

**Escola de Ciências
da Saúde**



Luana Catramby Maciel Bittencourt

Yasmin Brandão Fonseca

A utilização de células tronco na odontologia

Rio de Janeiro, RJ.

2021

Luana Catramby Maciel Bittencourt

Yasmin Brandão Fonseca

A utilização de células tronco na odontologia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Professor José de Souza Herdy”, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof Dr Walter Arthur Silva Valente

Rio de Janeiro – RJ.

2022

Luana Catramby Maciel Bittencourt

Yasmin Brandão Fonseca

A utilização de células tronco na Odontologia

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio "Professor José de Souza Herdy",
como parte dos requisitos parciais para
obtenção do grau de bacharel em
Odontologia

Aprovado em 15 de junho de 2022.

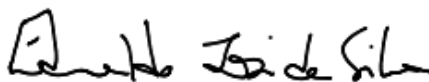
Banca Examinadora



Prof. Walter Arthur Valente



Prof. Luis Paulo Barreto



Prof. Ednaldo José da Silva

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Luiz e à minha madrastra Dani, por sempre valorizarem meus estudos e por nunca medirem esforços para que meu sucesso fosse alcançado. Agradeço imensamente e reconheço todos os obstáculos que enfrentaram para que eu pudesse chegar onde estou hoje.

À minha mãe Shalimar e ao meu irmão Thiago, que vivenciaram de perto todas as etapas desse processo e me ensinaram a enfrentá-lo com mais leveza e alegria. Vocês são meu equilíbrio diário e nada seria possível sem vocês ao meu lado.

À Sônia, Marly e Mariza, por serem, desde sempre, minhas maiores inspirações e exemplos de vida. Poder contar com vocês é um privilégio e sou muito grata por tudo que fazem por mim.

Ao meu companheiro Gabriel, que encontrei durante essa caminhada acadêmica e foi, desde então, meu porto seguro de todos os momentos.

Amo cada um de vocês com todo meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Alexandre, sem você essa caminhada não seria iniciada. A sua batalha diária para que eu e meus irmãos tenhamos uma boa educação é o meu maior presente.

À minha mãe Eliane, que sempre me criou com a liberdade e independência de ir atrás dos meus sonhos e me ensinou que sou capaz de qualquer coisa.

Aos meus irmãos, Rafaele e Raphael, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu parceiro de vida Fernando, que, desde que me deu a mão, nunca soltou nem por um segundo.

À Michelly, que entrou na minha vida durante essa caminhada e somou de diversas formas.

Amo vocês.

RESUMO

As células tronco são conhecidas por serem as células precursoras do corpo humano, pois, por meio delas, todas as outras células especializadas que estruturam os organismos são derivadas. Elas são diferenciadas em células tronco de origem embrionária e células tronco adultas, que, por sua vez, se subdividem de acordo com sua potência, destacando-se as células tronco hematopoiéticas e as células tronco mesenquimais, encontradas em diversos órgãos e tecidos, incluindo dentes. Por esse motivo, a odontologia vem ganhando notoriedade no campo de pesquisa das células tronco, a partir da sua extração da polpa de dentes permanente (DPSC), ligamento periodontal (PDLSC), e principalmente da polpa de dentes decíduos (SHED). Portanto, o que esperar das células tronco mesenquimais adultas como possibilidades na odontologia? Com investigações mais profundas voltadas para a terapia celular regenerativa a partir da odontologia, globalmente poderão ser desvendadas as incógnitas que ainda permeiam os estudos, e, então, teremos um forte potencial de substituição ou potencialização das atuais terapêuticas encontradas no mercado, trazendo grandes avanços na engenharia tecidual e no futuro da saúde mundial.

Palavras-chaves: Células tronco, SHEDs, odontologia.

ABSTRACT

Stem Cells are known to be precursor cells of the human body, from them, all the specialized cells that structure the organisms are derived. They are differentiated into embryonic stem cells and adults stem cells, which are subdivided according to their potency. Standing out the hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells, these last one are found in many tissues and organs, including teeth. For this reason, dentistry has been gaining notoriety in the stem cells's research field, since your extraction from dental pulp stem cells (DPSC), periodontal ligament stem cells (PDLSC) and mostly from human exfoliated deciduous teeth stem cells (SHED). Therefore, what to expect from adult mesenchymal stem cells as a possibility for dentistry? With deepest investigations focused on regenerative cell therapy from dentistry, these doubtful that still infuse the researches will be globally reveled. That way, we'll have a strong substitution potential or potentiation of the current therapies found on market, achieving big steps on the tissue engineering and the future of global health.

Key words: Stem Cells, SHEDs, Dentistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	12
2.2 CÉLULAS TRONCO ADULTAS.....	13
2.3 FORMAS DE OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO NO CORPO HUMANO.....	15
2.4 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) EM CAVIDADE ORAL.....	16
2.4.1 DPSCs	17
2.4.2 SHEDs.....	18
2.4.3 PDLSCs.....	19
2.4.5 COLETA.....	19
2.4.6 ISOLAMENTO.....	22
2.4.7 ARMAZENAMENTO E PRESERVAÇÃO.....	23
2.4.8 APLICABILIDADES ODONTOLÓGICAS.....	25
3 DISCUSSÃO	28
4 CONCLUSÃO.....	33
Referências bibliográficas	34
Anexos	40

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a humanidade está em uma incansável busca e pesquisa por substitutos teciduais, na tentativa de atenuar e compensar perdas fisiológicas e patológicas que venham a acometer negativamente órgãos e tecidos fundamentais para o organismo¹. Atualmente, as soluções encontradas para essa problemática são majoritariamente baseadas em técnicas de substituições não biológicas e sujeitas a falhas, o que ajudou a fulminar a busca por outros tipos de métodos, como a utilização de células tronco².

A descoberta e os estudos primários envolvendo esse tipo de células teve seu início no ano de 1930, na Alemanha, com uma experiência realizada pelo embriologista Hanns Spemann e pelo fisiologista Jacques Loeb. Baseados nessa pesquisa, em 1996, escoceses do instituto Roslin foram capazes de criar o primeiro clone já feito, a ovelha DOLLY, que foi o experimento inicial de clonagem que sofreu centenas de modificações e tentativas para o seu sucesso e, por esse motivo, serviu como possibilitador de maiores conhecimentos e avanços acerca do potencial celular dessas células até então pouco conhecidas. Com isso, a corrida em pesquisas e experiências celulares começaram a apresentar mais coerência e clareza, e, em razão disso, a evolução foi tornando-se inevitável, a ponto de, em 1999, as células tronco serem eleitas "Scientific Breakthrough of the Year" (avanço científico do ano) pela revista Science. ^{3,4,5}

Por meio dessas inúmeras observações, conclui-se que células tronco são células indiferenciadas, ou seja, capazes de se diferenciarem em qualquer outro tipo de célula⁶. Assim sendo, são cada vez mais uma fonte promissora na engenharia tecidual, que quando estimuladas laboratorialmente e implantadas no paciente, apresentam forte potencial de diferenciação e capacidade de regeneração de tecidos/órgãos lesados⁷. Classificam-se em células tronco de origem embrionária e células tronco adultas, que, por sua vez, se subdividem originariamente, sendo as mais relevantes, portanto, as células tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais, encontradas em diversos órgãos e tecidos, incluindo dentes⁸.

Suas atuais formas de obtenção possuem protocolos de coleta invasivos, e, junto ao risco do doador, levam à uma busca incessante por novas alternativas: a polpa de dentes decíduos, polpa de dentes permanentes e ligamento periodontal^{9,10}.

