas constituintes da matriz extracelular permitindo no seu conjunto manter um equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação (37).

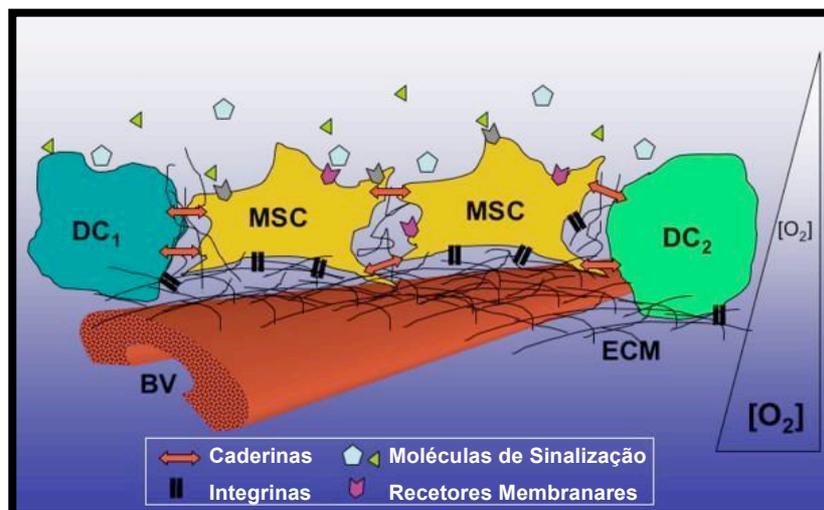


Figura 4 - Representação esquemática de um nicho de células estaminais mesenquimatosas mostrando a sua localização perivascular (BV). As células estaminais mesenquimatosas (MSC) presentes neste nicho contactam com várias outras células diferenciadas (DC₁, DC₂ ...) através de moléculas de adesão celular (como as caderinas) e ainda com os componentes da matriz extracelular (ECM) através de recetores integrina. São ainda parte importante deste nicho diferentes moléculas de sinalização (incluindo fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos). A variação da tensão de oxigénio pode também influenciar o comportamento das MSC. Adaptada de Kolf et al, 2007(37).

Numerosos nichos de células estaminais têm vindo a ser continuamente identificados em quase todos os tecidos do organismo, exercendo, como já foi referido, um papel fundamental nos mecanismos de renovação, cicatrização, reparação e regeneração tecidual. A este respeito, é importante recordar mais uma vez que a medula óssea pode ser considerada como o maior nicho de células estaminais do organismo, particularmente no que se refere às células estaminais hematopoiéticas.

5. Métodos de Isolamento de Células Estaminais

Dado que as células estaminais são morfológicamente idênticas ou muito semelhantes às células dos tecidos onde se encontram, os seus processos de identificação e isolamento são extremamente difíceis sendo frequentemente necessário o recurso a vários critérios e tecnologias de natureza morfológica e bioquímica. Por outro lado, para que possam ser aplicadas em terapias regenerativas importa separá-las em condições o mais próximo possível de situações fisiológicas, de forma a excluir possíveis alterações induzidas pelos meios de cultura e processamento (35, 38, 39). A deteção e identificação das células estaminais constitui, pois, um importante desafio.

A tentativa de resolução dos problemas de identificação das células estaminais tem por base, como já foi referido, o facto de que cada tipo de célula apresentar um arranjo próprio de recetores na sua superfície, geralmente um conjunto de proteínas membranares, que a torna distinta de outros tipos celulares. Estas proteínas bem como outros fatores de transcrição são usados como marcadores citológicos nos processos de identificação e posteriormente, ou em simultâneo, nos processos de separação. No entanto, não existe ainda um procedimento reconhecido e recomendado como específico e seletivo que permita de uma forma rigorosa a deteção, isolamento e purificação das células estaminais (33).

Os processos de seleção de células estaminais, a partir dos seus tecidos de origem, visando possíveis aplicações clínicas, requerem uma metodologia minimamente invasiva recorrendo-se, geralmente, a uma técnica de citometria de fluxo e em seguida, visando a obtenção de populações celulares homogêneas, a uma separação por *cell sorting* (25).

Atualmente, as células estaminais podem ser detetadas e isoladas a partir de uma população celular heterogênea com base numa das seguintes técnicas(33):

- 1) Marcação imunocitoquímica
- 2) Separação de células ativadas por fluorescência, num processo designado por *fluorescent antibody cell sorting* (FACS);
- 3) Seleção imunomagnética, num processo designado por *magnetic antibody cell sorting* (MACS);
- 4) Estabelecimento de culturas e sub-culturas celulares (com análise morfológica, avaliação do crescimento/proliferação, tempo de duplicação e caracterização do perfil imuno-fenotípico das colónias).

As três primeiras metodologias englobam um conjunto de técnicas que visam a deteção de antigénios presentes nas células em estudo, através de anticorpos específicos. A ligação antigénio-anticorpo é posteriormente visualizada utilizando um sistema de deteção que pode envolver um número variável de reações bem como diversos tipos de marcadores, nomeadamente fluorocromos, enzimas e partículas magnéticas. Assim, o grande número de técnicas atualmente disponível difere sobretudo na natureza da molécula utilizada para marcar o anticorpo, de modo a permitir a sua visualização.

As culturas de células constituem um método clássico, mas não menos eficaz, para purificar células estaminais a partir de uma mistura heterogénea de células. Este processo é essencial quando pretendemos obter populações celulares numerosas e homogéneas com possibilidades de aplicação de outras técnicas.

Mais recentemente, têm sido aplicadas algumas técnicas de biologia molecular para a deteção e caracterização de células estaminais, que incluem a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), análise com *western* ou *northern* blot ou o recurso a vetores.

5.1. Marcação imunocitoquímica

Os métodos de imunocitoquímica permitem detetar e localizar antigénios, presentes em células ou tecidos, com recurso a um ou vários anticorpos (anticorpo primário e secundário). Habitualmente o primeiro anticorpo, anticorpo primário, específico para o antigénio que se pretende identificar não é marcado. O segundo anticorpo, anticorpo secundário, é geralmente marcado e dirigido contra a molécula da imunoglobulina da espécie animal em que foi produzido o primeiro anticorpo.

A preservação dos antigénios, a par de uma boa informação morfológica resulta de uma fixação convenientemente aferida. Todavia a manutenção da antigenicidade e a preservação morfológica estão geralmente inversamente relacionadas.

O sucesso da aplicação destes métodos depende, muitas vezes, de vários outros fatores adicionais e não do método em si mesmo, sendo de destacar: a) a imobilização e preservação dos antigénios; b) a redução do ruído de fundo e c) a realização de controlos apropriados.

5.2. Fluorescent antibody cell sorting (FACS)

O método mais comum e eficiente de purificação de uma população celular (fig. 6) baseia-se inicialmente na sua deteção por citometria de fluxo, após marcação com anticorpos fluorescentes (capazes de identificar as células pretendidas), seguida de uma separação por FACS(25).

A citometria de fluxo é uma tecnologia que simultaneamente mede e analisa múltiplas características físicas das células em estudo, à medida que passam num sistema de fluxo laminar e sobre elas é direcionado um feixe de luz. As características analisadas abrangem o tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência(40).

A separação de células ativadas por fluorescência (FACS) constitui uma técnica padrão para purificação de sub-populações celulares (a partir de uma suspensão) apresentando-se, hoje em dia, como um método indispensável para definir e separar com elevada pureza estas população celulares.

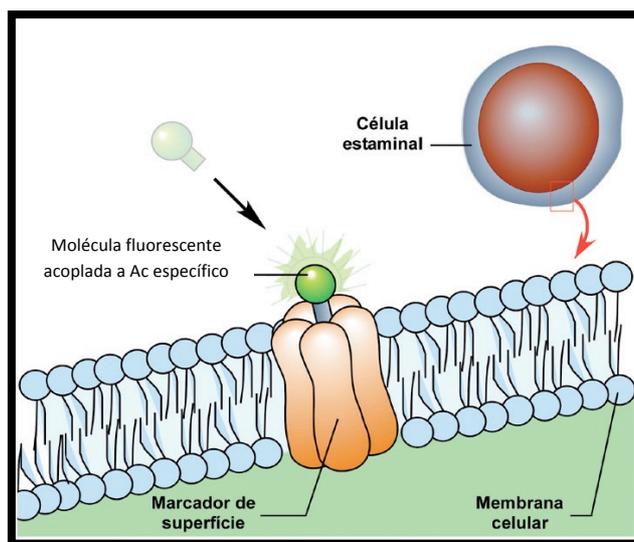


Figura 5 – Identificação de antígenos de superfície presentes nas células estaminais através da sua ligação a um anticorpo específico acoplado à fluoresceína (Adaptado de Correia *et al.* 2010).

Na técnica de FACS, uma suspensão de células, às quais foram adicionadas moléculas fluorescentes que reconhecem marcadores celulares específicos (fig.5), passa em fluxo laminar sob pressão através de um orifício estreito e de um campo elétrico (fig.6). As células estaminais pretendidas correspondem a células fluorescentes possuidoras de uma carga elétrica.

