



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



CÍNTIA DE VASCONCELLOS MACHADO

**IMUNOLocalização de Marcadores de Células-
Tronco na Polpa de Dentes Permanentes
Humanos**

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR - BA

2013

CÍNTIA DE VASCONCELLOS MACHADO

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-
TRONCO NA POLPA DE DENTES PERMANENTES
HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Ivana Lucia Oliveira Nascimento
Coorientador: Profa. Dra. Paloma Dias da Silva Telles

SALVADOR - BA

2013

Dedico este trabalho à pessoa mais doce, compreensiva e generosa que já conheci, que me apoiou incondicionalmente desde que “aportei” nesta terra abençoada, há oito anos...a minha vizinha **Eva**! Te amo, desde sempre e pra sempre.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela bênção da vida, por todo amor.

À irmã que a vida me deu, **Jaqueline**...amiga de todas as horas, boas e nem tanto, por toda paciência, amor, amizade e apoio incondicional. Obrigada por estar sempre ao meu lado nesta grande caminhada. De todo coração eu te agradeço e afirmo...essa vitória também é tua.

À minha querida amiga e coorientadora **Paloma Dias Telles**, meu exemplo e minha inspiração. Obrigada pela amizade verdadeira e apoio incondicional. Tu bem sabes o quanto foi difícil chegar até aqui...sem a tua amizade, carinho e apoio, nada disso teria sido possível...muito obrigada!

À minha orientadora **Ivana Lúcia Oliveira Nascimento**, por ter me recebido no Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGI) e aceitado me orientar. Obrigada pela confiança depositada, pelo apoio, incentivo e carinho.

À minha eterna professora, **Maria Celina Siquara da Rocha**...não tenho palavras pra agradecer tudo o que tu fizeste e fazes por mim. Me recebeste de braços abertos na disciplina de Odontopediatria da UFBA há alguns anos atrás sem nem mesmo me conhecer....e, a partir daquele momento, surgiu uma grande amizade, admiração, carinho e respeito...és um exemplo de professora e profissional...de integridade, honestidade e dedicação...muito obrigada!

Aos meus pais, amigos e colegas de profissão **Telma** e **Sérgio**, obrigada por acreditarem em mim e nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos. Vocês foram fundamentais para que eu galgasse mais esse degrau. Com todo meu amor, obrigada! **Pai**, tu tens toda minha admiração e respeito, por “matares um leão a cada dia” e continuares a exercer essa linda profissão que escolhemos. Tu continuas sendo o meu “herói”.

Ao meu irmão querido e colega **Cristiano**, minha “irmã” **Aline** e meu “pacotinho” **Martín**...sei que mesmo de longe torceram e vibraram muito por mim. Obrigada por todo amor, pelo carinho e incentivo, traduzidos em longos telefonemas entre Salvador e Porto Alegre...

Ao meu querido irmão **Cássio** e minha “irmãzinha” **Karine**, obrigada pelo amor, apoio, carinho e por todas as risadas. Vocês tornam a minha vida mais leve e divertida!

À minha vizinha **Maria Helena**...muito obrigada pelas palavras de carinho e incentivo...assim como pelos pasteizinhos e rapadurinhas de leite, preparados sempre com muito amor para me receber em Porto Alegre.

Ao **Walter Lomanto**...obrigada por todo amor, carinho, apoio e torcida para que tudo desse certo! Obrigada também por compreender a minha ausência em muitos momentos. Que bom que tu “apareceste” na minha vida, me fazes muito feliz.

À querida **Lisiane Bernardi**, pela amizade, pela ajuda com os experimentos, pelos momentos divertidos (e outros nem tanto) que passamos juntas no laboratório e fora dele também. Muito obrigada!

À **Sílvia Oliveira** e ao **Walker Nonato**...nunca vou esquecer das risadas, dos passeios no shopping, da amizade e do companheirismo durante esse tempo. Vocês moram no meu coração pra sempre.

Ao professor **Jacques Eduardo Nör**...obrigada por me receber tão bem no seu laboratório, por ser um exemplo de honestidade e competência, tão comprometido com a ciência e a pesquisa.

À professora **Sara Passos** e ao professor **Lucas Carvalho**...muito obrigada pelo carinho com que fui acolhida no laboratório, pela atenção e pelos valiosos ensinamentos passados. Serei sempre muito grata a vocês!

À querida amiga **Val**, por toda torcida, vibrações e carinho. A tua ajuda foi essencial para que eu me mantivesse confiante e calma nos momentos mais difíceis deste curso. Com todo meu carinho eu te agradeço!

À amiga, colega e professora **Deise Vilas Boas**, muito obrigada pela ajuda, disposição, amizade e conhecimentos compartilhados. Foi muito bom te conhecer!

Aos meus queridos colegas, amigos e professores da Pós-Graduação...muito obrigada.

A todos os estudantes e pesquisadores do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Edgar Santos (SIM - HUPES) e do Laboratório de Angiogênese, Faculdade de Odontologia, Universidade de Michigan.

À **Dilcea Oliveira** e **Sônia Costa de Sant’Anna**, secretárias do PPGIm, muito obrigada por toda ajuda, disposição e atenção.

A todos os colegas e amigos do **SESC**...em especial à **Aline Bonfim**, sempre divertida, competente e bem-humorada e à Coordenadora de Odontologia **Dra. Maria Vanda Albuquerque**, pela compreensão e apoio durante a realização deste curso, principalmente durante período no qual fiquei afastada das minhas atividades como Odontopediatra.

À **Fapesb**, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste curso.

Aos **amigos de Luz**, muito obrigada!

“Bem lá na frente é que poderemos avaliar do que exatamente foi feita nossa vida, se de amor ou de rancor, se de alegrias ou tristezas, se de vitórias ou derrotas, se de ilusões ou realidade. Pensem sempre que hoje é só o começo de tudo, que, se houver algo errado, ainda está em tempo de ser mudado e que o resto de nossas vidas, de certa forma, ainda está em nossas mãos.”

Autor desconhecido

RESUMO

O objetivo deste estudo foi detectar, através da imunohistoquímica, células positivas para os marcadores STRO-1 e CD90, os quais são usualmente utilizados para caracterizar células-tronco mesenquimais (MSCs), assim como para a ALDH (aldeído desidrogenase), enzima que tem sido empregada na identificação de células-tronco hematopoiéticas e também tumorais, na polpa de dentes permanentes jovens. Da mesma forma, foi avaliada a expressão dos marcadores ALDH, STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos (SHEDs), permanentes (DPSCs) e fibroblastos da polpa (HDPFs), através da citometria de fluxo e *western blot*. Para a análise imunohistoquímica, a polpa dental de nove terceiros molares e pré-molares hígidos foi coletada, fixada e processada. SHEDs, DPSCs e HDPFs foram cultivadas em meio DMEM/HEPES, suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A reação imunohistoquímica mostrou células imunomarcadas com ALDH, CD90 e STRO-1 essencialmente nos espaços perivasculares e nas fibras nervosas da polpa, embora o STRO-1 tenha apresentado uma expressão menos pronunciada. Foi demonstrada uma forte marcação para a ALDH e para o STRO-1 através do *western blot* em SHEDs, DPSCs e HDPFs, enquanto que as células apresentaram uma fraca expressão para o CD44. Não foram observadas diferenças na intensidade das bandas entre os três tipos de células para os marcadores testados. Já na análise de citometria de fluxo, todas as células apresentaram valores percentuais altos para o CD44 e relativamente baixos para o STRO-1 e para a ALDH. Os resultados sugerem que as células-tronco pulpares residem nas proximidades dos vasos sanguíneos e das fibras nervosas deste tecido, visto que células positivas para marcadores associados às mesmas foram detectadas nestas áreas. Da mesma forma, apontam para a possibilidade de existência de mais de um nicho de MSCs na polpa dentária. Ainda, sugerem que SHEDs, DPSCs e fibroblastos podem compartilhar algumas características importantes, como a expressão de determinados marcadores.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, polpa dentária, nicho, aldeído desidrogenase.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect, by immunohistochemistry, cells expressing STRO-1 and CD90, which are markers usually employed to characterize mesenchymal stem cells, as well as ALDH (aldehyde dehydrogenase), an enzyme that has been used to identify hematopoietic and cancer stem cells, in the dental pulp of permanent young teeth. Likewise, we evaluated the expression of ALDH, STRO-1 and CD44 in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs), dental pulp stem cells (DPSCs) and human dental pulp fibroblasts (HDPFs) through flow cytometry and western blot. For immunohistochemical analysis, the pulp tissue of nine third molars and pre-molars were collected, fixed and processed. Likewise, SHEDs, DPSCs and HDPFs were cultured in DMEM/HEPES, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin, in a humidified incubator with 5% CO₂, at 37°C. ALDH, CD90 and STRO-1 positive cells were detected in the perivascular areas and nerve fibers of the dental pulp by immunohistochemistry, although the STRO-1 positive cells have demonstrated a less pronounced expression. The western blot test showed that SHEDs, DPSCs and HDPFs strongly expressed ALDH and STRO-1, whereas a weak expression was observed for CD44. No differences were observed in the intensity of the bands among the three types of cells for the markers tested. In the flow cytometry analysis, all the cell types showed high percentage values for CD44, while moderate to low labeling was observed for STRO -1 and ALDH. These results suggest that pulp stem cells reside in the vicinity of blood vessels and nerve fibers, as well as indicate the possible existence of more than one stem cell niche in the dental pulp. In addition, we can infer that SHEDs, DPSCs and fibroblasts may share some important characteristics, such as the expression of certain markers.

Keywords: menchymal stem cells, dental pulp, niche, aldehyde dehydrogenase.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Surface antigens expressed by MSCs from various origins.....39

Artigo 4

Tabela 1. Representação dos valores percentuais da Mediana (Percentil 25 e 75) obtidos através da análise por citometria de fluxo de SHEDs, DPSCs e HDPFs, para os marcadores STRO-1, CD44 e ALDH.....92

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Corte histológico da polpa dental.....20

Artigo 1

Figure 1. Schematic representation of self-renewal and multi-differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. ASC indicates adult stem cell; HSC, hematopoietic stem cell; MSC, mesenchymal stem cell.....38

Artigo 3

Figura 1. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Padrão morfológico apresentando fibras nervosas, vasos sanguíneos e elevada celularidade - HE (A, B, C, D).....74

Figura 2. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do ALDH em células ao redor dos vasos sanguíneos (A, B, C, D) e em fibras nervosas (E e F).....75

Figura 3. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do CD90 em células ao redor dos vasos sanguíneos e em fibras nervosas (A, B, C, D).76

Figura 4. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do STRO-1 na parede de vasos sanguíneos e em fibras nervosas próximas (A e B).....77

Artigo 4

Figura 1. SHEDs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). SHEDs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.....93

Figura 2. DPSCs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). DPSCs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.....94

Figura 3. HDPFs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). HDPFs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.....95

Figura 4. Expressão das proteínas STRO-1, ALDH, CD44 e CD90 em SHEDs, DPSCs, HDPFs e no tecido pulpar como um todo. TP1 - tecido pulpar 1; TP2 - tecido pulpar 2.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3G5	antígeno associado aos pericitos
ALDH	aldeído desidrogenase
APC	célula apresentadora de antígeno
APC	aloficocianina (fluorocromo)
ASC	células-tronco adultas
BAA	BODIPY [®] - aminoacetaldeído
BMMSC	células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
BMP	proteína óssea morfogenética
CD	grupamento de diferenciação
CFU-Fs	unidades formadoras de colônias de fibroblastos
CTL	linfócito T citotóxico
DAB	3-3' diaminobenzidina
DC	célula dendrítica
DEAB	dietilaminobenzaldeído
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DPSC	células-tronco humanas de polpa dental
DSPP	sialofosfoproteína de dentina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESC	células-tronco embrionárias
FGF-2	fator de crescimento de fibroblastos 2
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GvHD	doença do enxerto- <i>versus</i> -hospedeiro
HDPF	fibroblastos de polpa dental humana
HE	hematoxilina e eosina
HEPES	n-2 hidroxietil piperazine- n'- 2 ácido sulfônico etano
HGF	fator de crescimento hematopoiético
HLA-ABC	antígeno leucocitário humano ABC (classe I)
HLA-DR	antígeno leucocitário humano DR (classe II)
HLA-G5	molécula não clássica do antígeno leucocitário humano classe I
HRP	horseradish peroxidase
HSC	células-tronco hematopoiéticas
IDO	indoleamina 2,3-dioxygenase

IFN- γ	interferon gama
IgA	imunoglobulina A
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL-1 α	interleucina 1 alfa
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
iPS	células-tronco pluripotentes induzidas
ISCT	sociedade internacional de terapia celular
MHC	complexo principal e histocompatibilidade
MLC	cultura mista de linfócitos
MSC	células-tronco mesenquimais
NK	célula natural killer
NKp30	receptor p30 de célula natural killer
NKp44	receptor p44 de célula natural killer
NO	óxido nítrico
NOD	não-obeso diabético (camundongo)
NP 40	nonil fenoxi polietoxietanol
NSC	células-tronco neurais
OI	osteogênese imperfeita
PE	ficoeritrina
PGE ₂	prostaglantina 2
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SHED	célula-tronco humana de polpa de dente decíduo
SSEA-1	antígeno específico do estágio embrionário 1
SSEA-4	antígeno específico do estágio embrionário 4
TBST	solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20
TCD4 ⁺	linfócito T CD4

TCD8 ⁺	linfócito T CD8
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
Th1	linfócito T auxiliar 1
Th2	linfócito T auxiliar 2
Th17	linfócito T auxiliar 17
TNF	fator de necrose tumoral
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 POLPA DENTAL.....	18
2.2 CÉLULAS-TRONCO.....	20
2.3 MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	22
2.3.1 ALDH.....	24
2.3.2 STRO-1.....	26
2.3.3 CD90.....	27
2.3.4 CD44.....	28
2.4 CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM PULPAR.....	28
2.5 CÉLULAS-TRONCO E SUA UTILIZAÇÃO NA ODONTOLOGIA.....	30
2.6 AS CÉLULAS-TRONCO E O NICHOS.....	33
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	35
ARTIGO 1 - Stem cells and their niches: importance in tissue engineering applied to dentistry.....	36
ARTIGO 2 - Immunologic characteristics of mesenchymal stem cells.....	48
ARTIGO 3 - Imunolocalização de células positivas para STRO-1, CD90 e ALDH na polpa de dentes permanentes humanos.....	62
ARTIGO 4 - Expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes.....	78
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
5 PERSPECTIVAS FUTURAS	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	114

1 INTRODUÇÃO GERAL

A descoberta das células-tronco, assim como os recentes avanços no campo da biologia celular e molecular, tem levado ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam a regeneração de órgãos e tecidos injuriados por doenças ou traumas (BIANCO et al., 2008; ESTRELA et al., 2011). A engenharia de tecidos é a ciência que aplica os princípios da biologia e da engenharia para o desenvolvimento de tecidos funcionais, associando a escolha de células apropriadas, matrizes biodegradáveis e biocompatíveis, assim como agentes envolvidos no processo de formação dos órgãos, tais como genes e fatores de crescimento. Nos últimos anos, tanto a medicina quanto a odontologia vêm explorando o potencial de aplicação de células-tronco de diferentes origens e a engenharia de tecidos para o reparo de tecidos danificados por doenças como câncer, diabetes, problemas cardiovasculares, distúrbios neurológicos, doenças autoimunes, cárie dentária, doença periodontal, assim como tecidos ausentes devido a problemas congênitos (LANGER & VACANTI, 1993; NAKASHIMA, 2005b; CASAGRANDE et al., 2011; LODI et al., 2011).

As células-tronco são consideradas um grupo especial de células, as quais podem ser encontradas em quase todos os tecidos nos organismos multicelulares, durante praticamente todo tempo de vida dos mesmos. As suas principais funções são promover o desenvolvimento dos diferentes tecidos nos quais se encontram, assim como no caso de injúrias, proporcionar a sua reparação (SUCHÁNEK et al., 2007). Para ser considerada uma célula-tronco, a mesma deve ter a capacidade de se autorrenovar bem como de se diferenciar em tipos celulares maduros distintos quando devidamente estimulada (DOMINICI et al., 2006).

A depender da origem das células-tronco, elas podem ser classificadas em embrionárias ou adultas (FORTIER, 2005). As células-tronco embrionárias são extraídas da massa celular interna do blastocisto e são capazes de dar origem aos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma (FORBES et al., 2002). As células-tronco adultas são as que residem em todos os tecidos já formados, onde mantêm a homeostase dos mesmos e respondem aos estímulos nocivos (WALKER et al., 2008).

As células-tronco adultas podem ser classificadas ainda células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células-tronco mesenquimais (MSCs). As HSCs, isoladas principalmente da medula óssea, dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, incluindo linfócitos e células mieloides. Já as MSCs estão presentes em diversos tecidos e órgãos, inclusive na medula óssea. Estas células apresentam inúmeras vantagens como baixa imunogenicidade, pluripotência, assim como relativa facilidade de isolamento e criopreservação. Estas células

estariam envolvidas no reparo e/ou regeneração dos tecidos ao longo de toda vida de um indivíduo (CAI et al., 2004a; MOORE & LEMISCHKA, 2006).

As MSCs derivadas da polpa, tanto de dentes decíduos quanto de permanentes, têm sido extensamente estudadas desde o início da década passada, quando foram isoladas pela primeira vez. São células morfológicamente semelhantes aos fibroblastos, clonogênicas, e conseguem manter a sua capacidade de proliferação mesmo quando mantidas em cultura por longos períodos de tempo (GRONTHOS et al., 2000, MIURA et al., 2003). Apesar disso, ainda não existe um marcador específico para a identificação de MSCs de diversas origens, inclusive as isoladas da polpa dentária (JAMAL et al., 2011). As células-tronco pulpares são capazes de se diferenciar não só em odontoblastos, mas também em osteoblastos, adipócitos, condroblastos e até em células do tecido nervoso (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003; HUANG et al., 2009; BERNARDI et al., 2011). Desta maneira, as MSCs presentes na polpa dental apresentam um grande potencial de uso nas áreas da medicina e odontologia regenerativas (CASAGRANDE et al., 2011).

O microambiente onde residem as células-tronco adultas, conhecido como “nicho”, regula um delicado equilíbrio entre a autorrenovação ou a diferenciação das mesmas, através de uma constante comunicação entre as células-tronco, as células do nicho ou estromais e a matriz extracelular (SMART & RILEY, 2008; LIAO et al., 2011). Em alguns tecidos e órgãos, a localização anatômica destes nichos já está bem estabelecida. Entretanto, em outros, como na polpa de dentes decíduos e permanentes, ainda existem dúvidas em relação à localização destas células, ou seja, se as células-tronco situadas próximas aos vasos sanguíneos ou em outras regiões nestes tecidos (SHI & GRONTHOS, 2003; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). O conhecimento de onde as células-tronco residem nos diferentes tecidos, assim como com quais células interagem nesse meio é de fundamental importância para que se possa cultivá-las *in vitro* e aplicá-las na regeneração e/ou substituição de tecidos injuriados por diferentes doenças, assim como os tecidos ausentes devido a problemas congênitos (MODINO & SHARPE, 2005; LODI et al., 2011).

Portanto, o objetivo principal deste estudo foi identificar a localização de células-tronco mesenquimais no tecido pulpar de dentes permanentes humanos. Além disso, avaliar a expressão de biomarcadores usualmente utilizados para caracterizar tais células, assim como testar novos marcadores, utilizando as técnicas de citometria de fluxo e *western blot*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLPA DENTAL

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo localizado no centro do dente, confinada em paredes rígidas de dentina, formando com esta uma entidade embriológica e funcional, denominada de complexo dentino-pulpar (HARGREAVES & GOODIS, 2002; ZHANG & YELICK, 2010). Este tecido é composto por diversos tipos de células, matriz extracelular, vasos sanguíneos e fibras nervosas, exercendo importantes funções para manter a vitalidade do dente, como fornecimento de nutrientes, inervação e proteção, sendo esta última realizada através da formação de dentina reacionária/reparadora após estímulos nocivos como a cárie, procedimentos operatórios, trauma e abrasão, assim como através da reação imunológica em resposta à infiltração bacteriana (NAKASHIMA, 2005a; PASHLEY & LIEWEHR, 2007; ZHANG & YELICK, 2010).

Tradicionalmente, o tecido pulpar apresenta quatro zonas distintas: a camada odontoblástica, a zona acelular de Weil, a camada rica em células e o centro da polpa, como ilustra a Figura 1. Os odontoblastos são células pós-mitóticas, altamente especializadas, responsáveis pela formação do tecido dentinário. São células colunares, as quais estão distribuídas em paliçada circunscrevendo toda a periferia da polpa, com o corpo celular localizado no tecido pulpar e os seus longos processos citoplasmáticos estendendo-se no interior dos túbulos presentes em toda a extensão da dentina. A zona acelular abriga um rico complexo de fibras nervosas, na sua maioria amielínicas, as quais também podem ultrapassar a camada odontoblástica e se estender através dos túbulos dentinários, exercendo uma função sensorial quando da ocorrência de cáries profundas, além da presença de capilares sanguíneos. Na zona rica em células e no centro da polpa, além de fibras e matriz extracelular, existe uma grande densidade de células, entre as quais estão os fibroblastos, os quais são as células mais numerosas deste tecido, células mesenquimais indiferenciadas ou células-tronco, que representam menos de 1% do total de células da polpa (SLOAN & WADDINGTON, 2009), células de defesa, como macrófagos e linfócitos, vasos sanguíneos mais calibrosos e também capilares, assim como fibras nervosas mielinizadas e amielinizadas (HARGREAVES & GOODIS, 2002; BERKOVITZ et al., 2004).

O dente como um todo consiste em uma estrutura complexa, formado por células derivadas do ectoderma e mesoderma. O esmalte dentário é produzido pelos ameloblastos, os

quais são derivados do ectoderma e desaparecem após o término da formação deste tecido mineralizado (HUANG, 2009). Já a dentina, a qual também consiste em um tecido mineralizado, tubular, é produzida pelos odontoblastos, sendo estas células ectomesenquimáticas, derivadas de células da crista neural que migraram para o primeiro arco branquial (RUCH et al., 1995). Após a formação da dentina, os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos permanecem dentro dos túbulos, servindo como um biossensor para detecção de estímulos deletérios (ZHANG & YELICK, 2010). Além das células derivadas da crista neural, a polpa dentária é povoada durante o seu desenvolvimento por células mesenquimais, provavelmente derivadas do primeiro arco branquial. Desta maneira, a polpa dental madura compreende uma população bastante heterogênea de células (CHAI et al., 2000).

A polpa dental apresenta uma capacidade de defesa e regeneração tecidual bastante limitada, principalmente pelo fato de estar quase que totalmente encapsulada em um tecido duro. A única conexão entre a polpa e os tecidos adjacentes são os ápices radiculares, por onde entram os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, constituindo-se na principal via de nutrição do tecido e de trocas tissulares (ZHANG & YELICK, 2010). Por isso, a polpa é considerada um tecido bastante vulnerável, tornando-se difícil a eliminação da infecção e a regressão da inflamação quando estas ocorrem, podendo levar ao colapso dos vasos sanguíneos e à necrose tecidual (HUANG, 2009). Quando a polpa sofre uma agressão leve, como uma cárie pequena, erosão moderada ou uma fratura superficial, os odontoblastos são preservados e secretam a matriz dentinária, sendo esta posteriormente mineralizada, formando uma barreira de tecido endurecido, denominado de dentina terciária ou reparadora, numa tentativa de afastar os odontoblastos do “perigo” vindo das camadas mais externas do dente. Quando a injúria sofrida é mais agressiva e a camada de odontoblastos é afetada, células mesenquimais indiferenciadas migram em direção à área lesada e proliferam sob a ação fatores de crescimento que são liberados da dentina adjacente parcialmente dissolvida pelos ácidos bacterianos presentes no processo cariioso ou mesmo liberados dos debris de dentina que são produzidos durante o preparo cavitário. Estas células então, diferenciam-se em células semelhantes aos odontoblastos e começam a secretar dentina (SMITH & LESOT, 2001; SMITH, 2003; ZHANG & YELICK, 2010).

A origem das células-tronco/progenitoras durante o processo de dentinogênese reparadora ainda permanece indefinida, embora a sugestão de diferentes origens para estas células, como a camada rica em células, células perivasculares, fibroblastos e células

mesenquimais indiferenciadas possa explicar uma variação no padrão de respostas observadas durante o processo de reparação do complexo dentino-pulpar (RUCH et al., 1995; SMITH et al., 2005). Os estudos realizados por Gronthos et al. (2000, 2002) sugerem a existência de uma hierarquia de células progenitoras na polpa dentária adulta, incluindo uma pequena população de células altamente proliferativas, multipotentes, indiferenciadas, capazes de autorrenovação, inseridas em um compartimento maior junto a células progenitoras provavelmente mais comprometidas.