Os avanços na Odontologia, quando se trata de terapia celular, ainda são recentes. No ano de 2000, Gronthos identificou a presença das células tronco em polpa de dentes permanentes (DPSC). Três anos depois, seguindo a mesma pragmática de Gronthos, Miura e colaboradores extraíram essas células de dentes decíduos esfoliados (SHED). Nos anos seguintes, foram sendo encontradas em outros tecidos orais como ligamento periodontal, papila apical, folículo dental progenitor e periósteo oral.^{10,11,12}

O presente artigo tem como objetivo, portanto, esclarecer a funcionalidade das células tronco encontradas na cavidade oral e elucidar as diferentes formas de obtenção e aplicações que desenvolvem dentro da Odontologia, destacando a importância do cirurgião dentista na terapia celular. Serão analisados, através de uma revisão de literatura, artigos científicos compreendidos entre os anos 2000 e 2022, com a abordagem focada principalmente na extração de células tronco advindas da polpa de dentes decíduos esfoliados e de dentes permanentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

As células tronco são conhecidas por serem as células precursoras do corpo humano, considerando que é por meio delas que todas as outras células específicas que estruturam os organismos são derivadas¹³. Isso se deve ao fato de que elas são células indiferenciadas, com forte capacidade de autorrenovação e de diferenciação em multilinhagem, ou seja, possuem capacidade ilimitada de proliferação e potencial de gerar células descendentes especializadas¹⁴.

As células tronco embrionárias (CTE), derivadas dessa massa celular, são encontradas em estágio de pré-implantação no útero, cerca de 4 a 5 dias após o começo do desenvolvimento embrionário, ainda em fases iniciais de divisão celular do embrião, o qual recebe a designação de blastocisto, com apenas 150 células em sua composição¹⁵. Esse blastocisto é composto de uma camada externa que será responsável pela formação da placenta e dos anexos embrionários enquanto a massa de células internas será responsável pela formação do embrião em si, e é através dela que posteriormente serão formados os três folhetos embrionários¹⁶ (figura 1).

Todavia, sua forma de obtenção acontece através da extração de tal massa celular interna do embrião, causando a destruição do mesmo por meios físico-químicos, além de que grandes números de embriões são necessários para o isolamento e cultivo destas células, levando a um embate ético, moral, religioso e judicial.¹⁷

Em 1980, essa massa celular foi pela primeira vez isolada do embrião e cultivada *in vitro* sob circunstâncias adequadas, na expectativa de manter sua pluripotência, e foi a partir de então que se iniciaram os estudos de células tronco embrionárias, ainda que restritos a células removidas de camundongos, comprovando a capacidade de cultivação da mesma e diferenciação em todas os outros tipos celulares a nível laboratorial¹⁶. Foi somente em 1998 que esses estudos se estenderam a embriões humanos, que apesar de apresentarem a mesma capacidade que os embriões estudados dezoito anos antes, não participaram de testes clínicos por questões éticas e morais. ^{14,16,18,19}

Quanto a classificação das células tronco embrionárias, estas podem ser consideradas pluripotentes, ou seja, são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de tecido derivado de um dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), sem capacidade de formar tecidos extra-embrionários. Elas são derivadas de células ainda mais precoces do embrião, que se classificariam como totipotentes, sendo capazes de se diferenciar em todos os 216 tipos de células que compõem o corpo humano, incluindo a placenta e os anexos embrionários, sendo um exemplo disso o óvulo fecundado (figura 1).^{15,18,19,20,21,22}

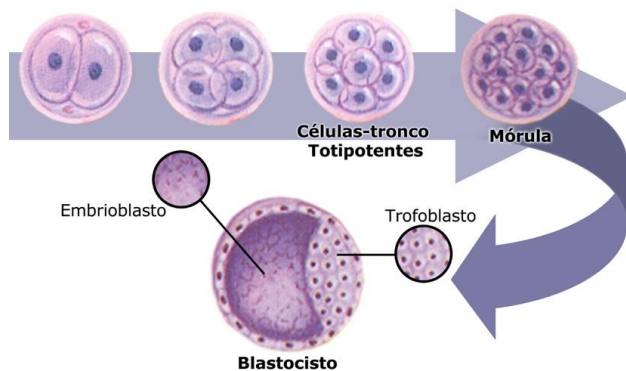


Figura 1: surgimento do blastocisto e das células tronco

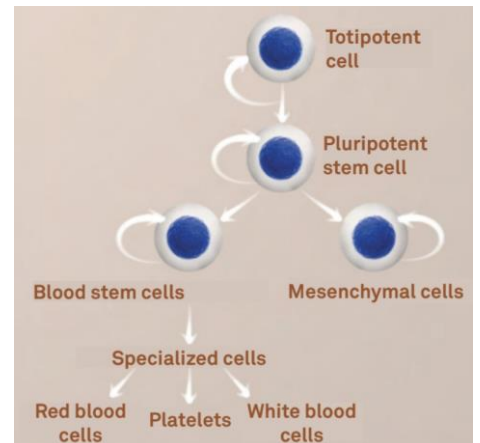


Figura 2: classificação das células-tronco

Fonte Figura 1: Roberto Sanchez. (casadaciência.com.br). Brasil: Casa da Ciência. (25 de Fevereiro de 2015) - (acessado em 01 de Junho de 2022). Disponível em : <https://www.casadaciencia.com.br/como-surgem-as-celulas-tronco/>

Fonte Figura 2: Ferreira, J.R.M., Greck, A.P. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for Dentistry: what to expect? Special article - Dental Press J. Orthod. 2020; 25 (03)

2.2 CÉLULAS TRONCO ADULTAS

As células tronco adultas, por sua vez, são aquelas obtidas em estágios pós embrionários, em que o indivíduo já está devidamente formado e desenvolvido, e podem ser encontradas em diferentes tecidos adultos especializados, tais como medula óssea, cordão umbilical, fígado, tecido adiposo, sangue, e até na polpa dos

dentes. Exercem função estabelecida de homeostase tecidual e renovação fisiológica e patológica, se essas se apresentarem em graus leves.^{19,20,21}

A descoberta desse tipo de células aconteceu na década de cinquenta, com as CTs hematopoiéticas derivadas da medula óssea, aplicável exclusivamente para doenças sanguíneas. Quarenta anos depois, 1990, foram identificadas CTs da medula óssea com capacidade de diferenciação não só em células sanguíneas como também em outras participativas de diferentes órgãos e tecidos^{14,23}. Por fim, foi identificada a presença dessas células para além da medula óssea, como em tecido adiposo, pele, fígado, coração, dente entre outros (figura 3), que foram reconhecidas com MSC (mesenchymal stem cells) por serem originadas no mesênquima.^{19,24,25}

Sendo assim, as CTs adultas podem ser classificadas quanto a sua origem, sendo as mais relevantes, portanto, as CTs hematopoiéticas, que apresentam capacidade de diferenciação em células especializadas hematológicas como eritrócitos e leucócitos; e as células-tronco mesenquimais (MSC), encontradas em outros tecidos/órgãos, incluindo os dentes, e apresentam capacidade de formação de tecidos duros, tais como cartilagens, ossos, nervos, músculos, células neurais, cardíacas, pancreáticas, dentre outros, a partir de células especializadas.⁸

Quanto a classificação relacionada ao potencial de diferenciação, as CTs adultas são oligopotentes ou unipotentes, significando respectivamente, que podem se diferenciar em células estreitamente relacionadas ou que são capazes de originar apenas um tipo celular.^{19,22}

Já as MSCs podem ser consideradas multipotentes, ou seja, diferenciam-se na maioria das células adultas, com exceção da placenta e anexos embrionários, gerando apenas células de tecidos específicos, sendo mais capacitadas do que as com potencial oligopotente.^{15,19}

É importante lembrar que todas as células tronco possuem como características a alta plasticidade, capacidade de diferenciação e autorrenovação.^{19,22}

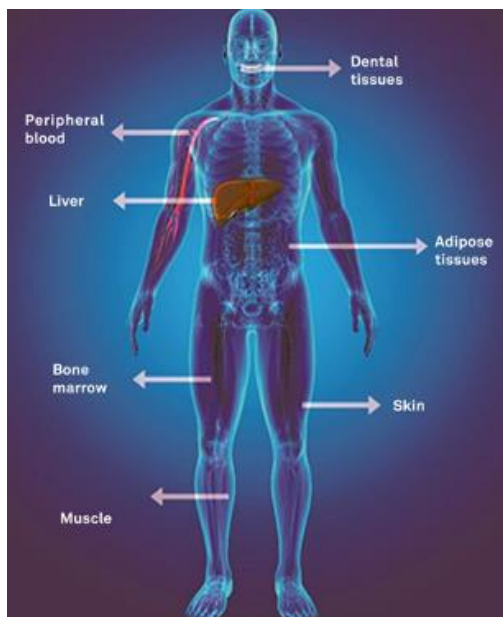


Figura 3: Fontes de obtenção de CTs.

