

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAYNE DE SOUZA



AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE POLPA DE DENTE



CURITIBA

2023

JAYNE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE POLPA DE DENTE

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Íris Hass  
Coorientadores: Profa. Dra. Tamara Borgonovo e Msc. Mateus de Oliveira Lisboa

CURITIBA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

JAYNE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE POLPA DE DENTE

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Paraná como requisito para  
obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

---

Profa. Dra. Íris Hass

Orientadora – Departamento de Genética, UFPR

---

Msc. Miriam Lacerda Barbosa

Laboratório de Citogenética do Complexo Hospital de  
Clínicas-UFPR

---

Profa. Dra. Fernanda Gatto de Almeida

UTFPR-Dois Vizinhos

---

Curitiba, 03 de março de 2023

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais humanas (MSCs, do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*) podem ser ferramentas extremamente poderosas para terapias celulares, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, não apenas pelo seu potencial de diferenciação multilinhagem, mas principalmente por sua atividade parácrina, sendo uma realidade já em expansão na clínica devido ao seu enorme potencial terapêutico para o tratamento de doenças e lesões. Sua derivação de diversos tecidos adultos de diferentes fontes, no caso do presente trabalho, células-tronco mesenquimais de polpa de dente (DPSCs, do inglês *Dental Pulp Stem Cells*), resolve desafios éticos representados pelo uso de outros tipos de células, além de que podem ser colhidas usando métodos minimamente invasivos e tanto sua expansão quanto sua diferenciação podem ser facilmente manipuladas *in vitro*. Devido à frequência de MSCs em tecidos humanos ser baixa, a expansão *ex vivo* é frequentemente necessária para obter o número suficiente de células a serem administradas, mas este procedimento tem algumas desvantagens, podendo acarretar problemas com estabilidade genética e transformação. Por isso, é fundamental minimizar os riscos e garantir as evidências de eficácia e segurança pré-clínica. A avaliação da integridade genômica, portanto, é extremamente importante tanto para pesquisa básica como para uma futura aplicação clínica. Estudos citogenéticos são considerados determinantes para avaliação consistente do potencial uso terapêutico de células-tronco cultivadas, sendo utilizada, principalmente, a cariotipagem por bandeamento GTG (com tripsina e Giemsa), para confirmar a ausência de instabilidade citogenética. Diferentemente das células-tronco embrionárias, as MSCs têm demonstrado manter a estabilidade genômica durante o cultivo celular. Nesta monografia, foram analisadas oito amostras de DPSCs, através da técnica de bandeamento GTG com o objetivo de avaliar se há manutenção da estabilidade citogenética durante o cultivo celular. Foi detectado o surgimento de células tetraploides, um fenômeno já conhecido em células cultivadas *in vitro*, mas não foi detectado em nenhum caso o surgimento de aberração cromossômica clonal ou alteração estrutural nas amostras analisadas. Portanto, houve manutenção da estabilidade citogenética nas DPSCs, mesmo após diversas passagens de cultivo celular, visto que, houve manutenção do cariótipo normal, demonstrada através da análise citogenética com bandeamento G, técnica que se mostrou muito informativa e eficaz, comprovando a segurança da técnica de cultivo destas células *in vitro*.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais de polpa de dente. DPSCs. Estabilidade Citogenética. Bandejamento GTG. Potencial Tumorigênico.

## ABSTRACT

Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) can be extremely powerful tools for cell therapies, tissue engineering and regenerative medicine, not only because of their potential for multilineage differentiation, but mainly because of their paracrine activity, which is a reality already expanding in the clinic due to its enormous therapeutic potential for the treatment of diseases and injuries. Its derivation from several adult tissues from different sources, in the case of the present work, Dental Pulp Stem Cells (DPSCs), solves ethical challenges represented by the use of other types of cells, in addition, can be harvested using minimally invasive methods and both their expansion and differentiation can be easily manipulated *in vitro*. Due to the low frequency of MSCs in human tissues, *ex vivo* expansion is often necessary to obtain a sufficient number of cells to be administered, but this procedure has some disadvantages, which can lead to problems with genetic stability and transformation. Therefore, it's essential to minimize risks and ensure evidence of preclinical efficacy and safety. The assessment of genomic integrity, therefore, is extremely important both for basic research and for future clinical application. Cytogenetic studies are considered essential for a consistent evaluation of the potential therapeutic use of cultured stem cells, mainly using G-banding karyotyping (with trypsin and Giemsa) to confirm the absence of genetic instability. Unlike embryonic stem cells, MSCs have been shown to maintain genomic stability during cell culture. In this monograph, eight samples of DPSCs were analyzed using the GTG banding karyotyping technique in order to assess whether there is maintenance of genetic stability during cell culture. The appearance of tetraploid cells was detected, a phenomenon already known in cells cultivated *in vitro*, but the appearance of clonal chromosomal aberration was not detected in any case. No structural changes were detected in the samples analyzed. Therefore, the cytogenetic stability of the DPSCs was maintained, even after several passages of cell culture, since the normal karyotype was maintained, demonstrated through the cytogenetic analysis with G-banding, a technique that proved to be very informative and effective, proving the safety of the technique of culturing these cells *in vitro*.

Keywords: Dental Pulp Stem Cells. DPSCs. Cytogenetic Stability. G-banding karyotyping. Tumorigenic Potential.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Tipos de células-tronco e suas origens. As vias a), b) e c) mostram como são originados os três tipos de células-tronco. a) células-tronco embrionárias derivadas de blastocisto; b) células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos adultos; c) células-tronco adultas derivadas de medula óssea, por exemplo: células-tronco mesenquimais. Fonte: Martino et al., 2012..

..... 10

Figura 2 - Aplicação de DPSCs para o tratamento de vários distúrbios. Fonte: Yamada et al., 2019. .... 12

Figura 3 - Representação esquemática do potencial de diferenciação das DPSCs.Fonte: Madhoun et al., 2021..... 15

Figura 4 - Tecido oral e células-tronco dentárias. Um esboço esquemático para o desenvolvimento do dente. A) As células da ectoderme contribuem apenas para a formação do esmalte dentário, enquanto as células da crista neural geram o restante dos tecidos dentários. B) Representação das zonas que constituem a polpa dentária. Fonte: Madhoun et al., 2021..... 16

Figura 5 - Potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico, respectivamente. Escala de 50 µm. Ampliação de 40x. Fonte: Mateus Lisboa.....20

Figura 6 - Fluxograma representando a metodologia utilizada neste trabalho.....27

Figura 7 -Processo de isolamento das DPSCs. A) amostras chegam imersas em meio IMDM e heparina; B) extração da polpa; C) maceração mecânica com bisturi; D) digestão enzimática com collagenase II, incubado por uma hora a 37°C;

E) centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm; F) DPSCs plaqueadas em garrafas de cultivo. Fonte: o autor.....28

Figura 8 - Esquema representativo do processo de cultivo celular. A renovação de células de uma garrafa de cultivo para outra é chamada de passagem. Fonte: o autor.....30

Figura 9 - Kit de bandeamento G. As lâminas são mergulhadas em tripsina, solução salina+ SBF, H<sub>2</sub>O destilada e corante Giemsa, respectivamente. Fonte: o autor..... 32

Figura10- Cariograma representativo. A) cariograma da amostra “DPSCs 1” em P4, cariótipo 46, XY. B) cariograma da amostra “DPSCs 5” em P8, cariótipo 46,XY.....37

Figura11- Representação esquemática da análise cariotípica da amostra “DPSCs 2” nas passagens P4 e P8. Adaptado de Borgonovo (2016)..... 38

Figura 12- Amostra “DPSCs 2” na passagem P4. A) Célula tetraploide. B) Cariograma de uma célula tetraploide, com cariótipo 92, XXYY. .... 39

Figura 13- Amostra “DPSCs 4” na passagem P4. Diplocromossomos.. .... 40

Figura 14-Curva de crescimento de células em cultura, dividida nas seguintes fases de crescimento: Fase lag (período de adaptação no qual não ocorre proliferação após adição das células ao meio de cultivo), Fase log (a multiplicação celular é máxima e constante), Fase estacionária (a velocidade de crescimento diminui, o número de morte celular tende a ser equivalente ao número de células novas), Fase de declínio (há redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de células novas). Fonte: Alves & Guimarães (2014).....41

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Potencial terapêutico de DPSCs no tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP) ..... 18

Quadro 2 -Potencial angiogênico, miogênico, osteogênico, condrogênico e imunomodulador das DPSCs aplicados no tratamento de doenças..... 22



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 1” em P4.....	33
Tabela 2 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 2” em P4.....	33
Tabela 3 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 3” em P4.....	34
Tabela 4 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 4” em P4.....	34
Tabela 5 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 5” em P8.....	35
Tabela 6 - Análise cariotípica da amostra “DPSCs 6” em P8.....	35
Tabela 7 - Cariótipos das amostras analisadas ao longo das passagens.....	36
Tabela 8 – Frequência de células com sinais de instabilidade genética.....	37
Tabela 9 - Frequência de células tetraploides (4n) ao longo das passagens P4 e P8.....	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCs- Células-tronco adiposas (do inglês *Adipose Stem Cells*)

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BD- MSCs - Células-tronco mesenquimais derivadas de queimaduras (do inglês *Burn-derived mesenchymal stem cells*)