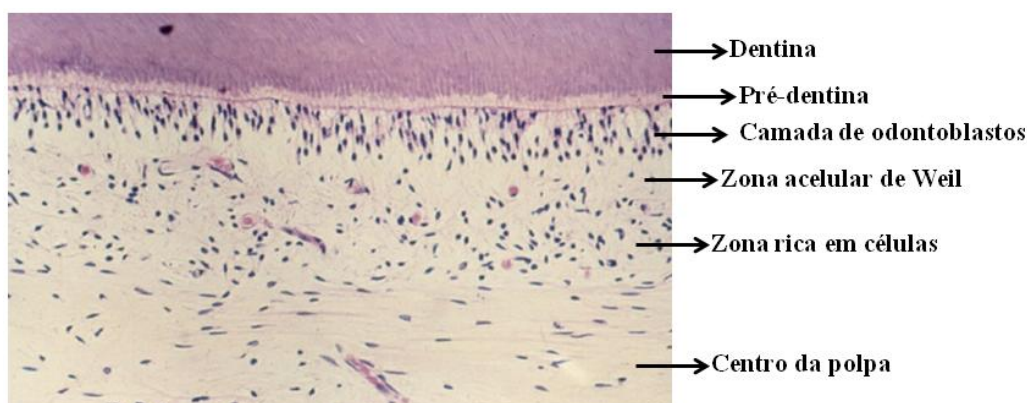


Figura 1. Corte histológico da polpa dental.

Fonte: <http://pt.scribd.com/doc/19508864/HISTOLOGIA-DA-POLPA-DENTARIA>

2.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são definidas como aquelas células que possuem a capacidade de perpetuar a si mesmas por longos períodos através da autorrenovação como também de gerar células maduras de determinado tecido quando adequadamente estimuladas, por meio da diferenciação celular (NIH, 2001; FORBES et al., 2002).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna de células de embriões que se encontram na fase de blastocisto, os quais têm tipicamente de quatro a cinco dias de idade e são obtidos a partir de óvulos fertilizados *in vitro*, doados para pesquisas. Essas células são consideradas totipotentes, ou seja, podem se diferenciar em qualquer outro tipo celular (SLACK, 2000). No entanto, as questões éticas e religiosas sobre pesquisas envolvendo células-tronco embrionárias, assim como o perigo potencial de formação de teratomas têm contribuído para limitar as pesquisas com esse tipo de célula (NAKASHIMA, 2005b).

Já as células-tronco adultas são consideradas multipotentes, isto é, são capazes de se diferenciar em mais de um tipo celular, mas não em todos. Hoje, sabe-se que as células-tronco adultas estão presentes nos mais diversos sítios do organismo, tais como medula óssea, sangue, tecido adiposo, cordão umbilical, córnea, tecido nervoso, pulmão, retina, fígado, pele, trato gastrintestinal, pâncreas e dentes (SLACK, 2000; BONNER-WEIR & SHARMA, 2002; OTTO, 2002; ZUC et al, 2002; SHI & GRONTHOSs, 2003; BITTENCOURT et al., 2006; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006; KRAMPERA et al., 2006; REBELATTO et al., 2008; NADIG, 2009). Essas células apresentam a vantagem de constituírem-se numa fonte viável para transplantes autólogos, minimizando os riscos de uma rejeição imune. Além disso, pelo menos em teoria, podem ser obtidas de um indivíduo durante todo o período de vida do mesmo (CASAGRANDE et al., 2011). No entanto, também apresentam desvantagens, como o fato de não serem totipotentes, a relativa dificuldade de obtê-las, purificá-las e cultivá-las *in vitro*, além da presença em menor quantidade destas células nos tecidos (RISBUD & SHAPIRO, 2005).

As células-tronco adultas ainda podem ser classificadas em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) ou mesenquimais (MSCs) (NADIG, 2009; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). As HSCs podem ser obtidas da medula óssea, do cordão umbilical e do sangue periférico, sendo responsáveis pela renovação de todo sistema sanguíneo e imunológico. As HSCs são as células-tronco mais conhecidas, estudadas e, conseqüentemente, melhor caracterizadas (REYA et al., 2001).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) constituem-se em um dos mais promissores tipos de células-tronco, devido a sua disponibilidade nos tecidos, capacidade de multi-diferenciação, ausência de problemas éticos e/ou religiosos para a sua utilização em pesquisas científicas e a não formação de teratomas (DA SILVA MEIRELES et al., 2008). Entretanto, ainda não existem marcadores específicos ou combinações de marcadores que possam identificar tais células (JAVASON, et al., 2004; YAN et al., 2011). Por este motivo, a obtenção das MSCs depende também de características biológicas, como capacidade de formar colônias aderentes ao plástico, morfologia semelhante a fibroblastos (são células conhecidas também como unidades formadoras de colônias de fibroblastos - CFU-Fs), alta capacidade proliferativa, capacidade de autorrenovação e de multi-diferenciação (DA SILVA MEIRELES et al., 2008; YAN et al., 2011). Apesar da ausência de marcadores específicos, as MSCs frequentemente expressam CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, STRO-1, CD146 e HLA-ABC na sua superfície (MUSINA et al., 2005; DA SILVA MEIRELES et al., 2006;

DOMINICI et al., 2006). Entretanto, apresentam pouca ou nenhuma expressão de marcadores endoteliais, como CD31, e marcadores hematopoiéticos, como CD14, CD34 e CD45. Da mesma forma, não expressam HLA-DR ou marcadores de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40 (JAVASON et al., 2004; DA SILVA MEIRELES et al., 2008; UCCELLI et al., 2008). As MSCs também podem expressar marcadores genéticos de células-tronco embrionárias, como oct-4, sox-2 e rex-1, assim como SSEA-1 e SSEA-4 (IZADPANAHA et al., 2006; ANJOS-AFONSO & BONNET, 2007; GANG et al., 2007). Marcadores metabólicos gerais, como a aldeído desidrogenase (ALDH), também têm sido utilizados para isolar diferentes populações de células-tronco adultas, visto que a atividade desta enzima parece ser alta nestas células (CORTI et al., 2006; HESS et al., 2006; DOUVILLE et al., 2009).

Segundo DA SILVA MEIRELES et al. (2006), as MSCs agem como um reservatório de células indiferenciadas para suprir a demanda por células do tecido ao qual pertencem, adquirindo as características fenotípicas do local. Quando necessário, e após receberem sinais do microambiente, as MSCs dão origem a células progenitoras, as quais gradualmente vão fazer parte do tecido no qual estão inseridas.

As primeiras MSCs isoladas e caracterizadas foram obtidas da medula óssea, representando uma pequena sub-população de células não-hematopoiéticas residentes neste tecido (IZADPANAHA et al., 2006; PROCKOP, 2007). Hoje, sabe-se que essas células estão presentes em vários outros tecidos e órgãos, tendo sido inclusive isoladas de tecidos orofaciais, como polpa de dentes permanentes e decíduos, ligamento periodontal, papila apical e germes dentários (KOLYA & CASTANHO, 2007; BARRY & MURPHY, 2004; TAKEDA et al., 2008).

2.3 MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Habitualmente, as células possuem receptores e moléculas de superfície que as ligam entre si, possibilitando a sua comunicação e a execução de suas funções no organismo. Essas moléculas de superfície celular são usadas como marcadores de células-tronco (NIH, 2001). As células-tronco mesenquimais expressam um variado número de marcadores de superfície, no entanto, não existe ainda um marcador realmente específico para defini-las. Uma grande variação na expressão de marcadores tipicamente apresentados pelas MSCs, como o CD90, CD73, CD117, CD105 e STRO-1, pode ser observada entre as diferentes culturas de células-

tronco mesenquimais estabelecidas por grupos de pesquisa distintos. Estas discrepâncias ocorrem devido aos diferentes métodos de isolamento de tais células, pelos diferentes tecidos e espécies dos quais as MSCs foram originadas, assim como pelas condições de cultivo das mesmas. Por este motivo talvez, a abordagem mais utilizada para a identificação de tais células ainda seja a funcional, como a indução *in vitro* de diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (JAVASON et al, 2004).

As DPSCs, descritas pioneiramente por Gronthos et al. (2000), isoladas da polpa de terceiros molares retidos, foram avaliadas por meio da técnica de imunocitoquímica, mostrando-se negativas para os marcadores CD14, CD34 e CD45 e positivas para CD44 e CD146, assim como alguns marcadores de fibroblastos e tecido ósseo. Tais células foram capazes de formar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar *in vivo*, assim como demonstraram capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e neuronal *in vitro* (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002). Alongi et al (2010), observaram expressão positiva para os marcadores STRO-1, CD90, CD105 e CD146 na polpa de dentes permanentes, através da técnica da imunohistoquímica. Neste mesmo estudo, quando as células isoladas do tecido foram avaliadas pela citometria de fluxo, expressaram níveis de moderados a altos dos marcadores CD146, SSEA-4, CD73 e CD166. Quando induzidas, as células apresentaram potencial para produção de tecido mineralizado após serem transplantadas para o dorso de camundongos imunossuprimidos. Em outro estudo, células isoladas da polpa de dentes permanentes, positivas para CD73, CD90 e CD105, caracterizadas através da citometria de fluxo, foram capazes de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos, assim como produziram tecido semelhante à polpa dental, bem vascularizado (HUANG, 2010).

As primeiras células isoladas da polpa de dentes decíduos mostraram-se positivas para os marcadores STRO-1 e CD146, quando analisadas pela técnica da imunocitoquímica, e positivas para o STRO-1, quando avaliadas pela citometria de fluxo. As SHEDs diferenciaram-se não só em odontoblastos, mas em adipócitos e células neurais. Após serem transplantadas para o dorso de camundongos imunossuprimidos, as mesmas foram capazes de induzir a formação de tecido ósseo e dentina, não sendo capazes, no entanto, de formar um complexo dentino-pulpar (MIURA et al., 2003). Da mesma forma, células obtidas da polpa de dentes decíduos com diferentes graus de rizólise apresentaram-se positivas para os marcadores CD29, CD44 e CD90, e negativas para CD146 e STRO-1 quando analisadas pela citometria de fluxo. Entretanto, quando as células foram analisadas pela imunofluorescência,

expressaram marcação positiva apenas para o STRO-1. Neste estudo, as células mostraram capacidade de diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica (BERNARDI et al., 2011). Em outro estudo, as SHEDs, caracterizadas imunofenotipicamente pela citometria de fluxo, mostraram expressão positiva para os marcadores CD73, CD90 e CD105, enquanto que apresentaram expressão moderada para o marcador CD146. Tais células foram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica, mas não na adipogênica (PIVORIUNAS et al., 2010).

Já nos estudos de Laino e colaboradores (2005 e 2006), os autores verificaram que células $c\text{-kit}^+/\text{CD}34^+/\text{CD}45^-$, isoladas da polpa de dentes permanentes, assim como células $c\text{-kit}^+/\text{CD}34^+/\text{STRO-1}^+$, isoladas da polpa de dentes decíduos, e selecionadas através da citometria de fluxo, foram capazes de diferenciar-se em ostoblastos e formar amostras de tecido ósseo bem mineralizado, embora $c\text{-kit}$ e $\text{CD}34$ sejam marcadores conhecidos de células de linhagens hematopoiéticas.

2.3.1 ALDH

A aldeído desidrogenase (ALDH) é uma enzima citosólica, envolvida no metabolismo dos retinóides, sendo que, até o momento, 19 isoformas da ALDH foram descritas (SLÁDEK, 2003). A maioria destas isoformas está amplamente distribuída nos tecidos, com a maior expressão observada no fígado e rins. Da mesma forma, a distribuição celular da enzima é ampla, estando as diferentes isoformas da mesma presentes no citoplasma, na mitocôndria e no retículo endoplasmático da célula (EVANS, 1988). A superfamília das aldeído desidrogenases protege as células, catalisando a oxidação de uma grande variedade de substratos de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos aldeídicos, gerados a partir de precursores endógenos e exógenos, aos seus correspondentes ácidos carboxílicos. Os aldeídos endógenos são formados durante o metabolismo de alcoóis, aminoácidos, amins biogênicas, vitaminas, esteroides, enquanto que os exógenos são frequentemente gerados através do metabolismo de diferentes drogas e agentes ambientais (VASILIOU et al., 2004).

A ALDH age principalmente convertendo retinol (vitamina A) em ácido retinóico. Nos mamíferos, os retinóides são essenciais para o desenvolvimento normal e homeostase, pois estas substâncias apresentam um papel crucial na fisiologia de muitos órgãos e agem como poderosos morfógenos durante o desenvolvimento embrionário (EVANS, 1988; PURTON, 2007). De acordo com Moreb (2008), a ALDH seria crucial para a proteção das células-tronco

contra aldeídos tóxicos endógenos e exógenos, assim como para a habilidade de diferenciação destas células.

Vários estudos mostram que a ALDH está expressa em níveis elevados nas células-tronco hematopoiéticas (HSCs), tanto humanas quanto murinas, sendo que a isoforma ALDH1 está presente de uma forma mais marcante nestas células (ARMSTRONG et al., 2004; CAI et al., 2004a; HESS et al., 2004; LIOZNOV et al., 2005; STORMS et al., 2005; CHUTE et al., 2006; HESS et al., 2006; MOREB, 2008). Evidências mostram que populações de células hematopoiéticas que apresentam uma alta atividade da ALDH estão correlacionadas com um estado mais indiferenciado das mesmas (STORMS et al., 1999).

Chute et al. (2006) demonstraram que a ALDH exerce um papel chave na regulação da diferenciação das HSCs. Neste estudo, a inibição da enzima retardou a diferenciação das HSCs em resposta a determinadas citocinas. Os efeitos inibitórios sobre a enzima puderam ser revertidos pela coadministração do receptor agonista do ácido retinoico, sugerindo que a capacidade da ALDH em gerar ácido retinoico é importante na determinação do destino da célula-tronco hematopoiética. Da mesma forma, o inibidor da ALDH causou uma diminuição na sinalização molecular mediada pelo receptor do ácido retinoico, sugerindo também que a inibição da ALDH promoveria a autorrenovação das HSCs, através da redução da atividade do ácido retinoico. Estes resultados indicam que a modulação da atividade da enzima ALDH, assim como da sinalização molecular dos retinoides pode ser uma estratégia eficaz para amplificar as HSCs.

O uso da atividade da ALDH para selecionar células progenitoras hematopoiéticas abriu campo para o estudo da atividade desta enzima em células-tronco de diferentes origens (MOREB, 2008). Na busca por um marcador de células-tronco “universal”, Corti et al. (2005) isolaram uma população de células primitivas das zonas germinais do cérebro de embriões murinos, assim como da zona subventricular de camundongos adultos com base na atividade da enzima ALDH. Esta população de células-tronco neurais isoladas dos animais era capaz de se autorrenovar e de gerar novas neurosféricas e células-tronco neuroepiteliais. Além disso, apresentaram a capacidade de se diferenciar em neurônios e células da macróglia. Da mesma forma, Cai et al. (2004b) isolaram uma população células-tronco neuroepiteliais de ratos com base na atividade da ALDH, as quais apresentavam uma alta atividade da enzima.

Segundo Douville et al. (2009), diferentes populações de células-tronco apresentam atividade da ALDH, e a citometria de fluxo com o auxílio do Aldeflour® poderia constituir-se em um “meio universal” para o isolamento de células-tronco de origens diversas. Segundo os

autores, além da citometria de fluxo, os níveis da atividade da enzima ALDH nos tecidos também pode ser observada através das técnicas de imunohistoquímica, western blot e imunofluorescência.

De acordo com os resultados de estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa, a isoforma ALDH1 também tem sido considerada como um marcador de células-tronco tumorais em diferentes tipos de câncer, como no carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, câncer de mama, colorretal e de pulmão (GINESTIER et al., 2007; CHEN et al., 2009; HUANG et al., 2009; JIANG et al., 2009). No estudo realizado por Deng e colaboradores (2010), o número de mamosferas formadas pela fração de células ALDH⁺ em linhagens de células tumorais foi significativamente maior do que as formadas pelas células ALDH⁻, inferindo que, nestas linhagens, as células que apresentam alta atividade da enzima ALDH apresentam características de células-tronco. A isoforma ALDH1A1 tem sido considerada responsável pela resistência das células tumorais aos fármacos usualmente empregados nos regimes quimioterápicos. De uma maneira geral, células tumorais positivas para a ALDH não são destruídas por essas drogas (JANUCHOWSKI et al., 2013). No estudo realizado por Sládek e colaboradores (2002), os níveis da ALDH estavam significativamente mais altos em células tumorais metastáticas que sobreviveram à exposição à ciclofosfamida, do que naquelas que não entraram em contato com a mesma. Ainda, os níveis da enzima apresentaram-se significativamente mais elevados nos tumores metastáticos que não responderam ao tratamento subsequente com a droga, quando comparados aos que responderam ao regime farmacológico, ou seja, diminuíram de tamanho.

2.3.2 STRO-1

O STRO-1 é um antígeno de superfície celular expresso por células precursoras da medula óssea (GRONTHOS et al., 1994; GRONTHOS et al., 2003). Esta molécula reconhece um antígeno de superfície celular resistente à tripsina, presente em uma subpopulação de células da medula óssea, incluindo uma proporção predominante das populações celulares com elevado potencial de proliferação e de diferenciação em células-tronco esqueléticas, assim como células com características de fibroblastos formadores de unidades de colônias (NAKAMURA et al., 2009). É considerado o marcador mais conhecido de células-tronco mesenquimais (NING et al., 2011). Entretanto, a função desta molécula ainda não está esclarecida, embora tenha sido relatado que MSCs STRO-1⁺ isoladas da medula óssea,

tiveram uma maior capacidade de migração nos tecidos e órgãos de camundongos imunossuprimidos do que MSCs STRO-1⁻, sugerindo que esta proteína pode ter uma função na migração das MSCs, assim como ligação destas células à matriz extracelular (BENSIDHOUM et al., 2004).

Células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e purificadas com base no STRO-1 apresentaram grande capacidade proliferativa, capacidade de multidiferenciação *in vitro*, assim como a habilidade de formação de tecido ósseo *in vivo* (GRONTHOS et al., 2003). Nakamura e colaboradores (2009) encontraram expressão positiva para este marcador em todas as populações de MSCs estudadas, ou seja, SHEDs, DPSCs e BMMSCs. Yu et al. (2010) demonstraram que células isoladas da polpa de dentes permanentes, e selecionadas através da citometria de fluxo apenas com base na expressão do STRO-1 foram capazes de formar, *in vivo*, tecido ósseo bem mineralizado e vascularizado, assim como uma estrutura semelhante ao tecido cartilaginoso. Da mesma forma, foi observado o desenvolvimento de tecido dentinário, com a presença de odontoblastos ao longo da estrutura. Em inúmeros outros estudos, este marcador foi empregado para caracterizar e selecionar células-tronco mesenquimais, tanto de dentes decíduos, como de permanentes (MIURA et al., 2003; YANG et al., 2007; SAKDEE et al., 2009; YANG et al., 2009; ALONGI et al., 2010; BAKOPOULOU et al., 2011; BERNARDI et al., 2011). Este marcador também foi utilizado para identificar células mesenquimais pulpares através da técnica da imunohistoquímica (SHI & GRONTHOS, 2003; KANEKO et al., 2009).

2.3.3 CD90

De acordo com Dominici e colaboradores (2006), um dos critérios para que uma célula mesenquimal seja considerada tronco é a expressão de determinados marcadores de superfície que usualmente estão presentes nas mesmas, dentre os quais está incluído o CD90 ou Thy-1. É uma proteína de superfície celular, a qual também está expressa em timócitos, linfócitos T periféricos e neurônios. A exata função desta molécula permanece desconhecida, mas parece mediar as interações célula-célula, estando envolvida na adesão de monócitos e leucócitos às células endoteliais e fibroblatos (HAERYFAR & HOSKIN, 2004). Diferentes grupos de pesquisa, onde células-tronco mesenquimais foram isoladas da polpa de dentes permanentes e decíduos, utilizaram este marcador para caracterização imunofenotípica das células através da citometria de fluxo (PERRY et al., 2008; ALONGI et al., 2010; YAMAZA et al., 2010;

BERNARDI et al., 2011). Da mesma forma, a expressão do antígeno CD90 foi avaliada na polpa de dentes permanentes através da técnica de imunohistoquímica (ALONGI et al., 2010).

2.3.4 CD44

Além de leucócitos e hemácias, o antígeno CD44 também é expresso pelas células-tronco mesenquimais e tem sido reportado em MSCs isoladas da medula óssea e da polpa dental. Da mesma forma, tem sido utilizado para selecionar, junto a outros marcadores, células-tronco tumorais (GRONTHOS et al., 2000; WEI et al., 2007; KRISHNAMURTHY et al., 2010). É uma glicoproteína transmembrana expressa na matriz extracelular e na superfície de células endoteliais, mesenquimais, hematopoiéticas e leucócitos, a qual está relacionada com a adesão e migração celular. Segundo Chen e colaboradores (2013), esta molécula estaria envolvida na mineralização de células da polpa dentária, estando fortemente expressa em odontoblastos em estágio de deposição mineral ativa. Visto que o CD44 está expresso em múltiplos tipos celulares, assim como em muitos tecidos, não pode ser considerada isoladamente como um marcador específico para as MSCs (ABBAS & LICHTMAN, 2007; ZOLLER, 2011).

2.4 CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM PULPAR

As células-tronco mesenquimais isoladas da polpa, tanto de dentes permanentes como de decíduos, apresentam a capacidade de se autorrenovar, assim como de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, como fibroblastos, odontoblastos, células endoteliais, osteoblastos, condrócitos, miócitos, adipócitos, células neuronais, assim como células-tronco pluripotentes induzidas (KOLYA & CASTANHO, 2007; MADAN & KRAMER, 2005; BATOULLI et al., 2003; YAN et al., 2010; STEVENS et al., 2008; SAKAI et al., 2011; ESTRELA et al., 2011). Esta plasticidade das células-tronco de origem pulpar habilita as mesmas a serem utilizadas nas terapias celulares que visam a regeneração e/ou substituição dos tecidos dentários danificados ou perdidos, como esmalte, dentina, polpa e ligamento periodontal, assim como na regeneração de órgãos e tecidos de origens diversas, como o tecido cardíaco, nervoso e ósseo, da mesma forma que apresentam um grande potencial de uso no tratamento de doenças como diabetes, Parkinson, Alzheimer, câncer, entre outras (NOSRAT et al., 2001; PITTENGER & MARTIN, 2004; MURRAY et al., 2007; KERKIS et al., 2008; SEO et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2011; ESTRELA et al., 2011).

A diferenciação de células-tronco adultas da polpa dental para uma linhagem celular específica é determinada principalmente pelos componentes do microambiente no qual elas estão inseridas, tais como fatores de crescimento, receptores moleculares, fatores de transcrição e proteínas da matriz extracelular (YAN et al., 2010; ESTRELA et al., 2011; STEVENS et al., 2008). Fatores de crescimento e morfogenéticos são proteínas que se ligam a receptores específicos nas membranas das células, iniciando uma série de vias sinalizadoras, as quais coordenam as atividades celulares. Essas moléculas exercem um papel crucial durante o desenvolvimento, guiando processos que determinam o destino das células-tronco e regulam a geração de todos os tecidos e órgãos num embrião em desenvolvimento. Similarmente, essas moléculas desempenham uma função importante nos processos fisiológicos de regeneração dos tecidos, como por exemplo, na cicatrização de feridas na pele ou nas respostas da polpa dental à progressão da cárie dentária. Os mesmos fatores de crescimento que guiam a embriogênese e a regeneração fisiológica dos tecidos também podem ser utilizados de maneira terapêutica, direcionando a diferenciação de células-tronco em determinadas linhagens celulares e coordenando processos celulares que têm como finalidade o desenvolvimento de um novo órgão ou tecido (CASAGRANDE et al., 2011).

A grande vantagem da utilização de células-tronco mesenquimais provenientes da polpa dental é o fácil acesso a essas células, tornando os dentes uma fonte não invasiva e livre de problemas éticos. As células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs) podem ser obtidas através de terceiros molares e pré-molares extraídos por indicação ortodôntica. Enquanto isso, os dentes decíduos, de onde são isoladas as células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHEDs), são naturalmente perdidos durante a transição entre as dentições decídua e permanente e, na maioria das vezes, os mesmos são descartados após a esfoliação fisiológica (GRONTHOS et al., 2000; SHI & GRONTHOSs, 2003; CASAGRANDE et al., 2011).

As DPSCs foram isoladas pela primeira vez no início dos anos 2000 (GRONTHOS et al., 2000). São células morfológicamente semelhantes aos fibroblastos, as quais apresentam uma alta taxa de proliferação, capacidade de formar colônias, assim como são aderentes ao plástico (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002). Nesses estudos, as DPSCs demonstraram possuir uma taxa de proliferação e potencial de formar colônias maior do que os valores referentes às já consagradas células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSSCs).