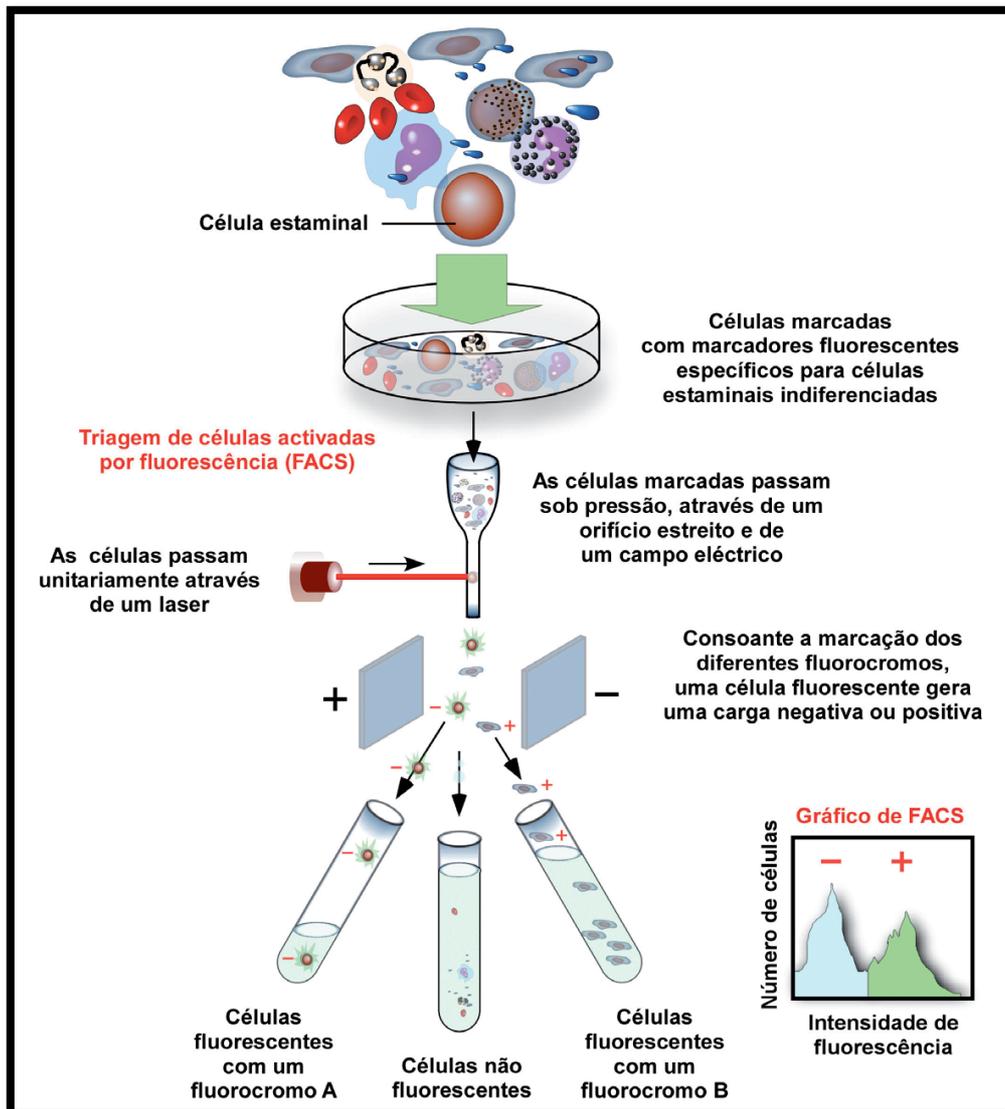


Figura 6 – Esquema representativo de um processo de separação celular (FACS) após aplicação de uma técnica de citometria de fluxo (Adaptado de Correia *et al.* 2010).

Atualmente a FACS constitui a tecnologia mais fiável para separação e caracterização de populações de células raras como células estaminais (25, 33).

5.3. Separação imuno-magnética (*Magnetic activated cell sorting - MACS*)

No método imunomagnético (fig.7), para além de uma incubação com anticorpos primários específicos dos antígenos de superfície das células em questão, são posteriormente utilizados anticorpos secundários conjugados com partículas magnéticas. As células em suspensão serão depois sujeitas a um campo magnético permitindo assim a sua separação e purificação (33).

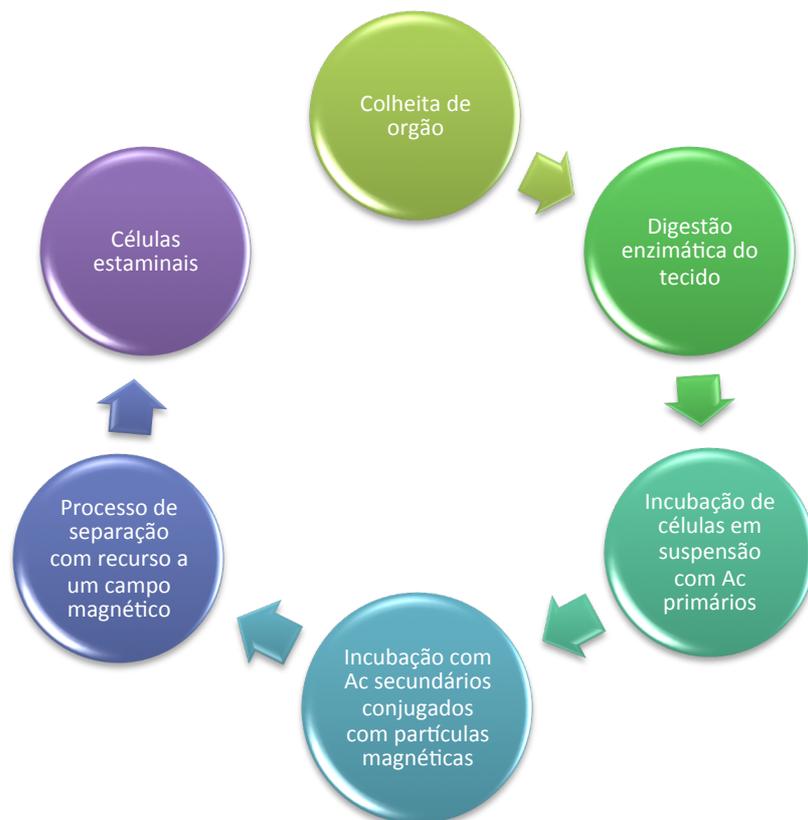


Figura 7 - Representação esquemática de um processo de separação imunomagnético

De um modo geral, a MACS representa um método tecnicamente simples, pouco dispendioso e com capacidade para separar um grande número de subpopulações celulares, apresentando-se assim como uma metodologia prática para a seleção de linhas celulares específicas(33). Porém, o grau de purificação obtido com este método não é muito satisfatório, o que poderá comprometer uma posterior aplicação clínica das células.

5.4 Culturas Celulares

As culturas celulares (fig.8) constituem um método clássico para purificação de células a partir de uma população celular heterogénea. As colónias de células estaminais, particularmente as obtidas diretamente a partir da digestão enzimática de tecidos, são frequentemente distintas no que respeita ao seu tamanho, morfologia e densidade celular(33).

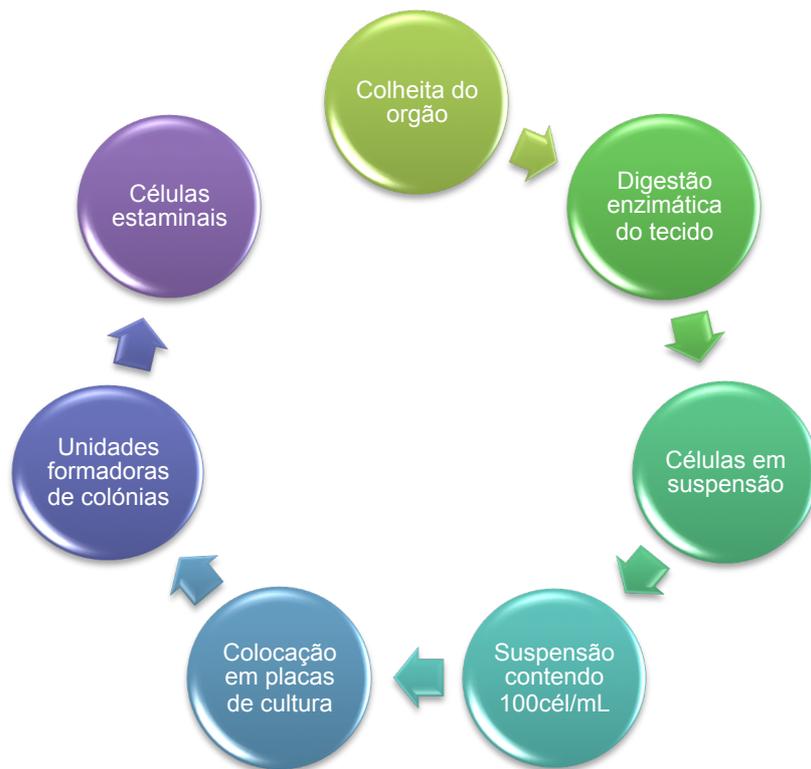


Figura 8 – Esquema representativo de um processo de cultura de células

Têm sido publicados importantes trabalhos de investigação com o objetivo de analisar a influência dos processos e meios de cultura na *performance* das células estaminais (27, 33). Neste âmbito, Yu *et al.* (41) afirmam que quando as células estaminais pós-natais são repetidamente cultivadas as suas características biológicas podem ser significativamente alteradas, com perda de vários marcadores de superfície (por exemplo o STRO-1 e MHC classe II), decréscimo da capacidade de autorrenovação, diminuição da percentagem de células indiferenciadas e restrições no seu potencial de diferenciação (41). Estes aspetos são particularmente notórios com o aumento do número de passagens. A utilização destas células, após cultura, deve ter em conta a possibilidade de alguma instabilidade genética e epigenética (25).