BMSCs – células-tronco mesenquimais de medula óssea (do inglês *Bone Marrow Stem Cells*)

CHC – Complexo Hospital de Clínicas

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CTCs – Centros de Tecnologia Celular

DNA – ácido desoxirribonucleico

DA - Doença de Alzheimer

DP- Doença de Parkinson

DPSCs – Células-tronco derivadas de polpa de dente (do inglês *Dental Pulp Stem Cells*)

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

ESCs - Células-tronco embrionárias (do inglês *Embryonic Stem Cells*)

IMDM - *Iscoves Modified Dulbecco's Medium*

iPSCs – Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*)

ISCN – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

ISCT – Sociedade Internacional para Terapia Celular (do inglês *International Society for Cell & Gene Therapy*)

KCl – cloreto de potássio

LECC – Laboratório Experimental de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

LME – Lesão da Medula Espinhal

MenSCs- Células-tronco menstruais (do inglês *Menstrual Blood-derived Stem Cells*)

MSCs – Células-tronco mesenquimais (do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*)

NaCl – cloreto de sódio

PBS – solução tampão fosfatada

P4 – quarta passagem do cultivo celular

P8 – oitava passagem do cultivo celular

rpm – rotações por minuto

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1	TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO .....	10
1.2	POTENCIAL TUMORIGÊNICO .....	13
1.3	JUSTIFICATIVA .....	14
1.4	OBJETIVOS .....	14
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1	CARACTERIZAÇÃO DAS DPSCs .....	195
2.2	USO CLÍNICO DAS DPSCs .....	17
2.2.1	Uso de DPSCs no tratamento de Doenças Neurodegenerativas e Doenças e Lesões nos Sistemas Nervoso Central e Periférico.....	17
2.2.2	Potencial angiogênico, miogênico, osteogênico, condrogênico e imunomodulador das DPSCs aplicados no tratamento de doenças ....	20
2.3	OUTROS TECIDOS DE DESCARTE COMO FONTES DE CÉLULAS-TRONCO .....	23
2.3.1	Tecido adiposo .....	23
2.3.2	Tecido endometrial .....	24
2.3.3	Tecido epitelial .....	25
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco humanas podem ser subdivididas em três tipos principais de células (Figura 1), de acordo com sua origem e potencial de diferenciação: células-tronco embrionárias, células-tronco pluripotentes induzidas e células-tronco adultas multipotentes, como por exemplo as células-tronco estromais mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*) (NERI, 2019).

As células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês *Embryonic Stem Cells*) são células pluripotentes, pois têm a capacidade de se transformar em qualquer tipo celular; são encontradas na camada interna do embrião, quando este se encontra na fase de blastocisto (LEROU, 2011).

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) podem ser geradas *in vitro* a partir de células somáticas adultas reprogramadas para um estado pluripotente pela introdução de fatores de transcrição específicos, passando então a apresentar propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias (TAKAHASHI et al., 2007).

Já as células-tronco adultas multipotentes possuem um potencial de diferenciação e capacidade de proliferação mais restritos quando comparadas às anteriores (LIRAS, 2010); esse grupo inclui as MSCs, que são originadas da camada germinativa mesodérmica e estão disponíveis em muitos tecidos humanos adultos.

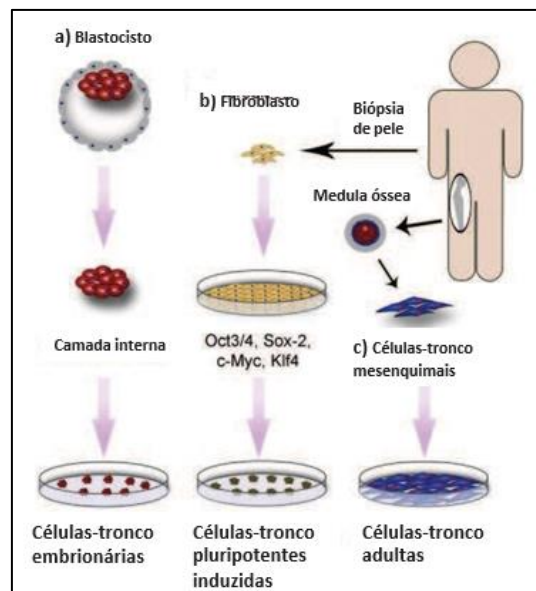


Figura 1. Tipos de células-tronco e suas origens. As vias a), b) e c) mostram como são originados os três tipos de células-tronco. a) células-tronco embrionárias derivadas de blastocisto; b) células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos adultos; c) células-tronco adultas derivadas de medula óssea, por exemplo: células-tronco mesenquimais. Fonte: Martino et al., 2012.

De acordo com a hipótese de sua origem perivascular, as MSCs estão presentes em praticamente todos os tecidos vascularizados: células perivasculares separadas de diversos tecidos humanos e cultivadas a longo prazo dão origem a células progenitoras multilinhagens aderentes que exibem as características das MSCs (CRISAN et al., 2008). São células altamente notáveis por sua capacidade de autorrenovação, seu potencial de diferenciação multilinhagem, sua atividade parácrina e por suas propriedades imunomoduladoras. Por todas estas razões estas células são um candidato ideal para terapias celulares e engenharia de tecidos, oferecendo novas oportunidades para o tratamento de doenças e lesões, com um enorme potencial de desenvolvimento (VERMA et al., 2013; TATULLO et al., 2015; YAMADA et al., 2019; MASUDA et al., 2021).

O considerável potencial terapêutico das MSCs tem gerado um interesse crescente em uma ampla variedade de disciplinas, por isso o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs três critérios mínimos para definir a MSCs humanas, como forma de padronização dos estudos: primeiro, a MSC deve ser aderente ao plástico quando mantida em condições de cultura padrão; em segundo lugar, deve expressar certos marcadores de superfície específicos e, por fim, deve reter o potencial de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSCs, do inglês *Bone Marrow Stem Cells*) compreendem o tipo de MSCs mais bem descrito e mais utilizado em estudos até o momento (LI et al., 2016), porém, elas também podem ser isoladas de uma série de outros tecidos, como por exemplo, tecido adiposo, cordão umbilical, endométrio, cérebro, pele, mucosa nasal e também podem ser derivadas de polpa de dente. Estas últimas, especificamente, são referidas como células-tronco mesenquimais de polpa de dente (DPSCs, do inglês *Dental Pulp Stem Cells*).

As DPSCs possuem certas vantagens quando comparadas às células-tronco mesenquimais de medula óssea, por não apresentarem riscos ou desconforto aos doadores no momento da coleta, pois esse material é

descartado como resíduo em procedimentos odontológicos, o que é de grande relevância prática; também apresentam maior potencial de expansão e diferenciação *in vitro*, conferindo o fornecimento de maior número de células (NAKAMURA et al., 2009; KARAÖZ et al., 2011). Quando comparadas às células-tronco embrionárias, a questão ética também é uma vantagem a favor do uso das DPSCs, pois ainda há muitos debates em relação ao uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos (PRANKE, 2004; KING & PERRIN, 2014). As DPSCs têm demonstrado, portanto, um grande potencial para uso em diversas áreas da terapia celular, devido ao seu potencial de diferenciação multilinhagem e por sua atividade parácrina, podendo ser empregadas no tratamento de várias doenças, como por exemplo, doenças bucais, doenças neurológicas, doenças circulatórias, doenças internas, distúrbios ortopédicos e doenças oculares (YAMADA et al., 2019) (Figura 2).

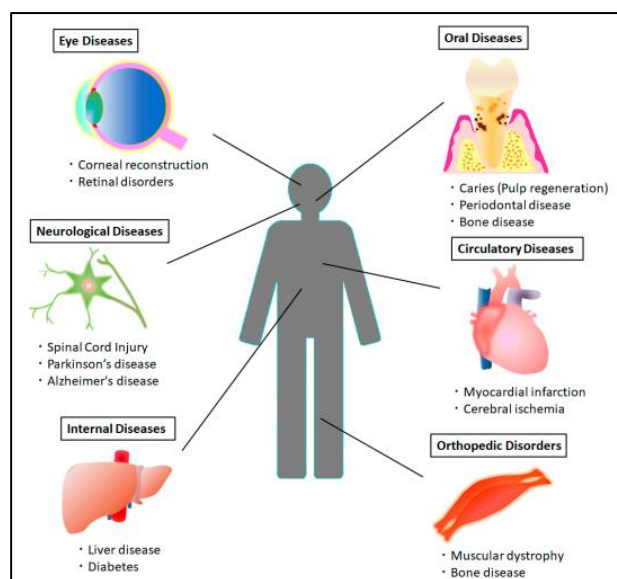


Figura 2. Aplicação de DPSCs para o tratamento de vários distúrbios.

Fonte: Yamada et al., (2019).

## 1.2 POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Apesar do grande potencial do uso de células-tronco na medicina regenerativa, há necessidade de testar a instabilidade genética dessas células pois não podemos minimizar seu potencial tumorigênico (BORGONOVO, 2016).