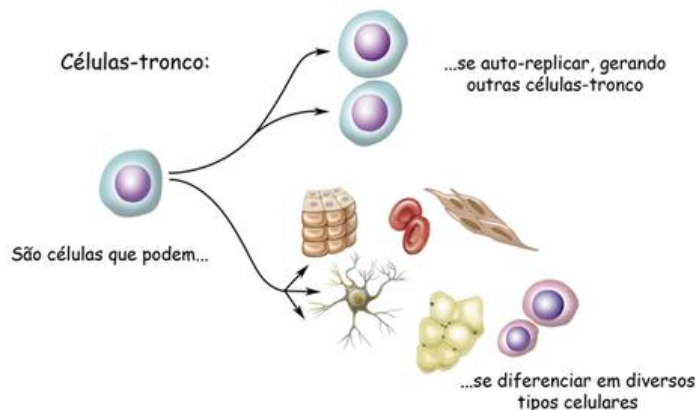


Figura 4: potencial das CTs.

Fonte Figura 3: Ferreira, JRM., Greck, A.P. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for Dentistry: what to expect? Special article - Dental Press J. Orthod. 2020; 25 (03)

Fonte Figura 4: Stevens Rehen (rntc.org.br) Brasil: RNTC- Rede Nacional de Terapia Celular. - (acesso em 26 de Maio de 2022). Disponível em : <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

2.3 FORMAS DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO NO CORPO HUMANO:

Durante o nascimento, o sangue presente na placenta e no cordão umbilical apresenta disponibilidade de CTs, e surgiram como promissoras para armazenamento e utilização em um futuro necessário, considerando que após o parto elas não apresentam funcionalidade e são, na maioria dos casos, descartadas. Apesar de ser um processo raramente executado e consideravelmente trabalhoso, é possível que o sangue dessas regiões seja purificado para então sofrer o processo de preservação e, por isso, já é uma realidade a presença delas em bancos de células e a aplicação clínica em pacientes humanos.^{19,22}

No próprio corpo humano, essas CTs adultas na forma de MSC são residentes de diversos tecidos/órgãos, onde exercem o papel de regeneração tecidual para ciclos naturais de reparação, além de sempre estarem realizando o processo de autorrenovação. Em teoria, todas elas poderiam ser isoladas para preservação, não obstante, isolar células do coração, fígado e cérebro é muito mais invasivo e tortuoso

do que realizar esse processo em áreas mais periféricas, por exemplo^{19,22}. Por esse motivo, cria-se um obstáculo na quantidade de fontes de obtenção que acabam ficando mais reduzidas e restritas. Todavia, ainda existem locais fáceis e seguros para a confecção dessa atividade, como é o caso do tecido adiposo, podendo ser obtido pelo simples processo de lipoaspiração²⁶; medula óssea, que é atualmente a mais reconhecida, coletando suas células por um processo de aspiração com agulha de punção na região de crista ilíaca posterior e podendo ser utilizadas para diferenciar-se em tecidos de derivados de sua mesma camada germinativa (mesoderma) e até mesmo de outra como a ectodema (caso de diferenciação em células neurais)²⁷; e cavidade oral.

2.4 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (MSC) EM CAVIDADE ORAL:

A cavidade oral apresenta variados sítios de obtenção de células tronco mesenquimais e cada um deles dá origem a subgrupos com características e peculiaridades independentes, apresentando diferentes nomenclaturas: PDLSC (periodontal ligament stem cells), SCAP (stem cells from apical papilla), Stem cells from third molars, DPSC (dental pulp stem cells) e SHED (stem cells from exfoliated deciduous teeth) (figura 5). Podem ser encontradas também em gengiva, periósteo, células progenitoras do germe dentário e outros^{28,29}. Todas elas foram identificadas e possuem a habilidade de se diferenciarem em células específicas quando colocadas em arcabouço com fatores de crescimento estimuladores, porém, estudos e experimentos ainda precisam ser mais aprofundados para declarar a real possibilidade de uso em humanos quando se trata de alguns desses subtipos.²⁸

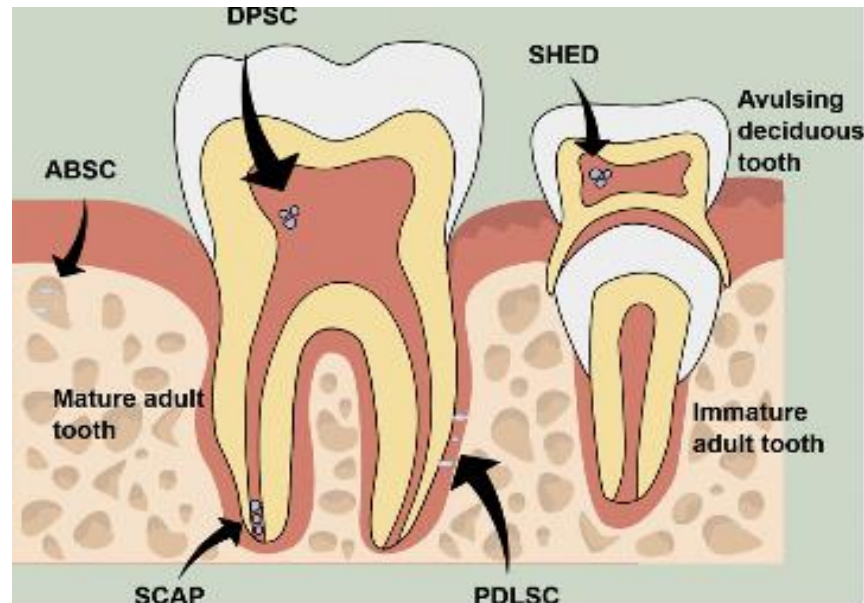


Figura 5: ilustração dos locais de obtenção de células tronco orais.

Fonte Figura 5: Zeitlin,BD. Banking on teeth. Stem cells and the dental office. Biomedical Journal.2020; 43(2): 124-133

2.4.1 DPSC (dental pulp steem cells)

As DPSCs são células tronco derivadas da polpa de dentes permanentes e foram as primeiras CTs descobertas em cavidade oral, no ano de 2000, por Gronthos.

Essas células apresentam origem embrionária no ectomesênquima, que é um mesênquima com presença de células ectodérmicas migratórias da crista neural, ocorrido no momento da odontogênese²⁰. Por esse motivo, apresentam grande aptidão para tornarem-se células neurais no momento de diferenciação, se submetidas a condições ideais de cultura e estímulo, assim como podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, células endoteliais e odontoblastos.⁶

Seus marcadores de superfície expressos são Stro-1, CD29, CD73, CD90, CD105 e CD166, e são negativos para marcadores hematopoiéticos como CD14, CD45, CD90, CD25 e CD28, sendo semelhantes às CTs encontradas na medula óssea. Entretanto, quando comparadas com estas, exibem maior capacidade de proliferação.^{6,30}

Consequentemente, as DPSCs imergem como futuras fontes viáveis de terapêutica para questões médicas de distúrbios neurológicos³¹, infarto do miocárdio³² e isquemia cerebral³³.