O conhecimento de muitas das características das células estaminais e do seu potencial de diferenciação foi estabelecido com base na análise morfológica, avaliação do crescimento/proliferação, tempo de duplicação e caracterização do perfil imunofenotípico de colónias de células.

Parte II

1. Células Estaminais Dentárias

Desde a descoberta de células estaminais pós-natais na medula óssea (BMMSCs) têm sido desenvolvidos diversos trabalhos com o objetivo de identificar, isolar e caracterizar populações de células estaminais mesenquimatosas existentes noutros tecidos diferenciados. Na procura de uma fonte mais acessível de células estaminais mesenquimatosas os tecidos dentários têm despertado particular interesse (17). De facto, a alta capacidade de proliferação e grande potencial de crescimento e diferenciação das células estaminais de origem dentária, aliada à sua fácil acessibilidade fazem dos tecidos dentários uma fonte muito atrativa de células estaminais com possíveis aplicações em mecanismos de regeneração tecidular particularmente importantes em medicina regenerativa.

Já é grande o conjunto de estudos que demonstram a existência nos tecidos dentários de vários nichos de células estaminais e progenitoras tendo sido, até ao momento, isoladas, identificadas e caracterizadas diferentes tipos de células estaminais de origem dentária, designadas coletivamente como células estaminais dentárias. Neste grupo podemos incluir as células existentes na: a) polpa dentária de dentes definitivos (DPSCs), b) polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (SHEDs), c) papila apical (SCAPs), d) ligamento periodontal (PDLSCs) e e) folículo dentário (DFSCs) (42-48). Todas elas, exceto as SHEDs, foram extraídas de dentes permanentes.

Estas células estaminais dentárias são consideradas células estaminais de natureza mesenquimatosas (MSCs) com grande capacidade proliferativa e grande versatilidade e, embora representem somente 1 a 4% da população celular total, podem originar, como já foi descrito, uma multidão de células amplificadoras altamente diferenciadas (49). Aliadas a estas características, a sua facilidade de obtenção e de preservação, faz com que estas células possam representar uma fonte ideal de células estaminais capaz de reparar estruturas dentárias comprometidas ou participar em processos de regeneração (2, 3, 35, 50-54). De referir ainda que a criopreservação de células estaminais dentárias (de dentes decíduos esfoliados e de dentes permanentes extraídos) parece não diminuir a sua capacidade de proliferação, diferenciação e plasticidade podendo ser preservadas por muitos anos e posteriormente cultivadas (33). Este facto constitui um elemento muito importante para a criação de bancos de células estaminais dentárias. (1, 55-58).

1.1 Células Estaminais Pulpares

Dentro das células estaminais com origem pulpar podemos considerar as células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes e as células estaminais de dentes decíduos esfoliados.

1.1.1. Células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs)

Do tecido pulpar de dentes permanentes foi extraída uma população de células muito heterogênea com uma grande capacidade proliferativa e de diferenciação, confirmadamente reconhecidas como células estaminais e designadas por *dental pulp stem cells* (DPSCs)(34).

A partir do trabalho de Gronthos *et al.*(34), são já vários os investigadores que isolaram e caracterizaram células estaminais originárias da polpa dentária utilizando, preferencialmente, o terceiro molar para este fim (3, 9, 25, 47, 51, 56, 58-77).

As células estaminais da polpa dentária apresentam perfis de expressão génica e capacidade proliferativa e de diferenciação semelhante às das células mesenquimatosas indiferenciadas presentes na medula óssea. Em condições apropriadas (meios de cultura adequados) podem evoluir para células da linha osteogénica, condrogénica, adipogénica, miogénicas e neurogénicas, propriedades consideradas como essenciais para a sua definição como células estaminais mesenquimatosas. Porém a sua principal característica reside no seu potencial de diferenciação odontoblástico, quer *in vivo* quer *in vitro*. Com efeito, as DPSCs são capazes de formar um complexo pulpo-dentinário-*like*, composto por uma camada de odontoblastos adjacente a uma matriz mineralizada, num arranjo semelhante ao do complexo pulpo-dentinário de dentes humanos normais(34, 78, 79). O processo de diferenciação das DPSCs em odontoblastos funcionais tem grandes semelhanças com os mecanismos de diferenciação das MSCs em osteoblastos (80). Por sua vez, as DPSCs são também capazes de regenerar um tecido semelhante à polpa dentária, quando transplantadas para canais radiculares (79), o que abre inúmeras possibilidades de aplicação na área de endodontia regenerativa.

Estas células têm sido também referenciadas por possuir uma suposta atividade imunossupressiva e anti-inflamatória, o que pode ser considerado uma vantagem em situações de transplante alogénico de células estaminais (4, 33, 81).

A origem e localização das DPSCs ainda é objeto de grande controvérsia, pois estas células podem residir em diferentes locais dentro do mesmo tecido parecendo, todavia, integrar diversos nichos perivasculares(82).

Como já foi referido o conhecimento de marcadores específicos para as células estaminais reveste-se de extrema importância na sua localização (80). Com efeito, Sloan *et al.* (30) tendo por base a utilização de diversos marcadores, demonstraram, numa polpa dentária madura, a existência de vários nichos distintos de células estaminais: a) células mesenquimatosas indiferenciadas residentes na camada sub-odontoblástica rica em células, b) uma população celular intimamente associada a elementos vasculares presentes na polpa e c) uma população situada no estroma da porção central da polpa.

As DPSCs mostram positividade para os seguintes marcadores de superfícies CD13, CD29, CD59, CD73, CD90, CD 105, sendo negativas para o CD14, CD24, CD34, CD45, CD19 E HLA-DR (4). Quando comparadas com as MSCs, ambas as populações celulares expressam CD44, CD106 (VCAM-1, CD146, 3G5 e STRO-1 bem como fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina)(30). Todavia, as DPSCs apresentam uma muito mais alta capacidade proliferativa (>30%) e um maior potencial de crescimento(30) do que as MSCs. De facto, embora estas células sejam muito semelhantes às células mesenquimatosas da medula óssea (compartilhando muitos marcadores comuns) apresentam, no entanto, algumas diferenças na sua plasticidade, certamente resultantes da sua natureza ectomesênquimatososa (47).

Como também já foi descrito, quando em condições fisiológicas as células estaminais presentes nos nichos mantêm-se num estado quiescente. Porém, quando sujeitas a agressões, são estimuladas no sentido de aumentarem a sua atividade proliferativa e de diferenciação sendo reconhecido o seu papel fulcral nos processos de reparação e regeneração pulpar (5). Na verdade, quando os odontoblastos primitivos são destruídos as células estaminais presentes na zona central da polpa são capazes de se diferenciar em odontoblastos secundários e desencadear a síntese de uma matriz dentinária (2, 83, 84). De facto, está já demonstrado que as DPSCs estão ativamente envolvidas na formação de dentina reparadora (52). Neste âmbito importa referir que a formação de tecidos mineralizados, na sequência de proteções pulpares diretas (com utilização de MTA e hidróxido de cálcio) são também exemplos do envolvimento das células estaminais nos processos de regeneração.

O conhecimento dos mecanismos pelos quais estas células são capazes de responder às alterações do meio ambiente pode representar um avanço importante no desenvolvimento de processos de engenharia de tecidos e terapias endodónticas regenerativas (85). Serão necessários mais estudos de investigação visando esclarecer o padrão de comportamento das DPSCs aos diferentes estímulos que possam alterar o seu estado de quiescência, bem como o seu potencial de proliferação e diferenciação. A este respeito convém recordar que a dentina constitui

por si só um reservatório de moléculas bioativas claramente envolvidas na regulação da resposta das células estaminais aos estímulos agressores(2, 83, 84).

De notar ainda que também foi já possível detetar e isolar células estaminais/progenitoras na polpa de dentes infetados salientando, no entanto, o facto de poderem apresentar uma senescência prematura, ou seja, um *population doubling* mais baixo. De igual modo parecem apresentar uma diminuição do seu potencial dentinogénico. Com efeito, em situações de polpas infetadas, a presença de certas citocinas como o TNF- α e IL-1, podem reduzir as capacidades de diferenciação das DPSC em odontoblastos (79, 86).

Mais recentemente, Pereira *et al.* (87) ao compararem células estaminais extraídas de uma polpa dentária considerada saudável, com células estaminais provenientes de polpas com processos inflamatórios verificaram que não se observavam diferenças significativas quanto à sua morfologia, taxa de proliferação e potencial de diferenciação.

De referir ainda que as DPSC expressam também marcadores típicos de células da crista neural, traduzindo a manutenção de características específicas de uma fase de desenvolvimento muito precoce (33). Com efeito, expressam nestina, Tuj1, S100, proteína glial fibrilar ácida, tubulina- β III, descarboxilase do ácido glutâmico e neuroenolase, tudo marcadores típicos de precursores neurais e células gliais (33, 47, 60). A este respeito é interessante referir também que até os próprios odontoblastos “carregam” ainda muitas das características do seu neuroepitélio de origem (88). Dentro desta filosofia, foi proposto, que os odontoblastos seriam originalmente recetores sensoriais, respondendo a alterações químicas e térmicas do ambiente, especificidades que ainda hoje se mantêm (5, 89).