A frequência de MSCs em tecidos humanos é limitada, por isso a expansão *ex vivo* é frequentemente necessária para obter o número de células suficientes para serem administradas. Porém esse procedimento pode provocar problemas com estabilidade genética e transformação. Além disso, a expansão *in vitro* reduz o potencial replicativo e a multipotência (ALVES et al., 2010), leva à senescência, reduz a atividade da DNA polimerase e a eficiência de reparo do DNA, levando ao acúmulo de danos no DNA, como alterações citogenéticas, mutações e alterações epigenéticas (BEHRENS et al., 2014), caracterizando uma instabilidade genética que pode explicar, pelo menos em parte, seu potencial tumorigênico (SENSEBÉ & BOURIN, 2009); essa instabilidade genômica pode surgir do estresse replicativo imposto pela cultura *in vitro* e por defeitos na condensação cromossômica (LAMM et al., 2016).

Diferentemente das células-tronco embrionárias, onde houve vários relatos de anormalidades genéticas e formação de tumores em camundongos, células-tronco de humanos adultos, especialmente as MSCs, parecem manter sua estabilidade genética durante cultivo (BERNARDO et al., 2007), e, portanto, não seriam suscetíveis à transformação maligna (WANG et al., 2012).

No entanto, a observação de que todas as células cultivadas desenvolvem aberrações cromossômicas ao longo do tempo, mesmo aquelas que não são células-tronco, sugere que essas células, mesmo células adultas, podem ter uma potencial transformação tumorigênica após expansão *in vitro* (HERBERTS; KWA; HERMENS, 2011, BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2011). Essas explicações também podem ser estendidas às MSCs de qualquer fonte porque, em essência, o fato principal é que o cultivo pode criar um ambiente favorável para as células transformadas se expandirem e propagarem *in vitro* (BORGONOVO, 2016). Além disso, há relatos de alterações cromossômicas clonais durante o cultivo de MSCs (BORGONOVO et al., 2015).



### 1.3 JUSTIFICATIVA

Diante da preocupação amplamente relatada na literatura, que o cultivo *in vitro* de células-tronco pode ser um fator de risco para a formação de tumores, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de portaria que regulamenta o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular (CTCs) (RDC09/2011), exige a implantação do controle genético como critério de liberação para o uso dessas células.

A avaliação da estabilidade citogenética pela técnica de citogenética convencional (cariotipagem através de bandeamento-G), é uma forma de análise bastante informativa para avaliação genética de linhagens celulares, permitindo a identificação de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais (CATALINA et al.,2007, PAYÃO; SEGATO; SANTOS, 2009). A avaliação da propensão à transformação maligna pode e deve ser abordada por estudos citogenéticos, especialmente a cariotipagem, uma vez que a manutenção de um cariótipo é um indicador confiável da estabilidade genética de MSCs e deve ser considerado como critério de liberação para uso clínico dessas células.

Apesar das vantagens das DPSCs, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento sobre sua estabilidade genética; além disso, a literatura existente apresenta resultados controversos (NERI, 2019). Portanto, a análise por meio do teste de cariotipagem por bandeamento G para avaliação da estabilidade cromossômica poderá possibilitar um maior entendimento sobre o tema. Sendo assim, no presente projeto foi avaliada a estabilidade citogenética de DPSCs pela técnica de Análise Cromossômica com bandeamento G e foi verificada se a estabilidade cromossômica é mantida mesmo em passagens mais avançadas/tardias do cultivo celular.

### 1.4 OBJETIVOS

- Acompanhar o isolamento e cultivo de DPSCs
- Avaliar a estabilidade citogenética das DPSCs pela técnica de Análise Cromossômica com bandeamento G.
- Verificar se a estabilidade cromossômica é mantida mesmo após diversas passagens de cultivo celular

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS DPSCs

DPSCs, também conhecidas como células-tronco da polpa dentária pós-natal, foram isoladas pela primeira vez de terceiros molares, possuem morfologia fibroblastoide e foram caracterizadas como células com alto nível de clonogenicidade (capacidade de proliferação celular e de formação de colônias e nódulos ocasionais) (GRONTHOS et al., 2000). A identidade de DPSCs como célula-tronco mesenquimal foi confirmada por sua capacidade de diferenciar-se em células ectodérmicas neurais, adipócitos, odontoblastos, osteoblastos, condrócitos e células mioblásticas de origem mesodérmica, confirmando sua plasticidade (GRONTHOS et al., 2002) (Figura 3).

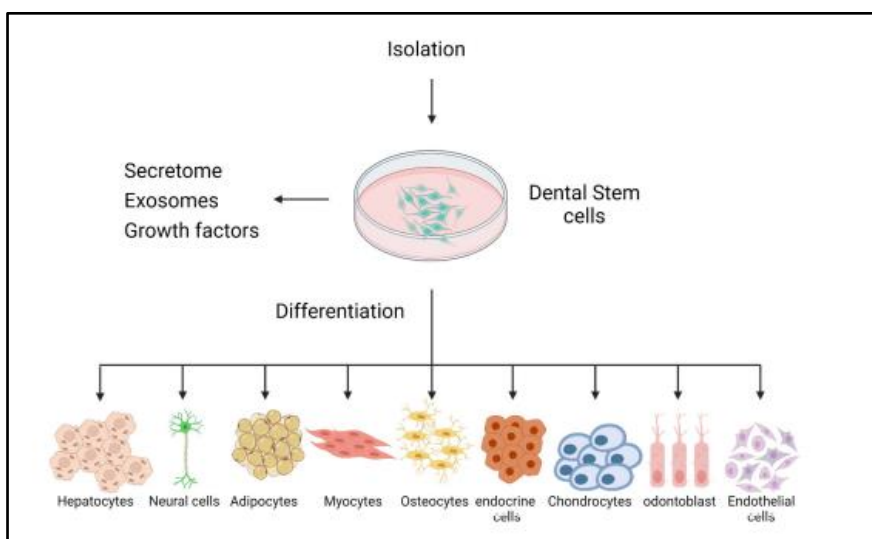


Figura 3. Representação esquemática do potencial de diferenciação das DPSCs.

Fonte: Madhoun et al., 2021.

A maioria das MSCs são formadas a partir da mesoderme, porém, as MSCs derivadas da cabeça e pescoço, como as DPSCs, derivam da ectoderme. A polpa dentária, portanto, é derivada de células ectodérmicas que crescem na periferia do tudo neural durante o desenvolvimento embrionário (Figura 4.A),

sendo descrita como “ectomesênquima” por alguns autores. Essas células multipotentes formam vários tecidos faciais: elas migram para o primeiro e segundo arcos branquiais durante o desenvolvimento embrionário inicial, e, após migrarem para a região oral, então se diferenciam em células do fenótipo mesenquimal, indicando que as MSCs na polpa dentária são de origem da crista neural (CHAI et al., 2000). Dentro da polpa dentária, aproximadamente 90% das células originaram-se da crista neural pois marcadores expressos por células da crista neural são amplamente expressos em tecidos da polpa de dente e em DPSCs cultivadas (FRACARO, 2019). Portanto, por possuírem a mesma origem embrionária que as células neuronais, há um maior potencial para diferenciação em células do sistema nervoso, sendo uma fonte promissora para estudos da aplicação de MSCs em doenças neurodegenerativas (FRACARO, 2019).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, que consiste em quatro zonas: zona odontogênica periférica, zona intermediária livre de células, zona rica em células e núcleo pulpar (Figura 4.B). A zona rica em células contém fibroblastos estromais (conhecidos como pulpoblastos), macrófagos, capilares sanguíneos e células mesenquimais em proliferação que podem se diferenciar em odontoblastos pois possuem potencial odontoosteoprogenitor. O núcleo da polpa é povoado por múltiplas populações de células dentais mesenquimais, macrófagos e células dendríticas que mantêm a funcionalidade do complexo dentina-polpa e a homeostase do tecido pulpar e periodontal (Cohen & Hargreaves, 2007).

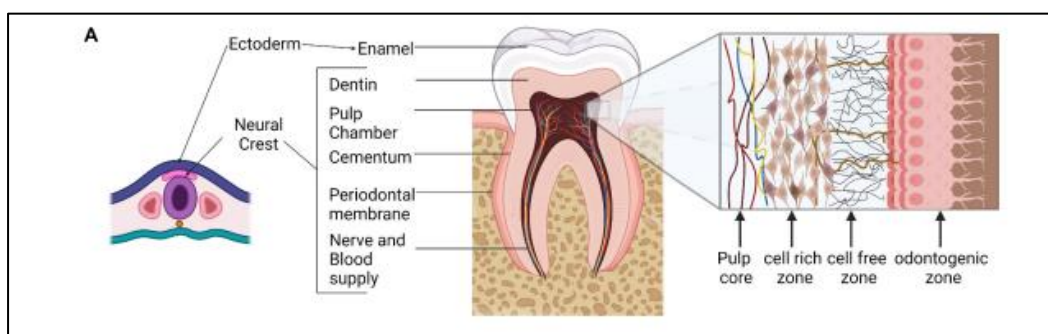


Figura 4. Tecido oral e células-tronco dentárias. Um esboço esquemático para o desenvolvimento do dente. A) As células da ectoderme contribuem apenas para a formação do esmalte dentário, enquanto as células da crista neural geram o restante dos tecidos dentários. B) Representação das zonas que constituem a polpa dentária. Fonte: Madhoun et al., 2021.