Da mesma forma que as DPSCs, as SHEDs apresentam características de células-tronco mesenquimais, como capacidade de se autorrenovar e de dar origem a um ou mais tipos de células diferenciadas. Quando comparadas às DPSCs, as SHEDs apresentam uma taxa mais elevada de proliferação (MIURA et al., 2003). De acordo com Nakamura et al. (2009), as SHEDs apresentam uma expressão mais acentuada de fatores de crescimento como o FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2) e o TGF- β (fator transformador de crescimento beta) em relação às DPSCs. Tais fatores podem exercer um papel crucial na regulação da proliferação, formação de matriz extracelular, diferenciação, migração e apoptose das células indiferenciadas.

Da mesma forma que as BMSSCs isoladas da medula óssea, as DPSCs e as SHEDs são consideradas uma população heterogênea de células mesenquimais, de forma que diferentes marcadores podem estar expressos nestas subpopulações celulares presentes na polpa de dentes permanentes e decíduos (HUANG, 2011). Da mesma maneira, morfologia e tamanhos celulares diferentes podem ser visualmente observados nas células de uma mesma colônia, tanto as isoladas de dentes permanentes, como de dentes decíduos (GRONTHOS et al., 2000; SHI & GRONTHOS, 2003).

2.5 CÉLULAS-TRONCO E SUA UTILIZAÇÃO NA ODONTOLOGIA

Nos últimos anos, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido pulpar têm sido utilizadas em inúmeros estudos com o objetivo de avaliar o seu potencial para futuras aplicações clínicas na área da odontologia (MURRAY & GARCIA-GODOY, 2004; SHI et al., 2005; GRONTHOS et al., 2000; CASAGRANDE et al., 2011; YAN et al., 2010; DEMARCO et al., 2011).

As células-tronco pulpares respondem aos fatores de crescimento proliferando-se ou diferenciando-se em células maduras, como odontoblastos, células endoteliais, células neuronais, entre outras, a depender o fator de crescimento envolvido (TZIAFAS, 2004; SAKAI et al., 2010). A matriz dentinária é considerada um reservatório dessas moléculas, as quais são cruciais nos processos formativos e reparadores do complexo dentino-pulpar (CASAGRANDE et al., 2011). Fatores de crescimento como TGF- β , FGF-2, proteína óssea morfogenética (BMP), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) podem ficar “aprisionados” na dentina durante a sua formação, sendo liberados durante o processo cariioso, pela ação dos ácidos bacterianos,

promovendo a diferenciação de células progenitoras em odontoblastos e a formação de dentina terciária (TZIAFAS, 1995; MURRAY & SMITH, 2002).

Diferentes estudos onde DPSCs ou SHEDs foram implantadas no dorso de camundongos imunossuprimidos junto a matrizes biodegradáveis no lugar do tecido pulpar previamente removido de “fatias” de dentes, indicam que esses fatores de crescimento podem ter sido liberados da dentina, promovendo a diferenciação das células-tronco pulparem em odontoblastos, assim como a formação de tecido mineralizado similar à dentina e tecido conjuntivo vascularizado muito semelhante à polpa dental (CASAGRANDE et al., 2011; CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2010). Quando DPSCs foram implantadas junto às matrizes, mas fora de contato com a dentina, essas células não foram capazes de se diferenciar em odontoblastos (DEMARCO et al., 2010).

É consenso de que não existe, atualmente, nenhum material restaurador que contemple as propriedades físicas e mecânicas ideais para substituir tecidos dentários perdidos por cárie ou trauma (MURRAY et al., 2001; NADIG, 2009). Da mesma maneira, a própria dentina seria o melhor “material” para proteção da polpa dentária, o qual é considerado um tecido bastante sensível e vulnerável a injúrias sofridas pelo dente, levando a reações inflamatórias das células da polpa, o que pode ocasionar patologias como a inflamação irreversível e a necrose pulpar (ABOUT et al., 2001; ZHANG & YELICK, 2010). Por isso, imensos benefícios seriam alcançados com a produção de tecidos biológicos como esmalte, dentina, ligamento periodontal, assim como uma “nova” polpa dentária, através da engenharia de tecidos aplicada à odontologia (YAN et al., 2010).

A restauração de um dente cariado ou traumatizado com tecidos biológicos minimizaria problemas comuns a restaurações com materiais odontológicos tradicionais, como a microinfiltração e fraturas (SMITH, 2003; MURRAY & GARCIA-GODOY, 2004; NADIG, 2009). Dentes permanentes jovens que necessitam de apicificação devido à necrose pulpar decorrente de trauma ou cárie seriam beneficiados com a regeneração da polpa dental através da engenharia de tecidos, associando células-tronco, matrizes biodegradáveis e fatores de crescimento apropriados, permitindo a completa formação radicular e a manutenção da vitalidade pulpar (NÖR, 2006).

A regeneração do tecido pulpar em dentes com raízes completamente formadas também seria bastante interessante, pois é sabido que um dente sem vitalidade torna-se mais friável e, conseqüentemente, mais propenso a fraturas, sendo muitas vezes necessária a exodontia da unidade dentária algum tempo após o tratamento endodôntico (BHASKAR, 1989; CAPLAN

et al., 2005). HUANG et al. (2010), pela primeira vez apresentaram evidências de que esse tipo de tratamento seria possível, ao constatarem a formação de um complexo dentino-pulpar bem vascularizado em canais radiculares, onde o tecido pulpar original foi previamente removido. Neste estudo, DPSCs adicionadas a matrizes biodegradáveis foram introduzidas no espaço correspondente ao canal radicular de raízes de terceiros molares humanos, cortadas em peças de aproximadamente 07 mm de comprimento e seladas em uma das extremidades com MTA (trióxido mineral agregado). Esse conjunto foi então transplantado para o dorso de camundongos imunossuprimidos e analisado após quatro meses.

Da mesma forma, em vários outros estudos onde células-tronco isoladas da polpa de dentes decíduos e permanentes foram utilizadas, foi detectada a formação de tecido semelhante ao pulpar, assim como tecido mineralizado com características similares à dentina (DUAILIBI et al., 2004; CASAGRANDE et al., 2011; BATOULI et al., 2003; CORDEIRO et al., 2008; PRESCOTT et al., 2008; DEMARCO et al., 2011). Quando DPSCs, hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico foram transplantados no dorso de camundongos imunossuprimidos, observou-se diferenciação das mesmas em odontoblastos após quatro semanas. Após 16 semanas, as DPSCs foram capazes de produzir um tecido bastante semelhante ao complexo pulpo-dentinário, além de induzir as células do hospedeiro a participarem no processo reparativo/produtivo do órgão dentário (BATOULI et al., 2003).

Outra estratégia foi utilizada por Nakashima & Akamine (2005) para promover a regeneração do complexo dentino-pulpar em cães. Os autores adicionaram células-tronco/progenitoras isoladas da polpa dos próprios animais, transduzidas com o fator de crescimento de diferenciação 11 (Gdf11), o qual faz parte da grande família do TGF- β , junto a matrizes biodegradáveis nas polpas expostas dos mesmos. Após três meses, foi observada a formação de grandes quantidades de osteodentina e dentina tubular no local onde as células foram transplantadas.

Lovelace et al. (2011) demonstraram que células-tronco mesenquimais podem ser colocadas dentro dos espaços do canal radicular, durante procedimentos endodônticos regenerativos em dentes jovens necrosados com ápices ainda abertos. O procedimento clínico consistiu na formação intracanal de um coágulo de sangue, através da sobreinstrumentação (3 a 5 mm) do canal radicular com uma lima do tipo Kerr. A amostra de sangue do canal foi analisada e verificou-se a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais, como CD73, CD90, CD105 e STRO-1, numa quantidade maior quando comparada com a expressão desses marcadores no sangue periférico. Os autores acreditam que o coágulo sanguíneo agiria

como uma matriz, as plaquetas e a dentina liberariam os fatores de crescimento necessários para a diferenciação celular e as células-tronco seriam derivadas dos tecidos periapicais. Esses achados fornecem a base biológica para a participação de células-tronco no desenvolvimento radicular contínuo e resposta regenerativa seguinte a tal procedimento clínico, a qual ainda deve ser avaliada.

Assim como outros órgãos, o dente se desenvolve a partir de interações entre células epiteliais (epitélio oral) e células mesenquimais (células ectomesenquimáticas que migraram da crista neural). O tecido epitelial embrionário “instrui” as células mesenquimais, através da sinalização molecular, o início da formação do dente e a determinação da forma do mesmo (THESLEFF et al., 1995). Na busca pela formação de um órgão dentário completo, Ohazama et al. (2004) promoveram a interação de três fontes de células-tronco não dentais de camundongos (células-tronco embrionárias, neurais e da medula óssea) com o epitélio oral embrionário dos mesmos. O conjunto células progenitoras/epitélio foi transplantado para sítios ectópicos nos animais. Todas as três populações de células-tronco responderam ao estímulo do epitélio oral, expressando genes de indução odontogênica. Entretanto, somente o conjunto formado por células-tronco da medula óssea/epitélio foi capaz de induzir a formação de um dente ectópico completo, com presença de polpa, pré-dentina, dentina, esmalte e um tecido similar ao ligamento periodontal.

2.6 AS CÉLULAS-TRONCO E O NICHOS

O conceito de “nicho” de células-tronco foi proposto pela primeira vez por Schofield (1978), como um ambiente especializado necessário para que estas células mantivessem as suas características de células indiferenciadas. Segundo Scadden (2006), a simples localização do nicho de células-tronco não é suficiente para definir o mesmo. O nicho deve possuir tanto dimensões anatômicas como funcionais, do qual fazem parte elementos que controlam o “destino” destas células, ou seja, vão determinar se a célula-tronco vai permanecer no nicho e manter o seu perfil indiferenciado ou se vai abandonar o mesmo e dar origem a uma célula diferenciada, comprometida com determinada linhagem celular. Da mesma forma, este microambiente especializado protege as células-tronco da exaustão e da morte. De acordo com o autor, as células-tronco adultas apresentam uma função limitada sem o nicho. Por isso a importância de se conhecer o mesmo, para tentar reproduzir com a maior fidelidade possível *in vitro* o microambiente onde diferentes populações de células-tronco residem. Assim, o

nicho de células-tronco, de uma maneira geral, é um campo da pesquisa científica que vem sendo extensamente estudado nos últimos anos, numa busca constante para o entendimento dos mecanismos regulatórios que controlam as células-tronco e a regeneração tecidual (WALKER et al., 2008).

O nicho deve ser altamente especializado, exigindo uma organização específica para equilibrar e controlar as capacidades de autorrenovação e de diferenciação das células (WALKER et al., 2008). Sinais apropriados endereçados às células-tronco, emitidos de maneira autócrina, parácrina ou até endócrina, direcionam as interações das mesmas com as células residentes do nicho assim como com as moléculas da matriz extracelular, proporcionando a regulação e a manutenção adequada das células-tronco neste microambiente especializado (SCADDEN, 2006).

Embora o nicho de diferentes populações de células-tronco já tenha sido identificado, como das células neurais, epidérmicas, intestinais e hematopoiéticas, a localização exata das células-tronco mesenquimais da polpa dentária ainda não foi esclarecida até o momento (SUCHÁNEK et al., 2007). Entretanto, Shi & Gronthos (2003) identificaram células positivas para os marcadores STRO-1, CD146 e 3G5 (antígeno associado aos pericitos) na parede de vasos sanguíneos e também no perineuro de feixes nervosos pulpares de dentes permanentes humanos, indicando a possível localização do nicho de DPSCs neste tecido. Da mesma forma, Alongi et al. (2010) identificaram expressão positiva para os marcadores STRO-1, CD90, CD105 e CD146 na polpa de dentes permanentes humanos, os quais estavam localizados junto às estruturas vasculares e nervosas deste tecido.

A elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação das células-tronco, tanto em relação à manutenção da homeostase quanto em relação à resposta a injúrias, depende do desenvolvimento em laboratório de modelos que reproduzam o mais fielmente possível o nicho funcional, incluindo os sinais moleculares envolvidos, a fonte celular de onde são esses sinais são emitidos, as interações físicas entre as células do nicho e as células-tronco, assim como os componentes do nicho, celulares ou não (WALKER et al., 2008).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

HIPÓTESE

As células-tronco pulpares de dentes permanentes humanos estão localizadas nas proximidades dos vasos sanguíneos deste tecido.

OBJETIVO GERAL

- Identificar a localização de células no tecido pulpar de dentes permanentes humanos, que expressem marcadores apresentados por células-tronco mesenquimais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura a respeito dos nichos de células-tronco, com ênfase nas células-tronco isoladas da polpa dentária.
- Revisar a literatura a respeito da atividade das células-tronco mesenquimais sobre o sistema imune.
- Avaliar no tecido pulpar de dentes permanentes humanos a expressão de biomarcadores usualmente utilizados para caracterizar células-tronco mesenquimais, assim como um novo marcador, através da técnica de imunohistoquímica.
- Avaliar em linhagens de células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes a expressão de biomarcadores usualmente utilizados para caracterizar células-tronco mesenquimais, assim como um novo marcador, através das técnicas de citometria de fluxo e *western blot*.

ARTIGO 1

Stem cells and their niches: importance in tissue engineering applied to dentistry.

Células-tronco e seus nichos: importância na engenharia de tecidos aplicada à odontologia.

Cíntia de Vasconcellos Machado; Ivana Lucia Oliveira Nascimento; Paloma Dias da Silva Telles.

Publicado na RGO - Revista Gaúcha de Odontologia, v.61, n.2, p. 263-286, abr./jun., 2013.

Abstract

Niches are special microenvironments in tissue where stem cells are located. At this sites, that are compound of stromal cells, extracellular matrix and soluble factors, complex molecular interactions occur, which maintain the essential properties of stem cells, like self-renewal and differentiation in multiple lineages, according to the organism needs. Some adult stem cell niches had already been described, but most of them remains unclear, including the dental pulp stem cells niches. The dental pulp stem cells were isolated from deciduous and permanent teeth and have the potential to self-renew and differentiate. However, little is known about the exact anatomic location of these cells, as well as the relationship between stem cells and surrounding cells in dental pulp. Understanding how stem cells behave in the niche is strongly important to extract these cells from the natural habitat, expand them in vitro and transplant the stem cells back to the patient, to repair and/or regenerate tissues and organs, with no risks to the individual integrity. Likewise, the knowledge of stem cell biology is crucial to the development of stem cell therapies, based on tissue engineering applied to dentistry, seeking the regeneration of dental tissues damaged or lost by caries, trauma or genetic diseases.

Indexing terms: stem cells, dental pulp, niche.

Resumo

Os nichos são microambientes especiais nos tecidos onde células-tronco de várias origens estão localizadas. Nestes sítios específicos, formados por vários tipos de células, matriz extracelular e fatores solúveis, complexas interações moleculares ocorrem para que a célula-tronco mantenha sua capacidade de autorrenovação e permaneça no seu estado indiferenciado ou se especialize em determinada linhagem celular, atendendo desta maneira

as necessidades do organismo. Alguns nichos de células-tronco adultas já foram descritos, embora a maioria permaneça desconhecida, como o das células-tronco pulpares. As células-tronco pulpares, já foram isoladas tanto de dentes decíduos como de permanentes e apresentam as características essenciais de uma célula-tronco, como capacidade de autorrenovação e multi-diferenciação. Apesar disso, pouco se sabe a respeito da localização anatômica destas células na polpa, assim como as possíveis interações funcionais entre as células-tronco pulpares e as células do estroma circundante. O entendimento de como as células-tronco interagem com o microambiente onde estão inseridas é essencial para que se possa extrair as mesmas do seu *habitat* natural, cultivá-las *in vitro* e aplicá-las em diferentes sítios para que promovam o reparo e/ou regeneração de tecidos e órgãos, sem que isso represente um risco à integridade do organismo. Da mesma forma, o conhecimento de como estas células se comportam e respondem ao meio é fundamental para o desenvolvimento de terapias baseadas na utilização de células-tronco, que através da engenharia de tecidos aplicada à odontologia, visa a reestruturação de tecidos dentários danificados e/ou perdidos por cárie, trauma ou distúrbios genéticos.

Termos de indexação: células-tronco, polpa dentária, nicho.

Introduction

Therapies based on application of stem cells have a great potential in the prevention and treatment of several diseases, like cancer, diabetes, cardiovascular disease, spinal cord injuries, neurological diseases such as Parkinson's and Alzheimer's, as well as in the regeneration of various tissues and organs. However, further studies are required to the complete understanding of the stem cell biology, which is fundamental for the development of successful cell-based therapies¹⁻³.

Stem cells are undifferentiated cells with an extraordinary capacity of self-renewal, that is, have the ability to generate other stem cells and perpetuate themselves. Likewise, these cells give rise to progenitor cells committed to a particular cell lineage, playing a crucial role in tissue repair and homeostasis.

According to the origin of these cells, they can be classified into embryonic stem cells (ESC) and adult stem cells (ASC). ESCs are pluripotent cells derived from the inner cell mass of the embryo at the blastocyst stage, and are able give rise to all three embryonic germ layers - ectoderm, endoderm, and mesoderm. However, these cells can induce the development of teratomas^{4,5}. In addition, legal and ethical issues difficult the use of these cells in scientific

studies. On the other hand, ASCs are present virtually in all tissues and organs of an organism at different stages of development, and are able to differentiate in one or more cellular types, but not in all, like ESCs. ASCs are also classified in hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stem cells (MSC)^{4,6-7}.

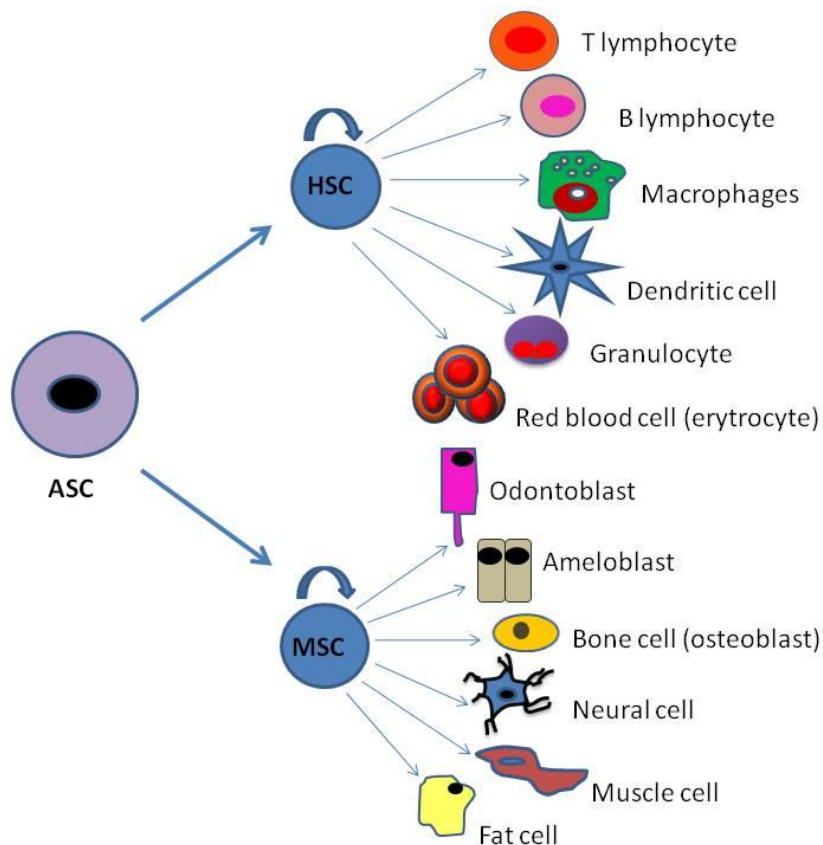


Figure 1. Schematic representation of self-renewal and multi-differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. ASC indicates adult stem cell; HSC, hematopoietic stem cell; MSC, mesenchymal stem cell.

MSCs are considered one of the most promising stem cell types, due to their availability in tissues, multi-differentiation capacity, lack of ethical problems and do not form teratomas⁸. Meanwhile, until now, there is no specific marker or combination of markers that identify MSCs⁹. For this reason, the isolation of MSCs also depends on the biological characteristics, like colony-forming capacity, fibroblast-like morphology (these cells are also known as colony-forming unit fibroblasts - CFU-Fs), plastic adherence, vigorous proliferative ability, self-renewal and multi-differentiation capacity⁸⁻⁹. Table 1 shows the surface markers

frequently expressed by MSCs isolated from different tissues. Likewise, markers with little or no expression are listed¹⁰⁻¹⁷.

Table 1. Surface antigens expressed by MSCs from various origins.

Expression	Surface antigen	References
Positive	STRO-1	10, 11, 12
	CD44	13, 14
	CD73	13, 14
	CD90	11, 12
	CD105	12, 14
	CD106	12, 15
	CD146	10, 12
	SSEA-1	16
	SSEA-4	17
Negative	CD31	12, 15
	CD34	14, 15
	CD45	14, 15
	CD80	11
	CD86	11
	HLA-DR	13

The key for the use of stem cell therapy in regeneration of tissues and organs is the ability of SCs to differentiate into several cell types, depending on the stimulus received¹⁸. Stem cells presents an enormous plasticity, being able to respond to the environment in which they are inserted, altering their original features and acquiring the characteristics of a given tissue, even if they had originated in a different site⁶. This ability of transdifferentiation has been evidenced in several studies¹⁹⁻²¹, emphasizing that the niche or microenvironment where the stem cells reside exerts a great influence over them²².

Stem cells: symmetric and asymmetric divisions

Most cells, including stem cells, can divide symmetrically, given rise to two identical cells. However, stem cells also have the ability to undergo asymmetric divisions, in which two distinct daughter cells are generated. This process results in the generation of a stem cell daughter that remains in the niche and a progenitor daughter that leaves the niche and differentiates into a particular mature cell. The asymmetric division consists in a fundamental strategy of stem cells to keep their self-renewal and differentiation capacity. An appropriate

stem cell number must be retained in the niche, as well as the demand for specialized cells in the surrounding tissues must be supplied, in order to maintain the organism homeostasis^{6,22-23}.

What are the stem cells niches?

Stem cells are located in special microenvironments called niches, which protects these cells from damage, as well as from inappropriate differentiation or apoptotic stimuli, and other stimuli that could challenge stem cell reserves and compromise tissue homeostasis²⁴. The niches are composed not only of stem cells but also a diversity of differentiated cells, extracellular matrix and soluble factors. Complex interactions among the components of the niche allow stem cells to preserve their unique intrinsic properties for long periods, including the maintenance of their undifferentiated state, their ability to self renew, as well as their capacity of give rise to different cell types^{22,25}.

There is a constant cross-talk between stem cells and the surrounding niche cells that sometimes stimulates the differentiation of stem cells into progenitor cells and sometimes protects them from many different stimuli. The primary function of the niche is to anchor stem cells and keep physical organization in a particular location in tissues. Adhesion molecules like N-cadherins and integrins are essential for maintenance of HSCs in the niche for example. The microenvironment also exerts a regulatory role over stem cells, safeguarding excessive stem cells production that could lead to cancer²³⁻²⁴.

Thus, a hallmark of a functional niche is to maintain the perfect balance between quiescence and activity of stem cells. This delicate equilibrium plays a key role during embryonic development, as well as in tissue regeneration, replenishing lost cells due to apoptosis or due to tissue damage²²⁻²⁴. This special and unique relationship between stem cells and their niche occurs through cell-to-cell direct contact and through the release of different soluble molecules, like cytokines, chemokines and growth factors. The combination among the intrinsic genetic characteristics of stem cells and their microenvironment will drive their properties, as well as define the potential for clinical application of these cells²⁶.

Structure of different stem cell niches

The stem cell niches vary in nature and location depending on the tissue type²³. Exactly when and how these stem cell “sanctuaries” develop in tissues remains unclear²². What is known is that there is a considerable variation in structure and organization of these special microenvironments that shelters different types of stem cells²⁷.

In mammals, some adult stem cell niches were already indentified successfully. Epithelial stem cells reside in the bulge area of hair follicles, near the sebaceous glands. Upon activation, these cells give rise to daughter cells that are retained in the bulge and remain as stem cells, or to progenitor cells responsible for hair regeneration. These cells can also convert to epidermal progenitors and replenish lost or damaged epidermis^{23,28}. In the other hand, the intestinal stem cell niche was identified near the crypt base of the small intestine. At this region, the intestinal stem cells are in close contact and interaction with MSCs²⁹.

Bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) are the best characterized stem cell population until now²⁴. HSCs are located proximal to the endosteal surface of trabecular bone in bone marrow, in direct contact with the osteoblasts. HSCs are attached to osteoblasts through a specific adhesive interaction between N-cadherin and β -catenin³⁰, although other adhesion molecules are important in this process, like integrins²². In this location, MSCs appear to be an important component of the HSC niche³¹. HSCs were also identified in association with blood vessels in bone marrow, indicating that more than one niche may harbor stem cells in the same tissue³².

In the nervous system, the neural stem cells (NSC) are located near the blood vessels at the subventricular zone of the lateral ventricle and at the subgranular zone of the hippocampus region³³. The endothelial cells, which are essential components of the NSC niche, provide the adhesion of the stem cells in these sites and generate a variety of signals that control the self-renewal and lineage differentiation³⁴.