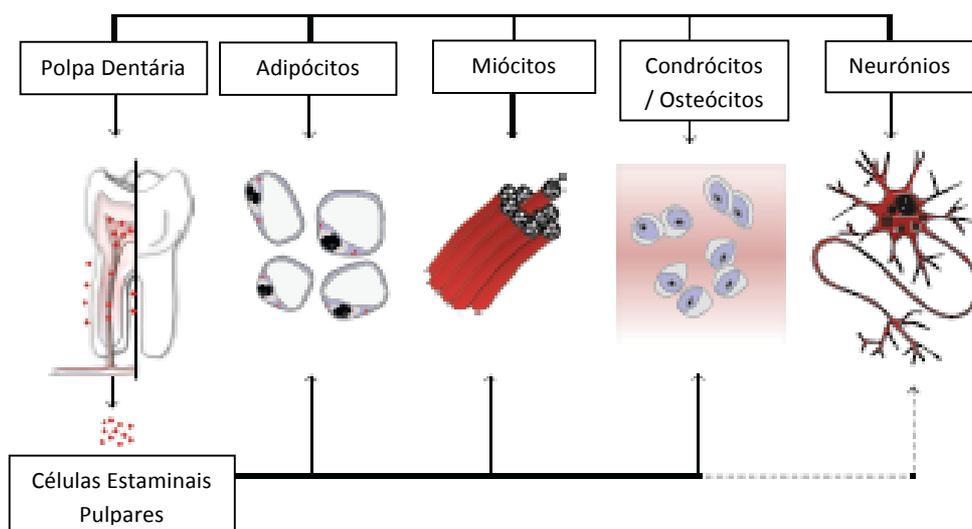


Figura 9 - Esquema representativo de algumas das potenciais vias de diferenciação das células estaminais pulpaes.

A recente confirmação relativamente à presença na polpa dentária (quer de dentes decíduos, quer permanentes) de duas populações distintas de células estaminais, originárias separadamente da mesoderme e da crista neural, confere a estas células um grande espetro de possibilidades de natureza regenerativa (55, 90, 91).

A capacidade de diferenciação das células estaminais da polpa em células neurais, demonstrada quer em estudos *in vitro* quer *in vivo* aumenta a sua potencial eficácia de utilização em processos de regeneração craniofacial e nas doenças degenerativas do foro neurológico (66, 77, 91, 92).

1.1.2. Células estaminais da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHEDs)

O tecido pulpar de dentes decíduos aparenta ser também uma fonte excelente de células estaminais, considerando a sua fácil obtenção e o seu estágio muito precoce de diferenciação (93). Koyama *et al* (69) afirmam mesmo que um dente decíduo naturalmente esfoliado é semelhante a um cordão umbilical, contendo uma população de células estaminais com características e potencialidades únicas. Do mesmo modo, a sua capacidade de proliferação é também bastante superior e mais rápida do que as DPSCs ou mesmo as MSCs (SHEDs > DPSCs > MSCs), sugerindo que estas células representam uma população celular “muito imatura” de células estaminais da polpa dentária (IDPSCs) (5, 47, 50, 69). Este facto é apoiado pela expressão de marcadores celulares embrionários como Oct4 (fator crítico transcripcional para manutenção da pluripotencialidade), Nanog, antigénios de estádios embrionários específicos (SSEA-3 e SSEA-4) e antigénios de reconhecimento tumoral (TRA-1-60 e TRA-1-81) (3, 47, 94).

Em relação ao seu perfil imunofenotípico, as SHEDs expressam STRO-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, sendo negativas para CD14, CD44 e CD45 (4).

Por outro lado, as células estaminais isoladas de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) têm capacidade de se diferenciar num maior número de populações celulares do que a maioria das DPSCs, apresentando também padrões de expressão genética diferentes em relação às DPSCs e às MSCs. Estudos *in vitro* demonstraram a sua capacidade de diferenciação em células da linhagem adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica, osteogénica e dentinogénica (17, 47). Também em diversos estudos *in vivo* e na presença de BMP-2, se verificou a diferenciação das SHEDs em células odontoblastos-*like*, bem como a expressão dos três marcadores específicos da diferenciação odontoblástica (DSPP, DMP1, MEPE)

(17). Para além disso, o tecido mineralizado sintetizado por estas células apresenta características típicas da dentina, com túbulos dentinários e uma camada de pré-dentina, o que a distingue, desde logo, de tecidos de natureza osteóide (4). Todavia, ao contrário das DPSCs, as SHEDs parecem incapazes de regeneração do complexo pulpo-dentinário (3, 4). Salienta-se, no entanto, que Cordeiro *et al.*(95), ao associarem as SHEDs com uma matriz que consideraram adequada, obtiveram um tecido semelhante ao da polpa. Desta forma, concluíram que as SHEDs constituem também uma fonte viável de células estaminais para regeneração pulpar.

Considerando também a sua proximidade temporal às células da crista neural as SHEDs têm vindo a ser utilizadas, a título experimental e com um certo êxito, no tratamento de doenças neurodegenerativas e na reparação de neurónios motores (9, 42).

Em síntese, a grande versatilidade e alta plasticidade destas células, aliada à sua fácil acessibilidade, fazem das SHEDs uma importante e atrativa fonte de células estaminais para engenharia de tecidos. De facto, a aplicação destas células parece ser bem mais vantajosa do que as recolhidas de uma polpa adulta. No entanto, dado que o processo de esfoliação ocorre, normalmente, de uma forma particularmente rápida, estas células só poderão ser aproveitadas durante um período limitado de tempo.

Uma nota final para referir que tanto as DPSCs como as SHEDs apresentam capacidades para se diferenciar em células endoteliais, contribuindo ativamente para o desenvolvimento de processos de natureza angiogénica. Está demonstrado que estas duas linhas celulares quando expostas a fatores pró angiogénicos, como o VEGF, podem adquirir progressivamente um fenótipo endotelial, dando origem à formação de vasos sanguíneos, colaborando desta forma para a sua própria sobrevivência (3, 96).

Este aspeto deverá representar um papel bem mais importante do que à primeira vista se lhe atribui nos mecanismos de regeneração. Assim, as DPSCs e as SHEDs poderão constituir uma fonte única para regeneração dos tecidos dentários quer pelas suas características de autorrenovação, proliferação e diferenciação em células pulpares e odontogénicas, quer pelo facto de promovem, ao mesmo tempo, a formação de uma rede vascular capaz de suportar os próprios tecidos recém formados (3).

1.2. Células estaminais da papila apical (SCAPs)

Após a formação da coroa, e durante o processo de desenvolvimento da raiz, o remanescente do ectomesênquima constituinte da papila dentária, adquire uma localização apical em relação à polpa dentária. As características morfológicas e funcionais da papila apical e da junção polpa/papila apical não são habitualmente referidas nos livros de texto apresentando, no entanto, segundo Sonoyama *et al* (46) particularidades muito interessantes e de extrema importância, que só recentemente foram valorizadas.

A papila apical apresenta características físicas e morfofuncionais muito próprias. Esta estrutura (fig. 10), localizada para apical do diafragma epitelial, está fracamente unida ao ápice radicular em desenvolvimento sendo, por este motivo, facilmente destacável. Por outro lado, devido à sua localização anatômica e ao facto de estar rodeada por ligamento periodontal, parece beneficiar, entre outras razões, de uma circulação colateral, que lhe confere uma maior resistência aos processos infecciosos e inflamatórios locais (24).



Figura 10 - Aspeto macroscópico da localização topográfica e conformação morfológica das papilas apicais de um dente humano permanente imaturo pluriradicular. Imagem gentilmente cedida pelo Mestre Paulo Palma.

Recentemente, a papila apical tem assumido uma importância crescente enquanto fonte de células estaminais mesenquimatosas, com potencialidades imensas na formação e crescimento da polpa e dentina da raiz, bem como nos processos de reparação e regeneração do complexo pulpo-dentinário (8, 14, 46, 97).

Sonoyama *et al.* (46) fez uma análise histológica detalhada da papila apical diferenciando esta zona da restante região pulpar, tendo identificado, nesta área, a existência de uma população de células estaminais mesenquimatosas que designou por células estaminais da papila apical (SCAPs). Os processos de caracterização biológica e funcional destas células confirmaram tratar-se de células estaminais

pluripotenciais, tendo sido demonstrado o seu vasto potencial de diferenciação em condroblastos, osteoblastos e células adiposas, para além de odontoblastos (8, 17).

Do perfil imunológico das SCAPs destaca-se a positividade para o CD13, CD24, CD29, CD31, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD146, tendo marcação negativa para CD18, CD34, CD45 e CD150 (4, 20). De referir ainda que a expressão positiva relativamente ao CD24 não se verifica nas DPSCs nem nas MSCs (20). No entanto, à medida que se processa a sua diferenciação, a positividade para o CD24 vai sendo perdida, passando a observar-se, simultaneamente, um aumento da expressão de fosfatase alcalina, característica de um perfil odontoblástico (5).

As figuras 11 e 12¹ representam cortes histológicos de uma papila apical do dente 38, de um jovem com 16 anos, extraído por razões ortodônticas. Nestes cortes, foi possível observar a presença de células com uma intensa marcação imunocitoquímica para o CD31, antigénio de superfície associado a células estaminais.