## 2.2 USO CLÍNICO DAS DPSCs

### 2.2.1 Uso de DPSCs no tratamento de Doenças Neurodegenerativas e Doenças e Lesões nos Sistemas Nervoso Central e Periférico

DPSCs têm atraído a atenção no campo da medicina regenerativa, especialmente no que diz respeito às doenças neurodegenerativas (LUO et al., 2018). Conforme discutido por Fracaro (2019), já foi demonstrado que as DPSCs podem se diferenciar em células gliais e neurônios, tipos celulares que também são originados de células progenitoras da crista neural. Sugere-se que estas células podem responder ativamente a sinais do ambiente neural e efetivamente se integrar em tecidos nervosos lesados promovendo o restabelecimento da conectividade nervosa funcional, através da produção de fatores neurotróficos, pois também possuem atividade de neuroimunomodulação (GNANASEGARAN et al., 2017; FRACARO, 2019).

As DPSCs não só têm o potencial para se diferenciarem em neurônios funcionalmente ativos, como também têm o potencial de diferenciar-se em tipos neuronais específicos, como neurônios dopaminérgicos, sob condições de meio de cultura de diferenciação neuronal específico (CHANG et al., 2014; CHUN et al., 2016).

As terapias médicas convencionais têm eficácia limitada no suporte à recuperação funcional de danos nervosos, uma vez que tecidos nervosos maduros já diferenciados têm baixa capacidade regenerativa (LUO et al., 2018). As terapias baseadas em células-tronco, especialmente as de polpa dentária, devido à sua origem embrionária em comum, portanto, são um recurso promissor para o tratamento de doenças neurodegenerativas e doenças e lesões nos Sistemas Nervoso Central e Periférico, como Doença de Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e Esclerose múltipla, Epilepsia, Lesão da medula espinhal, Acidente Vascular Cerebral Isquêmico, lesões de nervos periféricos e lesões na retina e na córnea (LUO et al., 2018; YAMADA et al., 2019; UEDA et al., 2020). No quadro a seguir estão representados alguns dos principais resultados obtidos por grupos de estudo que envolvem o uso de terapia celular com DPSCs para o tratamento das doenças citadas anteriormente (QUADRO 1).

QUADRO 1. Potencial terapêutico de DPSCs no tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP).

Doença	Modelo de estudo (Método de Aplicação)	Desempenho das DPSCs	Ref.
<b>Doença de Alzheimer (DA)</b>	DPSCs co-cultivadas com modelo celular de DA induzido por peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) <i>in vitro</i>	DPSCs secretaram e produziram numerosos fatores neurotróficos e fatores de crescimento de vasos endoteliais o que diminuiu significativamente a citotoxicidade do peptídeo A $\beta$ , aumentando a viabilidade celular em comparação com as células não tratadas.	Apel et al., 2009  Ahmed et al., 2016
	DPSCs co-cultivadas com modelo celular de DA induzido por ácido okadaico	As células tratadas com DPSCs tinham a morfologia dos neurônios restaurados, dendritos alongados, microfilamentos densamente arranjados e fibrilas microtubulares espessadas	Wang et al., 2017
<b>Doença de Parkinson (DP)</b>	DPSCs foram tratadas com o kit de diferenciação de neurônios dopaminérgicos <i>in vitro</i>	DPSCs podem se diferenciar em células neurais dopaminérgicas em condições experimentais de diferenciação celular	Chang et al., 2014; Chun et al., 2016
	Transplante de DPSCs em um modelo de DP <i>in vitro</i>	As DPSCs poderiam tratar a DP regulando os mediadores inflamatórios, como a redução das secreções de fatores pró-inflamatórios	Gnanasegaran et al., 2017
	DPSCs foram cultivadas em um sistema que consiste em neurônio e micróglia <i>in vitro</i>	DPSCs desempenharam um papel protetor através da inibição da produção de óxido nítrico em uma co-cultura de neurônios dopaminérgicos e micróglia	Gnanasegaran et al., 2017
<b>Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)</b>	Secretoma de meios condicionados por DPSCs	DPCM suprime a fragilidade da junção neuromuscular e a perda do neurônio motor em modelos de ELA	Wang et al., 2019
<b>Esclerose Múltipla</b>	DPSCs foram submetidas a knockdown genético para avaliação do possível papel da proteína HSP27, crítica para a diferenciação neural	O knockdown da HSP27 nas DPSCs transformou as células em progenitores de oligodendrócitos em modelos de esclerose múltipla	Guo et al., 2022
<b>Epilepsia</b>	DPSCs foram transplantadas por via intraperitoneal em ratos modelo experimental de epilepsia induzida por Lítio-pilocarpina	Observou-se a redução das crises espontâneas recorrentes nos animais tratados, possivelmente devido à diminuição da expressão de citocinas inflamatórias no cérebro dos animais	Freitas, Daniele Pinheiro. 2011

(Continua...)

(Continuação...)

<b>Lesão da Medula Espinhal (LME)</b>	Transplante de DPSCs intraespinhal	DPSCs inibiram massivamente a apoptose induzida por LME, fibras neurais foram preservadas, axônios transeccionados foram regenerados e células danificadas substituídas por diferenciação em oligodendrócitos	Yamamoto et al., 2014
	DPSCs transplantadas com molde de quitosana	As DPSCs promoveram a recuperação funcional motora e inibiram a apoptose celular após lesão medular por meio da secreção de fatores neurotróficos	Zhang et al., 2016
	DPSCs transplantadas com pellets de células marcadas com fluorescência	As DPSCs reduziram a lesão inflamatória, promoveram a regeneração axonal e reduziram a necrose hemorrágica progressiva após a lesão medular por inibição da expressão de mediadores inflamatórios	Yang et al., 2017
<b>Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVC)</b>	DPSCs co-cultivadas com o meio condicionado <i>in vitro</i>	As DPSCs conferiram citoproteção superior contra a morte celular, reduzindo a gliose reativa e suprimindo a expressão de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias	Song et al., 2015
	Injeção intravenosa de DPSCs humanas em um modelo de roedor	DPSCs reduziram o volume de infarto após oclusão da artéria cerebral média devido à alta angiogênese e diferenciação neurogênica e redução de gliose reativa	Song et al., 2017
	Transplante de DPSCs intracerebral	O transplante de DPSCs inibiu a ativação microglial e expressão de citocinas pró-inflamatórias. DPSCs aumentaram a recuperação de déficits sensório-motores pós-AVC devido à diferenciação em astrócitos e mediação por meio de efeitos parácrinos dependentes de DPSCs	Leong et al., 2012 Nito et al., 2018
<b>Doenças do SNP- Defeitos no nervo facial e no nervo ciático</b>	Transplante de DPSCs em um modelo de roedor	As DPSCs promoveram a regeneração do axônio e a formação do nervo mielinizado, e formação e sobrevivência de novos vasos sanguíneos; DPSCs podem ser diferenciadas em oligodendrócitos funcionais	Sasaki et al., 2011; Askari et al., 2015; Sanen et al., 2017
<b>Lesões na retina e na córnea</b>	Transplante de DPSCs intravítreo	As DPSCs produziram e secretaram muitas neurotrofinas para promover a neuritogênese/ axogênese das células da retina; forneceram proteção contra perda de células ganglionares da retina	Mead et al., 2013; Mead et al., 2016

FONTE: Adaptado de Luo et al., 2018; Yamada et al., 2019; Ueda et al., 2020.

### 2.2.2 Potencial angiogênico, miogênico, osteogênico, condrogênico e imunomodulador das DPSCs aplicados no tratamento de doenças

As DPSCs também apresentam propriedades angiogênicas, sendo alternativas relevantes para o tratamento de distúrbios circulatórios, como Acidente Vascular Cerebral Isquêmico e doenças cardíacas, como infarto do miocárdio (IOHARA et al., 2008; MATTEI et al., 2021). Seu potencial miogênico também é útil em possíveis terapias para o tratamento de distrofias musculares (PISCIOTTA et al., 2015). As terapias com DPSCs também podem ser empregadas no tratamento de doenças orais devido ao seu potencial odontoosteoprogenitor, que mantêm a integridade do tecido pulpar e periodontal (Cohen & Hargreaves, 2007), como já citado anteriormente neste trabalho; esse potencial osteogênico também pode ser útil no tratamento de doenças como câncer na região maxilofacial (AWAIS et al., 2020). DPSCs também exibem potencial condrogênico, o que pode ser útil em aplicações em engenharia de tecidos fibrocartilaginosos (LONGONI et al., 2020) (Figura 5).

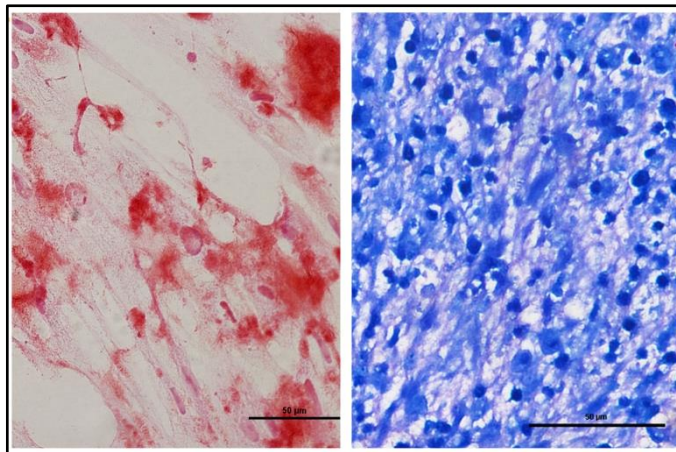


Figura 5. Potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico, respectivamente. Escala de 50 µm. Ampliação de 40x. Fonte: Mateus Lisboa.