Stem cells in the dental pulp and the niche

Mesenchymal stem cells can be isolated from almost all tissues in the organism, including dental pulp. Although mesenchymal stem cells have already been isolated from deciduous and permanent teeth, there is a lack of information regarding the precise anatomical location of these cells^{19,35-36}. This is mainly attributed to the rarity of stem cells in the pulp, as well as the absence of specific MSC markers that identify different developmental stages of these cells during odontogenesis, like ectomesenchymatic stem cells, cells from dental papilla, dental pulp stem cells, precursors cells from the pulp, pre-odontoblasts and mature odontoblasts⁹⁻¹⁰.

In a traditional view of dental pulp, the cell rich zone, situated close to the odontoblast layer, shelters a population of stem/progenitors cells, serving as a reservoir for replacement of odontoblasts damaged by carious process⁹. However, Shi & Gronthos¹⁰ demonstrated that the

localization of stem cells in dental pulp is restricted to the perivascular region and to the perineurium of dental pulp fiber nerves, but is absent in the odontoblastic layer and in the surrounding fibrous tissue. Likewise, it was demonstrated that the damage caused to the dental pulp tissue stimulated the migration of stem/progenitor cells located in perivascular areas in dental pulp towards the injury site³⁷.

According to Scadden²⁵, both endothelial cells, pericytes as smooth muscle cells surrounding blood vessels may constitute the MSC niche, and contribute to a perivascular location of these cells. Recent studies that associate the location of MSCs to blood vessels, suggest a strong correlation between MSCs and pericytes³⁸. Typical pericyte markers, like CD146, were also expressed in MSCs from several tissues, including dental pulp^{10,39}.

Localization of MSCs to perivascular sites throughout the body would provide to these cells easy access to all tissues in the organism. In case of an injury, MSCs would be released by the rupture of blood vessels, migrate to the affected site and differentiate in the required cell type, promoting tissue repair⁴⁰. In the affected area, MSCs would be capable of secreting immunomodulatory molecules, minimizing the extent of tissue damage and decreasing the inflammatory response, allowing the tissue regeneration^{8,14}. Similarly, the secretion of trophic factors by MSCs in the damaged area could inhibit apoptosis, stimulate angiogenesis, as well as stimulate mitosis of tissue-intrinsic progenitors⁴¹.

Importance of stem cells in dental pulp

Despite the technological advances in dentistry, to this date, no restorative material can contemplate all ideal physical, mechanical and biological properties to replace dental tissues⁴. Theoretically, biomaterials developed from autogenous tissues should be the best choice for clinical reconstruction of teeth lost or damaged by oral diseases, trauma or genetic disorders, besides the repair of craniofacial bone defects^{9,42-44}. Thus, tissue engineering applied to dentistry, through the use of stem cell therapies, could contemplate in a masterful way this innovative and promising proposal.

MSCs obtained from the pulp of deciduous (SHEDs - stem cells from human exfoliated deciduous teeth)³⁶ and permanent teeth (DPSCs - postnatal human dental pulp stem cells)³⁵ may play a crucial role in the regeneration of pulp-dentin complex, through the differentiation into functional odontoblasts. Different studies showed that when these cells were transplanted into the subcutaneous space of immunocompromised mice, in association with biodegradable scaffolds and specific growth factors, areas of vascularized pulp tissue, surrounded by a

layer of odontoblasts associated with dentin-like structures were observed^{3,19,35-36,45}. According to Murray & Garcia-Godoy⁴³, dental tissues developed from stem cells derived from human dental pulp have the same chemical, physical and aesthetic characteristics of a natural tooth.

An efficient vascular network is fundamental for the correct functioning of a regenerated or implanted tissue, promoting an adequate supply of oxygen and nutrients. Recent studies demonstrated the differentiation potential of SHEDs into vascular endothelial cells, induced by the presence of VEGF (vascular endothelial growth factor), which is considered the most important growth factor related to angiogenesis and vasculogenesis⁴⁵⁻⁴⁶. These differentiated endothelial cells were able to form functional blood vessels, which are crucial for the development of a “new tissue”, in cases of pulp necrosis for example. Likewise, dental pulp stem cells were capable of differentiate into osteoblasts, indicating that the use of stem cells may constitute a viable therapy in cases of several bone loss due to periodontal disease, trauma or anodontia⁴⁷.

Mesenchymal stem cells isolated from dental pulp, besides the regeneration of orofacial structures, can be considered a promising alternative in the treatment of various, conditions, such as muscular dystrophy, spinal cord injuries, autoimmune diseases, ischemic disorders, among others, emphasizing the ability of DPSCs and SHEDs specialization into different cell types^{45,48-50}. The combination of characteristics such as self-renewal, high proliferation capacity, as well as the easy access and availability, make the dental pulp an attractive source of MSCs for tissue regeneration, especially those cells extracted from deciduous teeth, which are usually disposed after physiological exfoliation³.

Final considerations

The knowledge of how stem cells are inserted in their physiological microenvironment is crucial for the elucidation of the biology of these cells. In other words, understanding how niche cells and extracellular matrix control stem cell fate is critical for the development of therapies that apply stem cells in the prevention and treatment of several diseases, as well as in the regeneration of organs and tissues such as teeth and craniofacial structures.

Collaborators

All authors participated in the conception, data collection and composition of the article.

References

1. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*; 2004; 95 (1): 9-20.
2. 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.
3. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011; 99 (1): 1-7.
4. Nadig RR. Stem Cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009; 12 (4): 131-8.
5. Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2006; 329: 459-67.
6. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol*. 2004; 32 (7): 585-98.
7. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119 (11): 2204-13.
8. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (9): 2287-99.
9. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev Rep*. 2011; 7 (1): 161-71.
10. 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.
11. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (9): 726-36.
12. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble Jm, *et al*. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006; 99 (5): 1285-97.
13. Govindasamy V, Ronald VS, Totey S, Din SB, Mustafa WM, Totey S, *et al*. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem cells - and economic and commercial angle. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46 (9): 764-73.
14. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105 (4): 1815-22.

15. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999; 181 (1): 67-73.
16. Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* 2007; 109 (1): 1298-306.
17. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007; 109 (15): 1743-51.
18. Kolya CL, Castanho FL. Células-tronco e a odontologia. *ConScientiae Saúde.* 2007; 6 (1): 165-71.
19. 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.
20. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M, *et al.* Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem cells.* 2006; 24 (11): 2493-503.
21. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008; 26 (7): 1787-95.
22. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116 (19): 769-78.
23. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 605-31.
24. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science.* 2006; 311 (31): 1880-5.
25. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006; 44 (29): 1075-9.
26. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, *et al.* Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010; 70 (1): 9969-78.
27. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008; 132 (22): 598-611.

28. Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005; 11 (12): 1351-4.
29. Booth C, Potten C. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest.* 2000; 105 (11): 1493-9.
30. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003; 425 (6960): 836-41.
31. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res.* 2007; 313 (16): 3377-85.
32. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish haematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005; 121 (7): 1109-21.
33. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13 (5): 543-50.
34. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004; 304 (5675): 1338-40.
35. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PNAS.* 2000; 97 (25): 13625-30.
36. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS.* 2003; 100 (10): 5807-12.
37. T  cl  s O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, *et al.* Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol.* 2005; 50 (2): 103-8.
38. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008; 11 (3): 301-13.
39. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008; 11 (3): 229-30.
40. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9 (1): 204.
41. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006; 98 (5): 1076-84.

42. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004; 83 (7): 523-8.
43. Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev.* 2004; 13 (3): 255-62.
44. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, *et al.* SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008; 14 (5): 428-34.
45. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S *et al.* Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008; 34 (8): 962-69.
46. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MAAM, Shi S, *et al.* SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010; 89 (8): 791-6.
47. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007; 14 (6): 1162-71.
48. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons *in vitro*, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol.* 2001; 238 (1): 120-32.
49. Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, *et al.* Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? *J Transl Med.* 2008; 6: 35.
50. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, *et al.* Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1 (1): 5.

ARTIGO 2

Immunologic characteristics of mesenchymal stem cells.

Características imunológicas das células-tronco mesenquimais.

Cíntia de Vasconcellos Machado; Paloma Dias da Silva Telles; Ivana Lucia Oliveira Nascimento.

Publicado na RBHH - Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.35, n.1, p.62-7, 2013.

Abstract

Although bone marrow is the main source, mesenchymal stem cells have already been isolated from various other tissues, like liver, pancreas, adipose tissue, peripheral blood and dental pulp. These plastic adherent cells are morphologically similar to fibroblasts and have a high proliferative potential. This special group of cells possesses two essential characteristics: self-renewal and differentiation into various cell types, with appropriate stimuli. Mesenchymal stem cells are considered immunologically privileged, since they do not express costimulatory molecules on their surface, required for complete T cell activation. Several studies have shown that these cells exert an immunosuppressive effect on cells from both innate and acquired immunity. Mesenchymal stem cells can regulate the immune response, in vitro, by inhibiting the maturation of dendritic cells, as well as by suppressing the proliferation and function of T and B lymphocytes and natural killer cells. These special properties of mesenchymal stem cells make them a promising strategy in the treatment of immune mediated disorders, like graft-versus-host disease and autoimmune diseases, as well as in regenerative medicine. The understanding of immune regulation mechanisms of mesenchymal stem cells, and also those involved in the differentiation of these cells in various lineages is primordial for their successful and safety application in several areas of medicine.

Key words: *Mesenchymal stem cells, Immunomodulation, Immune system*

Resumo

Embora a medula óssea seja a sua principal fonte, as células-tronco mesenquimais já foram isoladas de diversos locais do organismo, como fígado, pâncreas, tecido adiposo, sangue periférico e polpa dentária. São células aderentes ao plástico e morfologicamente semelhantes aos fibroblastos, as quais possuem um grande potencial de proliferação. Este

grupo especial de células apresenta duas características fundamentais para que sejam consideradas células-tronco: capacidade de autorrenovação e de multidiferenciação, quando submetidas a estímulos apropriados. As células-tronco mesenquimais são consideradas imunologicamente privilegiadas, visto que não expressam em sua superfície moléculas co-estimulatórias, necessárias para a completa ativação das células T. Vários estudos têm mostrado que as células-tronco mesenquimais exercem um efeito imunossupressor sobre diferentes células, tanto da imunidade inata como da adquirida. As células-tronco mesenquimais conseguem regular a resposta imunológica *in vitro*, através da inibição da maturação de células dendríticas, assim como através da supressão da proliferação e função de células T, células B e células *natural killer*. Estas propriedades especiais fazem com que as terapias baseadas nas células-tronco mesenquimais tornem-se uma promissora estratégia no tratamento de diversas doenças mediadas pelo sistema imune, como a doença do enxerto-*versus*-hospedeiro e doenças autoimunes, assim como na regeneração de diferentes órgãos e tecidos. A compreensão dos mecanismos imunomodulatórios exercidos pelas células-tronco mesenquimais, assim como os envolvidos na diferenciação destas células em diferentes linhagens, é essencial para o sucesso e a segurança da aplicação das mesmas nas mais diversas áreas da medicina.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, Imunomodulação, Sistema imunológico

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are plastic adherent cells and morphologically similar to fibroblasts, which are able to self-renewal and multilineage differentiation under appropriate conditions.⁽¹⁾ This capacity of generate mature cells of a particularly tissue was shown in several studies, where MSCs were able to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and even neurocytes.⁽²⁻⁵⁾ Due to these special characteristics, in addition to the availability of these cells in various tissues, high proliferation rate, as well as lack of ethical and legal problems with their use in research, MSCs are considered one of the most promising types of stem cells, with respect to tissue engineering and application of stem cell therapies in the prevention and treatment of several conditions.⁽⁶⁻⁸⁾

Mesenchymal stem cells were first isolated from the bone marrow (BMMCs), and are located at the stroma of this tissue. In bone marrow, MSCs are an important component of the hematopoietic stem cells (HSCs) niche, the best characterized adult stem cell until now.^(1,9) The search for MSC-like cells in specific tissues has led to the discovery of a variety of stem

cells in different tissues and organs, like pancreas, liver, cornea, retina, adipose tissue, umbilical cord, peripheral blood, intestine and dental pulp.^(2,5,10-12) The presence of stem cells in different sites of organism suggests that these cells are involved in the repair and/or regeneration of tissues throughout the live of an individual.⁽¹³⁾

Although there is a wide range of positive markers described for MSCs, up to now, no single specific marker has been identified. For this reason, biological characteristics such as plastic adherence, expression of certain surface markers, self-renewal and capacity of differentiation in other cell types are important requirements to a cell to be considered a MSC.⁽¹⁾ Some of the most frequently surface markers expressed by MSCs include STRO-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, SSEA-1 and SSEA-4, while these cells are negative for CD31, CD34, CD45, CD80, CD86 and HLA-DR.^(9,14-22)

Several studies have been demonstrated the immunomodulatory capacity of MSCs over different cells from immune system.^(18,22-32) This unique feature of MSCs has a great importance in the field of transplantation, treatment of autoimmune diseases, as well as in the modulation of inflammatory responses.

Immunologic profile of MSCs

By flow cytometry, human MSCs isolated from bone marrow present positive expression for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, minimal expression for MHC class II and do not express the co-stimulatory molecules CD40, CD40 ligant, CD80 and CD86.^(22,23,27,33) MSCs stimulated with the pro-inflammatory cytokine interferon γ (IFN- γ) can upregulate the expression of MHC class I molecules and induce the expression of MHC class II,^(22,27,34) but are not able to modify the expression of co-stimulatory molecules.^(22,27) Besides the attempt to increase the stimulatory capacity of MCSs, the treatment of these cells with IFN- γ aimed to reproduce an inflammatory condition in organism, since MSCs may be used in sites of inflammation.⁽²⁷⁾

When MSCs are induced to differentiate along the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages, they express MHC class I, but not MHC class II molecules on their surface. After cell treatment with IFN- γ for 48 hours, it was observed a slight increase in the expression of MHC class II on cells differentiated in the chondrogenic lineage, no expression of these molecules in the adipogenic lineage and even a decreased expression of MHC class II molecules on cells differentiated in the osteogenic lineage, when compared with undifferentiated MSCs.⁽³⁴⁾

This phenotype observed in undifferentiated and differentiated MSCs (along the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages) is considered nonimmunogenic and suggests that these cells can induce tolerance. MHC class II molecules can activate alloreactive T cells, but in the absence of co-stimulatory molecules, the secondary signal would not be activated, leading to the anergy of T cells.⁽³⁾

Immunomodulatory capacity of MSCs

Normally, allogeneic cells are deleted by host immune system. The major surprise to immunologists was the observation that MSCs do not follow these “rules” of immune rejection. Apart from not being recognized as alloantigens, MSCs are able to suppress the activation and proliferation of different cells of the host immune system.^(22,28,29,31,35)

Dendritic cells

It has been observed that MSCs are capable of interfere in the differentiation, maturation and function of dendritic cells (DCs),^(25,30,35) which are considered the most efficient antigen presenting cells (APCs), playing a crucial role in orchestrating cellular and humoral immune responses against self and foreign antigens.⁽³⁶⁾ MSCs and their supernatants can interfere with endocytosis of DCs, as well as are able to affect the capacity of these cells to secrete IL-12 and activate alloreactive T cells.⁽²⁵⁾ The inhibition of molecules associated with antigen presentation, like CD40, CD83, CD80, CD86 and HLA-DR was observed during DC differentiation, when these cells were in contact with MSCs.⁽²⁵⁾ These results agree with those observed in other studies, where MSCs prevented the differentiation of monocytes from peripheral blood into dendritic cells.^(30,37) The DCs cytokine secretion profile can be altered by MSCs, stimulating the production of anti-inflammatory molecules, such as IL-10, and inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines, like tumor necrosis factor (TNF) and IL-12.⁽¹⁸⁾

T cells

Results of different studies have been shown that when MSCs are cocultivated with mixed lymphocyte cultures, the T cell proliferation is suppressed.^(22,27,34,38,39) This immunosuppressive ability of MSCs was demonstrated in different species, like humans, mice⁽⁴⁰⁾ and baboons.⁽⁴¹⁾ It seems that the inhibitory effect of MSCs is dose-dependent, since when higher concentrations of stem cells are added to the cell culture, the inhibition is more

pronounced.^(38,39) Likewise, this unique ability of MSCs to inhibit T cell alloresponses appears to be independent of the major histocompatibility complex, as similar results were obtained when autologous or allogeneic MSCs were used.⁽³⁹⁾

Allogeneic MSCs were not capable to induce T cell proliferation, even when the culture medium was supplemented with the potent pro-inflammatory cytokine IFN- γ , or when MSCs were transfected with co-stimulatory molecules. Conversely, T cells responded vigorously to allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Important cytokines in APC function, like IL-1 α , IL-1 β and TNF, were ineffective in generating T cell proliferative responses to allogeneic MSCs. It could be attributed to active suppressive mechanisms of MSCs over T cell proliferation, rather than the lack of immunogenicity or tolerance induction.⁽²⁷⁾

MSCs can interfere in the differentiation of naive TCD4⁺ cells into T helper 1 (Th1) effector cells. When mesenchymal stem cells were present during the T cell differentiation, there was a significant decrease in the amount of IFN- γ production (about 50%). In contrast, when MSCs cells were present during Th2 cells differentiation, there was a significant increase in the amount in the IL-4 production. These results indicate that MSCs may play an anti-inflammatory and regulatory role, directing the profile of cytokines produced by these immune cells.⁽¹⁸⁾

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) can lyse allogeneic cells after antigen recognition via MHC class I.⁽³⁶⁾ When MSCs were added early in a mixed lymphocyte culture (MLC) they inhibited the cytotoxicity, presumably by preventing the formation of active CTLs. However, little effect on cytotoxicity was noted when these cells were added to MLC in the cytotoxic phase of CTLs. MSCs were not lysed by allogeneic CTLs, suggesting that these cells can escape recognition by cytotoxic lymphocytes.⁽⁴²⁾

MSCs differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes retain the ability of inhibit the proliferation of T cells in mixed lymphocyte cultures. Also, it was seen that in cultures of MSCs differentiated along the osteogenic (OS) lineage, the suppressive effect on T cells was increased.⁽³⁴⁾ Even after the treatment of OS-differentiated MSCs with IFN- γ , it was not observed a proliferative response of T cells, when these two cell types were cocultured.⁽²⁷⁾

B cells

MSCs exert an inhibitory effect on the proliferation of B cells,^(28,31,43) as well as are able to suppress terminal differentiation of these cells into plasmocytes.^(28,31) In addition, MSCs can

inhibit the chemotactic properties of B cells, since the B cells chemokine receptors CXCR4, CXCR5, CXCL12 and CXCR4 ligand are downregulated when B cells are cocultured with MSCs.⁽²⁸⁾

This suppressive effect of MSCs on the B cells function was also evaluated *in vivo*. The humoral factor(s) from MSCs released in culture medium were capable to suppress the antigen-specific IgM and IgG1 secretion in mice immunized with T-cell-dependent and T-cell-independent antigens.⁽³¹⁾ These results confirm previous *in vitro* studies, where the addition of MSCs to a mixed lymphocyte culture⁽⁴⁴⁾ or the coculture of MSCs and purified B cells from peripheral blood⁽²⁸⁾ suppressed the production of IgM, IgG and IgA.

NK cells

Natural killer (NK) cells, which are considered the major effector cells of the innate immunity, are also influenced by the immunomodulatory potential of MSCs. When MSCs were co-cultured with NK cells (stimulated by IL-2), there was a decreased secretion of IFN- γ from these cells.⁽¹⁸⁾ Furthermore, activating receptors like NKp30 and NKp44 were downregulated on these innate immune cells. Likewise, a marked decrease in the cytolytic capacity of NK cells was observed.⁽²⁹⁾

The expression of MHC class I by MSCs protects themselves from certain mechanisms of deletion by the NK cells. Tumor cells, as well as virus infected cells, which have little or no expression of MHC class I, are usually killed by NK cells.⁽³³⁾

Immunosuppressive mechanisms of MSCs

Although data from several research suggest that the use of MSCs in regenerative therapies could be successful, the mechanisms responsible for the tolerance of the host immune system to MSCs are not fully understood.⁽³³⁾ Some possible mechanisms were pointed, such as the induction of an immunosuppressive local microenvironment by MSCs, the ability of immunomodulation of immune cells phenotype by MSCs and finally, the lack of immunogenicity of MSCs. Possibly, all these mechanisms are inter-related and involve both the direct contact between cells and indirect mechanisms, through the production and release of soluble factors, such as cytokines.⁽³³⁾

The involvement of soluble molecules in the suppressive activity of MSCs on T cells was demonstrated in a study where TCD4⁺ e TCD8⁺ cells were cocultured with MSCs in transwell chambers. Although the cells were not in direct contact, a reduction in T cells

proliferation was noted.⁽²³⁾ Similar results were found by other researches, evidencing the immunosuppressive effect of MSCs over T⁽²⁷⁾ and B cells⁽³¹⁾, even in the presence of the membrane, indicating that cell-cell contact is not essential. Interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor β (TGF- β), hematopoietic growth factor (HGF), prostaglandin E2 (PGE₂), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and nitric oxide (NO) were some of soluble molecules associated with the immunosuppressive effect of MSCs.^(18,23,33,45-47)

Another important soluble molecule involved in the immunoregulation of MSCs is HLA-G5. This protein is a nonclassic molecule from human leukocyte antigen (HLA) class I, that protects the fetus against rejection from maternal immune system.⁽⁴⁸⁾ The isoform HLA-G5, released by MSCs after contact with allostimulated T cells, contributes for the immunomodulatory properties of MSCs, since this molecule can suppress the allogeneic T cells proliferation and can also induce the expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells (Tregs). With regard to innate immunity, HLA-G5 is able to inhibit the lysis of MSCs mediated by NK cells, as well as the secretion of IFN- γ by these cells.⁽⁴⁹⁾

For Krampera et al., the inhibitory effect of MSCs on T cells is due exclusively to the direct contact between the two cell types, where MSCs physically hinder T cells from the contact with APCs, impairing antigen presentation and, consequently, preventing the activation and proliferation of T cells.⁽³⁸⁾

Although several studies have identified different soluble factors as possible mechanisms of immune regulation by MSCs, blocking any of these molecules does not result in a complete loss of the immunosuppressive capacity of MSCs, suggesting that the immune regulation by MSCs is a complex phenomenon, where distinct mechanisms act synergistically.⁽⁵⁰⁾

Regulatory T cells play an important role in the induction of peripheral tolerance and inhibition of pro-inflammatory immune responses.⁽³²⁾ This special cell population suppress the activation of the immune system, maintaining organism homeostasis and tolerance to self antigens.⁽¹⁸⁾ It was suggested that MSCs exert their immunosuppressive activity inducing an increase in the proportion of CD4⁺CD25⁺ Tregs.⁽¹⁸⁾ Besides providing the significant expansion of Tregs, MSCs are able to increase the inhibitory capacity of these cells.⁽³²⁾

Therapeutic application of MSCs

The immunosuppressive nature of MSCs is of great relevance in the field of allogeneic transplantations, since this “immunologically privileged” cell population could be used to

reduce the incidence and severity of graft-versus-host disease, (GvHD).⁽³⁹⁾ Acute severe GvHD is a serious complication associated with the transplantation of allogeneic hematopoietic grafts. The observation that MSCs induce the inhibition of mixed lymphocyte cultures and T cells, regardless of the MHC, may have important clinical implications.

Le Blanc et al. reported a surprising improvement in the clinical response of a 9-year-old boy with severe acute GvHD of the gut and liver, resistant to conventional therapy, after infusion with allogeneic MSCs. The patient developed diarrhea up to 20 times daily and a high concentration of bilirubin. Four days after the intravenous infusion with MSCs (2×10^6 cells per kg), the frequency of diarrhea fell to twice daily and there was a decline in total bilirubin.⁽⁶⁾

In a phase II experimental study, which included 55 patients with severe acute GvHD grades III and IV, steroid-resistant, it was observed a complete response to the treatment in 30 patients and nine showed improvements, after a infusion of allogeneic MSCs isolated from bone marrow ($1,4 \times 10^6$ cells per kg). Survival of patients with complete response was significantly higher than those with partial response or no response to the treatment with MSCs.⁽⁵¹⁾

Several studies have shown that MSCs contribute to tissue repair and that could be employed for the regeneration of different tissues in organism. Allogeneic murine MSCs injected directly into the infarcted heart, or administered intravenously in the animals were able to home to the site of injury, as well as prevent deleterious remodeling of heart tissue.⁽⁷⁾ In an experimental model of Duchenne muscular dystrophy in mice, human MSCs isolated from the synovial membrane, promoted the regeneration of skeletal muscle tissue.⁽⁵²⁾ Likewise, the transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) with hydroxyapatite and tricalcium phosphate in bone defects produced in the calvaria of mice, were able to repair the defects with substantial bone formation.⁽⁵³⁾

Osteogenesis imperfecta (OI) is a genetic disorder caused by a deficiency in the production of type I collagen, the major structural protein in bone, resulting in bone fragility and growth deficiency.⁽⁵⁴⁾ Horwitz et al. reported a significant increase in body length and in the bone mineralization in five children with severe OI after allogeneic bone marrow transplantation from HLA-compatible donors.⁽⁵⁵⁾ In another study, an acceleration of growth velocity in six children with OI was observed after infusion with purified bone marrow MSCs.⁽⁵⁶⁾ These studies indicate that the use of MSCs to treat severe OI may represent a promising approach for this condition.