As figuras 13 e 14¹ apresentam imagens da deteção imunocitoquímica do CD34, realizada em cortes histológicos da mesma papila apical, referida no parágrafo anterior. A positividade da reação imunocitoquímica é particularmente evidente nas células endoteliais e pericitos associados, o que pressupõe a afinidade destas células estaminais com as células endoteliais e perivasculares.

Em comparação com as DPSCs, as SCAPs têm um padrão similar de expressão de marcadores osteo/dentinogénicos (4, 8). Apresentam, no entanto, maior número de células positivas para o STRO-1, maior velocidade de proliferação (3 vezes superior), maior número de *populations doubling* e maior capacidade de regeneração dentinária *in vivo*. Além disso, mostram uma expressão superior de *survivin* (20), reconhecida como uma proteína anti-apoptótica (14).

¹ A preparação do material para observação em microscopia de luz, representado nas figuras 11, 12, 13 e 14, teve por base a realização de estudos imunocitoquímicos efetuados em cortes de parafina, segundo o protocolo seguido no serviço de Anatomia Patológica do Hospital da Universidade de Coimbra. Nesta técnica foi aplicado o método de peroxidase-anti-peroxidase, apenas com pequenos ajustes de pormenor. Depois de um processo de desparafinação e hidratação dos cortes procedeu-se a uma “digestão” O anticorpo primário *Monoclonal Mouse, anti-human CD31 e CD34* (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), foi utilizado com uma diluição de 1:50, durante 30 minutos, a 37°C. Posteriormente procedeu-se a uma incubação com o complexo peroxidase-anti-peroxidase. A peroxidase foi revelado com uma solução de 3,3'-diaminobezidina. Os controlos positivos e negativos da técnica imunocitoquímica foram feitos em simultâneo.

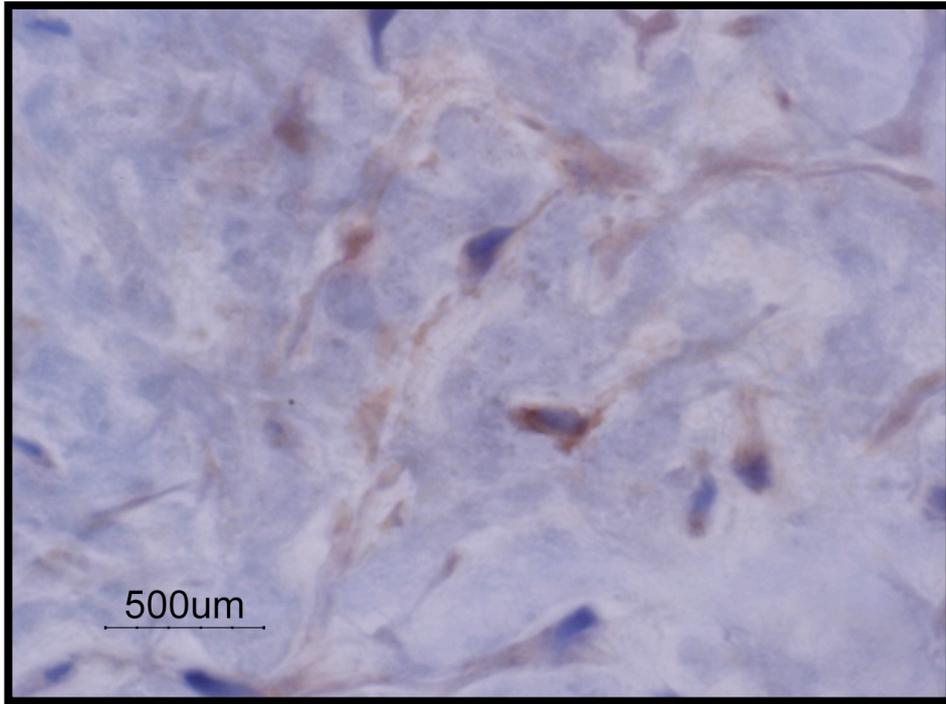


Figura 11 – Demonstração por imunocitoquímica (com anticorpos anti-CD31) da existência de células estaminais presentes na papila apical.

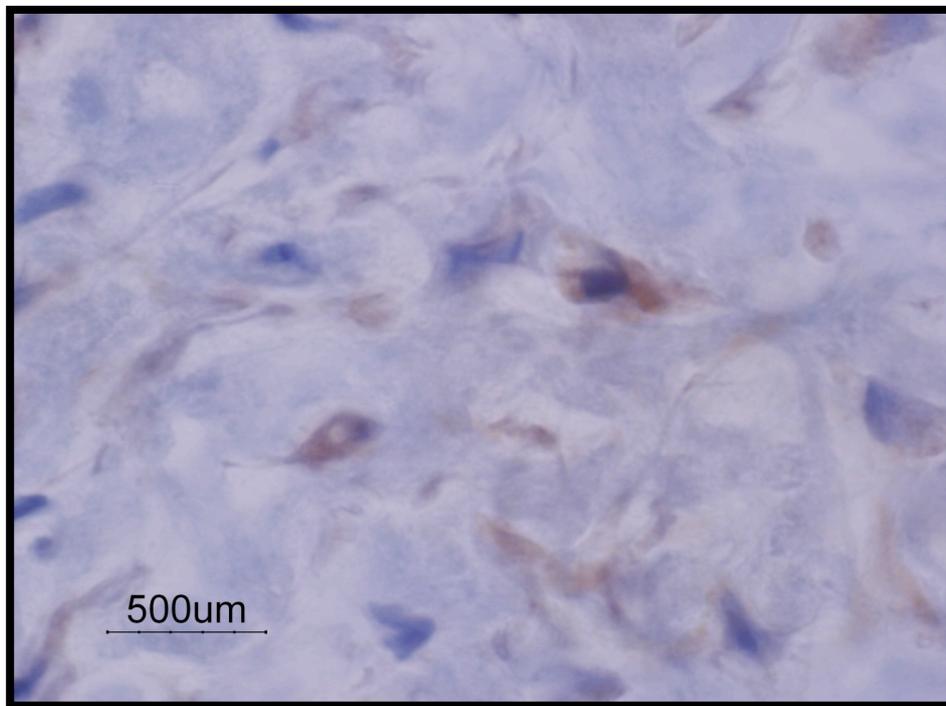


Figura 12 – Imagem de células estaminais marcadas por imunocitoquímica com anticorpos anti-CD31 presentes num corte histológico de uma papila apical.

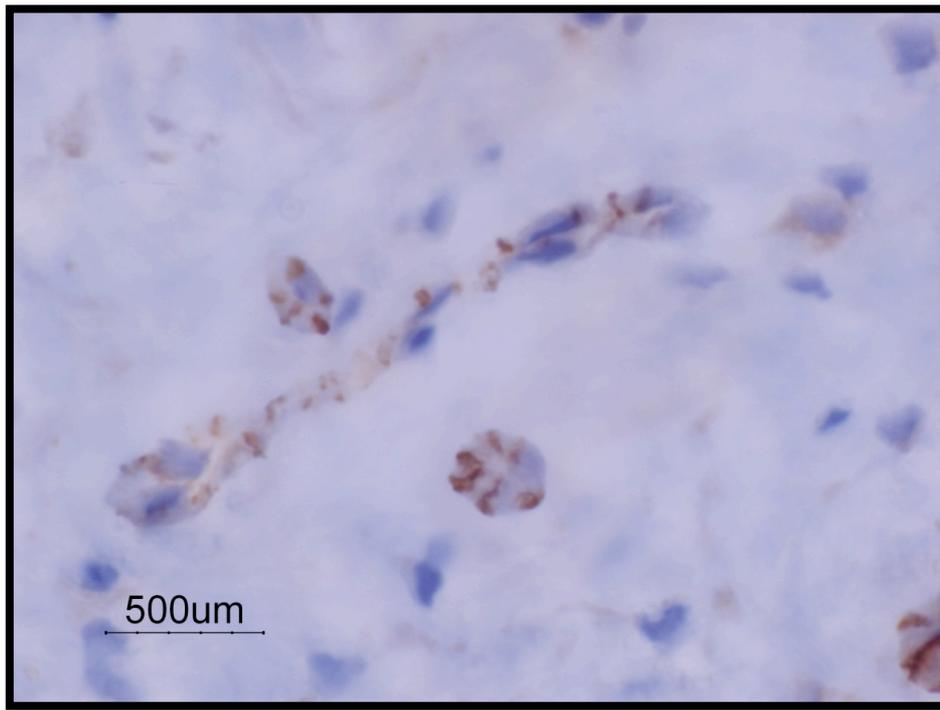


Figura 13 – Presença de uma reação imunocitoquímica positiva relativamente ao CD34 localizada em várias células endoteliais e pericitos.