O potencial imunomodulador das DPSCs foi recentemente testado em terapias em pacientes acometidos pela COVID-19, doença que pode causar síndrome respiratória aguda grave nos casos mais severos, nos quais os pacientes desenvolvem uma condição de hiper inflamação, que pode causar

danos a vários órgãos, especialmente no sistema respiratório; a ocorrência de uma tempestade de citocinas nos pulmões é um passo crítico na patogênese da doença (ZAYED & IOHARA, 2020). DPSCs são consideradas uma fonte potencial para imunomodulação, pois têm a capacidade de regenerar e reconstruir tecidos danificados via propriedades reparativas e efeitos de fatores tróficos, podendo auxiliar no tratamento dos pacientes (ZAYED & IOHARA, 2020).

Resultados obtidos por Croci et al. (2021) corroboram a informação de que a administração das DPSCs poderia ser eficaz em pacientes com hiperinflamação induzida por COVID-19, através da inibição da produção de várias citocinas. Ambos os estudos mencionados anteriormente evidenciaram o potencial uso das DPSCs como potencial fonte na terapia celular em pacientes com COVID, porém, mais testes deveriam ser realizados. O potencial imunomodulador das DPSCs também foi testado em modelos animais para avaliar sua aplicação em terapias para tratar pacientes com diabetes (GUIMARÃES et al., 2013).

No quadro a seguir estão representados, resumidamente, alguns dos principais resultados obtidos por grupos de estudo que envolvem o uso de terapia celular com DPSCs para o tratamento de doenças de origem não nervosa, de acordo com seu potencial de diferenciação (QUADRO 2).



QUADRO 2. Potencial angiogênico, miogênico, osteogênico, condrogênico e imunomodulador das DPSCs aplicados no tratamento de doenças

	<b>Aplicação em:</b>	<b>Resultados observados</b>	<b>Ref.</b>
<b>Potencial angiogênico</b>	<b>Doenças Cardiovasculares-</b> (doença cardíaca isquêmica, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose, doença arterial coronariana)	Aumento do fluxo sanguíneo e alta densidade de formação capilar em um modelo de rato com isquemia do membro posterior	Iohara et al., 2008; Mattei et al., 2021;
<b>Potencial miogênico</b>	<b>Distrofia Muscular-</b> (DPSCs foram enxertadas dentro do músculo de camundongos modelo de Distrofia muscular. As DPSCs foram diferenciadas para linhagem miogênica <i>in vitro</i> através da co-cultura com uma linha celular miogênica).	Redução da fibrose (via efeito parácrino). Fontes potenciais de células-tronco em estratégias para melhorar a histopatologia e potencialmente aliviar a fraqueza muscular em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne.	Pisciotta et al., 2015
<b>Potencial osteogênico</b>	<b>Doenças periodontais e maxilofaciais-</b> Aplicações na engenharia de tecidos ósseos baseada em células-tronco	Excelente capacidade de crescimento e potencial de diferenciação osteogênica para restauração do osso, como por exemplo, após traumas e procedimentos cirúrgicos.	Awais et al., 2020
<b>Potencial condrogênico</b>	<b>Engenharia de tecidos fibrocartilaginosos,</b> como por exemplo na regeneração da articulação temporomandibular	Formação de tecidos fibrocartilaginosos (mas não cartilagem hialina), sendo uma valiosa fonte de células para a regeneração da fibrocartilagem nas articulações.	Longoni et al., 2020
<b>Potencial Imunomodulador</b>	<b>Potencial de uso em pacientes com COVID-19</b>	Modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias desreguladas em pacientes com COVID-19, atenuando sua resposta inflamatória.	Zayed & Iohara, 2020. Crocì et al., 2021
	<b>Diabetes</b>	Presença de DPSCs transplantadas dentro ou ao redor das ilhotas pancreáticas e o transplante de DPSCs melhoraram o dano pancreático, a função renal e neuropatia dolorosa dos animais.	Guimarães et al., 2013
		Potencial para diferenciação em linhagens de células pancreáticas semelhantes a ilhotas, que passaram a liberar insulina, exibindo funcionalidade <i>in vitro</i> .	Govindasamy et al., 2011

FONTE: O autor.

## 2.3 OUTROS TECIDOS DE DESCARTE COMO FONTES DE CÉLULAS-TRONCO

### 2.3.1. Tecido Adiposo:

O tecido adiposo é rico em células-tronco estromais adultas, as células-tronco adiposas (ASCs). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as ASCs são multipotentes, possuindo a capacidade de se diferenciar em células de origem mesodérmica, incluindo adipócitos, condrócitos, osteoblastos e outros (VISHNUBALAJI et al., 2012). Bunnell (2021) discorre que essas células produzem uma vasta gama de mediadores solúveis e vesículas extravasculares (microvesículas) que podem alterar a biologia das células e tecidos, estimular as células-tronco residentes nos tecidos, alterar a atividade das células imunes e mediar efeitos terapêuticos *in vivo*; também podem influenciar a biologia das células-alvo através de produtos da secreção de macromoléculas livres (como uma ampla gama de citocinas, quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, adipocinas, moléculas antioxidantes, fatores pró-angiogênicos, fatores anti-apoptóticos e fatores de crescimento).

O tecido adiposo é encontrado em todo o corpo humano adulto na medula óssea, intra-articular, subcutâneo e depósitos viscerais, bem como em locais ectópicos, como intra-hepático e intramuscular. A fonte mais comum de tecido adiposo processado para isolamento de células-tronco é o tecido adiposo branco subcutâneo isolado do abdômen, coxa ou quadris/nádegas, como descarte de procedimentos estéticos de lipoaspiração (BUNNELL, 2021). A abundância da fonte tecidual para isolamento, a facilidade de metodologias para coleta de tecidos e isolamento celular e seu potencial terapêutico, rapidamente atraíram interesse para uso como potenciais terapias celulares.

Muitos estudos pré-clínicos testando os potenciais terapêuticos das ASCs foram realizados *in vitro* e *in vivo* em modelos animais. A maior parte das descobertas relatadas demonstrou resultados encorajadores, o que resultou em testes de ensaios clínicos em humanos. As ASCs estão sob investigação como uma terapia viável em pacientes com várias doenças e distúrbios, como acidente vascular cerebral, isquemia miocárdica, esclerose múltipla, osteoartrite, doenças

pulmonares, lesão renal aguda e feridas crônicas (BUNNELL, 2021, KRAWCZENKO et al., 2022). Para aplicações clínicas, duas estratégias estão sendo exploradas, a infusão de ASCs autóloga (utilizando células do próprio paciente, o que é considerado a forma mais segura) ou a infusão alogênica, que utiliza células de outro doador (BUNNELL, 2021).

### **2.3.2. Tecido endometrial:**

A existência de células-tronco progenitoras no endométrio foi postulada há muitos anos, mas a primeira evidência funcional só foi publicada em 2004 (CHAN et al., 2004).

As Células-tronco progenitoras endometriais no sangue menstrual são definidas como células-tronco menstruais (MenSCs) e foram identificadas pela primeira vez em 2007; elas possuem capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica, endotelial, neurogênica, hepática/pancreática, cardiogênica e miogênica (MENG et al., 2007). Devido a sua excelente proliferação e capacidade de autotransplante, as MenSCs são candidatas para terapia baseada em células em medicina regenerativa, inflamação e doenças relacionadas ao sistema imunológico (KONG et al., 2021). A facilidade da coleta do material também é um ponto positivo, visto que o sangue menstrual que seria descartado pode ser facilmente coletado com o uso de coletor menstrual e utilizado em transplantes autólogos.

Os transplantes autólogos de menSCs já foram testados no tratamento de problemas de infertilidade feminina, como a síndrome de Asherman, e atuaram regenerando o endométrio, aumentando sua espessura, possibilitando assim êxito na implantação do embrião (TAN et al., 2016). Também já foram realizados estudos em relação ao transplante autólogo de menSCs no tratamento de pacientes com endometriose e síndrome do ovário policístico (SHEIKHOLESLAMI et al., 2021); os resultados também se mostraram promissores.

### 2.3.3. Tecido epitelial

O fator mais importante na determinação da sobrevivência ou morte de um paciente com queimadura é a cobertura e cicatrização da ferida (SCOTT-CONNER et al., 1988). O enxerto de pele autóloga é considerado o padrão ouro para cobertura de feridas após a remoção da pele queimada (OZHATHIL et al., 2021); no entanto, esse processo é invasivo, pois a colheita de pele autóloga cria uma nova ferida em uma área de pele saudável do paciente e carrega o risco de complicações da ferida, como dor e cicatrização, além de que, quanto maior for a queimadura, menos pele saudável permanece, o que limita sua disponibilidade para enxertia (AMINI-NIK et al., 2018). Estas complicações são indicativas da necessidade de alternativas de cobertura de feridas.

Em um estudo publicado por Amini-Nik et al (2018), usando tecido desbridado cirurgicamente de peles gravemente queimadas (com queimadura de terceiro grau, com dano estendido à epiderme e derme inteira) foram isoladas células viáveis. As células isoladas foram cultivadas em placas de cultura de tecidos e caracterizadas, apresentando potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica nos experimentos *in vitro*. Posteriormente, foram expandidas e incorporadas em camundongos imunocomprometidos e porcos Yorkshire para avaliar o potencial de cicatrização de feridas nesses modelos animais, os quais não apresentaram efeitos colaterais adversos, e com o passar dos dias, passaram a exibir, visivelmente, cicatrização mais rápida.