The known immunomodulatory characteristics of MSCs has also been used for development of therapies to treat autoimmune diseases.⁽⁵⁰⁾ In a murine model of experimental arthritis, the administration of human adipose-derived MSCs significantly reduced the incidence and severity of the disease. This therapeutic strategy decreased the production of various inflammatory cytokines and chemokines, decreased antigen-specific Th1/Th17 cell expansion, and induced the production of IL-10 in lymph nodes and joints. Also, it was observed the generation of antigen-specific regulatory T cells with the capacity of suppress self-reactive T effector responses.⁽⁵⁷⁾ In relation to autoimmune type I diabetes, the administration of allogeneic murine MSCs delayed the onset of disease in prediabetic NOD mice, promoting a shift toward Th2 immune response.⁽⁵⁸⁾ Similarly, murine MSCs were able to prevent the beta cell destruction in NOD mice, through the induction of regulatory T cells.⁽⁵⁹⁾ In the search for more effective and safe therapies to treat systemic lupus erythematosus (SLE), Sun and colleagues used an infusion of allogeneic bone marrow MSCs (1×10^6 cells per kg) in four patients with acute disease and nephritis caused by SLE, unresponsive to intravenous cyclophosphamide and oral prednisone. Promising results were found, like the recovery of regulatory T cells (CD4+Foxp3+) levels and a significant improvement in renal function. Besides, it was observed a stable 12-18 months disease remission in all treated patients.⁽⁶⁰⁾

Conclusions

The evident immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells over immune system cells, as well as the capacity of multidifferentiation and application of this special group of cells in the regeneration of damaged tissue, suggests that MSCs present a great potential for use in immunotherapy and tissue engineering.

However, *in vivo* well delineated studies regarding immunogenicity, mechanisms of immunomodulation and differentiation of MSCs, as well as the safe use of these cells in long term, are necessary for their application in different clinical conditions.

References

1. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(suppl 1):25-35.
2. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(10):5807-12.

3. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
4. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(4):435-41.
5. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galiè M, Rigotti G, Mosna F, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone.* 2007;40(2):382-90.
6. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363(12):1439-41.
7. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004;95(1):9-20.
8. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(9):2287-99.
9. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-30.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey G, 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.
11. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wrigth NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):585-97.
12. Nadig RR. Stem Cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent.* 2009;12(4):131-8.
13. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol.* 2004;32(7):585-98.
14. 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.
15. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36.
16. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1285-97.
17. Govindasamy V, Ronald VS, Totey S, Din SB, Mustafa WM, Totey S, et al. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem

- cells - and economic and commercial angle. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(9):764-73.
18. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
 19. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.
 20. Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* 2007;109(1):1298-306.
 21. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007;109(15):1743-51.
 22. Tse WT, Pendleton JD, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75(3):389-97.
 23. DiNicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-43.
 24. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5(6):485-9.
 25. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(3):263-71.
 26. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105(7):2821-7.
 27. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.
 28. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
 29. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111(3):1327-33.

30. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83.
31. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu C, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*. 2009;37(5):604-15.
32. Tolar J, Hippen KL, Blazar BR. Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells. *Br J Haematol*. 2009;147(2):200-6.
33. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005; 2:8.
34. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl, Zetterberg, Ringén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890-6.
35. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
36. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2007. 566 p.
37. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2080-7.
38. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-9.
39. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003;57(1):11-20.
40. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003;102(10):3837-44.
41. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30(1):42-8.

42. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003;76(8):1208-13.
43. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1482-90.
44. Comoli P, Ginevri, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced *in vitro* by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(4):1196-202.
45. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dillo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cells responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619-21.
46. Sato K, Ozaki, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228-34.
47. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2010;184(10):5885-94.
48. Hunt JS, Petroff MG, Morales P, Sedlmayr P, Geraghty DE, Ober C. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface. *Hum Immunol*. 2000;61(11):1113-7.
49. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26 (1):212-22.
50. Bassi EJ, Aita CAM, Câmara NOS. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 2011;3(1):1-8.
51. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86.
52. De Bari C, Dell' Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*. 2003;160(6):909-18.

53. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008;14(5):428-34.
54. Rios D, Vieira ALF, Tenuda LMA, Machado MAAM. Osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta: associated disorders. *Quintessence Int.* 2005;36(9):695-701.
55. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WWK, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 2001;97(5):1227-31.
56. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8932-7.
57. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1006-19.
58. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 2009;183(2):993-1004.
59. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia.* 2009;52(7):1391-9.
60. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells.* 2009;27(6):1421-32.

ARTIGO 3

Imunolocalização de células STRO-1, CD90 e ALDH positivas na polpa de dentes permanentes humanos.

Immunolocalization of STRO-1, CD90 and ALDH positive cells in the pulp of human permanent teeth.

Resumo

As células-tronco estão localizadas em microambientes especializados nos tecidos, denominados nichos, os quais controlam o destino destas células, ou seja, se vão se diferenciar em alguma linhagem específica e deixar o nicho ou se vão se autorrenovar e permanecer no mesmo. Embora alguns estudos já tenham sido realizados, ainda não está clara a localização anatômica das células-tronco mesenquimais (MSCs) na polpa dentária. O objetivo deste estudo foi detectar, através da técnica de imunohistoquímica, células positivas para STRO-1 e CD90, marcadores usualmente utilizados para caracterização imunofenotípica e seleção de células-tronco mesenquimais, assim células positivas para a aldeído desidrogenase (ALDH), enzima que tem sido empregada para identificação de células-tronco hematopoiéticas e também tumorais. Da mesma forma, Para tanto, a polpa dental de nove terceiros molares e pré-molares hígidos foi coletada, fixada e processada. A análise imunohistoquímica mostrou células positivas para os marcadores ALDH e CD90 essencialmente nos espaços perivasculares e nas fibras nervosas do tecido pulpar. Embora apresentando uma expressão menos pronunciada que as outras proteínas testadas, células imunomarcadas com STRO-1 também foram detectadas nas estruturas vasculares e nervosas da polpa de dentes permanentes humanos. Os resultados deste estudo sugerem que as células-tronco mesenquimais pulpares residem nas proximidades dos vasos sanguíneos e das fibras nervosas deste tecido, assim como apontam para a possibilidade de existência de mais de um nicho de MSCs na polpa dentária, visto que células expressando marcadores associados às mesmas células foram identificadas nestas regiões.

Palavras-chave: polpa dentária, células-tronco mesenquimais, nicho, imunohistoquímica.

Abstract

Stem cells are located in specialized microenvironments called niches, which control the fate of these cells. In other words, they decide if the stem cells should differentiate into a specific cell lineage or if they should undergo self-renewal. Although some studies have already been carried out, the precise anatomical location of mesenchymal stem cells (MSCs) in the dental pulp is not clear yet. The aim of this study was to detect, by immunohistochemistry, STRO-1 and CD90 positive cells, which are markers usually employed for immunophenotypic characterization and selection of MSCs, as well as cells expressing the aldehyde dehydrogenase (ALDH), a cytosolic enzyme that has been used to identify hematopoietic stem cells and cancer stem cells. For this purpose, the dental pulp of nine third molars and premolars were collected, fixed and processed. Immunohistochemical analysis showed that CD90 and ALDH positive cells were located in the perivascular areas and in the nerve fibers of the pulp tissue. Although cells immunostained with STRO-1 have shown a less marked expression when compared with the other proteins tested, these cells were also detected in the vascular and nervous structures of the human permanent teeth pulp. The results of this study suggests that dental pulp stem cells reside in the vicinity of blood vessels and in the nerve fibers of this tissue, as well as indicates the possibility of existence of more than one niche of MSCs in the dental pulp, whereas positive cells for stem cell markers were identified in these regions.

Key words: *denta pulp, mesenchymal stem cells, niche, immunohistochemistry.*

Introdução

As células-tronco mesenquimais (MSCs) compreendem uma população de células progenitoras, multipotentes, capazes de se replicar como células indiferenciadas, assim como possuem a habilidade de se diferenciar em linhagens de tecidos distintos, incluindo tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular^{1,2}. As MSCs foram obtidas pela primeira vez a partir da medula óssea, mas hoje, após inúmeras pesquisas, acredita-se que esta população especial de células está presente virtualmente em todos os órgãos e tecidos do organismo³.

As células-tronco residem em microambientes especiais nos tecidos, chamados de nichos, os quais conceitualmente são formados pelas próprias células-tronco, por outros tipos de células e matriz extracelular. Evidências mostram que o microambiente no qual as células-tronco estão inseridas exerce uma grande influência no que diz respeito à diferenciação ou à manutenção do estado indiferenciado destas células, através da sinalização molecular entre as

diferentes células do nicho e a matriz extracelular⁴. Um exemplo a respeito da importância do microambiente na regulação da função de uma célula-tronco tem sido demonstrada pela capacidade de células do estroma da medula óssea, entre elas as MSCs, em manterem as funções de autorrenovação, diferenciação ou morte celular das células-tronco hematopoiéticas (HSCs) *in vitro*⁵.

A localização exata das MSCs *in vivo* ainda permanece pouco conhecida, mas evidências indicam que estas células estão situadas próximas aos vasos sanguíneos nos tecidos aos quais pertencem³. Na tentativa de identificar o nicho de células-tronco na polpa de dentes permanentes, Shi & Gronthos (2003)⁶ avaliaram a expressão de uma combinação de marcadores (STRO-1, marcador de células-tronco mesenquimais; CD146, marcador de células perivasculares; 3G5, marcador associado aos pericitos) através da técnica da imunohistoquímica. Os resultados deste estudo sugerem que uma população de células-tronco pulparenses reside nas proximidades dos vasos sanguíneos deste tecido. No entanto, os autores ressaltam a necessidade de realização de mais estudos para determinar se outros nichos de células-tronco estariam presentes na polpa dentária. Alongi e colaboradores (2010)⁷ detectaram a presença de células positivas para os marcadores STRO-1, CD90, CD105 e CD146, usualmente utilizados para caracterizar fenotipicamente células-tronco mesenquimais, nas proximidades de vasos sanguíneos e nas estruturas nervosas, através da técnica imunohistoquímica. No estudo realizado por Martens e colaboradores (2012)⁸, os resultados demonstraram a existência de um nicho perivascular, assim como também na região cervical (limite cemento/esmalte) e na região apical da polpa dentária. Neste estudo, realizado em polpas de dentes permanentes bastante jovens, com menos de 50% da raiz formada, os marcadores expressos de forma mais pronunciada foram o CD29, CD44 e CD146, embora tenha sido observada uma marcação imunohistoquímica positiva para o CD117 e STRO-1.

O entendimento da biologia das MSCs, ou seja, as vias de sinalização moleculares que regulam a autorrenovação, a diferenciação ou a morte celular, com quem estas células se relacionam, ou seja, quais os estímulos recebidos por estas células nos seus nichos que as fazem autorrenovar-se ou diferenciar-se em uma determinada linhagem celular, permitirá que se chegue a métodos clínicos para a amplificação destas células *in vitro* e aplicação das mesmas em diferentes áreas da biologia e medicina. Por isso, a importância de se conhecer o nicho destas células na polpa dental, para sabermos com quais células as MSCs deste tecido se relacionam. Esse entendimento possibilitará investigar quais os estímulos moleculares

liberados pelo microambiente onde residem estas células, que fazem com que as mesmas permaneçam quiescentes, se autorrenovem ou se diferenciem^{4,9,10}.

Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar a localização de células no tecido pulpar de dentes permanentes humanos, que expressem os marcadores STRO-1, CD90 e ALDH, os quais são usualmente utilizados para caracterizar células-tronco, através da técnica da imunohistoquímica.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, por meio do Parecer Cosubstanciado, nº 06/11. O protocolo para coleta de dentes no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan (MI, EUA) foi PRO00004986. O consentimento informado foi obtido de cada paciente.

Imunohistoquímica

Nove dentes permanentes hígidos, dentre estes cinco terceiros molares e quatro primeiros pré-molares, foram coletados de adultos jovens (18 a 25 anos de idade). Após a exodontia, sulcos nas faces vestibular, mesial e distal de cada dente foram realizados com auxílio de uma broca diamantada cilíndrica, acoplada à caneta de alta rotação, sob refrigeração constante. Após a clivagem dos dentes, o tecido pulpar foi obtido e imediatamente fixado em formalina neutra tamponada a 10% por 24 horas, a 4°C. Após processamento histológico de rotina, uma lâmina de cada dente foi corada com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica do tecido pulpar.

Cortes longitudinais de 5 µm foram desparafinizados e reidratados. A recuperação antigênica foi realizada com solução de recuperação antigênica (Dako, Carpinteria, CA, USA) em banho-maria, a 95°C, por 40 min. Para bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 3% (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) diluído em metanol. Em seguida, foi utilizado um agente redutor de coloração não específica (Background Sniper, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA). Os anticorpos primários anti-ALDH, 1:50 (Clone 44/ALDH, BD Biosciences, Lexington, KY, USA); anti-CD90, 1:50 (Clone EPR3132, Abcam, Cambridge, MA, USA) e anti-STRO-1, 1:100 (Clone Stro-1, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) foram incubados *overnight*, em câmara úmida, a 4°C. Como controle negativo foram utilizados os anticorpos isotípicos IgG e IgM (Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, os cortes foram incubados com o kit de detecção MACH3

(MACH3 Mouse or Rabbit HRP-Polymer Detection, Biocare Medical), revelados com diaminobenzidina (DAB, Biocare Medical) e contra corados com hematoxilina de Gill n° 2 (GHS232-1L, Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

O padrão de expressão em relação à intensidade e à distribuição dos marcadores utilizados foi examinado em toda a extensão do tecido pulpar por um morfolologista, que procurou descrever os principais aspectos de cada lâmina. Foram consideradas positivas as células que exibiam marcação na cor marrom.

As imagens visualizadas em HE e imunohistoquímica foram observadas e capturadas para análise com o auxílio do microscópio Nikon Scope Eclipse E 800® (Nikon, Melville, EUA), acoplado a uma câmera digital Nikon DS FA, com o auxílio do programa NIS - Elements Br, Nikon.

Resultados

A avaliação pela coloração HE mostrou que o tecido pulpar apresentava características de vitalidade, sem evidência de reação inflamatória, com a presença de camada odontoblástica, fibras nervosas, vasos sanguíneos e de elevada celularidade, disposta em uma matriz de tecido conjuntivo frouxo. A maior parte das células observadas no tecido pulpar exibiu um aspecto fibroblastóide, como mostra a Figura 1.

Na análise imunohistoquímica, os marcadores ALDH, CD90 e STRO-1 apresentaram expressão positiva no tecido pulpar. O ALDH e o CD90 apresentaram um padrão de expressão semelhante no tecido, de forma pronunciada em células ao redor dos vasos sanguíneos e nas fibras nervosas, como ilustram as Figuras 2 e 3. Em relação ao marcador STRO-1, foi detectada marcação positiva junto às estruturas vasculares e nervosas, embora de forma menos pronunciada que os outros marcadores avaliados. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Discussão

Neste estudo, o tecido pulpar de dentes permanentes jovens hígidos foi avaliado pela técnica da imunohistoquímica para a expressão dos marcadores CD90 e STRO-1, moléculas usualmente utilizadas para selecionar e caracterizar células-tronco mesenquimais^{6,11-13}, assim como para o marcador ALDH, utilizado normalmente para selecionar células-tronco hemaopoiéticas e também tumorais^{10,14-18}. Células com expressão positiva para os marcadores ALDH, CD90 e STRO-1, foram detectadas nas proximidades dos vasos sanguíneos, assim

como junto às fibras nervosas da polpa. Esses resultados reforçam os encontrados por Shi & Gronthos (2003)⁶ e Alongi e colaboradores (2010)⁷. No primeiro estudo, células positivas para os marcadores STRO-1, CD146 e 3G5 estavam localizadas na parede de vasos sanguíneos e também no perineuro de feixes nervosos pulpares de dentes permanentes humanos. Já no segundo, embora outro grupo de marcadores de MSCs tenha sido empregado (STRO-1, CD90, CD105 e CD146), as células imunomarcadas também estavam localizadas junto às estruturas vasculares e nervosas da polpa dentária.

Segundo Sloan & Waddington (2009)¹⁹, diferentes nichos de células-tronco ou progenitoras podem residir na polpa dentária humana. As células sub-odontoblásticas poderiam constituir um potencial nicho de células-tronco, assim com as células localizadas no espaço perivascular. De acordo com os autores, a presença de mais de um nicho num mesmo tecido poderia ocorrer devido à existência de uma hierarquia entre as populações de células tronco/progenitoras do mesmo. Os resultados do presente estudo indicam a possibilidade de existência de mais de uma localização anatômica destas células dentro de um mesmo tecido.

A enzima ALDH vem sendo utilizada como marcador para selecionar e caracterizar células-tronco hematopoiéticas (HSCs) em diferentes pesquisas^{14,16,20-25}, assim como também outras populações de células-tronco, como as neuroepiteliais, mamárias e tumorais²⁶⁻³⁰. Embora este marcador já tenha sido identificado em células-tronco pulpares de dentes decíduos (SHEDs) e permanentes (DPSCs) através das técnicas de imunocitoquímica e imunofluorescência³¹, até o momento, não existe na literatura nenhum estudo mostrando a expressão deste marcador no tecido pulpar, confirmando o ineditismo da presente pesquisa. De acordo com Cai et al. (2004a)²¹, é possível que células-tronco de diferentes origens usem estratégias semelhantes para manter o seu estado indiferenciado, assim como regular a sua proliferação e diferenciação. Visto que não existe um marcador específico para caracterizar as MSCs, e sim um grupo de marcadores mais frequentemente utilizados, parece razoável a concepção de que determinados parâmetros metabólicos possam ser similares entre diferentes populações de células-tronco. Neste contexto, inúmeras evidências indicam que a atividade da ALDH pode constituir uma característica em comum entre estas células, podendo ser inclusive detectada nas células e tecidos através da técnica da imunohistoquímica³².

Assim como a ALDH, células com expressão positiva para o marcador CD90 foram observadas junto às estruturas vasculares e nervosas da polpa dentária, corroborando com os resultados encontrados por Alongi e colaboradores (2010)⁷, os quais avaliaram a presença e localização de células imunomarcadas com o CD90 no tecido pulpar, entre outros marcadores.

A diferença é que no referido estudo os autores avaliaram a presença de células-tronco/progenitoras no tecido pulpar inflamado, onde, inclusive, os autores encontraram níveis mais altos dos marcadores de MSCs STRO-1, CD90, CD105 e CD146 quando comparados com a marcação em polpas não inflamadas.

Embora neste estudo o STRO-1 tenha apresentado expressão positiva no tecido pulpar, a marcação imunohistoquímica foi menos pronunciada do que as apresentadas pelo CD90 e ALDH. Uma possível explicação para tal achado seria de que nenhum dos anticorpos disponíveis no mercado para a marcação desta proteína seja específico para a avaliação por imunohistoquímica, apesar de diferentes estudos publicados terem encontrado resultados positivos utilizando o marcador STRO-1 de diferentes marcas comerciais^{6,7,33,34}. Da mesma forma, as células positivas para o STRO-1 estavam localizadas exclusivamente nas paredes dos vasos sanguíneos, enquanto que as células imunomarcadas com ALDH não estavam localizadas exatamente na parede, mas sim, ao redor dos vasos, no espaço perivascular. Já as células positivas para o CD90 estavam localizadas nos espaços perivascular e nas paredes dos vasos. Apesar do STRO-1 ser considerado um marcador consagrado de células-tronco mesenquimais, os estudos realizados por Ning e colaboradores (2011)³⁵ sugerem que o mesmo seja uma proteína endotelial, justificando a marcação encontrada na parede dos vasos sanguíneos da polpa no presente estudo.

Apesar de existirem pouquíssimos estudos na literatura a respeito da localização anatômica das células-tronco no tecido pulpar, todos são unânimes em afirmar que tais células se encontram principalmente nas proximidades dos vasos sanguíneos⁶⁻⁸. Na pesquisa realizada por Yoshida e colaboradores (2012)³⁴, o marcador STRO-1 apresentou expressão positiva nas células endoteliais, células do músculo liso e pericitos da polpa de dentes permanentes humanos. Segundo os autores, tanto os pericitos como as células do músculo liso são candidatas a MSCs. Já para Feng et al. (2011)³⁶, a habilidade dos pericitos em agirem como MSCs ainda permanece bastante controversa. Os autores provocaram danos ao tecido pulpar de camundongos, no intuito de promover a diferenciação de células-tronco em odontoblastos, células especializadas produtoras de tecido dentinário. Dois dias após a injúria, pericitos foram capazes de migrar em direção ao tecido danificado e de se diferenciar em odontoblastos. Apesar disso, apenas 15% dos odontoblastos recém-diferenciados foram originados a partir dos pericitos, sugerindo que MSCs de um mesmo tecido podem ter origens distintas, e que a ocorrência de MSCs derivadas de pericitos em um dado tecido depende da extensão da vascularização do mesmo. De fato, MSCs e pericitos coexpressam alguns

marcadores, como CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO-1^{34,36,37}, indicando uma possível associação entre as duas populações de células. No estudo realizado por Crisan et al. (2008)³⁷, pericitos isolados de diferentes tecidos fetais e adultos diferenciaram-se nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, embora não tenham sido capazes de diferenciar-se em células hematopoiéticas nem em células neurais, a despeito da sua localização perivascular neste tecido. Esses dados suportam a hipótese de que as MSCs podem originar-se de células presentes nas paredes dos vasos sanguíneos.

Em relação à imunomarcação das estruturas nervosas do tecido pulpar, tanto Shi & Gronthos (2003)⁶ como Yoshida e colaboradores (2012)³⁴ encontraram expressão positiva para o marcador STRO-1 no perineuro, uma estreita bainha de tecido conjuntivo denso, formado por camadas concêntricas de células delgadas separadas por lâminas de colágeno, que envolve os feixes nervosos³⁸. Já no presente estudo, células com expressão positiva para os anticorpos STRO-1, ALDH e CD90 foram observadas junto aos feixes nervosos do tecido pulpar, onde estão localizadas as fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas, células de Schwann, capilares e fibroblastos³⁸. A marcação de estruturas nervosas da polpa dentária com moléculas usualmente utilizadas para identificar MSCs poderia ser justificada pela origem embriológica destas células. Apesar das MSCs serem consideradas células de origem mesodérmica, Takashima et al. (2007)³⁹ demonstraram em seu estudo que MSCs embrionárias podem ser originadas do neuroepitélio como também da crista neural. Por outro lado, a presença de capilares na região do endoneuro poderia justificar a expressão positiva destes marcadores nas fibras nervosas pulpares, uma vez que neste e em outros estudos, células positivas para marcadores de MSCs estavam presentes nas áreas perivasculares do tecido pulpar.

De acordo com Takashima et al. (2007)³⁹, apesar de todas as expectativas em torno das possibilidades terapêuticas das MSCs, o grande obstáculo no estudo destas células é a falta de conhecimento a respeito das suas características biológicas *in vivo*, tais como a origem, o desenvolvimento, a localização anatômica exata nos tecidos e o papel fisiológico das mesmas no organismo. Ainda, uma célula-tronco fora de seu meio-ambiente original provavelmente não apresentará o mesmo comportamento de quando está inserida em seu *habitat* natural. As MSCs cultivadas *in vitro* são submetidas a diferentes condições daquelas encontradas na sua localização anatômica original, mesmo que as condições do meio de cultura sejam o mais próximas possíveis daquelas encontradas *in vivo*⁴⁰. Por este motivo, as MSCs expandidas em cultura não devem ser consideradas equivalentes às MSCs sob condições fisiológicas *in vivo*.

Neste contexto, o conhecimento da localização, estrutura e função dos diferentes nichos de células-tronco vai permitir um grande avanço no que diz respeito à manutenção e expansão destas células *in vitro*, e conseqüentemente a aplicação das mesmas em terapias *in vivo*^{12,41}. Da mesma maneira, os riscos inerentes a este tipo de abordagem poderão ser conhecidos e, conseqüentemente, minimizados^{10,42}.

Considerações finais

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram a distribuição dos marcadores STRO-1, CD90 e ALDH na polpa de dentes permanentes humanos através da técnica de imunohistoquímica. Células positivas para tais marcadores foram observadas nas proximidades dos vasos sanguíneos e também junto às fibras nervosas do tecido pulpar, sugerindo a existência de mais de um nicho de células-tronco mesenquimais na polpa, visto que estas proteínas são usualmente utilizadas para caracterizar tais células.

Referências

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284 (5411):143-7.
2. 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.
3. Da Silva Meireles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119 (Pt 11):2204-13.
4. Lin H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet*. 2002; 3 (12): 931-40.
5. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (9):726-36.
6. 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.
7. Alongi J, 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):617-631.

8. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrechts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs*. 2012; 196 (6):490-500.
9. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116 (6):769-78.
10. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (31):11707-12.
11. 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.
12. Da Silva Meireles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (9):2287-99.
13. 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.
14. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (16):9118-23.
15. Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis*. 2005; 11:729-37.
16. Storms RW, Green PD, Safford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*. 2005; 106 (1):95-102.
17. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*. 2009; 13 (8B):2236-52.
18. Shenoy A, Butterworth E, Huang EH. ALDH as a marker for enriching tumorigenic human colonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012; 916:373-85.
19. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19 (1):61-70.

20. Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, Ahmad S, Stojkovic P, Hole N et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004; 22 (7):1142-51.
21. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol*. 2004; 32 (7):585-98.
22. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004; 104 (6):1648-55.
23. Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35 (9):909-14.
24. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006; 107 (5):2162-9.
25. Moreb, JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008; 3 (4):237-46.
26. Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem*. 2004; 88 (1):212-26.
27. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 1 (5):555-67.
28. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385 (3):307-13.
29. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009; 69 (8):3382-9.
30. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009; 7 (3):330-8.

31. Telles PDS, Nör JE. Expressão de ALDH e CD44 em células-tronco da polpa dentária. *Braz Oral Res.* 2007; 21 (Suppl.1):223-83.
32. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009; 18 (1):17-25.
33. Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasan Y. Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2009; 58 (6):363-73.
34. Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A et al. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of α -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol.* 2012; 138 (4):583-92.
35. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 413 (2):353-7.
36. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (16):6503-8.
37. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008; 3 (3):301-13.
38. Ortiz-Hidalgo C, Weller RO. Peripheral Nervous System. In: Sternberg SS. *Histology for Pathologists.* Philadelphia: Lippincott, 1997. cap.12, p. 285-311.
39. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007; 129 (7):1377-88.
40. Watt FM., Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000; 287 (5457):1427-30.
41. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21:605-31.
42. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011; 99 (1):1-7.

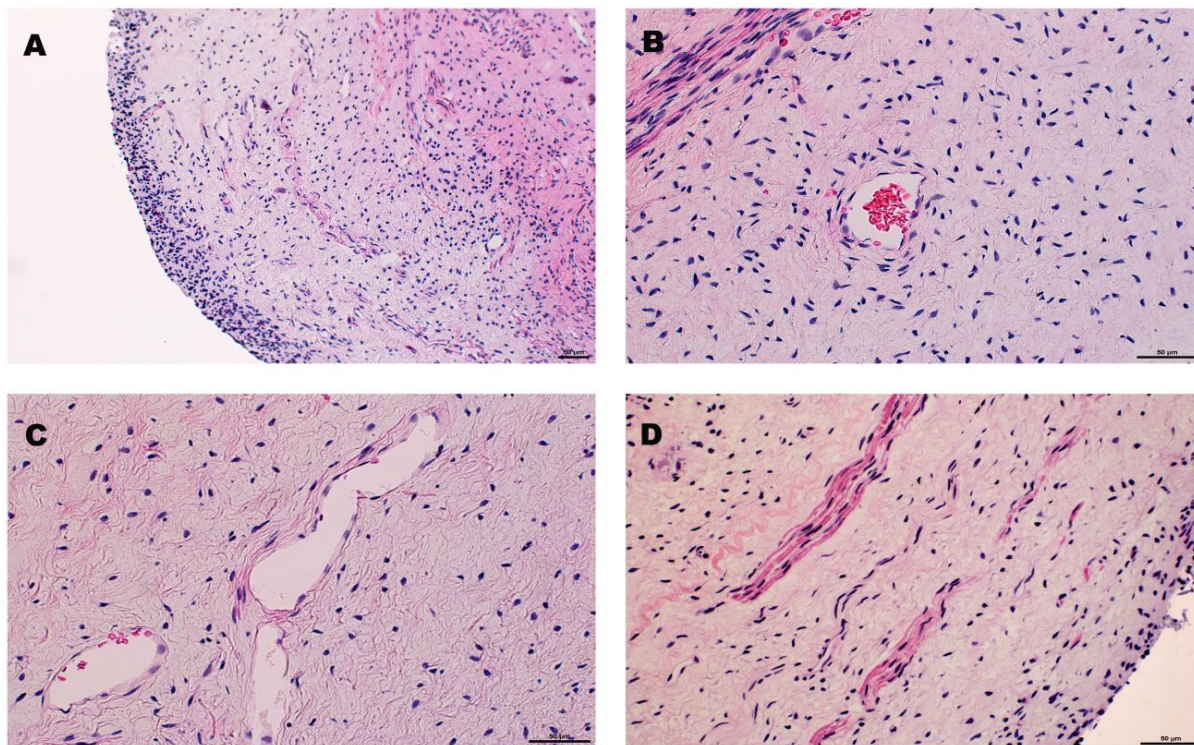
Figuras do Artigo

Figura 1. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Padrão morfológico apresentando fibras nervosas, vasos sanguíneos e elevada celularidade - HE (A, B, C, D).

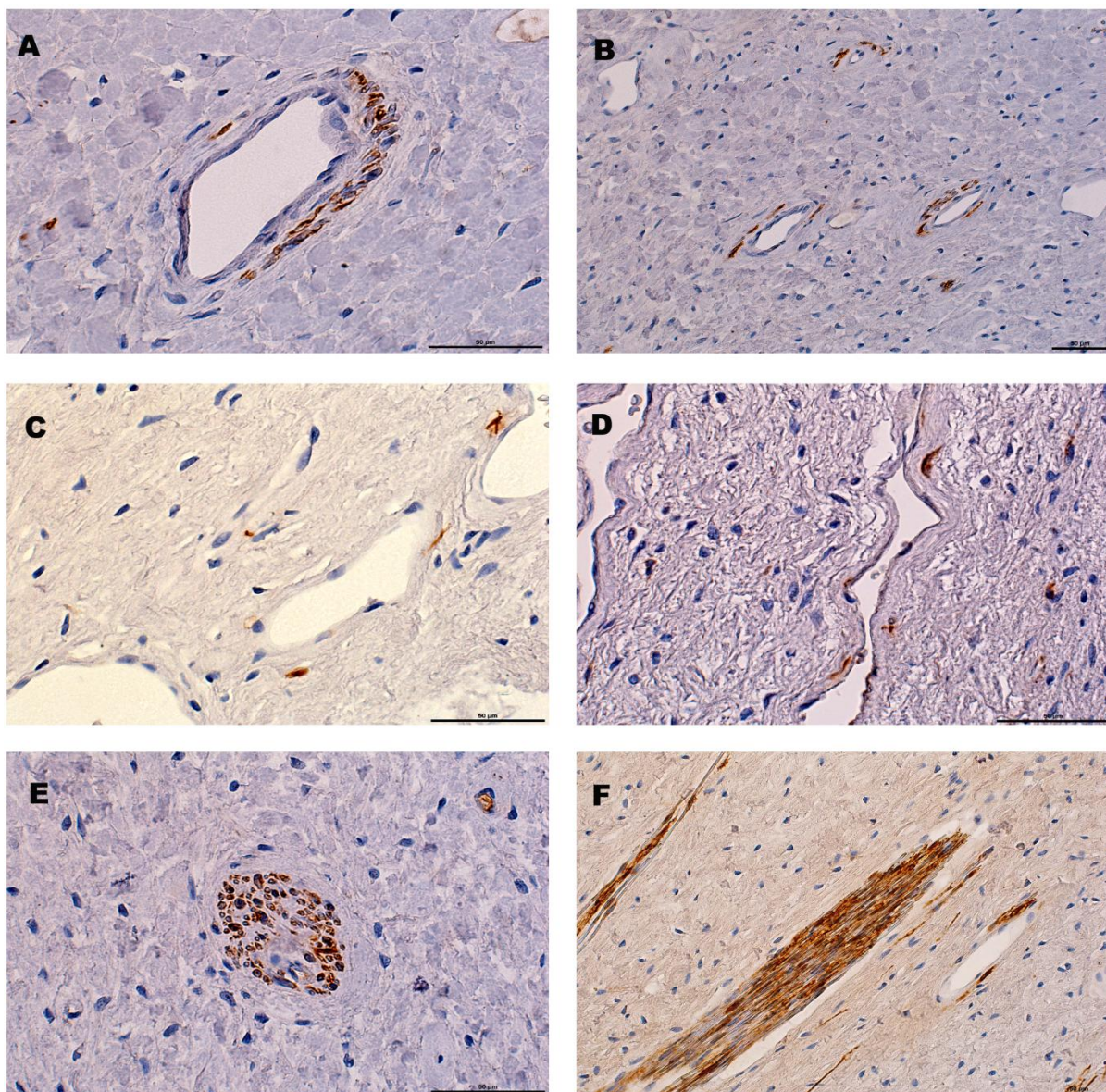


Figura 2. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do ALDH em células ao redor dos vasos sanguíneos (A, B, C, D) e em fibras nervosas (E e F).

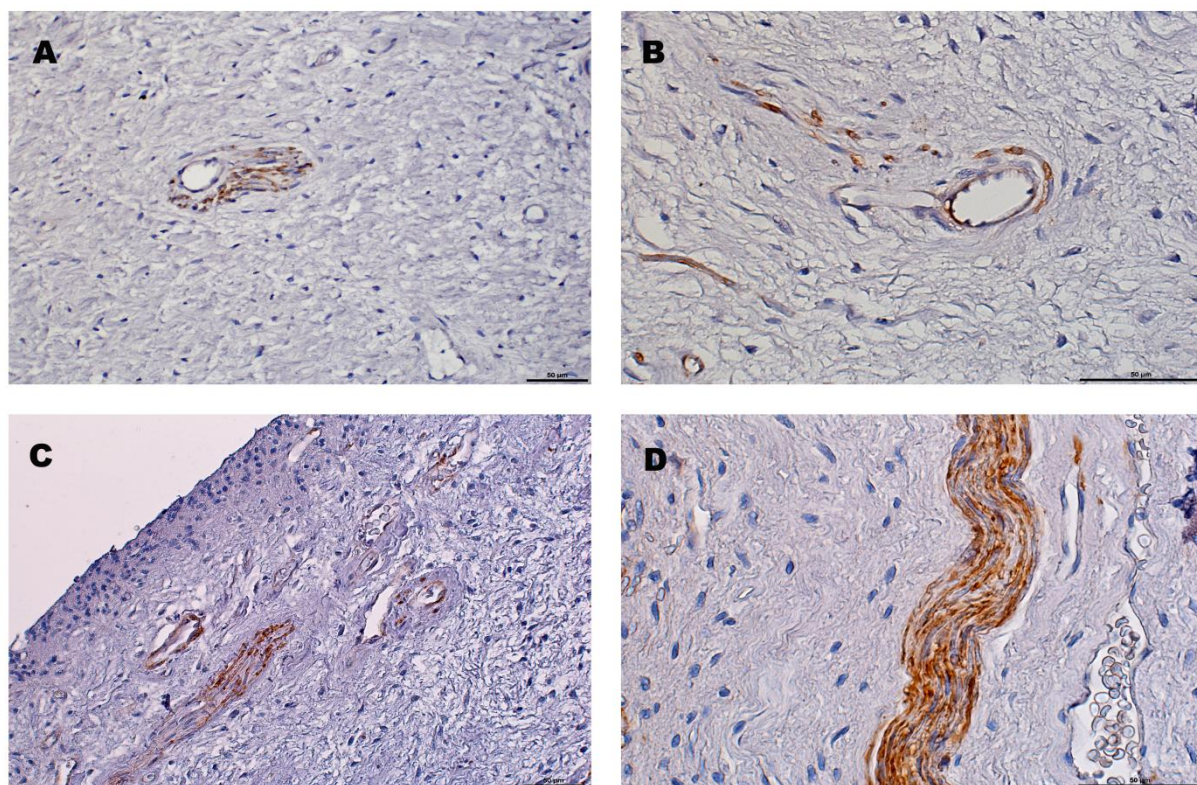


Figura 3. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do CD90 em células ao redor dos vasos sanguíneos e em fibras nervosas (A, B, C, D).

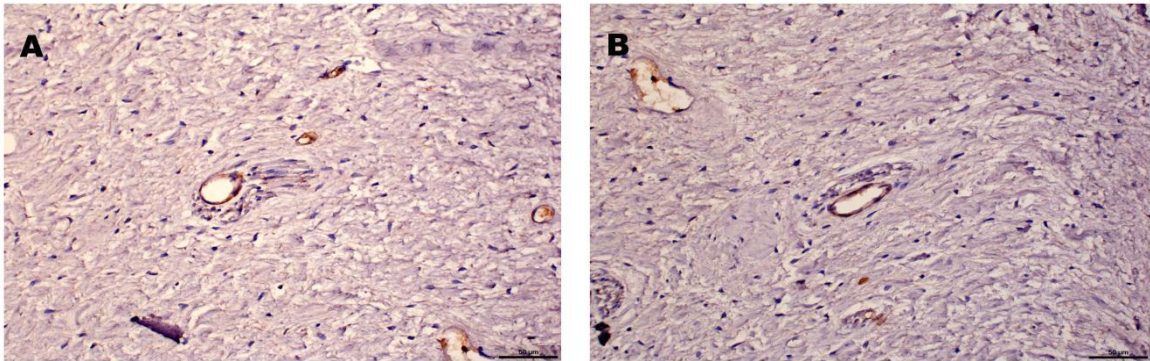


Figura 4. Fotomicrografias da polpa de dentes permanentes humanos. Marcação imunohistoquímica do STRO-1 na parede de vasos sanguíneos e em fibras nervosas próximas (A e B).

ARTIGO 4

Expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes

Expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH), STRO-1 and CD44 in pulp stem cells from deciduous and permanent teeth

Resumo

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas utilizando-se células tronco mesenquimais (MSCs) de diferentes origens, visto que as mesmas apresentam a habilidade de multidiferenciação, tornando-se extremamente atrativas para o uso na engenharia de tecidos. Uma vez que ainda não existe um marcador específico para caracterizar as MSCs, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), assim como dos marcadores STRO-1 e CD44 em células-tronco da polpa de dentes decíduos (SHEDs), permanentes (DPSCs) e fibroblastos da polpa, através da citometria de fluxo e do *western blot*. Para tanto, as células foram cultivadas em meio DMEM/HEPES, suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100U/mL de penicillina, 100µg/mL de estreptomicina e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As três linhagens de células, quando caracterizadas pelo *western blot*, expressaram fortemente a ALDH, assim como o STRO-1, ao passo que apresentaram uma fraca expressão para o CD44, não apresentando diferença na intensidade das bandas entre as mesmas. Já na análise por citometria de fluxo, todas as células apresentaram valores percentuais altos para o CD44 e relativamente baixos para o STRO-1 e para a ALDH. Os valores percentuais encontrados foram semelhantes entre os três tipos celulares, sendo que, em alguns casos, não houve diferença entre as células-tronco e os fibroblastos. Os resultados deste estudo sugerem que SHEDs, DPSCs e fibroblastos podem compartilhar algumas características, como a expressão de determinados marcadores genéticos. Da mesma forma, indicam que o uso da ALDH pode ser explorado em pesquisas futuras, para caracterização e seleção das MSCs.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, polpa dentária, aldeído desidrogenase.

Abstract

Numerous studies have been conducted using mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources, since they have the ability of multilineage differentiation, making them extremely attractive for the use in tissue engineering. As long as there is no specific marker that identifies MSCs, the aim of this study was to evaluate the aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, as well as the expression of STRO-1 and CD44 in pulp stem cells from deciduous (SHEDs) and permanent (DPSCs) teeth, as well in pulp fibroblasts, by flow cytometry and western blot. For this purpose, cells were cultured in DMEM/HEPES, supplemented with fetal bovine serum at 10%, 100U/ml of penicillin, 100µg/mL streptomycin and stored at 37°C and 5% CO₂. In the western blot test, all the cell lineages strongly expressed ALDH, as well as STRO-1, while they presented a weak expression for CD44. There were no differences in the band intensity between the three cell types for the proteins tested. In the flow cytometry analysis, SHEDs, DPSCs and fibroblasts were positive for the CD44 marker, while showed lower values for STRO-1 and ALDH. The percentage values were similar among the three cell types for the markers used, and in some cases, there was no difference between stem cells and fibroblasts. The results of this study suggest that SHEDs, DPSCs and pulp fibroblasts may share some important characteristics, such as the expression of certain genetic markers. Likewise, indicate that the use of ALDH activity can be exploited in future research for identification and characterization of MSCs.

Indexing terms: mesenchymal stem cells, dental pulp, aldehyde dehydrogenase.

Introdução

Nos últimos anos, um aumento exponencial no número de publicações a respeito das células-tronco tem sido observado, refletindo o potencial de uso destas células em estratégias terapêuticas em humanos.¹ As células-tronco adultas têm sido o grande foco destes estudos, e dentre estas, as células-tronco mesenquimais ou estromais (MSCs), visto que pesquisas utilizando células-tronco embrionárias apresentam inúmeros obstáculos de ordem ética e religiosa. As MSCs já foram identificadas em diversos tecidos, tais como medula óssea, fluido sinovial, tecido adiposo, polpa de dentes decíduos e permanentes, cordão umbilical, músculo esquelético, dentre outros.²⁻⁶

As MSCs são sabidamente difíceis de serem purificadas, pois não existem marcadores realmente específicos para este grupo de células.^{7,8} Entretanto, a identificação de marcadores mais adequados é crucial para que a aplicação da engenharia de tecidos ou de terapias baseadas na utilização destas células para a cura de diferentes doenças, assim como para que a

regeneração de órgãos e tecidos se torne uma realidade.⁸ Alguns marcadores têm sido frequentemente utilizados para a identificação de células-tronco mesenquimais de diferentes origens, nos quais estão incluídos o STRO-1, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) e SSEA-4.^{7,9-13}

A aldeído desidrogenase (ALDH) é uma enzima citosólica responsável pela oxidação intracelular de aldeídos, a qual está envolvida na oxidação do retinol em ácido retinóico durante as fases iniciais de diferenciação das células-tronco.^{14,15} Esta enzima seria crucial para a proteção das mesmas contra aldeídos tóxicos endógenos e exógenos, assim como para a habilidade destas células em se diferenciar em linhagens distintas.¹⁶

Diversos estudos mostram que a atividade da ALDH pode ser utilizada para caracterizar e selecionar células-tronco hematopoiéticas (HSCs), tanto murinas quanto humanas.¹⁵⁻¹⁹ Da mesma forma, populações de células-tronco adultas de diferentes origens, como células progenitoras neurais, do tecido adiposo, assim como MSCs obtidas da medula óssea foram isoladas com base na atividade desta enzima.¹⁹⁻²¹ A ALDH também tem sido empregada em várias pesquisas para identificar subpopulações de células com características de células-tronco, tanto em cânceres dos sistemas hematopoiético e linfático, quanto em tumores sólidos, como câncer de mama, ovário, fígado e intestino.²²⁻²⁶ Em relação à polpa dentária, Telles e colaboradores (2007)²⁷ identificaram a presença deste marcador em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHEDs) e células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs), as quais são linhagens de células-tronco mesenquimais isoladas destes tecidos, através da técnica da imunocitoquímica.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da enzima ALDH em SHEDs, DPSCs e fibroblastos de polpa dentária humana (HDPFs), além de outros marcadores usualmente empregados para caracterizar e selecionar células-tronco mesenquimais, através das técnicas de citometria de fluxo e *western blot*.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, por meio do Parecer Cosubstanciado, nº 06/11. O protocolo para coleta de dentes no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan (MI, EUA) foi PRO00004986. Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Informado.

Cultura de células

As SHEDs e DPSCs (gentilmente doadas pelo Dr. Songtao Shi - Dental Biology Unit, Craniofacial Skeletal Diseases Branch, NIH Bethesda, MD, EUA), assim como fibroblastos da polpa de dentes permanentes humanos - HDPFs (gentilmente doados pela Dra. Tatiana Botero - Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, University of Michigan, MI, USA) foram cultivadas em meio DMEM/HEPES (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias, sendo as culturas mantidas nestas condições até atingirem confluência de cerca de 90%, quando eram então realizadas as passagens. As células eram colhidas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e transferidas para subculturas com o respectivo meio de cultura até ser necessária a próxima passagem.

As SHEDs foram utilizadas nas passagens de 7 a 9, as DPSCs nas passagens 7 e 8 e os HDPFs, nas passagens 6 e 7. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Citometria de fluxo

As células (SHEDs, DPSCs e HDPFs) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos e submetidas à leitura em citômetro de fluxo. Um total de 10⁶ células foi incubado por 30 min a 4°C com os anticorpos STRO-1 (Clone Stro-1, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) e CD44 (Clone EPR1013Y, Abcam), conjugados com APC ou PE (BD Biosciences). Para detecção da atividade da enzima ALDH nas células foi utilizado o kit ALDEFLUOR (Stem Cell Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram suspensas com o substrato ativado do Aldefluor (BAA - BODIPY[®] aminiacetaldeído) ou com o inibidor específico desta enzima (DEAB - dietilaminobenzaldeído), sendo incubadas por 45 min a 37°C. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSDiVA Cell Sorter (BD Biosciences; Mountain View, CA, USA).

Western blot

Para avaliação dos marcadores STRO-1, CD44 e ALDH em SHEDs, DPSCs e HDPFs, as células foram coletadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), incubadas com tampão de lise celular (NP-40), sonicadas, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para a

quantificação da proteína total, realizada em um espectrofotômetro (Genius Tecan, Tecan, Graz, Áustria) em um comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa Magellan (Tecan Trading AG, Suíça). Para avaliação da expressão destes marcadores no tecido pulpar como um todo, dois terceiros molares hígidos (16 e 18 anos) foram coletados. Após o acesso ao tecido pulpar o mesmo foi homogenizado mecanicamente com tampão de lise celular e a proteína total das amostras extraída. A seguir, 20µg de proteína de cada amostra foram separadas por um gel de SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBST, por uma hora. Os anticorpos primários anti-ALDH, 1:500 (Clone 44/ALDH, BD Biosciences, Lexington, KY, USA), anti-CD44, 1:500 (Clone EPR1013Y, Abcam) e anti-STRO-1, 1:500 (Clone Stro-1, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) foram incubados *overnight* a 4°C. Após lavadas em TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP), por duas horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem, a detecção do sinal foi realizada com luminescência química (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). O sinal foi visualizado através de filmes Kodak BIOMAX MR

Análise estatística

Para avaliar se houve diferença estatística entre SHEDs, DPSCs e HDPFs em relação aos marcadores avaliados pela citometria de fluxo, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e o teste de comparação múltipla de Dunn.

Resultados

Citometria de fluxo

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células avaliadas (SHEDs, DPSCs e HDPFs) estão apresentados na Tabela 1. Os valores encontrados para o CD44 foram iguais ou superiores a 90% em todas as diferentes linhagens de células, inclusive para os fibroblastos de polpa dental, não havendo diferença estatística entre os grupos. Em relação ao STRO-1, uma fração menor de células entre os três diferentes grupos apresentou-se positiva para este marcador. Os valores percentuais de células STRO-1⁺ entre SHEDs e DPSCs foram maiores do que os encontrados nos HDPFs. Entretanto, foi detectada diferença significativa apenas entre as SHEDs e os fibroblastos. Todas as células testadas apresentaram valores mais baixos

para a atividade da enzima ALDH. Houve diferença significativa entre as DPCSs e fibroblastos, em relação à quantidade de células ALDH⁺ nestas duas linhagens. As Figuras 1, 2 e 3 ilustram os resultados obtidos.

Western blot

A expressão dos marcadores STRO-1, ALDH e CD44 em células-tronco isoladas da polpa de dentes decíduos e permanentes e em fibroblastos de polpa dental também foi avaliada através do *western blot*. SHEDs, DPSCs e fibroblastos apresentaram expressão positiva para o STRO-1 e ALDH, enquanto que foi observada uma marcação bastante tênue para o CD44. Quando a proteína total da polpa dentária foi avaliada, houve expressão positiva para os três marcadores testados. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 4.

Discussão

Fenotipicamente, as células-tronco mesenquimais são caracterizadas por expressarem um conjunto de marcadores de superfície celular e ausência de outros. Assim, diversos marcadores têm sido descritos e testados para definir esta população de células. Dentre estes encontra-se o STRO-1, cuja expressão por citometria de fluxo em células pulpares humanas apresenta-se variável, apesar de ser considerado um marcador genuíno de MSCs.²⁸ Na medula óssea, células STRO-1 negativas não foram capazes de formar colônias, ou seja, não contêm CFU-Fs (unidades formadoras de colônias de fibroblastos).²⁹ Células isoladas da polpa de dentes permanentes humanos com base na expressão do STRO-1 foram capazes de formar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar *in vivo*, além de tecido ósseo e cartilaginoso.³⁰ Entretanto, de acordo com Gronthos e colaboradores (2003),³¹ a expressão deste marcador é gradualmente perdida durante a expansão da cultura de células. No presente estudo, a expressão do STRO-1 em SHEDs e DPSCs entre as passagens 7 e 9, apesar de relativamente baixa (9,76% e 8,18%, respectivamente), está de acordo com os resultados encontrados por outros pesquisadores em diferentes estudos, onde a população de células STRO⁺ variou de 2,14 a 12,06%.^{6,32-34} Quando SHEDs, DPSCs e HDPFs foram comparados quanto à expressão deste marcador, houve diferença significativa apenas entre as SHEDs e os fibroblastos.