2.4.2 SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth)

As SHEDs, por sua vez, foram descobertas por Miura et. Al em 2003, e são obtidas na menor idade, quando o paciente ainda é criança e está na fase de esfoliação dentária. Elas se desenvolvem na sexta semana do pré-natal, e, por volta dos 7 anos, quando os dentes decíduos começam o processo de esfoliação, elas podem ser removidas da polpa coronária de dentes decíduos esfoliados armazenados na intenção de preservar a polpa, que é considerada um nicho ativo e rico em CTs que ainda não são fortemente afetados pelos efeitos cumulativos de fatores genéticos e/ou ambientais.^{33,34}

Em suas superfícies as SHEDs expressam os marcadores STRO-1, CD146, CD166, CD117, CD105, CD90, CD73, CD71, CD44, CD29, CD10 and SSEA-4. São negativos para CD197, CD184, CD133, CD106, CD63, CD49e, CD45, CD34, CD31, CD7 e HLA-DR.³⁵ (figura 6). Os marcadores CD71 e CD105 conferem às SHEDs propriedades como maior grau de proliferação e duplicações populacionais quando comparadas às DPSCs e CTs da medula óssea, sendo elas então as células mais vantajosas dentre todas as outras até então citadas quando considerado o quesito proliferação.^{30,34,36}

Assim como as DPSCs, possuem capacidade de diferenciação em células neurais, mas nesse caso, isso ocorre devido a presença de marcadores neurais em sua superfície que confere a elas potencial neurogenético. Além disso, *in vitro*, também são capazes de diferenciar-se em odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos, enquanto *in vivo* podem formar neurônios, adipócitos, odontoblastos e células osteoindutoras e endoteliais.^{10,11}

As SHEDs também apresentam propriedades imunomodeladoras, onde acredita-se que elas, ao entrarem em atividade, são capazes de estimular a liberação de citocinas que ajudam a contribuir no processo de imunomodulação³⁷. Apesar de alguns estudos mostrarem a significância dessas células ao atuarem positivamente com propriedades imunológicas, ainda é uma conclusão empírica e existem poucas informações que comprovem seus efeitos pró-inflamatórios.^{38,39}

Niche	Expression markers		Capacity of SHED	
	positive	negative	differentiation in	expression of
Deciduous tooth pulp Perivascular micro-environment	STRO-1	CD45	Osteoblasts	CBFA1, ALP, MEPE, bone sialoprotein
	CD146 (MUC 18)	CD34		Osteocalcin and osterix
	CD105	CD31	Odontoblasts	DSPP
	CD90	CD106		DMP-1, MEPE
	CD73, CD71	CD184	Chondrocytes	SOX 9, Col 2, and Col X
	CD44	CD197		
	CD29	CD133	Adipocytes	PPAR- γ_2
	CD10	CD63		Lipoprotein lipase
	CD166	CD49e		
	CD117	CD18	Neural cells	Nestin, β III tubulin, glutamic acid decarboxylase
	SSEA4	CD7		Neuronal nuclei, glial fibrillary acidic protein
		HLA-II/HLA-DR		NFM
				2,3-Cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase

Figura 6: marcadores de superfície das SHED e sua capacidade de diferenciação.

Fonte Figura 6: Saez DM, Sasaki RT, Neves ADC et al. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. Cells Tissues Organs 2016;202:269-280.

2.4.3 PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cells)

O ligamento periodontal é um dos tecidos de suporte do dente que conecta o cimento ao osso alveolar, com funções determinadas de nutrição, ancoragem e regeneração. Nele são encontradas fibras e células como cementoblastos, osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas, as PDLSCs. Essas são células tronco que podem ser extraídas dos ligamentos periodontais de raízes cujos dentes sofreram exodontia para então servirem como tratamento de doenças periodontais, pelo fato de que, *in vitro*, diferenciam-se em osteoblastos, cementoblastos e adipócitos, enquanto *in vivo*, podem originar estruturas semelhantes a tecido ósseo, cimento e cartilagem.^{11,40}

2.5 COLETA, ARMAZENAMENTO E PRESERVAÇÃO

2.5.1 COLETA:

O médico ou dentista que for coletar e obter as células tronco de seus pacientes deve considerar o grau de morbidade e dificuldade que irão enfrentar. Previamente a qualquer fonte de coleta, o exame sorológico é exigido pela ANVISA, ainda que resultados positivos ou negativos não impeçam o armazenamento e coleta, somente estabelecem meios mais adequados para a manipulação no laboratório. Após essa

etapa, se a decisão por preservar as células for positiva, serão submetidas a etapas de coleta, isolamento e armazenamento/preservação⁴¹ (figura 12).

Na odontologia, pelo fato de existirem diferentes locais de aquisição das mesmas, são empregues diferentes técnicas, específicas para cada área. Em casos de dentes decíduos, ou seja, extração das SHEDs, primeiramente o paciente deve ser submetido a uma avaliação clínica e radiográfica, para que possa ser agendada no momento mais favorável a exodontia desse elemento (necessitando que o dente decíduo esteja com 1/3 de raiz e o permanente com 2/3 de rizogênese completa)^{20,29}. Caso o dente seja esfoliado em momentos fora do consultório de forma espontânea, é fundamental que os pais já estejam cientes e preservem esse dente em leite de vaca ou até mesmo dentro da boca com ação salivar, e mais idealmente em solução adequada para tal (salina e estéril)²⁸. Assim sendo, se até o momento de preservação e armazenamento do mesmo a polpa se mantiver saudável (com fluxo sanguíneo normalizado), esse dente poderá ser enviado ao laboratório.

Porém, para evitar possíveis riscos a essa polpa e ser garantido um prognóstico mais favorável de coleta, preferencialmente, a extração deve ser feita em data marcada, no consultório, com uma antecedência de no mínimo 7 dias, dessa forma o laboratório consegue organizar o kit de coleta (figura 7) que terão 48 horas a partir do momento da coleta para darem entrada ao laboratório. Deve ser ofertado ao paciente um ambiente com controle rigoroso de assepsia e profilaxia intrabucal, com clorexidina 2% e a extração deve ser feita sob anestesia local⁴². Os mesmos cuidados devem ser tomados caso o dente de escolha para retirada das células tronco seja o terceiro molar ou algum supranumerário, desde que não precisem passar pelo processo de odontosecção. Dessa forma a saúde da polpa dentária será mantida sem maiores riscos, sob os cuidados do cirurgião-dentista e seus recursos facilitadores^{28,42}.

O perióstio do palato, por sua vez, apresenta um protocolo específico de coleta. Deve ser realizada também sob anestesia local e com o auxílio de um bisturi circular descartável com 3mm de diâmetro, e é feito com ele um movimento rotacional de incisão. O local mais indicado para tal é na região dos pré-molares superiores a uma distância de 4mm da junção amelocementária dos mesmos, de modo a evitar hemorragias. Não é necessária uma sutura local por ser um procedimento minimamente invasivo⁹.

No momento da extração, independente de qual sítio seja escolhido para coleta, o profissional deve ter a disposição em seu consultório o KIT referente ao

laboratório parceiro (figura 7) contendo a solução para meio de cultura (figura 8) para o armazenamento da coleta, além de todo o material biológico necessário durante o deslocamento do dente até o centro de processamento celular. Com o elemento já extraído e em condições estáveis e compatíveis com o usual aceito pelos laboratórios, o profissional deve armazená-lo no frasco preenchido com solução salina estéril, que evitará a desidratação e fornecerá nutrientes ao mesmo durante a etapa de transporte, que devem estar acondicionadas e não podem ultrapassar o período máximo de 48 horas^{9,28,29,42}.

É importante lembrar que a etapa de coleta pode variar de acordo com cada laboratório, que podem diversificar seus protocolos.