A equipe então chegou à conclusão de que a pele queimada desbridada cirurgicamente, que é rotineiramente retirada dos pacientes e considerada lixo médico, sendo descartada inconscientemente, contém células viáveis e intactas, resistentes ao estresse térmico, e que apresentam características de células-tronco mesenquimais da pele, sendo então chamadas de células-tronco mesenquimais derivadas de queimaduras (BD-MSCs). Neste estudo, essas células não exibiram potencial tumorigênico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, indicando ser uma fonte de terapia celular potencialmente segura. Esses achados são de suma importância por oferecerem uma alternativa que pode ser

usada em terapias de regeneração autóloga da pele, auxiliando na cicatrização de feridas em pacientes com queimaduras.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), foram coletados dentes permanentes (3º molar) de adultos entre 18 e 25 anos com indicação de extração por motivo ortodôntico. Os dentes foram coletados em Clínicas Odontológicas indicadas pelo Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) da PUCPR para o projeto “Avaliação da Expressão de marcadores neuronais em subpopulações de células-tronco derivadas de polpa de dente”, aprovado pelo Comitê de Ética sob nº CAAE 58272722.0.0000.0020 (Anexo II); este é o projeto central, do qual partem vários subprojetos, dentre eles o presente trabalho. Abaixo estão representadas, resumidamente, as etapas utilizadas neste trabalho (Figura 6) e que serão detalhadas ao longo da sessão.

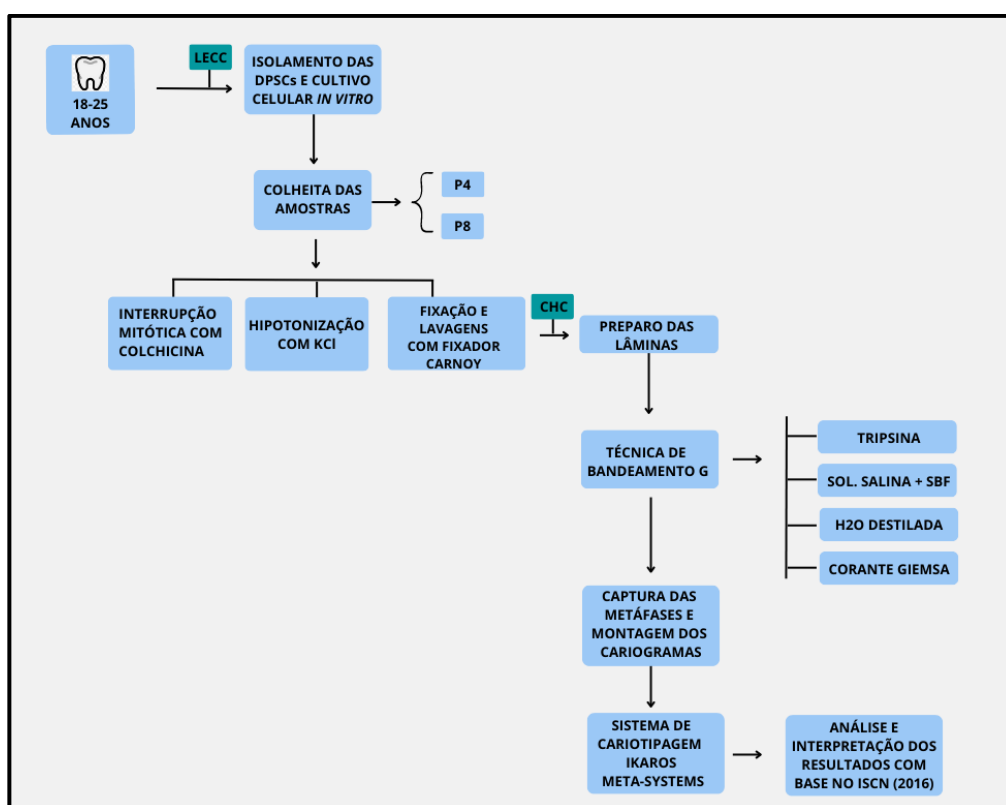


Figura 6. Fluxograma representando a metodologia utilizada neste trabalho.

Após a extração do dente, as amostras foram encaminhadas para o LECC, imersas em solução de meio *Iscoves Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) e heparina. Para o isolamento das DPSCs, os dentes foram lavados e foi realizada a extração da polpa e posterior maceração mecânica com auxílio de bisturi. O macerado foi submetido à digestão enzimática pela ação da collagenase tipo II (4mg/mL) e incubado por uma hora a 37°C, sob agitação; então, foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi então descartado e o botão de células, ressuspendido, e então o volume foi plaqueado em um frasco de 25 cm<sup>2</sup> para posterior análise da população total (Figura 7).

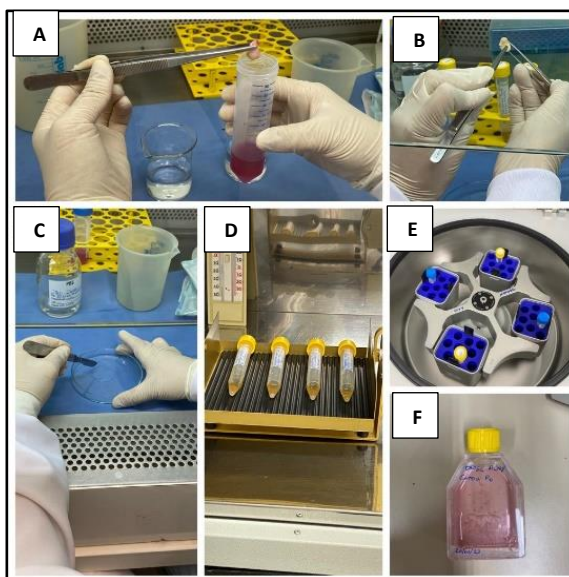


Figura 7. Processo de isolamento das DPSCs. A) amostras chegam imersas em meio IMDM e heparina; B) extração da polpa; C) maceração mecânica com bisturi; D) digestão enzimática com collagenase II, incubado por uma hora a 37°C; E) centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm; F) DPSCs plaqueadas em garrafas de cultivo. Fonte: o autor.

As células foram cultivadas em meio (IMDM) suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% penicilina e estreptomicina. As culturas foram armazenadas em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana. Quando as culturas atingiram cerca de 80% a 90% de confluência, (ou seja, 80% a 90% da área do meio de crescimento estava coberta por células aderentes), as células foram dissociadas utilizando tripsina/ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,25% e replaqueadas. Cada realização de dissociação enzimática foi chamada de “passagem”, ou seja, o processo de renovação de células de um frasco de cultivo para outro. O número de passagens, portanto, se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada.

As células aderentes, como é o caso das DPSCs, possuem um método específico para efetuar a sua passagem, por se encontrarem aderidas ao fundo da garrafa de cultivo, conforme já discutido por Alves e Guimarães (2014). Para que as células aderentes possam se ligar ao fundo da garrafa é necessário que o fundo tenha uma carga negativa: dessa forma, as garrafas de plástico utilizadas neste experimento foram previamente tratadas com agentes químicos, como agentes oxidantes, ou físicos, como a luz ultravioleta e radiação. A carga negativa é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e de interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Essa interação, então, desencadeia uma sinalização intracitoplasmática que acarretará na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular da própria célula, onde a célula então irá aderir, espalhar e iniciar sua proliferação.

As amostras foram acompanhadas diariamente e analisadas quanto a sua morfologia e aderência ao plástico, seguindo a padronização proposta pelo Comitê de Células-tronco teciduais e mesenquimais da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT).

Assim, foram cultivadas células para obtenção de metáfases. Devido à presença limitada de células-tronco mesenquimais nos tecidos humanos, a expansão *ex vivo* se faz necessária para obter o número suficiente de células para serem administradas; o cultivo celular *in vitro*, portanto, é de extrema importância. No projeto central, que deu origem a este trabalho, as células foram analisadas até a P12 (décima segunda passagem de cultivo celular). Nesta monografia, foram analisadas células em P4 e P8. Como as amostras são derivadas de origem dental, somente é possível realizar a análise citogenética após a expansão celular, após P4, pois em passagens mais anteriores ainda não possuem número de células suficientes para serem analisadas (Figura 8). As



células são analisadas em P4 pois é nesta passagem que as células são utilizadas na aplicação clínica; já as células em P8 são utilizadas como um parâmetro para evidenciar se há estabilidade mesmo com cultivo mais prolongado.

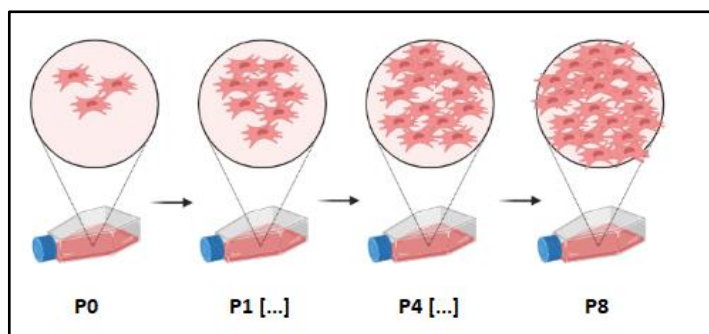


Figura 8. Esquema representativo do processo de cultivo celular. A renovação de células de uma garrafa de cultivo para outra é chamada de passagem. Fonte: o autor.