Em relação ao CD44, marcador utilizado frequentemente pra caracterizar células mesenquimais, SHEDs, DPSCs e HDPFs apresentaram uma elevada expressão do mesmo, não havendo diferença estatística nos valores percentuais encontrados entre as três linhagens de células. Esta proteína, presente na membrana da célula, possui diversas funções biológicas,

dentre elas a adesão e migração celular, assim como foi sugerido que esta molécula exerça um papel na mineralização inicial da dentina durante o desenvolvimento dentário.^{35,36} Apesar deste marcador estar distribuído abundantemente em diversos tipos celulares, como células mesenquimais, endoteliais, hematopoiéticas e leucócitos, o CD44 tem sido utilizado para caracterizar células-tronco mesenquimais de diversas origens, assim como selecionar células-tronco tumorais junto a outros marcadores, principalmente nos tumores epiteliais e hematopoiéticos.^{2,3,37-40}

Existem muitas limitações para se purificar uma determinada população de células-tronco com base somente em marcadores de superfície. Em primeiro lugar, a expressão dos mesmos pode variar entre diferentes espécies e fontes de células-tronco, assim como também pelos diferentes métodos de isolamento e cultivo celular utilizados por diversos grupos de pesquisa.^{1,41-43} Em segundo, o fenótipo da célula poder ser alterado pela progressão do ciclo celular ou pelo cultivo das células *ex vivo*, assim como pelo transplante destas células *in vivo*. Portanto, a purificação das mesmas com base na função conservada da célula-tronco, como por exemplo, a atividade da enzima ALDH, tem sido proposta como uma alternativa promissora para o isolamento de diferentes populações de células-tronco.^{41,44}

A porcentagem de células ALDH positivas em diferentes linhagens celulares normalmente é baixa, variando de 0,96 a 3,5%.^{24,26,45-48} Apesar de não existirem referências em relação às células pulpares, e dentre estas as células-tronco/progenitoras e fibroblastos, os valores encontrados neste estudo através da citometria de fluxo foram igualmente baixos, apesar de significativamente maiores do que os controles negativos, onde a enzima inibidora da ALDH (DEAB) foi adicionada. Alguns autores especulam que a população de células mesenquimais indiferenciadas ou células-tronco representam menos de 1% do total de células da polpa,⁴⁹ o que estaria de acordo com os níveis percentuais da atividade da ALDH encontrados em SHEDs (1,98%) e DPSCs (2,94%). Entretanto, para que atividade da enzima ALDH possa ser considerada um marcador de células-tronco mesenquimais, incluindo as isoladas da polpa de dentes decíduos e permanentes humanos, testes de diferenciação celular realizados em células ALDH positivas, selecionadas através da citometria de fluxo, devem ser realizados. No presente estudo, houve diferença significativa na quantidade de células ALDH⁺ entre DPSCs e HDPFs, mas não entre SHEDs e os fibroblastos. Apesar dos baixos valores encontrados para a atividade desta enzima em linhagens de células-tronco de polpa dental observadas neste estudo, eles estão de acordo com os valores encontrados na literatura, mesmo que nestes estudos outros tipos de células-tronco tenham sido utilizados, até porque,

até o momento, nenhuma pesquisa avaliou a atividade desta enzima em SHEDs e DPSCs através da citometria de fluxo.

Em relação ao *western blot*, realizado também para avaliar a expressão do STRO-1, CD44 e ALDH em SHEDs, DPSCs e fibroblastos, bandas bem marcadas foram observadas para a ALDH e o STRO-1, indicando a expressão positiva destes marcadores nas células da polpa dental. Da mesma forma, as bandas estavam fortemente expressas quando a proteína total da polpa foi avaliada. Em relação ao CD44, uma marcação bem fraca, mas equivalente para os três tipos celulares foi observada, enquanto que o mesmo apresentou uma forte marcação para a polpa total. A expressão positiva do STRO-1 e da ALDH nas células-tronco da polpa reforça os resultados obtidos através da citometria de fluxo que, apesar dos valores percentuais relativamente baixos encontrados, estão de acordo com os obtidos em outros estudos. Da mesma forma, não houve diferença em relação à intensidade de marcação entre as células-tronco e os fibroblastos para todos os marcadores avaliados.

Muitas questões ainda precisam ser esclarecidas em relação à origem das MSCs e o relacionamento destas células com outras células estromais, como os fibroblastos. Além disso, o conceito de que as MSCs são realmente células-tronco tem sido estabelecido principalmente por critérios *in vitro*, como a aderência ao plástico, capacidade de autorrenovação e transdiferenciação, assim como a expressão de determinados marcadores.^{50,51} As MSCs e os fibroblastos compartilham características importantes, como o efeito supressor sobre células do sistema imune, potencial de proliferação, capacidade de diferenciação nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, assim como apresentam vários marcadores de superfície em comum, além de alguns marcadores de células-tronco embrionárias.^{50,52,53} Para Haniffa e colaboradores (2009)⁵³, as células-tronco mesenquimais seriam fibroblastos com uma nova “roupagem”. Inclusive, a *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) não é capaz de diferenciar as MSCs de fibroblastos pela atual definição de células-tronco mesenquimais. Por este motivo, propôs que células aderentes ao plástico, normalmente referidas como células-tronco mesenquimais, na qual podem estar incluídos alguns tipos de fibroblastos, deveriam ser denominadas de células mesenquimais estromais multipotentes, enquanto que o termo MSC deve ser reservado para uma fração destas (ou outras) células que demonstrem atividade de célula-tronco através de critérios bem estabelecidos, como a multidiferenciação *in vivo*, a habilidade de formar colônias, a capacidade de autorrenovação por longos períodos, assim como a expressão de outros marcadores de superfície.^{50,54,55} Alguns estudos sugerem a utilização de novos marcadores que possam fazer a distinção entre

MSCs e fibroblastos, onde o CD106 e o CD146 estariam fortemente expressos nas MSCs e não nos fibroblastos, enquanto que o CD10 e o CD26 seriam marcadores específicos de fibroblastos.^{55,56}

Talvez estas semelhanças observadas em alguns estudos entre MSCs e fibroblastos justificariam os resultados desta pesquisa, onde valores muito próximos foram encontrados na análise por citometria de fluxo entre as células avaliadas com os marcadores utilizados. Da mesma forma, os marcadores STRO-1, CD44 e ALDH não apresentaram diferença na intensidade das bandas marcadas entre os três tipos de células no teste de *western blot*.

Considerações finais

Através dos resultados do presente estudo podemos inferir que as células da polpa dental (SHEDs, DPSCs e fibroblastos), expressam os marcadores STRO-1, ALDH e CD44, quando caracterizadas pela citometria de fluxo e *western blot*. Da mesma maneira, os dados encontrados nesta pesquisa indicam a possibilidade de que SHEDs, DPSCs e fibroblastos possam se tratar de populações celulares semelhantes.

Referências

1. Da Silva Meirelles, L; Caplan, AI; Nardi, NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (9): 2287-99.
2. Gronthos, S; Mankani, M; Brahimi, J, Gehron Robey, P; 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.
3. Da Silva Meirelles, L; Chagastelles, PC; Nardi, NBI. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119 (Pt 11):2204-13.
4. Rebellatto, CK; Aguiar, AM; Moretão, AP; Senegaglia, AC; Hansen, P; Barchiki, F et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med*. 2008; 233 (7):901-13.
5. Nadig, RR. Stem cell therapy – hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009; 12 (4):131-8.
6. Bernardi, L; Luisi, SB; Fernandes, R; Dalberto, TP; Valentin, L; Chies, JAB et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod*. 2011; 37 (7):973-9.

7. Gang, EJ; Bosnakovski, D; Figueiredo, CA; Visser, JW; Perlingeiro, RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007; 109 (4):1743-51.
8. Schawb, KE; Hutchinson, P; Gargett, CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Repro*. 2008; 23 (4):934-43.
9. 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.
10. Anjos-Afonso, F; Bonnet, D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007; 109 (3):1298-1306.
11. Uccelli, A; Moretta, L; Pistola, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (9):726-36.
12. Govindasamy, V; Ronald, VS; Totey, S; Din, SB; Mustafa, WM; Totey, S et al. Micromanipulation of culture niche permits long-term expansion of dental pulp stem cells--an economic and commercial angle. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46 (9):764-73.
13. Mafi, P; Hindocha, S; Mafi, R; Griffin, M; Khan, WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*. 2011; 5 (Suppl 2):253-60.
14. Yoshida, A. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics*. 1992; 2 (4):139-47.
15. Chute, JP; Muramoto, GG; Whitesides, J; Colvin, M; Safi, R; Chao, NJ; McDonnell, DP. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (31): 11707-12.
16. Moreb, JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008; 3 (4):237-46.
17. Kastan, MB; Schlaffer, E; Russo, JE; Colvin, OM; Civin, CI; Hilton, J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1990; 75 (10):1947-50.
18. Lioznov, MV; Freiburger, P; Kröger, N; Zander, AR; Fehse, B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35 (9):909-14.

19. Gentry, T; Foster, S; Winstead, L; Deibert, E; Fiordalisi, M; Balber A. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy*. 2007; 9 (3):259-74.
20. Corti, S; Locatelli, F; Papadimitriou, D; Donadoni, C; Salani, S; Del Bo, R et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006; 24 (4):975-85.
21. Mitchell, JB; McIntosh, K; Zvonic, S; Garrett, S; Floyd, ZE; Kloster, A et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006; 24 (2):376-85.
22. Pearce, DJ; Taussig, D; Simpson, C; Allen, K; Rohatiner, AZ; Lister, TA et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005; 23 (6):752-60.
23. Ginestier, C; Hur, MH; Charafe-Jauffret, E; Monville, F; Dutcher, J; Brown, M et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 1 (5):555-67.
24. Ma, S; Chan, KW; Lee, TK; Tang, KH; Wo, JY; Zheng, BJ et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res*. 2008; 6 (7):1146-53.
25. Chang, B; Liu, G; Xue, F; Rosen, DG; Xiao, L; Wang, X; Liu, J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*. 2009; 22 (6):817-23.
26. Huang, EH; Hynes, MJ; Zhang, T; Ginestier, C; Dontu, G; Appelman, H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009; 69 (8):3382-9.
27. Telles, PDS; Nör, JE. Expressão de ALDH e CD44 em células-tronco da polpa dentária. *Braz Oral Res*. 2007; 21 (Suppl.1):223-83.
28. 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.
29. Simmons, PJ; Torok-Storb, B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991; 78(1):55-62.

30. 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.
31. Gronthos, S; Zannettino, ACW; Hay, SJ; Shi, S; Graves, SE; Kortessidis, A et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 9):1827-35.
32. Yamaza, T; Kentaro, A; Chen, C; Liu, Y; Shi, Y; Gronthos, S; et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1 (1):5, 2010.
33. Sakdee, JB; White, RR; Pagonis, TC; Hauschka, PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009; 35 (6):818-23.
34. 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.
35. Abbas, AK; Lichtman, AH. *Imunologia básica.* Funções e distúrbios do sistema imunológico. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.
36. Chen, KL; Huang, YY; Lung, J; Yeh, YY; Yuan, K. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39 (3):351-6.
37. Da Silva Meireles, L; Nardi, NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003; 123(4):702-11.
38. Wei, X; Ling, J; Wu, L; Liu, L; Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod.* 2007; 33 (6):703-8.
39. Krishnamurthy, S; Dong, Z; Vodopyanov, D; Imai, A; Helman, JI; Prince, ME et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010; 70(23):9969-78.
40. Zoller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer.* 2011; 11 (4):254-67.
41. Hess, DA; Meyerrose, TE; Wirthlin, L; Craft, TP; Herrbrich, PE; Creer, MH et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* 2004; 104 (6):1648-55.
42. Javason, EH; Beggs, KJ; Flake, AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hemtol.* 2004; 32 (5):414-25.

43. Musina, RA; Bekchanova, ES; Sukhikh, GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Cell Tech Biol Med*. 2005; 1 (2):504-9.
44. Douville, J; Beaulieu, R; Balicki, D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18 (1):17-25.
45. Pearce, DJ; Taussig, D; Simpson, C; Allen, K; Rohatiner, AZ; Lister, TA et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005; 23 (6):752-60.
46. Storms, RW et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*, New York, v. 106, n. 1, p. 95-102, jul. 2005.
47. Povsic, TJ; Zavodni, KL; Kelly, FL; Zhu, S; Goldschmidt-Clermont, PJ; Dong, C et al. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50 (23):2243-8.
48. Jiang, F; Qiu, Q; Khanna, A; Todd, NW; Deepak, J; Xing, L et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(3):330-8.
49. Sloan, AJ; Waddington, RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19 (1):61-70.
50. Alt, E; Yan, Y; Gehmert, S; Song, YH; Altman, A; Gehmert, S et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell*. 2011; 103 (4):197-208.
51. Dominici, M; Le Blanc, K; Mueller, I; Slaper-Cortenbach, I; Marini, FC; Krause, DS et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4):315-7.
52. Haniffa, MA; Wang, XN; Holtick, U; Rae, M; Isaacs, JD; Dickinson, AM et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007; 179 (3):1595-604.
53. Haniffa, MA; Collin, MP; Buckley, CD; Dazzi, F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009; 94 (2):258-63.
54. Horowitz, 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.

55. Halfon, S; Abramov, N; Grinblat, B; Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(1):53-66.
56. Kundrotas, G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Med Lit.* 2012; 19 (2):75-9.

Tabela 1. Representação dos valores percentuais da Mediana (Percentil 25 e 75) obtidos através da análise por citometria de fluxo de SHEDs, DPSCs e HDPFs, para os marcadores STRO-1, CD44 e ALDH.

	SHEDs Mediana (%) (Percentil 25 – 75)	DPSCs Mediana (%) (Percentil 25 -75)	HDPFs Mediana (%) (Percentil 25 – 75)
STRO-1	9,76* (7,09 - 20,73)	8,18 (7,13 - 11,35)	3,23* (3,0 - 5,78)
CD44	99,6 (97,7 - 99,9)	90,1 (84,6 - 97,8)	99,8 (99,6 - 99,8)
ALDH	1,98 (1,6 - 2,2)	2,94* (2,7 - 3)	1,5* (1,0 - 1,7)

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Figuras do artigo

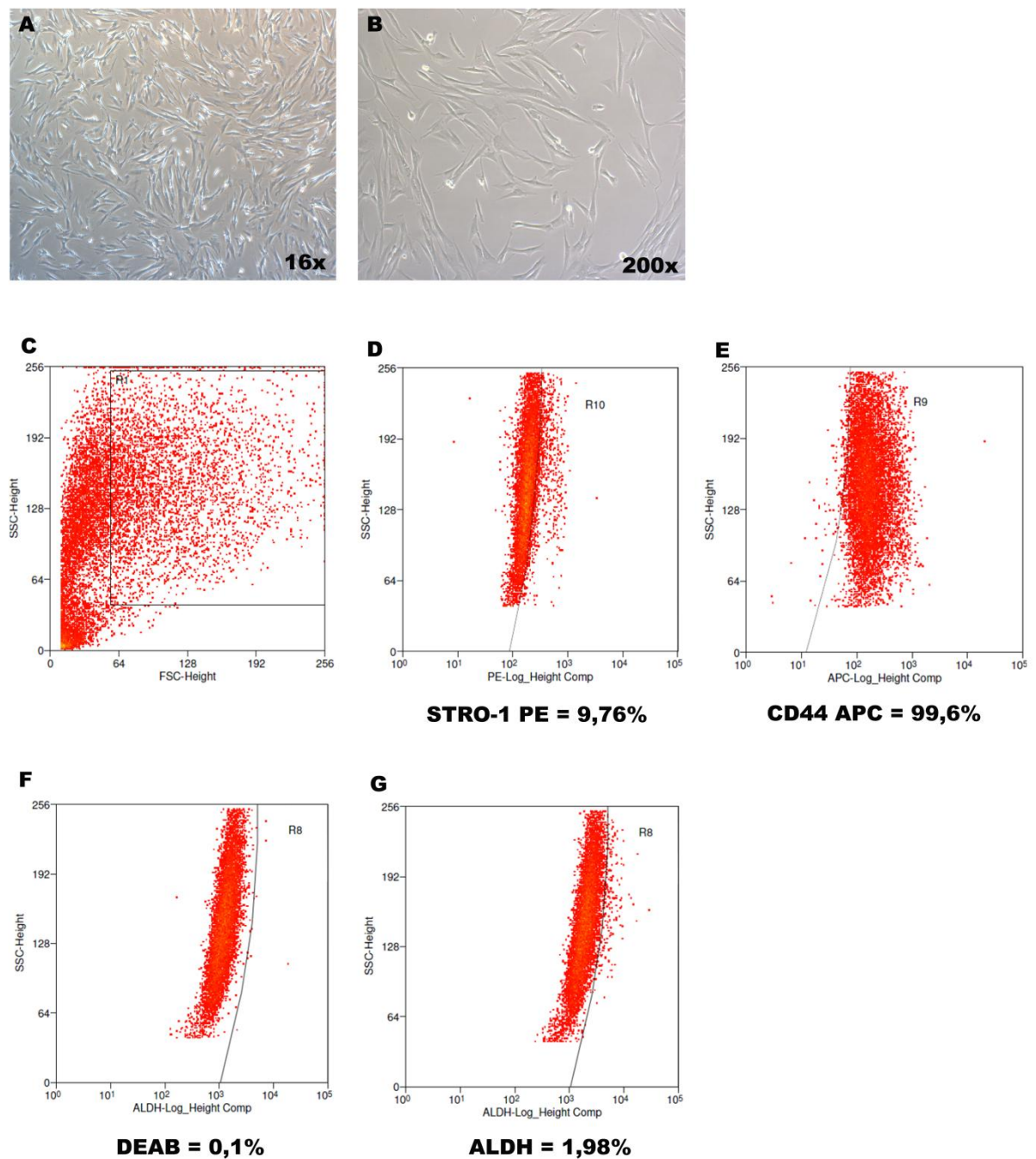


Figura 1. SHEDs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). SHEDs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.

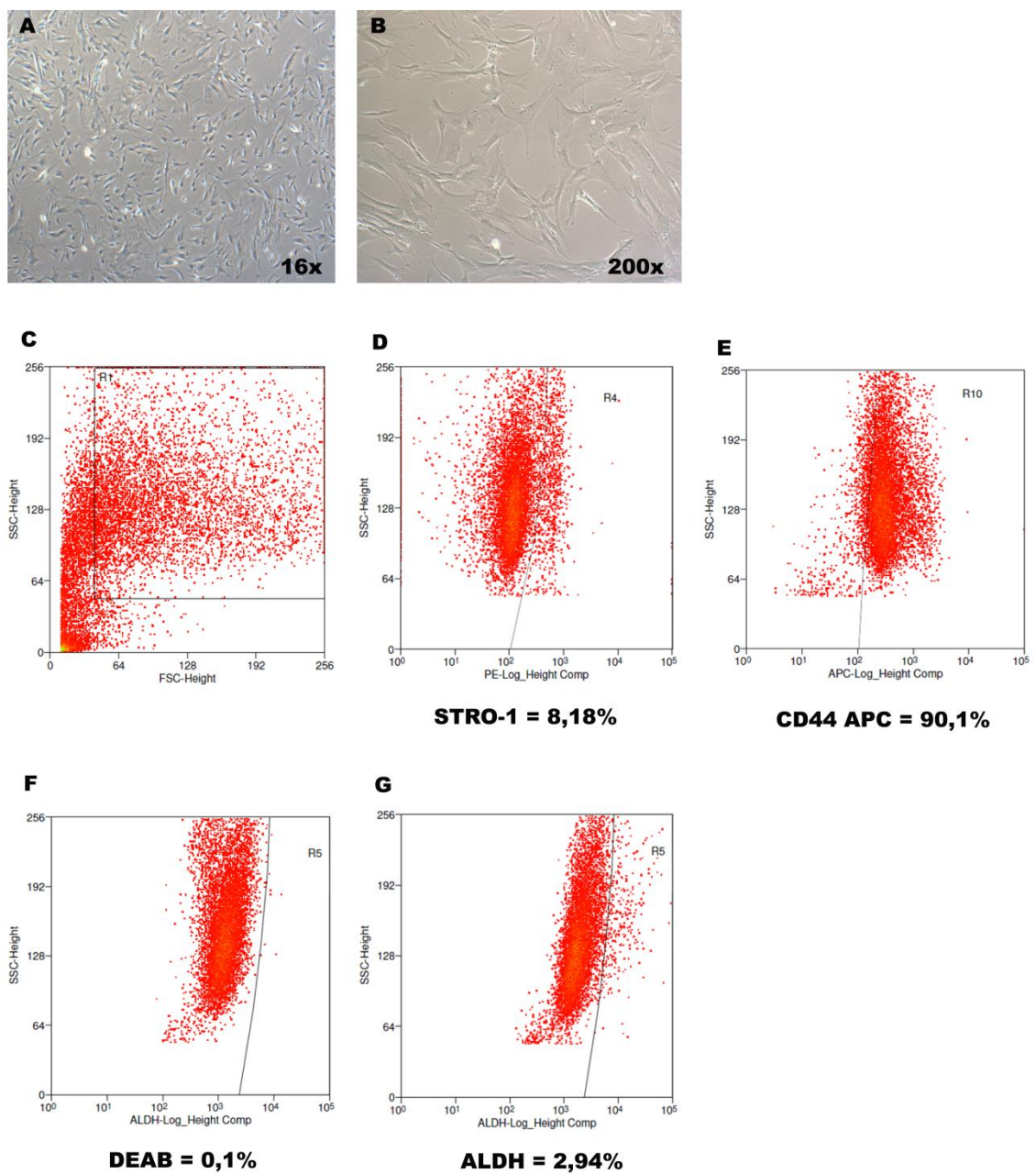


Figura 2. DPSCs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). DPSCs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.

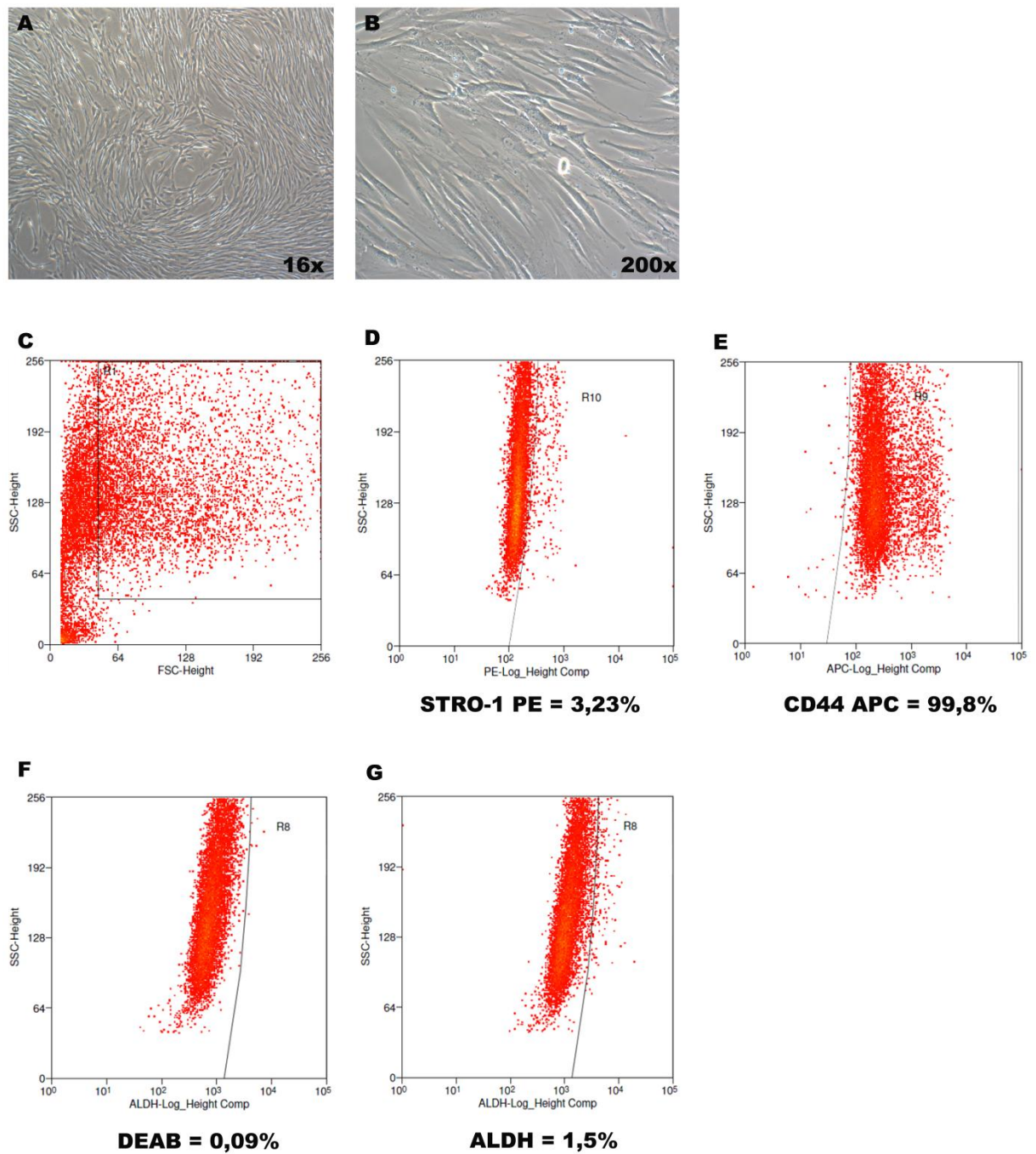


Figura 3. HDPFs cultivadas em DMEM/HEPES, suplementado com FBS 10% e 1% de antibióticos, observadas em diferentes aumentos em microscópio invertido (A e B). Células viáveis (C). Análise de citometria de fluxo para os marcadores STRO-1 e CD44 (D e E). HDPFs na presença (F) e ausência (G) do DEAB, inibidor da enzima ALDH.