Figura 7: KIT de transporte de material coletado. Imagem autoral.



imagem 8: Solução para meio de cultura do material coletado. Imagem autoral.

2.5.2 ISOLAMENTO

Após a chegada do material, inicia-se pela limpeza da superfície externa da embalagem enviada pelo cirurgião dentista, que em seguida é direcionada para o “pass-through” (figura 9), espécie de autoclave, que diminuirá os riscos de infecção⁴¹.

Assim, inicia-se a limpeza da própria superfície dentária, que ocorre por três vezes, com Dulbecco's phosphate buffered saline (PBSA) livre de íons de cálcio e magnésio. Em seguida, a polpa é retirada da câmara pulpar e condutos com o auxílio

de um escavador estéril, e essa polpa sofre com o processo de digestão, feito, geralmente, com colagenase tipo I e dispase, em um processo de uma hora em temperatura de 37°. Posteriormente, essas células isoladas passam por um filtro de centrifugação, onde ficarão em suspensão, e nesse momento já é possível confirmar a viabilidade de uso das mesmas^{10,29,43}.

Com isso são realizados o controle de qualidade das células que estão sendo laboratorialmente multiplicadas assim como ensaios de qualidade e viabilidade. Esse teste de viabilidade pode ser feito através de um método denominado citometria de fluxo e consiste em separar uma parcela de toda a amostra disponível, que será marcada por sondas ou anticorpos moleculares fluorescentes, podendo haver marcadores específicos de células tronco ou marcadores de viabilidade⁴⁴. Com isso, é possível analisar se aquela amostra possui viabilidade celular, mas é preciso uma rígida indicação para ser realizada sabendo que sua utilização pode gerar manuseio excessivo das células que poderiam, assim, perder seu potencial de ação.

É importante lembrar que a etapa de isolamento pode variar de acordo com cada laboratório, que podem diversificar seus protocolos.



Figura 9: “pass-through”. Imagem autoral.

2.5.3 ARMAZENAMENTO E PRESERVAÇÃO

O Processo final é estabelecido pelo armazenamento e preservação realizados de duas diferentes formas: a criopreservação ou o congelamento magnético.⁴³

A criopreservação mantém as células em temperaturas abaixo de zero, a fim de interromper suas atividades biológicas, com a presença de vapor de nitrogênio líquido chegando a temperatura abaixo de -150°C ⁴³. Esse congelamento é feito de forma gradual e escalonada, sendo -1°C por minuto de forma controlada, seguida de armazenamento a longo prazo, evitando possíveis danos celulares. Nessas condições, a atividade celular acaba sendo interrompida, porém continua com sua capacidade biológica de atividade mantida em caso de descongelamento quando solicitado pelo paciente. ^{28,29,43}

As células são suspensas em meio de preservação, que possivelmente contém fatores de crescimento e um crioprotetor, como o dimetilsulfóxido (DMSO), que interrompe o crescimento dos cristais de gelo que podem acarretar na redução da viabilidade geral celular. Essas amostras são divididas em quatro tubos distintos e armazenadas em diferentes tanques de criogenia (figuras 10 e 11), construídos com um polipropileno de alta densidade²⁸. Com isso, em caso de acidentes com alguma dessas amostras, haverá outras armazenadas. ⁴³

Já o congelamento magnético surgiu e é utilizado na Universidade de Hiroshima, conhecido como CAS (sistema de células vivas), e funciona através da aplicação de um campo magnético fraco sobre as células ou tecidos, levando ao ponto de congelamento aos 7°C , instante em que este campo é desligado. Dessa forma, o corpo é resfriado uniformemente sem ser levado a um congelamento total e assim, evitados danos a parede celular derivados da expansão do gelo. ^{29,43}

É importante lembrar que a etapa de armazenamento e preservação pode variar de acordo com cada laboratório, que podem diversificar seus protocolos.



Figuras 10 e 11: tanques de criogenia. Imagens autorais.

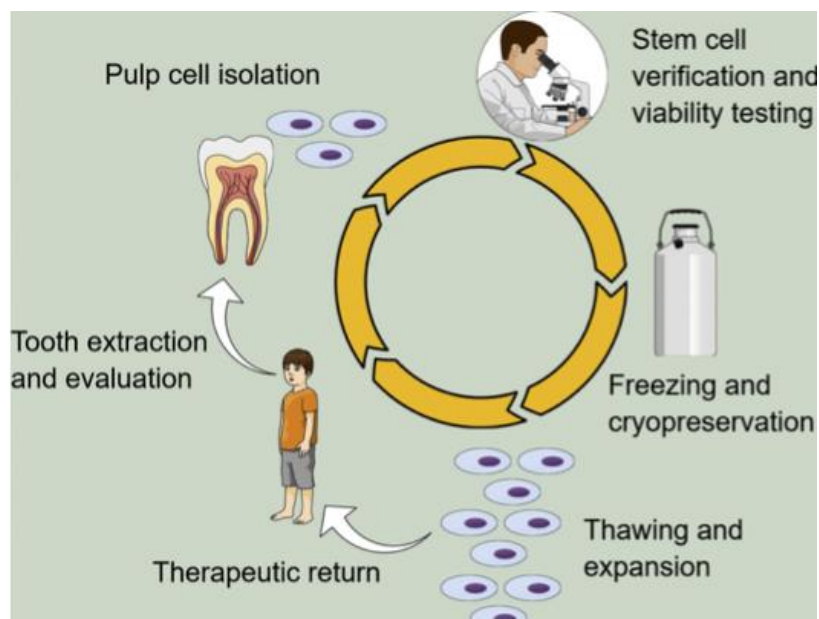


Figura 12: ilustração do ciclo completo de coleta, isolamento e preservação de CTs orais.

Fonte Figura 12: Zeitlin,BD. Banking on teeth. Stem cells and the dental office. Biomedical Journal.2020; 43(2): 124-133

2.6 APLICABILIDADES ODONTOLÓGICAS

As células tronco derivadas da cavidade oral são importantes inclusive para a própria odontologia regenerativa, considerando que elas possuem forte capacidade em formar tecidos do complexo dentinário. Suas aplicações são aptas a serem utilizadas em diferentes ramos da odontologia como a ortodontia, endodontia, periodontia, cirurgia bucomaxilofacial entre outras, e atuam de forma benéfica diminuindo as dificuldades atualmente enfrentadas pelos dentistas no que diz respeito a falhas em tratamentos reabilitadores nessas áreas.^{40,45}

É comprovada a capacidade que células como DPSCs e SHEDs apresentam na formação óssea, sabendo que elas têm a habilidade de diferenciação/recrutamento de células osteogênicas através de marcadores de superfície similares a elas, induzindo, portanto, a formação de novo osso³⁴. Esse fato é valioso para toda a medicina regenerativa, e na odontologia, são cruciais principalmente para a ortodontia, considerando que a facilidade da remodelação óssea na presença dessas células quando colocadas em *scaffolds* ampliaria os limites da movimentação ortodôntica²⁰; para a implantodontia, analisando que essa indução de formação óssea pode significar uma diminuição nos insucessos causados por defeitos ósseos na colocação de implantes, podendo atuar conjuntamente nas ações de biomateriais. Isso já foi comprovado em um estudo realizado por Lucaciu et al.⁴⁶, que experimentaram adicionar DPSCs (extraídas de dentes impactados) em superfícies de implantes de titânio e observaram que houve significativa regeneração óssea local mesmo com a presença do implante.; e para as cirurgias bucomaxilofaciais, em que a questão óssea acaba sendo de fundamental importância uma vez que o uso de células tronco derivadas da polpa dental lhe confere um perfil de diferenciação osteogênica, que apesar de não ser o atual “padrão ouro”, é uma alternativa emergente à problemática de defeitos bucomaxilofaciais e demonstra forte potencial na engenharia desses tecidos⁴⁷.