A colheita das amostras para testes citogenéticos é constituída basicamente pelas fases de interrupção mitótica com colchicina (ou colcemid), hipotonização com cloreto de potássio (KCl) e, por fim, fixação e lavagens com fixador Carnoy (metanol e ácido acético).

Para realizar a análise cromossômica, a colheita das amostras foi realizada em dois frascos de 150 cm<sup>2</sup> (comumente chamados de T150), com aproximadamente 80% de confluência, quando então foram submetidas às seguintes etapas: primeiramente, a interrupção mitótica foi realizada pela adição de colchicina (0,1 µg/mL) por 3 a 6 horas, monitorando as células em microscópio invertido. Para a colheita, o primeiro passo foi retirar o sobrenadante e lavar a garrafa com PBS, reservando-o em um tubo identificado, depois foi adicionado 8 ml de tripsina/EDTA 0,25% e mantido 3 min a 37°C, monitorando o descolamento das células em microscópio invertido. O próximo passo foi adicionar 0,2 mL de soro e transferir para o tubo previamente identificado, lavar

a garrafa com PBS e transferir este PBS para o mesmo tubo e centrifugar 8 min. a 400 g, e, por fim, retirar o sobrenadante.

Na fase de hipotonização, primeiro realizou-se a ressuspensão das células em 6 mL de KCl (0,057M) com Hepes, aquecido, adicionando lentamente e mantido 30 min. a 37°C. Na última fase, a de fixação, foi feita a adição de 1mL de fixador 3:1 (metanol/ácido acético), gelado, e uso da centrífuga por 8 min. a 400 g ; o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados lentamente 5 mL de fixador gelado (mantido no mínimo 10 min a -5°C), uso da centrífuga por 8 min a 400 g, e lavagem com fixador 2:1 duas vezes e transferir para um tubo criogênico previamente identificado, e, por fim, armazenar a -20°C. Os tubos com as amostras foram então encaminhados ao Laboratório de Citogenética do Complexo Hospital de Clínicas (CHC), onde foram confeccionadas as lâminas.

Para o preparo das lâminas, primeiramente foram separadas lâminas previamente lavadas e acondicionadas em álcool, que depois foram secas com gaze e identificadas; o próximo passo foi colocá-las sobre uma grade e levá-las no vapor do banho-maria a aproximadamente 60°C por alguns minutos, e então pingar sobre cada lâmina de 4 a 5 gotas do material e, por fim, levar as lâminas para a estufa a 60°C, deixando por, no mínimo 2 horas. As lâminas foram então submetidas à técnica de bandeamento G, para avaliação cromossômica pois detecta possíveis aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais.

A bateria de bandeamento cromossômico consiste em 4 tubos (Figura 9): primeiramente, as lâminas foram submersas em solução de tripsina, durante 5 segundos (esse tempo pode variar de acordo com o padrão de banda observado); então, passaram por um segundo tubo contendo solução salina (cloreto de sódio, NaCl, 0,9%, + soro bovino fetal, 1 mL), depois foram lavadas com água destilada, e, por fim, no quarto tubo, foram imersas em solução de corante (10 mL Tampão Sorensen + 2 mL corante Giemsa + H<sub>2</sub>O qsp 40 mL) e coradas por 5 a 7 minutos. As lâminas foram então lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente e, posteriormente, analisadas em microscópio óptico.

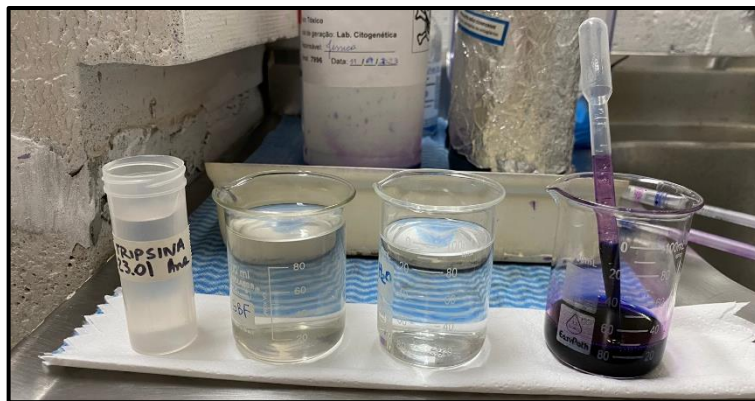


Figura 9. Kit de bandeamento G. As lâminas são mergulhadas em tripsina, solução salina+ SBF, H<sub>2</sub>O destilada e corante Giemsa, respectivamente. Fonte: o autor.

Foi feita análise cromossômica de 8 amostras e, sempre que possível, foram avaliadas 20 metáfases para cada uma. As metáfases encontradas foram capturadas em microscópios específicos (Zeiss, Scope. A1) e analisadas por meio do sistema de cariotipagem Ikaros-MetaSystems, um software que usa inteligência artificial para a montagem de kariogramas. O programa possui comandos que permitem a separação dos cromossomos, sendo que os contornos dos objetos são mostrados em cores diferentes para facilitar a distinção entre cromossomos separados e os adjacentes; além disso, há a possibilidade de usar um recurso para separar cromossomos sobrepostos e também é possível regular a intensidade de coloração das bandas, recursos estes que possibilitam uma análise mais segura e completa.

Os cromossomos homólogos foram pareados em seus respectivos grupos, de acordo com seu tamanho e sua morfologia, que é determinada pela posição do centrômero, e pelo seu padrão de bandas.

A análise dos kariogramas e a interpretação dos resultados foram feitas com base no ISCN 2016- An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016).

## 4 RESULTADOS

Foram analisadas oito amostras provenientes de sete dentes permanentes. Uma mesma amostra de dente, identificada como “DPSCs 2”, foi analisada em duas passagens diferentes, P4 e P8. As amostras foram nomeadas numericamente, de 1 a 7, de forma a manter a confidencialidade dos doadores. Os resultados referentes às análises cariotípicas de cada amostra estão representados nas tabelas a seguir. Os números indicados entre colchetes representam o número de metáfases que foram analisadas em cada amostra.

**Tabela 1: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 1” em P4**

<b>Metáfase</b>	<b>Cariótipo</b>
1	39, XY, -1, -3, -7, -13, -14, -16, -17
2	45, XY, -15
3	46, XY
4	44, Y, -X, +5 (?), -18, -19
5	45, XY, -5
6	46, XY
7	46, XY
8	41, XY, -9, -12, -14, -17, -19
9	46, XY
10	46, XY
11	45, XY, -2
12	44, XY, -9, -9
13	46, XY
14	46, XY
15	46, XY
16	46, XY
17	46, XY
18	46, XY
19	46, XY
20	46, XY
	<b>Cariótipo final: 46, XY [20]</b>

**Tabela 2: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 2” em P4**

<b>Metáfase</b>	<b>Cariótipo</b>
1	45, XY, -6
2	38, Y, -X, -1, -5, -18, -20, -21, -21, -22
3	Hiperdiploide
4	Hiperdiploide
5	Hiperdiploide
6	Hiperdiploide
7	46, XY
8	Hiperdiploide

(Continua...)

(Continuação)

9	35, Y, -X, -2, -2, -3, -4, -7, -9, -11, -11, -15, -20
10	42, XY, -8, -10, -15, -22
11	Hiperdiploide
12	Hiperdiploide
13	42, XY, -2, -5, -6, -22
14	45, XY, -6
15	Hiperdiploide
16	Hiperdiploide
17	Hiperdiploide
18	44, XY, -7, -9
19	Hiperdiploide
20	Hiperdiploide
21	43, XY, -1, -5, -19
22	Hiperdiploide
23	44, XY, -10, -11
24	Hiperdiploide
25	Hiperdiploide
	<b>Cariótipo final: 46, XY [10] / 58~92, XXYY [15]</b>

**Tabela 3: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 3” em P4**

Metáfase	Cariótipo
1	39, XY, -7, -8, -9, -10, -16, -21, -22
2	43, XY, -13, -19, -22
3	37, XY, -3, -4, -5, -10, -17, -19, -19, -20, -22
4	39, XY, -8, -9, -10, -14, -18, -19, -20
5	Hiperdiploide
6	Hiperdiploide
7	44, XY, -21, -22
8	39, XY, -4, -7, -11, -13, -14, -19, -19
9	45, XY, -16
10	38, XY, -2, -9, -11, -18, -19, -19, -20, -22
11	45, XY, -5
12	39, XY, -9, -10, -12, -18, -21, -22, -22
13	42, XY, -12, -14, -19, -21
14	38, XY, -3, -5, -9, -10, -16, -17, -18, -22
15	46, XY
16	42, XY, -10, -12, -17, -20
	<b>Cariótipo final: 38 ~ 46, XY [14]</b>

**Tabela 4: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 4” em P4**

Metáfase	Cariótipo
1	46, XX
2	46, XX
3	46, XX

(Continua....)

(Continuação...)