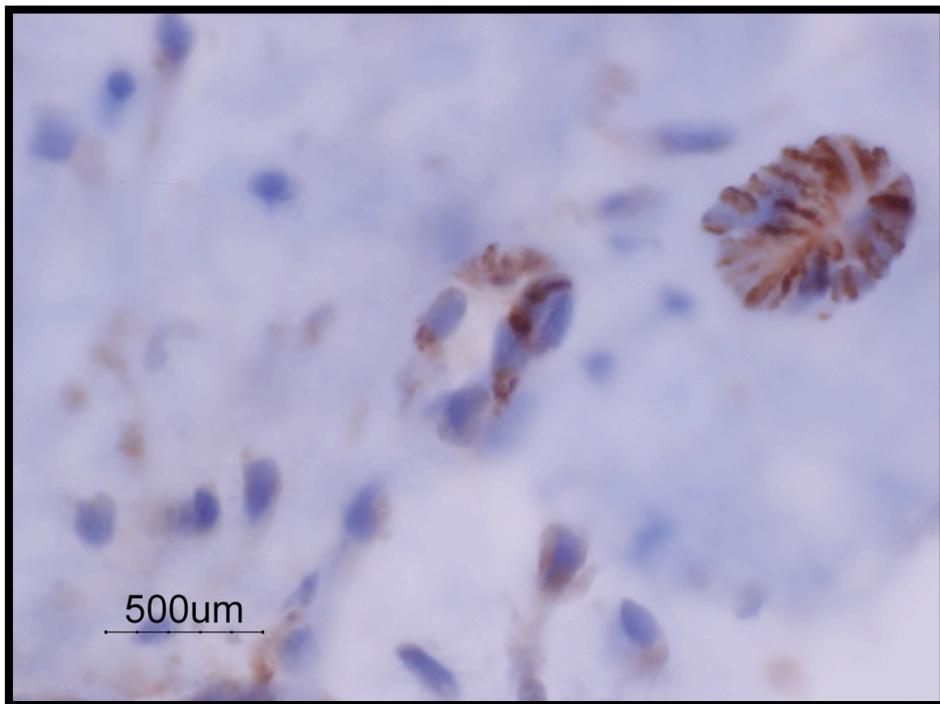


Figura 14 - Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior pondo em evidência a positividade das células endoteliais e dos pericitos.

Em relação às DPSCs e a outras MSCs, as SCAPs possuem grande atividade telomérica (característica das células embrionárias) sugerindo tratar-se de uma fonte de células estaminais muito imatura e, por isso, com grandes potencialidades (46, 47). De igual modo, apresentam uma menor expressão relativamente a marcadores celulares como DSP, MEPE, TGF- β RII, FGFR3, Flt-1 (receptor VEGF), FGFR1, e MUC 18, conjunto de marcadores associados a fases avançadas de diferenciação confirmando, mais uma vez, a sua relativa imaturidade (14).

As SCAPs apresentam, também, tal como as DPSCs, capacidade de gerar um complexo pulpo-dentinário. Com efeito, Huang *et al.* (47) publicaram um estudo que parece ter sido dos primeiros a levar a cabo um processo de regeneração pulpo-dentinário *in vivo*, com base na transplantação de células estaminais da polpa e da papila apical de dentes humanos, obtendo uma regeneração morfológica e funcional do complexo pulpo-dentinário bastante semelhante ao normal. Estes autores sublinham ainda que a presença da matriz dentinária é suficiente para induzir a migração e posterior diferenciação das células estaminais em células *odontoblast-like*, estendendo os seus prolongamentos para os túbulos dentinários. A matriz dentinária parece, pois, como já foi referido, exercer um papel primordial, devido ao armazenamento e libertação de proteínas específicas responsáveis pela diferenciação destas células.

Em síntese, as SCAPs parecem constituir a principal fonte de odontoblastos primários, responsável pelo desenvolvimento da dentina radicular, enquanto que as DPSCs parecem estar provavelmente mais envolvidas com a formação de dentina reparadora (5, 14, 24, 46, 50).

Uma nota mais, para referir que alguns estudos de investigação(14, 24) parecem indicar que as SCAPs deverão dar origem às DPSCs, acompanhando a transformação da papila em polpa. Porém outros autores como Sonoyama *et al* (46), sugerem que as SCAPs podem constituir uma população única de células estaminais pós-natais, distinta das DPSCs. Devido à sua atividade telomérica e grande capacidade de migração podem representar uma população de células indiferenciadas de alta qualidade, com particular relevância e potencialidades imensas na regeneração do complexo pulpo-dentinário e desenvolvimento da raiz. Huang *et al*, 2008 (14), chegam mesmo a afirmar que a papila apical representa um “*hidden treasure*” com enormes potencialidades e aplicações terapêuticas na área da medicina dentária.

1.3. Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) e do folículo dentário (DFSCs)

O ligamento periodontal contém uma população de células muito heterogénea, consideradas como células estaminais mesenquimatosas, capaz de se diferenciar em fibroblastos e em células formadoras de cemento e de matriz óssea (3). As células estaminais do ligamento periodontal têm, por sua vez, uma maior longevidade e maior capacidade de duplicação e proliferação do que as da medula óssea (43, 98, 99). As PDLSCs expressam marcadores de células estaminais mesenquimatosas como os CD10, CD13, C29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146, MUC18, CD166 e STRO-1 (3, 4). Para além destes, apresentam uma expressão positiva para marcadores específicos de tendão (3). Este facto, parece indicar que as PDLSCs constituem uma população de células estaminais pós-natais distintas das DPSCs ou de outras MSCs.

O potencial das PDLSCs para se diferenciarem em várias linhagens celulares, visando a formação de uma estrutura semelhante ao periodonto, ficou demonstrado pela capacidade de, quando em culturas, se diferenciarem em células com perfil de osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos (9). Com efeito, as PDLSCs parecem ser as células responsáveis pelos processos de regeneração do ligamento periodontal e demais estruturas do periodonto (100, 101). Estudos *in vivo* demonstraram a capacidade das fibras colagénicas, sintetizadas pelas PDLSCs, serem capazes de penetrar no cemento recém formado, mimetizando a inserção fisiológica das fibras de Sharpey (8, 47). De assinalar também o contributo das células mesenquimatosas indiferenciadas provenientes da medula óssea dada a frequência de locais de comunicação entre o ligamento periodontal e os espaços medulares existentes no osso alveolar adjacente. Assim podem ser consideradas, no ligamento periodontal, duas diferentes fontes de células indiferenciadas, umas localizadas nos nichos perivasculares, outras no estroma da medula óssea (45, 102).

É de referir, também, mas em estudos *in vitro* que a diferenciação das PDLSCs pode beneficiar da presença dos restos epiteliais de Malassez (5). Por outro lado, as PDLSCs mostraram também capacidade de diferenciação em células precursoras da linhagem neuronal (5).

Importa salientar ainda que, as PDLSCs, em relação às demais células estaminais dentárias, podem constituir uma população muito particular, expressando altos níveis de Scleraxis (fator de transcrição específico do tendão), que poderá

representar um marcador específico para estas células (8, 103). Este aspeto estará certamente relacionado com a grande capacidade de resistência mecânica das células do ligamento periodontal (103).

Finalmente convém realçar que, tal como em casos de pulpíte, foi já demonstrada a presença de células STRO-1, CD146 e CD44 positivas, nas porções médias e apicais do ligamento periodontal e cimento radicular de dentes afetados com periodontite. Estas células parecem responder facilmente a mudanças na matriz extracelular e à presença de citocinas inflamatórias. De facto, nas superfícies radiculares de dentes com periodontite é muito evidente um aumento do número de células estaminais no ligamento periodontal, refletindo a ativação deste grupo de células para a regeneração da área afetada (104). Com efeito, através de um processo de proliferação e diferenciação vão contribuir significativamente para a cicatrização destas lesões (43, 104).

O folículo ou saco dentário é constituído por uma condensação de ectomesênquima, que surge na fase de capuz, rodeando tanto o órgão do esmalte quanto a papila dentária, formando uma “cápsula” em torno do germen dentário em desenvolvimento, sendo responsável pela formação do periodonto de inserção (105).

O folículo dentário está ainda presente em dentes impactados, frequentemente extraídos e desperdiçados (7). No entanto, o folículo dentário pode constituir uma fonte de células estaminais (células estaminais do folículo dentário - DFSCs) facilmente acessível, que podem ser criopreservadas (106-108).

Dada a sua prematuridade em termos de desenvolvimento, as DFSCs parecem exibir uma maior plasticidade, quando comparadas com outras células estaminais dentárias (5). Com efeito, a caracterização destas células mostrou o seu grande potencial nos processos de regeneração dentária, com particular expressão nos tecidos periodontais e regeneração óssea. Estas células mostraram-se capazes de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos, adipócitos e alguns tipos de células neurais. Porém, as células do folículo dentário parecem estar maioritariamente comprometidas com a linha fibroblástica e cementoblástica (107).

As DFSCs expressam os marcadores de células estaminais mesenquimatosas como os CD10, CD13, CD29, CD44, CD53, CD59, CD73, CD90, CD105, sendo negativas para CD34, CD45 e HLA-DR (Lozano 2011). É de salientar ainda que estas células apresentam *in vivo* características e comportamentos semelhantes às PDLSC (107, 109).

Uma nota final para referir que, apesar de *à priori* a transplantação de células estaminais poder constituir um dos principais recursos utilizados nos mecanismos de regeneração, este procedimento encontra, no entanto, na prática clínica grandes barreiras e limitações (110, 111). Para além de representarem técnicas muito complexas e onerosas, as dificuldades na colheita, isolamento, cultura, manipulação e amplificação das células estaminais são exemplos adicionais das inúmeras complexidades a ultrapassar (111).

De facto, verifica-se a existência de um grande número de problemas associados às terapias de células estaminais que incluem entre outras e segundo Bhartt e Le e Zivkovic (112): a) dificuldade na obtenção de número suficiente de células estaminais sem causar grande morbilidade no local de colheita, b) as células transplantadas têm uma grande tendência para migrarem resultando, no final do processo, na presença de um pequeno número de células do dador no local de transplantação, c) uma vez que as células estaminais após colheita são normalmente sujeitas a uma expansão *ex vivo* podem não conseguir manter *in vivo*, a viabilidade e capacidade de diferenciação necessárias ao sucesso do processo regenerativo e d) não existe ainda conhecimento suficiente sobre a estabilidade cromossómica e atividade neoplásica e metastática das células estaminais dentárias.