Para a periodontia, as ações das células tronco também são muito significativas, já que elas têm capacidade de regeneração não só do osso como também dos outros tecidos periodontais. Doenças periodontais apresentam alta taxa de prevalência na sociedade, o que impulsionou a necessidade de novas terapias efetivas para essas desordens. O destaque nessa disciplina está nas PDLSCs, ou seja, as próprias CTs encontradas no ligamento periodontal. O fato de essas células

apresentarem capacidade, *in vitro* e *in vivo*, de diferenciação em fibroblastos, adipócitos, osteoblastos e células semelhantes ao cimento (ou seja, células de tecido mole e duro), permitem que elas sejam uma futura possibilidade de regeneração periodontal completa, que atualmente, não é uma realidade na terapia periodontal ⁴⁸ (figura 13). Além disso, o fato de as CTs derivadas da cavidade oral possuírem capacidade anti-inflamatória, permitiria a regeneração de problemas derivados de inflamações gengivais características da gengivite e periodontite, diminuindo os níveis de citocinas envolvidas nesse processo. Para que a implantação dessas CTs dentárias seja de fato efetivas, é importante lembrar que é uma prática que depende de um bom suprimento sanguíneo, sinais moleculares adequados e a proliferação *in situ*.⁶

A endodontia também é beneficiada. Pesquisas realizadas em dentes de cachorro demonstram que a utilização de DPSCs autólogos em canais que sofreram do processo de pulpectomia foram completamente regenerados, com neurogênese e vasculogênese, representando um novo tecido pulpar saudável⁵⁰. Outros estudos comprovaram também que SHEDs implantadas em canais radiculares humanos são capazes de sobreviver e se diferenciar em odontoblastos, e nessas condições experimentais, foram funcionais na formação de dentina tubular ⁵¹. Tais regenerações surgem como opções eficazes ao atual tratamento endodôntico, que combate as infecções, porém não apresenta capacidade de restaurar o tecido pulpar perdido e a vitalidade do dente.

Por fim, apesar de ser uma realidade ainda muito desconhecida e, portanto, com limitada aplicação, estudos já demonstraram a capacidade de DPSCs em formar tecido dentinário. Por serem células capazes de se diferenciarem e proliferarem como odontoblastos, conseguem então sintetizar matriz e induzir a formação de dentina terciária/reparadora.⁵²

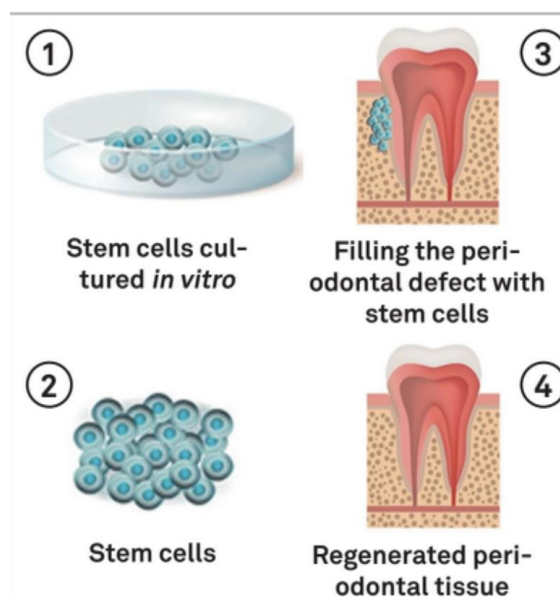


Figura 13: Células-tronco mesenquimais para regeneração periodontal

Fonte figura 13: Ferreira, JRM., Greck, A.P. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for Dentistry: what to expect? Special article - Dental Press J. Orthod. 2020; 25 (03)

3. DISCUSSÃO:

Existe uma dualidade quando discutida qual a melhor origem das células tronco. Por um lado, as células tronco adultas apresentam menor potencial de diferenciação celular e não tem a capacidade de originar qualquer tipo de células derivadas dos três folhetos germinativos, qualidade presente apenas nas células tronco embrionárias^{13,53}. Por outro, elas não sofrem com questões éticas e morais no momento da coleta.

As CTs embrionárias, por serem retiradas no momento embriogênico, geram discussões para além do ramo científico, levantando questões filosóficas e morais que fazem com que as pesquisas com embriões humanos ocorram de forma mais lenta. O dilema entre seu grande potencial celular e a ética gira em torno da problemática de considerar se é legal a prática de utilizar um embrião para esses fins, considerando que ele será destruído na prática⁵⁴. Com isso, muitas opiniões vão contra a utilização deste para uso científico com a percepção de que iria contra os direitos humanos do embrião, com a ideia de que não é ético causar a destruição de uma vida pela outra¹⁵.

No Brasil, de acordo com a Lei de biossegurança 11.105 de 2005, “É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento” desde que sejam doados com o consentimento dos pais, e que estejam congelados a pelo menos 3 anos, tempo máximo dado para que os pais ponderem a decisão⁵⁵.

Isso se estende também a parte médica, uma vez que muitas pesquisas ainda precisam ser realizadas com as CTs embrionárias para desvendar a real segurança em usá-las. Por serem altamente proliferativas e indiferenciadas, seu crescimento pode ocorrer de forma desorganizada e desordenada caso não sejam estimuladas da forma correta, o que causaria a formação de tumores e teratomas. Além disso, pouco se sabe sobre a compatibilidade delas com o paciente, correndo risco de rejeição e possibilidade de respostas autoimunes.¹¹

Portanto, segundo Felipe Janz¹⁷, “as células tronco embrionárias foram, em boa parte, substituídas por células adultas reprogramadas nos ensaios laboratoriais”. Isso afirma o fato de que células tronco embrionárias são cada vez mais mantidas de lado devido a tais embargues sociais, dando lugar aos estudos e pesquisas sobre células tronco adultas ou iPS (células tronco pluripotentes induzidas), células fibroblásticas convertidas em células tronco *embrionárias-like*, descoberta de 2006 pelos pesquisadores Takahashi e Yamanaka⁵⁶.

Um outro embate acirrado entre pesquisadores está na dúvida acerca de qual é, de fato, o sítio da cavidade oral que é mais favorável para a extração de células tronco. Com o avanço científico, as células tronco extraídas da polpa de dentes decíduos (SHEDs) e aquelas extraídas da polpa de dentes permanentes (DPSCs) ganham notoriedade nas atuais pesquisas.

Segundo Aurora et. al 2009 ⁴³, a forma de obtenção da SHEDs apresenta-se como fruto do processo natural da exfoliação dentária, surgindo assim como uma técnica menos invasiva em comparação às DPSCs, ainda que estas apresentem-se como uma prática pouco invasiva, visto que podem ser obtidas através da polpa de terceiros molares e pré-molares, os quais são altamente solicitados pelos cirurgiões-dentistas para exodontia em pacientes cujo estão sob terapia ortodôntica. Dessa forma, as SHEDs apresentam uma significância ética favorecida quando comparada

às DPSCs ou outras formas de obtenção das células tronco, por apresentar um contexto indolor, natural e minimamente invasivo.⁵⁷

A compatibilidade da doação de células tronco ao receptor é um fator decisivo à tal problemática, e as SHEDs destacam-se mais uma vez, visto que garantem um doador compatível ao receptor, por ser um transplante autólogo. Este por sua vez, é vantajoso por não apresentar reações imunológicas ou rejeição tecidual, não necessitar de terapia imunossupressora e ainda reduzir o risco de complicação transmissíveis⁴³. Além disso, Kerkis e Caplan⁵⁸, em 2012, apontaram que as SHEDs podem ser utilizadas em parentes próximos do doador, tais como pais, irmãos, avós e tios.