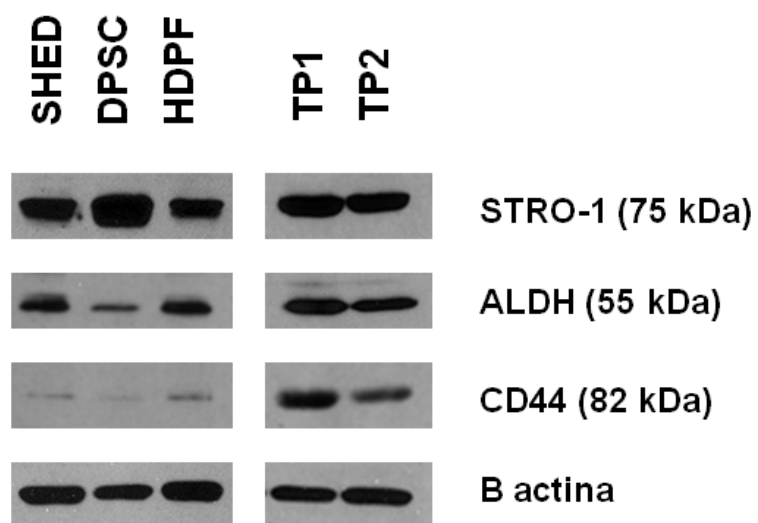


Figura 4. Expressão das proteínas STRO-1, ALDH e CD44 em SHEDs, DPSCs, HDPFs e no tecido pulpar como um todo. TP1 - tecido pulpar 1; TP2 - tecido pulpar 2.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não podermos afirmar que as células que apresentaram expressão positiva para a enzima ALDH no tecido pulpar através da técnica de imunohistoquímica sejam de fato células-tronco, acreditamos nesta possibilidade, visto que a marcação foi bastante específica e intensa, e que esta enzima tem sido utilizada em diversos estudos para a caracterização e isolamento de diferentes tipos de células-tronco, como as hematopoiéticas e tumorais. Ainda, marcadores usualmente utilizados para caracterizar células-tronco da polpa dentária, como o STRO-1 e o CD90, também apresentaram expressão positiva no tecido pulpar de dentes permanentes, sendo que o padrão de marcação dos mesmos foi semelhante ao encontrado para a ALDH, ou seja, células STRO-1⁺, CD90⁺ e ALDH⁺ estavam localizadas nos espaços perivasculares e nas fibras nervosas deste tecido.

Nos estudos realizados por DENG et al. (2010), a porcentagem de células exibindo atividade enzimática da ALDH detectada pela citometria de fluxo foi menor do que a porcentagem de células positivas para este marcador quando a técnica de imunohistoquímica foi empregada. Ainda de acordo com os autores, a ALDH pode ser utilizada para detectar células-tronco/progenitoras *in situ* em tecidos onde a expressão da enzima é limitada, visto que células fortemente marcadas foram observadas em regiões onde células-tronco/progenitoras estão supostamente localizadas (mama, pulmões, cólon, epitélio gástrico). Como já mencionado anteriormente, encontramos neste estudo uma marcação bastante forte e específica no tecido pulpar para a ALDH através da imunohistoquímica, ao passo que foram detectados valores percentuais bastante baixos para a atividade desta enzima quando células-tronco pulpares e fibroblastos foram analisados pela citometria de fluxo, estando de acordo com o que postularam os referidos autores em seus estudos.

Acreditamos que novas pesquisas para investigar o potencial da enzima ALDH para caracterizar e isolar células-tronco mesenquimais da polpa dentária são válidas, visto que células ALDH⁺ foram detectadas no tecido pulpar em áreas onde supostamente se encontram as células-tronco deste tecido.

Considerando os aspectos abordados nesta pesquisa, destacamos que a contribuição deste estudo foi a identificação de possíveis nichos de células-tronco mesenquimais/progenitoras residentes na polpa de dentes permanentes humanos, assim como a possibilidade de existência de mais de um nicho destas células. Sugerimos a realização de estudos que possam atestar que as células imunomarcadas nesta pesquisa sejam realmente MSCs.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a expressão dos marcadores testados neste trabalho (STRO-1, CD90 e ALDH) na polpa de dentes decíduos através da imunohistoquímica;
- Estabelecer uma metodologia de isolamento, cultivo e expansão das células da polpa de dentes permanentes e decíduos, avaliando, nestas células, parâmetros usualmente apresentados por células-tronco mesenquimais, como a expressão de determinados marcadores, entre os usualmente empregados e também novos, assim como caracterizar tais células quanto a sua pluripotencialidade, através da indução *in vitro* da diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica;
- Avaliar se a fração de células ALDH⁺, STRO-1⁺ e CD90⁺, residentes na polpa de dentes permanentes e decíduos, é capaz de proliferar, formar colônias, assim como se transdiferenciar;
- Utilizar estas células em estudos de regeneração tecidual, aliadas a matrizes biodegradáveis e fatores de crescimento;
- Avaliar o potencial imunossupressor de células-tronco mesenquimais isoladas de dentes permanentes e decíduos sobre células do sistema imune inato e adquirido.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H. *Imunologia básica*. Funções e distúrbios do sistema imunológico. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ABOUT, I et al. Pulpal inflammatory responses following non-carious class V restorations. *Oper Dent*, Seattle, v. 26, n. 4, p. 336-342, jul./ago. 2001.

ALONGI, Dominick J et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*, v. 5, n. 4, p. 617-631, jul. 2010.

ANJOS-AFONSO, Fernando; BONNET, Dominique. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*, New York, v. 109, n. 3, p. 1298-1306, fev. 2007.

ARMSTRONG, Lyle et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*, Dayton, v. 22, n. 7, p. 1142-51, 2004.

BAKOPOULOU, A et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 56, n. 7, p. 709-721, jul. 2011.

BATOULI, S et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, Washington, v. 82, n. 12, p. 976-981, dez. 2003.

BARRY, FP; MURPHY, JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, Oxford, v. 36, n. 4, p. 568-84, abr. 2004.

BENSIDHOUM, Morad et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, New York, v. 103, n. 9, p. 3313-3319, maio 2004.

BERKOVITZ, BKB; MOXHAM, BJ; HOLLAND GR. *Anatomia, embriologia e histologia bucal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 378p.

BERNARDI, Lisiane et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod*, Baltimore, v. 37, n. 7, p. 973-979, jul. 2011.

BHASKAR, SN. *Histologia e Embriologia Oral de Orban*. 10.ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989. 501p.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, v. 4, n. 2, p. 313-319, abr. 2008.

BITTENCOURT, Renata Aparecida de Camargo et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortop Bras*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 22-24, 2006.

BONNER-WEIR S, SHARMA A. Pancreatic stem cells. *J Pathol*, Edinburgh, v. 197, n. 4, p. 519-526, jul. 2002.

CAI, Jingli; WEISS, Mark L; RAO, Mahendra S. In search of "stemness". *Exp Hematol*, Copenhagen, v. 32, n. 7, p. 585-598, jul. 2004a.

CAI, Jingli et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem*, Oxford, v. 88, n. 1, p. 212-226, jan. 2004b.

CAPLAN, Daniel J et al. Root canal filled versus non root canal filled teeth: a retrospective comparison of survival times. *J Public Health Dent*, Raleigh, v. 65, n. 2, p. 90-96, 2005.

CASAGRANDE, Luciano et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, Tokyo, v. 99, n. 1, p. 1-7, jan. 2011.

CHAI, Yang et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, Cambridge, v. 127, n. 8, p. 1671-1679, abr. 2000.

CHEN, Yu-Chih et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 385, n. 3, p. 307-313, jul. 2009.

CHEN, KL et al. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *J Endod*, Baltimore, v. 39, n. 3, p. 351-356, mar. 2013.

CHUTE, John P et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 103, n. 31, p. 11707-11712, ago. 2006.

CORDEIRO, Mabel M. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*, Baltimore, v. 34, n. 8, p. 962-969, ago. 2008.

CORTI, Stefania et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*, Dayton, v. 24, n. 4, p. 975-985, abr. 2006.

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, Lonon, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-2213, jun. 2006.

DA SILVA MEIRELES, Lindolfo; CAPLAN, Arnold I; NARDI, Nance Beyer. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, Dayton, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, set. 2008.

DEMARCO, Flávio F et al. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

DENG, Shan et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*, San Francisco, v.5, n.4, p.e10277, abr. 2010.

DOMINICI M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, London, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOUVILLE, Julie; BEAULIEU, Raymond; BALICKI, Danuta. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, Larchmont, v. 18, n. 1, p. 17-25, jan./fev. 2009.

DUALIBI, MT et al. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*, Washington, v. 83, n. 7, p. 523-528, jul. 2004.

ESTRELA, Carlos et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 91-98, 2011.

EVANS, Ronald M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, Washington, v.240, n.4854, p.889-895, maio 1988.

FORBES, Stuart J. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)*, London, v. 103. n. 4, p. 355-369, out. 2002.

FORTIER, Lisa A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*, Philadelphia, v. 34, n. 5, p. 415-423, set./out. 2005.

GANG, Eun J et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, New York, v. 109, n. 4, p. 1743-1751, fev. 2007.

GINESTIER, Christophe et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 5, p. 555-67, nov. 2007.

GRONTHOS, Stan et al. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, New York, v. 84, n. 12, p. 4164-4173, dez., 1994.

GRONTHOS, Stan et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, dez. 2000.

GRONTHOS, Stan et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, Washington, v. 81, n. 8, p. 531-535, ago. 2002.

GRONTHOS, Stan et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, London, v. 116, n. Pt 9, p. 1827-1835, maio 2003.

HAERYFAR, SM; HOSKIN, DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol*, Baltimore, v. 173, n. 6, p. 3581-3588, set. 2004.

HARGREAVES, Kenneth M; GOODIS, Harold E. *Polpa dentária de Seltzer and Bender*. 1.ed. São Paulo: Quintessence, 2002. 501p.

HESS, David A et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*, New York, v. 104, n. 6, p. 1648-1655, set. 2004.

HESS, David A et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*, New York, v. 107, n. 5, p. 2162-2169, mar. 2006.

HUANG, Emina H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, Baltimore, v. 69, n. 8, p. 3382-3389, abr. 2009.

HUANG, George T; GRONTHOS, Songtao; SHI, Stan. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, Washington, v. 88, n. 9, p. 792-806, set. 2009.

HUANG, George T. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med*, v. 4, n. 5, p. 697-707, set. 2009

HUANG, George T. 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*, v. 16, n. 2, p. 605-615, fev. 2010.

HUANG, George T. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 3, p. 788-800, 2011.

IZADPANA, Reza et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, New York, v. 99, n. 5, p. 1285-1297, dez. 2006.

JAMAL, Mohamed et al. Dental stem cells and their potential role in regenerative medicine. *J Med Sci*, Dubai, v. 4, n. 2, p. 53-61, jun. 2011.

JAVASON, Elisabeth H; BEGGS, Kirstin J; FLAKE, Alan W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hemtol*, Copenhagen, v. 32, n. 5, p. 414-425, maio 2004.

JANUCHOWSKI, R; WOJTOWICZ, K; ZABEL, M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother*. No prelo.

JIANG, Feng et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 330-338, mar. 2009.

KANEKO, Ryuta et al. Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microscop* (Tokyo), Tokyo, v. 58, n. 6, p. 363-373, dez. 2009.

- KERKIS, Irina et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med*, 6:35, 2008.
- KOLYA, Cássia L; CASTANHO, Fernanda L. Células-tronco e a odontologia. *ConScientiae Saúde*, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 165-171, 2007.
- KRAMPERA, Mauro et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendal and skeletal muscle repair. *Bone*, New York, v. 39, n. 4, p. 678-683, out. 2006.
- KRISHNAMURTHY, Sudha et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*, Baltimore, v. 70, n. 23, p. 9969-9978, dez. 2010.
- LAINO, Gregorio et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, New York, v. 20, n. 8, p. 1394-1402, ago. 2005.
- LAINO, Gregorio et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*, Philadelphia, v. 206, n. 3, p. 693-701, mar. 2006.
- LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering. *Science*, Wasington, v. 260, n. 5110, p. 920-926, maio 1993.
- LIAO et al. Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential. *Exp Hematol*, Copenhagen, v. 39, n. 4, p. 393-412, abr. 2011.
- LIOZNOV, MV et al. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*, Basingstoke, v. 35, n. 9, p. 909-914, maio 2005.

LODI, D; LANNITTI, T; PALMIERI B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*, Rome, 30:9, 2011.

LOVELACE, Tyler W et al. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 133-138, fev., 2011.

MADAN, AK; KRAMER, B. Immunolocalization of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the developing root and supporting structures of the murine tooth. *J Mol Histol*, v. 36, n. 3, p. 171-178, mar. 2005.

MIURA, Masako et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, maio 2003.

MODINO, SA, SHARPE PT. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 50, n. 2, p. 255-258, fev. 2005.

MOORE, Kateri A; LEMISCHKA, Ihor R. Stem cells and their niches. *Science*, Washington, v. 311, n. 5769, p. 1880-1885, mar. 2006.

MOREB, Jan S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, v. 3, n. 4, p. 237-46, dez., 2008.

MURRAY, Peter E et al. Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc*, v. 132, n. 4, p. 482-491, abr. 2001.

MURRAY, Peter E; SMITH, Antony J. Saving pulps -- a biological basis. An overview. *Prim Dent Care*, London, v. 9, n. 1, p. 21-26, jan. 2002.

MURRAY, Peter E; GARCIA-GODOY, Franklin. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev*, Larchmont, v. 13, n. 3, p. 255-262, jun. 2004.

MURRAY, Peter E; GARCIA-GODOY, Franklin; HARGREAVES, Kenneth M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 377-390, abr. 2007.

MUSINA, RA; BEKCHANOVA, ES; SUKHIKH, GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Cell Tec Biol Med*, Moscow, v. 1, n. 2, p. 504-509, abr. 2005.

NADIG, Roopa R. Stem cell therapy – hype or hope? A review. *J Conserv Dent*, v. 12, n. 4, p. 131-138, out. 2009.

NAKAMURA, Sayaka et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*, Baltimore, v. 35, n. 11, p. 1536-1542, nov. 2009.

NAKASHIMA, Misako. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, Oxford, v. 16, n. 3, p. 369-376, jun. 2005a.

NAKASHIMA, Misako; AKAMINE, Akifumi. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*, Baltimore, v. 31, n. 10, p. 711-718, out. 2005b.

NIH STEM CELLS: Scientific Progress and Future Research Directions. http://stemcells.nih.gov/NR/exeres/3E41E0AE-C73C-4842-ADE8-83A17CD7563B_framless.htm?NRMODE=Published. Acesso em 13.07.2013.

NING, Hongxiu et al. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 413, n. 2, p. 353-357, set. 2011.

NÖR, Jacques E. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent*, Seattle, v. 31, n. 6, p. 633-642, nov./dez. 2006.

NOSRAT, Irina V et al. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*, Orlando, v. 238, n. 1, p. 120-132, out. 2001.

OHAZAMA, A et al. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*, Washington, v. 83, n. 7, p. 518-522, jul. 2004.

OTTO, WR. Lung epithelial stem cells. *J Pathol*, Edinburg, v. 197, n. 4, p. 527-535, jul. 2002.

PASHLEY DH, LIEWEHR FR. Estrutura e funções do complexo dentina-polpa, In: Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da Polpa*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

PERRY, Brandon C et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*, v. 14, n. 2, p. 149-156, jun. 2008.

PITTENGER, Mark F; MARTIN, Bradley J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*, Dallas, v. 95, n. 1, p. 9-20, jul. 2004.

PIVORIUNAS, A et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev*, Larchmont, v. 19, n. 7, p. 1081-1093, jul. 2010.

PRESCOTT, Rebecca S 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*, Baltimore, v. 34, n. 4, p. 421-426, abr. 2008.

PROCKOP, Darwin J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, Washington, v. 276, n. 5309, p. 71-74, abr. 1997.

PURTON, Louise E. Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *PPAR Res*, New York, 2007:87934, 2007.

REBELLATTO, CK et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med*, Maywood, v. 233, n. 7, p. 901-913, jul. 2008.

REYA, Tannishtha; MORRISON, Sean J; CLARKE, Michael F; WEISSMAN, Irving L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, London, v. 414, n. 6859, p. 105-111, nov. 2001.

RISBUD, MV; SHAPIRO, IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res*, Oxford, v. 8, n. 2, p. 54-59, maio. 2005.

RUCH, Jean Victor; LESOT, Hervé; BÈGUE-KIRN, Catherine. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 51-68, fev. 1995.

SAKAI, Vivien T et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*, Washington, v. 89, n. 8, p. 791-796, ago. 2010.

SAKDEE, JB et al. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*, Baltimore, v. 35, n. 6, p. 818-823, jun. 2009.

SCADDEN, David T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, London, v. 441, n. 7097, p. 1075-1079, jun. 2006.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, Berlin, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978.

SEO, BM et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*, Houndmills, v. 14, n. 5, p. 428-434, jul. 2008.

SHI, Songtao; GRONTHOS, Stan. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, New York, v. 18, n. 4, p. 696-704, abr. 2003.

SHI, Songtao et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniof Res*, Oxford, v. 8, n. 3, p. 191-199, ago. 2005.

SLACK JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, Washington, v. 287, n. 5457, p. 1431-1433, 2000.

SLÁDEK, Norman E. et al. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother Pharmacol*, Berlin, v. 49, n. 4, p. 309-321, abr. 2002.

SLÁDEK, Norman E. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol*, New York, v. 17, n. 1, p. 7-23, 2003.

SLOAN, Alastair J; WADDINGTON, Rachel J. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*, Oxford, v. 19, n. 1, p. 61-70, jan. 2009.

SMART, Nicola; RILEY, Paul R. The stem cell movement. *Circ Res*, Dallas, v. 102, n. 10, p. 1155-1168, maio 2008.

SMITH, Antony J; LESOT, H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, Boca Raton, v. 12, n. 5; p. 425-437, 2001.

SMITH, Antony J. Vitality of dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ*, Washington, v. 67, n. 6, p. 678-689, jun. 2003.

SMITH, Antony J et al. Dentine regeneration: key roles for stem cells and molecular signaling. *Oral Biosci Med*, London, v. 2, n. 2-3, p. 127-132, 2005.

STEVENS, Molly M. et al. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 102, n. 32, p. 11450-11455, ago. 2005.

STORMS, Robert W et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 96, n. 16, p. 9118-9123, ago. 1999.

STORMS, Robert W et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*, New York, v. 106, n. 1, p. 95-102, jul. 2005.

SUCHÁNEK J et al. Human dental pulp stem cells - Isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, v. 50, n. 3, p. 195-201, 2007.

TAKEDA T et al.. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*, Washington, v. 87, n. 7, p. 676-681, jul. 2008.

THESLEFF, Irma; VAAHTOKARI, Anne; PARTANEN, Anna-Maija. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 35-50, fev. 1995.

TZIAFAS, Dimitrios. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol*, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 281-290, fev. 1995.

TZIAFAS, Dimitrios. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*, Basel, v. 38, n. 3, p. 314-320, maio/jun. 2004.

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, London, v. 8, n. 9, p. 726-736, set. 2008.

VASILOU, Vasilis; PAPPA, Aglaia; ESTEY, Tia. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, New York, v. 36, n. 2, p. 279-299, maio 2004.

WALKER, MR; PATEL, KK; STAPPENBECK, TS. The stem cell niche. *J Pathol*, Edinburg, v. 217, n. 2, p. 169-180, jan. 2008.

WEI, X et al. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*, Baltimore, v. 33, n. 6, p. 703-708, jun. 2007.

YAMAZA, Takayoshi et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*, v. 1, n. 1, p. 5, 2010.

YAN, Xing et al. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*, Larchmont, v. 19, n. 4, p. 469-480, abr. 2010.

YAN, Ming et al. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev and Rep*, New York, v. 7, n. 1, p. 161-171, mar. 2011.

YANG, Xuechao et al. STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng*, v. 13, n. 11, p. 2803-2812, nov. 2007.

YANG, Xuechao et al. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*, v. 15, n. 2, p. 367-375, fev. 2009.

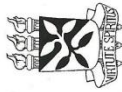
YU, Jinhua et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*, London, 11:32, 2010.

ZHANG, Weibo; YELICK, Pamela C. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*, 2010:856087, 2010.

ZOLLER, Margot. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*, London, v. 11, n. 4, p. 254-267, abr. 2011.

ZUC, Patricia et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, Bethesda, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, dez. 2002.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, em sessão ordinária no dia 06 de abril de 2011 resolveu através do Parecer Consubstanciado nº 06/11 aprovar o projeto de pesquisa "Imunolocalização de células-tronco na polpa de dentes decíduos e permanentes humanos", da pesquisadora Cintia de Vasconcelos Machado, área temática Grupo III, registro no SISNEP FR 374777, CAAE 0027.0.368.000-10.

Salvador, 12 de abril de 2011.


Prof. Dr. **André Carlos de Freitas**
Coordenador do CEP FOUFBA

Termo de Consentimento Informado

Este estudo, intitulado “Imunolocalização de células-tronco na polpa de dentes decíduos e permanentes humanos”, será realizado no Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, Nível Doutorado, e tem como objetivo avaliar a localização de células-tronco na polpa dental humana de dentes decíduos e permanentes.

A cárie dentária é uma doença que pode ser causada por vários fatores, como consumo exagerado do açúcar, higiene bucal deficiente e conseqüente acúmulo de placa bacteriana, assim como ausência de flúor. Se a cárie for detectada precocemente pode ser revertida, evitando técnicas invasivas como as restaurações. Porém, se progredir, pode evoluir a tal ponto, que a extração do dente seja a única opção a ser realizada. Estudos com células-tronco retiradas da polpa dental de dentes decíduos (dentes de leite) e dentes permanentes (dentes definitivos) podem trazer enormes avanços na área da odontologia para a população em geral, em um futuro próximo. A realização de pesquisas é muito importante para a descoberta de novos conhecimentos, os quais trazem benefícios a muitas pacientes.

Para participar deste estudo, é necessário que após a extração do dente de leite ou permanente, o mesmo seja doado para esta pesquisa. A participação neste estudo tem caráter voluntário, ou seja, o paciente não receberá nenhuma remuneração por fazer parte do mesmo. O paciente poderá retirar seu consentimento ou desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou ônus para o mesmo.

O paciente candidato a participar desta pesquisa será informado sobre a mesma e receberá uma cópia do termo de consentimento informado, o qual deverá ser lido com atenção e assinado pelo mesmo, autorizando a sua participação no estudo. O procedimento de extração dentária será realizado em ambulatório, sob anestesia local, respeitando-se as normas de biossegurança e utilizando-se a técnica cirúrgica mais adequada para cada caso, causando o menor desconforto possível ao paciente.

As informações a respeito deste estudo serão publicadas em periódico científico (revistas na área odontológica). Nenhum dado de identificação do paciente será publicado na revista, apenas as informações médicas e odontológicas que forem necessárias, assim como os procedimentos que serão realizados. Será preservado o direito da confidencialidade.

Toda e qualquer dúvida a respeito deste estudo poderá ser esclarecida com a responsável por esta pesquisa, Cíntia de Vasconcelos Machado, pelos telefones 71-81671709 ou 33365976, ramal 218 (Ufba).

Eu, _____, RG
 n° _____ (responsável pelo (a)
 menor _____, RG
 n° _____), declaro ter sido informado (a) e concordo com a participação
 como voluntário (a) no projeto de pesquisa acima descrito “Imunolocalização de
 Células-Tronco na Polpa de Dentes Decíduos e Permanentes Humanos”.

Data: ___/___/___

Assinatura do paciente ou responsável

Data: ___/___/___

Assinatura do responsável pela pesquisa