Apesar das limitações acima referidas a introdução na prática clínica de uma terapêutica baseada em células estaminais, com particular enfoque para as células dentárias vai certamente representar, no futuro, uma ferramenta importante nos mecanismos regenerativos (112). Ainda que o seu maior campo de aplicação esteja relacionado logicamente com a Medicina Dentária, as células estaminais dentárias podem apresentar uma contribuição fundamental em diversas doenças sistémicas, com particular relevância nos mecanismos de regeneração óssea, situações de fibrose hepática e mesmo em casos de enfarte de miocárdio. Uma referência especial para o facto das células de origem dentária apresentarem ainda um forte potencial neurogénico e terem, por este motivo, grandes capacidades terapêuticas nas doenças neurodegenerativas.

Em síntese, pode afirmar-se que a grande expansão de estudos de investigação experimental permitiu demonstrar que as DPSCs, SHEDs, SCAPs, PDLSC e DFSCs apresentam enormes capacidades de diferenciação específicas de células estaminais de natureza mesenquimatosas e de natureza neuronal, o que aliada à sua fácil acessibilidade e preservação confere a estas células um grande espectro de possíveis aplicações, com particular enfoque na reconstrução e regeneração de estruturas dentárias.

Parte III

1. Considerações Finais

Dentro do espectro das células estaminais pós-natais, as células estaminais dentárias como DPSCs, SHEDs, SCAPs, PDLSC e DFSCs apresentam enormes capacidades de diferenciação específicas de células estaminais de natureza mesenquimatosas e de natureza neuronal, o que aliada à sua fácil acessibilidade e preservação confere a estas células um grande espectro de possíveis aplicações, com particular enfoque na reconstrução e regeneração de estruturas dentárias.

Em jeito de conclusão, o diagrama 1 , pretende apresentar uma pequena sinopse da caracterização imunofenotípica das células estaminais de origem dentária com base nos seus marcadores de diferenciação.

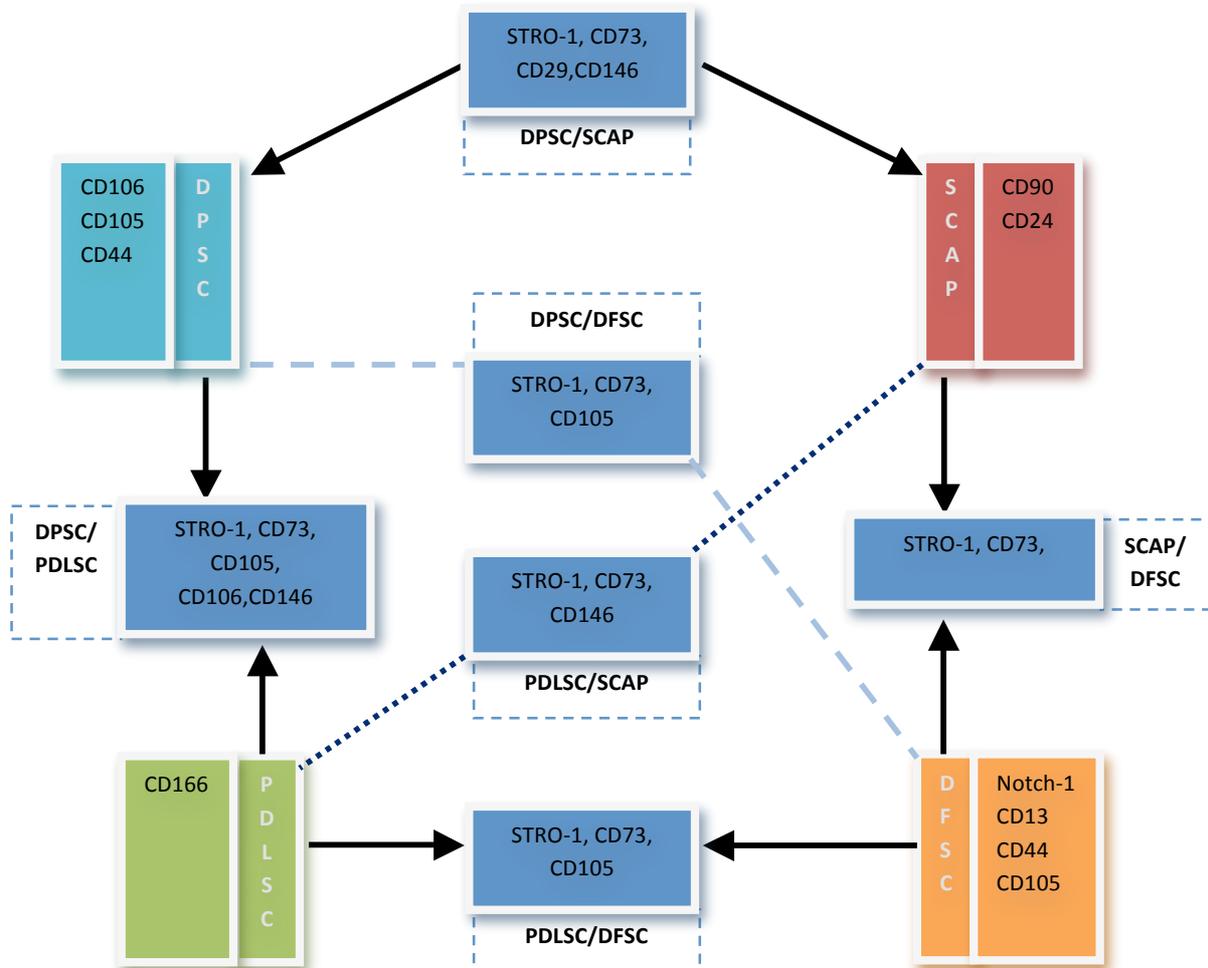


Diagrama 1 - Marcadores utilizados para a marcação imunofenotípica das células estaminais dentárias (Adaptado de Morsczeck *et al.* 2008 (7)).

De igual modo, a tabela 1, pretende resumir algumas das capacidades de diferenciação das várias células estaminais dentárias de origem humana.

Tabela I – Resumo de algumas das capacidades de diferenciação das várias células estaminais dentárias de origem humana observadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (Adaptado de Huang, 2009 e Ulmer 2010)

| Tipo Celular | Análise <i>In vitro</i> | | Análise <i>In vivo</i> |
|--------------|-------------------------|---|---|
| | PD | Capacidade de diferenciação | Formação ectópica de tecidos |
| DPSCs | 60 > 120 | Osteo/dentinogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica Endoteliócitos | Complexo pulpo-dentinário Células odontoblastos-like Tecido ósseo |
| SHEDs | >140 | Dentinogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica Osteogénica Endoteliócitos | Tecido pulpo-dentinário-like Células Odontoblastos-like Não forma complexo pulpo-dentinário Tecido ósseo |
| SCAPs | >70 | Dentinogénica Osteogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica | Complexo pulpo-dentinário Células odontoblastos-like |

| | Análise <i>In vitro</i> | | Análise <i>In vivo</i> |
|---------------------|--------------------------------|--|--|
| Tipo Celular | PD | Capacidade de diferenciação | Formação ectópica de tecidos |
| PDLSCs | ND | Osteo/cementogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica | Formação de estrutura semelhante a Cimento e LP |
| DFSCs | ND | Cementogénica Odontogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica | Formação de uma matriz de cimento Formação de uma estrutura semelhante ao LP |
| BMMSCs | 30 >50 | Odontogénica Osteogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica | Formação de tecido ósseo e medula óssea, cartilagem, músculo e células neuronais com localização ectópica e ortotópica |

2. Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, um muito obrigado por toda a orientação, força e paciência ao longo deste meu percurso. Foi graças ao vosso apoio incondicional que, mesmo em momentos menos bons, eu soube que este era o meu rumo.

À Professora e amiga Maria Helena Figueiredo, por todo o carinho, dedicação, empenho, força de vontade e paciência que disponibilizou para me ensinar, ao longo destes 5 anos, demonstrando-me o quão valiosa é a simplicidade e o valor do trabalho. Hei-de sempre reconhecer-lhe a sua enorme capacidade de trabalho e de ensino porque poucos são os que o fazem como a professora. Fez de mim, e de todos os seus alunos, pessoas mais curiosas e humildes.

Ao Mestre Paulo Palma, por todos os ensinamentos, disponibilidade incondicional, amizade, compreensão e motivação ao longo destes anos para comigo. Foi, sem dúvida, um grande mestre e orientador no meu percurso académico.

A todos os docentes da Área de Medicina Dentária, que durante estes 5 anos me transmitiram os seus conhecimentos e técnica, incutindo-me a vontade de ser sempre melhor, tornando-me no aluno e profissional que sou hoje.

A todo o corpo não docente desta casa que me acompanhou de forma digna neste percurso.

A todos os meus amigos, vocês foram o meu pilar, e o percurso não teria o mesmo valor se não fosse partilhado convosco.