Zeitlin et al 2020²⁸, apontam que “expressões genéticas analisadas nas DPSCs são equivalentes aos genes encontrados nas células tronco da medula óssea.” Todavia, estudos comparativos apresentam as SHEDs com ainda mais propriedades proliferativas do que DPSCs e podem ter uma maior propensão para a sobrevivência do que os seus homólogos adultos.^{10,28} A significância de tal fato é explícita visto que há um pequeno número de células tronco na polpa dentária, e, atualmente, a procura pela expansão das poucas células isoladas da polpa de um dente a um número que pode ser útil terapeuticamente, é um dos serviços mais procurados nos bancos de dentes.²⁸

Ambas, tanto as SHEDs quanto as DPSCs, são aptas a se diferenciar, *in vitro*, em linhagens de células odontogênicas, osteogênicas, adipócitas e neurogênicas³⁶. Entretanto, quando comparadas *in vivo*, Miura et. Al (2003)³⁴ e Seo Et Al (2008)⁴⁸ demonstraram que as SHED não apresentam capacidade de se transformarem em osteoblastos, mas sim em células semelhantes, *osteoblast-like*, que aí então são capazes de ativar por osteoindução a formação de novo osso^{10,11}. Por outra via, as DPSCs, *in vivo*, são capazes de se proliferar suficientemente a ponto de criar um novo osso completo incluindo sua vascularização, portanto, se estiverem em condições adequadas e estímulos, conseguem se diferenciar em osteoblastos^{6,11}. Apesar disso, um transplante realizado em osso bovino cerâmico (*in vivo*) foi realizado por Wang et Al (2012)³⁰ para comparar esses dois tipos celulares, e foi evidenciado que as SHEDs apresentam maior potencial de mineralização, sendo mais eficientes¹⁰.

Estudos de 2000 e 2003, Miura³⁴ e Gronthos⁵⁹ respectivamente, também demonstraram a diferenciação de SHEDs em células semelhantes a odontoblastos, porém sem apresentar a mesma capacidade de regenerar o complexo polpa-dentina como ocorre nas DPSCs. Entretanto, em pesquisas mais recentes, autores como Cordeiro et. Al⁶⁰ em 2008 e Sakai et. Al⁶¹ em 2010, já foram contra essa afirmativa e apresentaram experimentos em camundongos em que as SHEDs foram sim capazes de formar odontoblastos funcionais, regenerando o tecido pulpar e dentinário, *in vivo*.

A corrida científica se intensifica por buscas para tratamentos de doenças degenerativas, como a doença de Parkinson. Segundo Luciano Silva et. al¹¹, 2015, “as DPSCs são possivelmente mais propensas à formação de neurônios quando comparada á outras formas de obtenção de células tronco.” Isso porque esse tipo celular é originado da crista neural craniana, e, portanto, possuem características neurais e capacidade de recrutamento endógeno de células tronco neurais^{40,62}. Entretanto, estudos comparativos apresentam as SHEDs também como possíveis fontes promissoras de estudos em doenças degenerativas neurais pelo fato de apresentarem um número expressivo de marcadores neurais em sua superfície.^{10,34,58,63}

Ainda que as SHEDs apresentem uma fonte amplamente encontrada em paciente jovens, em 2005, foi comprovada a possibilidade de obtenção de DPSCs em pacientes mais velhos, uma vez que, aqueles que possuem até 30 anos não apresentaram diferenças substanciais nas mesmas quando comparados a pacientes mais jovens, característica vantajosa por permitir a possibilidade de doadores potenciais apesar da idade, principalmente para aqueles que perderam a oportunidade de extração através das SHEDs.¹¹

Em relação ao processo de armazenamento e preservação das células tronco, as SHEDs apresentam vantagens no isolamento, manipulação e expansão *in vitro* desses dentes, que são significativamente mais fáceis⁵⁸.

Muitas pesquisas e estudos também estão voltados para a polêmica sobre a possibilidade de utilizar dentes cariados para extração de células tronco, visto que a cárie dentária é um grande problema de saúde pública brasileira e atinge, aos cinco anos de idade, cerca de 53,4% das crianças do país⁶⁴. Logo, dentes decíduos com

lesões de cáries poderiam ser uma fonte de obtenção de células-tronco, gerando esperança de um novo futuro?

Segundo Werle et al. 2015 ⁶⁴, “células-tronco do tecido pulpar de dentes decíduos cariados exibem propriedades semelhantes a essas células obtidos da polpa de dentes decíduos hígidos.”. Ademais, Tsai et al. ⁶⁵ também concluiu que células tronco possuem potencial de serem isoladas de dentes decíduos cariados, porém, os números apresentam uma correlação inversamente proporcional à gravidade clínica da cárie além de que há uma diferença no aumento da taxa de mediadores inflamatórios e moléculas do sistema imunológico inato das células tronco nos dentes doentes, quando comparados aos dentes saudáveis.⁶⁵

Outro ponto que entra em conflito com cientistas ao redor do mundo é a respeito ao modo em que essas células tronco são preservadas na etapa laboratorial final. Apesar de a criopreservação ser utilizada na maioria dos “*bio-banks*”, evidências mostram que a forma através de campos magnéticos é mais favorável para as células, considerando que elas não são congeladas como ocorre na criopreservação e com isso, apresentam menos chances de danificação da parede celular²⁸. Isso porque o congelamento gerado leva a formação de cristais de gelo na superfície celular, e, dessa forma, pode causar eventos como ruptura da membrana, osmótica excessiva e desidratação rápida⁶⁶. Além disso, a infraestrutura para manter um sistema CAS é consideravelmente menos custoso quando comparado ao sistema de criogenia²⁹.

Por fim, no que se refere à viabilidade das células tronco preservadas ao decorrer dos dias, estudos mais antigos compreendidos entre os anos de 2010 e 2012 garantiram que a criopreservação das SHEDs não gera nenhuma alteração celular com o passar do tempo, mantendo-as com a mesma capacidade de diferenciação, nenhum tipo de degeneração e certeza de estabilidade da cultura ^{67,68}. Em contrapartida, pesquisas mais modernas dos anos de 2014 e 2015 foram contrárias e comprovaram que a passagem do tempo influencia na atividade celular e no potencial dessas células na proliferação. O estudo de 2014, por Ji et. al ⁶⁹, demonstrou que células criopreservadas há mais de 3 meses tiveram sua atividade reduzida e, após 4 meses, aumentou a quantidade de apoptose celular. Já em 2015, por Lee et. al ⁷⁰, foram comparadas SHEDs frescas com SHEDs criopreservadas entre 1 e 8 meses, o que trouxe como resultado uma diferença de viabilidade celular quando

transplantadas in vivo, em que as células frescas obtiveram maior capacidade de produzir tecido duro neoformado, quantitativamente falando ^{10,69}.

4 CONCLUSÃO

A terapia celular já é uma realidade na medicina regenerativa, analisando que o tratamento de pacientes doentes com emprego de células tronco derivadas da medula óssea e cordão umbilical já vem sendo realizado ao redor do mundo mesmo que de forma paulatina ^{19,71}. A dificuldade em apressar esse movimento está na complicação que é obtê-las, o que acaba por deixar os estudos e pesquisas um tanto estagnados. As células tronco derivadas da cavidade oral estão emergindo como uma alternativa a esse contratempo, ofertando fácil acessibilidade e ao mesmo tempo, excelentes características funcionais sejam elas as SHED, DPSC ou PDLSC. Com investigações mais profundas voltadas para a terapia celular regenerativa a partir da odontologia, globalmente poderão ser desvendadas as incógnitas que ainda permeiam os estudos e então, teremos um forte potencial de substituição das atuais terapêuticas encontradas no mercado, trazendo grandes avanços na engenharia tecidual e no futuro da saúde mundial ⁴⁰. Ademais, destaca-se o papel do cirurgião-dentista, o único homologador da extração de células-tronco da cavidade oral, como um marco importante na ciência e na odontologia ²⁰.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Soares MVR. Biomateriais utilizados na prática odontológica: uma revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia). Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2015.
- 2) Soares AP et al. Células-tronco em odontologia. Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial. 2007; 12(1):33-40.
- 3) Nascimento ER. Moura, MADA. Bioética e o avanço da ciência nas descobertas das células-tronco: células-tronco estaminais e embrionárias. Revista de Cultura Teológica. . 2014; 22(84): 2317-430.
- 4) Silva, TJC. Clonagem: o que aprendemos com Dolly?. Ciência e Cultura. 2004; 56 (3) : 27-30.
- 5) Vogel, G. Capturing the promise of youth. Science. The News and Editorial Staffs.1999; 286(5448):2238-2243.
- 6) Monjaraz BH, Osorio ES, Garcia AM et al. Mesenchymal stem cells of dental origin for inducing tissue regeneration in periodontitis: a mini-review. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19,(4): 944-1000.
- 7) Pereira, LV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. Ciência & Saúde Coletiva. 2008; 13(1): 07-14.
- 8) Choumerianou BM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. Tissue Eng Part B Rev. 2008; 14:53-60.
- 9) As células-tronco e a terapia celular como pilares fundamentais da medicina regenerativa. Brasília: Anadem; 2020
- 10) Saez DM, Sasaki RT, Neves ADC et al. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. Cells Tissues Organs 2016;202:269-280.
- 11) Silva L. Stem Cells in the Oral Cavity. Studies on Stem Cells Research and Therapy. 2015; 1(1): 012-016
- 12) Souza RCT, Froés VM. Coleta e criopreservação de células tronco em polpa de dentes decíduos e suas implicações (Trabalho de conclusão de curso). São Paulo: Universidade São Francisco, 2017

- 13) Souza VF et al. Células-tronco: uma breve revisão. Revista de ciências médicas e biológicas. 2003; 2(2):, 251-256.
- 14) Pereira LV. Células tronco: promessas e realidades da terapia celular. Cadernos de História da Ciência. 2009; 5(2): 49-56.
- 15) Marques MB. O que é célula-tronco.1º edição ebook. São Paulo: Brasiliense; 2017.
- 16) Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292:154-156
- 17) Janz FL, Queiroz FA. Aspectos histórico-filosóficos acerca do julgamento da Lei de Biossegurança no Supremo Tribunal Federal e as pesquisas científicas com células tronco embrionárias no Brasil. Filosofia e História da Biologia; 2020; 15(2): 159-178.
- 18) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-47.
- 19) Lellis JB. Células-tronco: potencial terapêutico e aplicabilidade na engenharia tecidual: uma revisão de literatura. São Paulo: Universidade estadual paulista “Julio de mesquita filho”; 2015.
- 20) Ferreira JRM, Greck AP. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for Dentistry: what to expect? Special article - Dental Press J. Orthod. 2020; 25 (03):85-92.
- 21) Denham M, Conley B, Olsson F et al. Stem cells: an overview. Curr Protoc Cell Biol. 2005; 23(23.1) :1-18.
- 22) Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. Br Med Bull. 2011; 98: 117-26.
- 23) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 2001; 105:369-377.
- 24) Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther. 2008;(15):109-16.
- 25) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997;276(5309):71-4.

- 26) Stefanutto JC, Molin MMD, Emanuelli IP. Técnicas para isolamento de células tronco mesenquimais extraídas de tecido adiposo. EPCC. 2013
- 27) Deus GC et al. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. Einstein. 2012;10: 296-301.
- 28) Zeitlin, BD. Banking on teeth. Stem cells and the dental office. Biomedical Journal. 2020; 43(2): 124-133
- 29) Popuri, SK. (2018). Concerns of a Pediatric Dentist in Dental Stem Cells: An Overview. The Open Dentistry Journal. 2018; 12(1), 596–604
- 30) Wang X, Sha XJ, Li GH et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Arch Oral Biol. 2012; 57: 1231–1240.
- 31) Gandia C, Armiñan A, Garcia-Verdugo JM et al. Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. Stem Cells. 2008; 26: 638–645.
- 32) Laino G, D'Aquino R, Graziano A et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue. J Bone Miner Res. 2005; 20: 1394–1402.
- 33) Kerkis I, Ambrosio CE, Martins DS 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.
- 34) Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100: 5807–5812
- 35) Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. Stem Cells Dev. 2010;19: 1081–1093.
- 36) Annibali S, Cristalli MP, Tonoli F et al. Stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth: a narrative synthesis of literature. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014; 18: 2863–2881.
- 37) Raza SS, Wagner AP, Hussain YS, Khan MA. Mechanisms underlying dental-derived stem cell-mediated neurorestoration in neurodegenerative disorders. Stem Cell Res Ther. 2018;9:245.

- 38) Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88: 792–806.
- 39) Li Z, Jiang CM, An S et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis*. 2014; 20: 25–34
- 40) Chaliserry EP, Nam SY, Park SH et al. Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal of Tissue Engineering*. 2017; 8:1-17.
- 41) Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos. 1º edição. Brasília: Anvisa. 2006.
- 42) Jesus AA, Soares MBP, Soares AP et al. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. *Dental Press J Orthod*. 2011;16(6):111-8.
- 43) Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 2009 ;33(4):289-9
- 44) Adan A, Alizada G, Kiraz Y et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37:163e76.
- 45) Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016;143(13): 2273–2280.
- 46) Lucaciu O, Soritau O, Gheban D et al. Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC Biotechnol*. 2015; 15: 114.
- 47) Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *The official Journal of ISCT*. 2018; 20(4): 479-498
- 48) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429): 149–155.
- 49) Gonçalves FC, Grings M, Nunes NS et al. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol Lett*. 2017;39: 613–622.
- 50) Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J Endod*. 2014; 40(4): 26–32.
- 51) Rosa V, Zhang Z, Grande RH et al. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res*. 2013; 92(11): 970–975.

- 52) Goldberg M, Pinheiro SL, Jegat N et al. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am.* 2006; 50(2): 277–298.
- 53) Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neuralstem cells plasticity and developmental potential. *J. Physiol.* 2002; 96 (1/2):81-89.
- 54) Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. *Sci Transl Med.* 2012; 4(160):1-11.
- 55) Lei de biossegurança, nº 11.105. Artigo 5. (24 de Março de 2005).
- 56) Takahashi K.,Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.*Cell.* 2006;126: 663-76.
- 57) Silva GCF, Medeiros BEP, Alvares LB et al. Células-Tronco de dentes decíduos e sua aplicabilidade na odontologia. *Revista CROMG.* 2021; 20(2), 28-33.
- 58) Kerkis I, Caplan A.I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part. B Rev.* 2012; 18(2):129-38.
- 59) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;97: 13625–13630.
- 60) Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008; 34(8): 962-9.
- 61) Sakai VT, Zhang Z, Dong Z et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 2010;89(8):791-6.
- 62) Arthur A, Shi S, Zannettino AC et al. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009; 27(9): 2229–2237.
- 63) Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol.* 2011; 55: 189–195.
- 64) Werle SB et al. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clinical Oral Investigations.* 2016; 20(1):75-81.
- 65) Tsai AI, Hong HH, Lin WR et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1-9.
- 66) Pilbauerova N, Suchanek J. Cryopreservation of dental stem cells. *Acta Med* 2018;61:1-7.

- 67) Suchánek J, Visek B, Soukup T et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010;53: 93–99.
- 68) Ma L, Makino Y, Yamaza H et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS ONE*. 2012; 7 (12): e51777.
- 69) Ji EH, Song JS, Kim SO et al. Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. *Cell Tissue Bank* . 2014; 15: 67–74.
- 70) Lee HS, Jeon MJ, Kim SO et al. Characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) from intact cryopreserved deciduous teeth. *Cryobiology*. 2015; 71: 374– 383.
- 71) Beike Biotechnology. (tratamentocomcélulastronco.com) China: Biotechnology Co.(2014-2022)- (acesso em 26 de Maio de 2022). Disponível em: <https://tratamentocomcelulastronco.com/sobre-a-beike/>