3. Bibliografia

1. Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem Cells and Regeneration of the Pulpodentin Complex. Seltzer and Bender's Dental Pulp, Second Edition. 2012:91-108.
2. Simon SRJ, Berdal a, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith aJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Advances in dental research*. 2011;23:340-5.
3. Casagrande L, Cordeiro MM, Nor SA, Nor JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011;99(1):1-7. Epub 2011/01/29.
4. Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*. 2011;44(9):800-6. Epub 2011/04/12.
5. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dental clinics of North America*. 2012;56:549-61.
6. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat*. 2002;200(Pt 3):277-82. Epub 2002/05/30.
7. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008;12(2):113-8. Epub 2008/01/04.
8. Bhatt A, Le Anh D. Craniofacial tissue regeneration: where are we? *J Calif Dent Assoc*. 200;37(11):799-803. Epub 2009/12/17.
9. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010;20(12):715-22. Epub 2010/11/03.
10. Sloan AJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2009;1 (1):61-70.
11. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621. Epub 1961/12/01.
12. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*. 2007;96:1020-4.
13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, al. e. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. ed. Science G, editor. New York 2002.
14. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008;34(6):645-51. Epub 2008/05/24.
15. Ju Z, Lenhard Rudolph K. Telomere dysfunction and stem cell ageing. *Biochimie*. 2008;90(1):24-32. Epub 2007/11/22.
16. Goldberg M. Pulp healing and regeneration: more questions than answers. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):270-4. Epub 2011/06/17.
17. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nor JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. 2011;22(1):3-13. Epub 2011/04/27.

18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
19. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134(5):877-86. Epub 2008/08/12.
20. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med*. 2009;4(5):697-707. Epub 2009/09/19.
21. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garcia-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int*. 2012;2012:103503. Epub 2012/10/25.
22. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):137-47. Epub 2008/07/08.
23. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):469-80. Epub 2009/10/03.
24. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells. *Journal of Endodontics*. 2010;36(5):781-9.
25. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):275-9. Epub 2011/06/17.
26. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012;7(6):e39885. Epub 2012/07/07.
27. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;16:1-9. Epub 2008/08/02.
28. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
29. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. Epub 2005/10/21.
30. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(1):61-70. Epub 2009/01/06.
31. Suomalainen M, Thesleff I. Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/beta-catenin signaling in the epithelial stem cells. *Dev Dyn*. 2010;239(1):364-72. Epub 2009/10/07.
32. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen*. 2001;9(6):429-42. Epub 2002/03/19.
33. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):161-71. Epub 2010/05/28.
34. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30. Epub 2000/11/23.
35. Saber SE-DM. Tissue engineering in endodontics. *Journal of oral science*. 2009;51:495-507.

36. About I. Dentin regeneration in vitro: the pivotal role of supportive cells. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):320-4. Epub 2011/06/17.
37. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.* *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204. Epub 2007/02/24.
38. Tyagi P, Dhindsa MK. Tissue engineering and its implications in dentistry. *Indian J Dent Res.* 2009;20(2):222-6. Epub 2009/06/26.
39. Soares AP, Knop LA, Jesus A, Araujo T. Células-tronco em Odontologia. *R Dental Press Ortodon Facial* 2007;V.12(1):p. 33-44.
40. Bashashati A, Brinkman RR. A survey of flow cytometry data analysis methods. *Adv Bioinformatics.* 2009:584603. Epub 2010/01/06.
41. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol.* 2010;11:32. Epub 2010/05/13.
42. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12. Epub 2003/04/30.
43. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55. Epub 2004/07/13.
44. Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155-65. Epub 2005/05/14.
45. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1:e79. Epub 2006/12/22.
46. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71. Epub 2008/01/25.
47. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research.* 2009;88(9):792-806. Epub 2009/09/22.
48. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod.* 2013;39(3):357-63. Epub 2013/02/14.
49. Smith AJ, Patel M, Graham A, Sloan AJ, Cooper PR. Dentine Regeneration : Key Roles for Stem Cells and Molecular Signalling. *Oral Biosci Med* 2005;2(2/3):127-32.
50. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J.* 2009;42(11):955-62. Epub 2009/10/15.
51. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696-704. Epub 2003/04/04.
52. Zheng Y, Wang XY, Wang YM, Liu XY, Zhang CM, Hou BX, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res.* 2012;91(7):676-82. Epub 2012/06/05.

53. Ritchie KE, Nor JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2012. Epub 2012/07/31.
54. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011;37(2):133-8. Epub 2011/01/18.
55. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, Huang YH, Jeng JH, Kuo TF, et al. Magnetic Cryopreservation for Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs.* 2012. Epub 2012/01/31.
56. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-6. Epub 2008/02/27.
57. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087. Epub 2010/05/11.
58. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-90. Epub 2007/03/21.
59. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003;82(12):976-81. Epub 2003/11/25.
60. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5. Epub 2002/07/31.
61. Casagrande L, Mattuella LG, de Araujo FB, Eduardo J. Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;31(1):25-7. Epub 2006/11/10.
62. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13(2):151-7. Epub 2007/02/20.
63. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *Journal of endodontics.* 2007;33:703-8.
64. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):571-4. Epub 2008/03/12.
65. Prescott RS, Alsanee R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod.* 2008;34(4):421-6. Epub 2008/03/25.
66. d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009;312B(5):408-15. Epub 2008/12/10.
67. Nedel F, Andre Dde A, de Oliveira IO, Cordeiro MM, Casagrande L, Tarquinio SB, et al. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2009;10(4):90-6. Epub 2009/07/04.
68. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):435-40. Epub 2009/11/10.
69. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(3):501-6. Epub 2009/02/24.

70. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010;36(8):1336-40. Epub 2010/07/22.
71. Sharma S, Sikri V, Sharma NK, Vivek M. Regeneration of tooth pulp and dentin : trends and advances Introduction Structure of Pulpodentinal. *Annals of Neurosciences* 2010;17:1-36.
72. Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:107-21. Epub 2011/03/25.
73. Lei G, Yan M, Wang Z, Yu Y, Tang C, Wang Z, et al. Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell.* 2011;103(4):185-96. Epub 2011/02/18.
74. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(7):e997-1004. Epub 2011/07/12.
75. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, et al. 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;122(1):80-90. Epub 2011/12/03.
76. Rosa V, Botero TM, Nor JE. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. *Int Dent J.* 2011;61 Suppl 1:23-8. Epub 2011/11/01.
77. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012. Epub 2012/09/18.
78. Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:788-800. Epub 2011/01/05.
79. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(2):605-15. Epub 2009/09/10.
80. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29(6):532-9. Epub 2001/12/01.
81. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 2005;80(6):836-42. Epub 2005/10/08.
82. Sun HH, Jin T, Yu Q, Chen FM. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010. Epub 2011/01/05.
83. D'souza R, Qin CL. Development of the Pulpodentin Complex. *Seltzer and Bender's Dental Pulp, Second Edition.* 2012:1-25.
84. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry.* 2010;38(9):687-97. Epub 2010/06/29.
85. Deepak BS, Nandini DB. Stem cells: Challenges in endodontics. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(1):84. Epub 2012/03/01.

86. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010;5(4):617-31. Epub 2010/05/15.
87. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Pocas-Fonseca MJ, et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J.* 2012;45(12):1080-90. Epub 2012/07/04.
88. Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F. Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol Int.* 2004;28(2):93-9. Epub 2004/02/27.
89. Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem.* 2006;281(39):29002-10. Epub 2006/07/13.
90. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;33(4):289-94. Epub 2009/09/04.
91. Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. *Stem Cell Rev.* 2011;7(3):608-15. Epub 2011/02/15.
92. Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009;27(9):2229-37. Epub 2009/06/23.
93. Kiran S, Bargale S, Srinivasan I. Paving The Way For Future Solutions Through Human Exfoliated Deciduous Teeth (Shed). *The Internet Journal of Genomics and Proteomics [Internet].* 2011; 6 (1).
94. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4):105-16. Epub 2007/04/06.
95. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Sbl S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics.* 2008;34(8):962-9.
96. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MAAM, Shi S, et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *Journal of Dental Research.* 2010;89(8):791-6.
97. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, et al. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res.* 2012;8(3):346-56. Epub 2012/01/31.
98. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res.* 2005;84(10):907-12. Epub 2005/09/27.
99. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006;41(4):303-10. Epub 2006/07/11.
100. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(3):149-60. Epub 2007/07/27.

101. Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:244-53; discussion 54-6, 381-2. Epub 2006/05/06.
102. Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cate's - Oral Histology - Development, Structure, and Function In: Nanci A, editor. 8th ed 2012.
103. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(3):191-9. Epub 2005/07/19.
104. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2006;41(6):547-53. Epub 2006/11/02.
105. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Desenvolvimento da raiz e do ligamento periodontal. In: Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ, editors. *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal.* 3ª ed ed. São Paulo 2004. p. 335-69.
106. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):406-8. Epub 2002/12/20.
107. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci.* 2010;52(4):541-52. Epub 2011/01/06.
108. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 2007;327(2):301-11. Epub 2006/10/03.
109. Morsczeck C, Vollner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2010;14(4):433-40. Epub 2009/07/11.
110. Zhu X, Zhang C, Huang GTJ, Cheung GSP, Dissanayaka WL, Zhu W. Transplantation of Dental Pulp Stem Cells and Platelet-rich Plasma for Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics.* 2012;38(12):1604-9.
111. Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, et al. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dental clinics of North America.* 2012;56:639-49.
112. Zivkovic P, Petrovic V, Najman S, Stefanovic V. Stem cell-based dental tissue engineering. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:901-16. Epub 2010/05/25.