4	diplocromossomos
5	44, XX, -6, -11
6	45, XX, -20
7	46, XX
8	46, XX
9	44, XX, -3, -22
10	45, X, -X
11	46, XX
12	45, XX, -22
13	45, XX, -17
14	46, XX
15	46, XX
16	46, XX
17	45, XX, -17
18	44, X, -X, -10
19	44, XX, -9, -15
20	44, XX, -14, -15
21	Hiperdiploide
22	43, XX, -10, -19, -22
	<b>Cariótipo final: 46, XX [20]</b>

**Tabela 5: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 5” em P8**

Metáfase	Cariótipo
1	46, XY
2	39, Y, -X, -2, -7, -11, -15, -18, -19
3	46, XY
4	Hiperdiploide
5	46, XY
6	46, XY
7	46, XY
8	44, XY, -11, -17
9	46, XY
10	39, X, -Y, -3, -5, -14, -14, -19, 20
11	42, X, -Y, -12, -18, -20
12	37, XY, -2, -2, -4, -9, -9, -10, -15, -16, -19
13	46, XY
14	46, XY
15	46, XY
	<b>Cariótipo final: 46, XY [14]</b>

**Tabela 6: Análise cariotípica da amostra “DPSCs 6” em P8**

Metáfase	Cariótipo
1	46, XY
2	43, XY, -11, -15, -19
	<b>Cariótipo final: 46, XY [2]</b>

As amostras “DPSCs 2” e “DPSCs 7”, analisadas em P8, não apresentaram metáfases para análise.

A seguir estão representados os cariótipos das amostras analisadas ao longo das passagens (P4 e P8), assim como o número de metáfases analisadas em cada amostra (Tabela 7).

**Tabela 7: Cariótipos das amostras analisadas ao longo das passagens**

**Cariótipo [n° de metáfases analisadas]**

<b>AMOSTRA</b>	<b>P4</b>	<b>P8</b>
<b>DPSCs 1</b>	<b>46, XY [20]</b>	NA
<b>DPSCs 2</b>	<b>46, XY [10] / 58~92, XXYY [15]</b>	<b>Sem metáfases</b>
<b>DPSCs 3</b>	<b>38~46, XY [14]</b>	NA
<b>DPSCs 4</b>	<b>46, XX [20]</b>	NA
<b>DPSCs 5</b>	NA	<b>46, XY [14]</b>
<b>DPSCs 6</b>	NA	<b>46, XY [2]</b>
<b>DPSCs 7</b>	NA	<b>Sem metáfases</b>

NA - não analisadas

A análise cromossômica demonstrou que as amostras deste estudo possuem cariótipo normal (Figura 10.A e 10.B) e houve sinais de instabilidade genética (células hiperdiploides) em 20% das metáfases totais observadas. (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de células com sinais de instabilidade genética

	P4 + P8
n (n° de amostras)	4 (P4) + 4 (P8) = 8
n° de metáfases totais observadas	83 (P4) + 17 (P8) = 100
Células com sinais de instabilidade genética	19 (P4) + 1 (P8) = 20
Frequência de células com sinais de instabilidade genética em relação às metáfases totais observadas	$20 / 100 = 0,2 = 20\%$

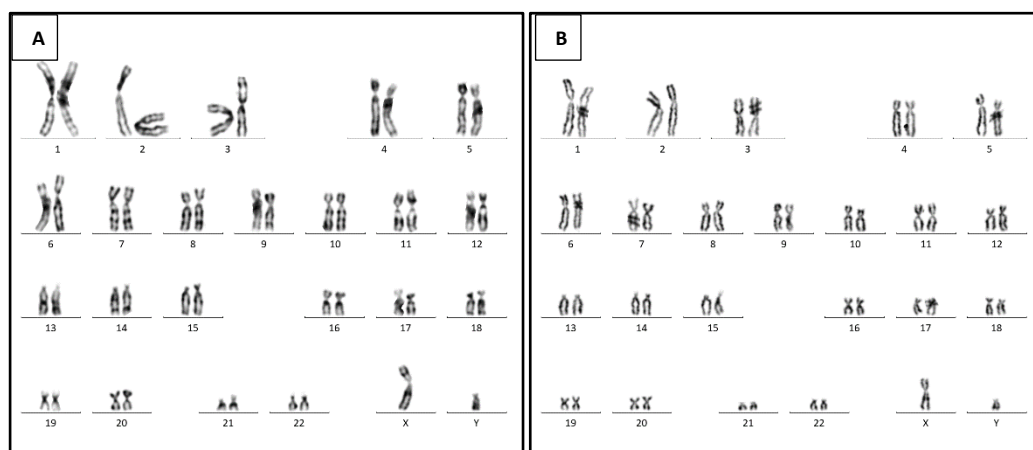


Figura 10. Cariograma representativo. A) cariograma da amostra “DPSCs 1” em P4, cariótipo 46, XY. B) cariograma da amostra “DPSCs 5” em P8, cariótipo 46, XY.

As amostras analisadas em P4 apresentaram um número muito mais abundante de metáfases. Por outro lado, as amostras analisadas em P8 apresentaram pouquíssimas metáfases, com exceção da amostra “DPSCs 5”, onde foi possível capturar 15 metáfases, porém foi necessária a análise de 21 lâminas no total para obter esse resultado. Em relação à amostra “DPSCs 6”,



mesmo com a análise de 20 lâminas no total, foi possível encontrar apenas 2 metáfases. Já para as amostras “DPSCs 2” e “DPSCs 7”, nenhuma metáfase foi encontrada, mesmo com a análise de inúmeras lâminas. A média de metáfases observadas em P4 foi 20, já em P8 a média foi 4.

A amostra “DPSCs 2” foi analisada em P4 e P8. Em P4 o cariótipo foi 46, XY [10] / 58~92, XXYY [15], ou seja, parte das células possuíam cariótipo normal e parte das células eram um clone hiperdiploide (“near-tetraploidy”). Em P8 o resultado foi sem metáfases (Figura 11).

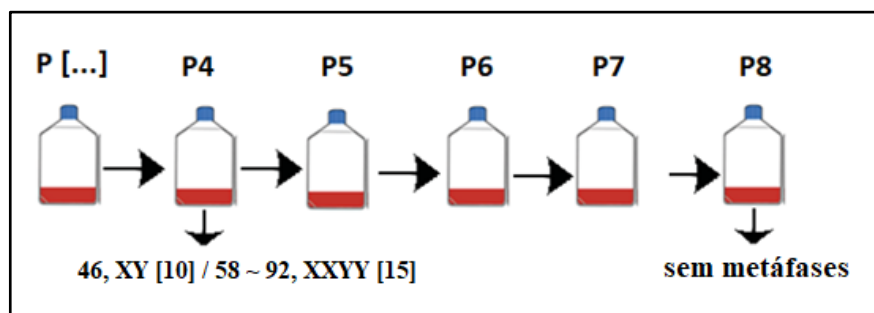


Figura 11. Representação esquemática da análise cariotípica da amostra “DPSCs 2” nas passagens P4 e P8. Adaptado de Borgonovo (2016).

Esta amostra apresentou muitas células hiperdiploides, o que é um sinal de instabilidade. A tetraploidia é o tipo de hiperdiploidia mais comumente encontrada em células cultivadas. Em células derivadas de vilosidade coriônica, por exemplo, sua frequência pode chegar em até 11,6% (GRIMES et al., 2009). Células tetraploides são células que apresentam o número cromossômico haploide ( $n=23$ ) quadruplicado, num total de 92 cromossomos (Figura 12).

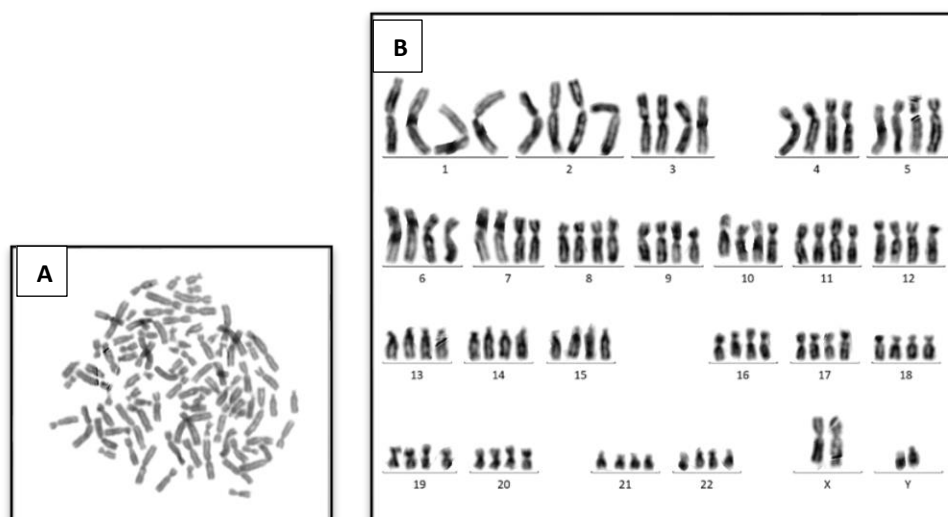


Figura 12. Amostra “DPSCs 2” na passagem P4. A) Célula tetraploide. B) Cariograma de uma célula tetraploide, com cariótipo 92, XXYY.

A frequência de células tetraploides (4n) observadas ao longo das passagens P4 e P8, em relação às metáfases totais observadas está representada na Tabela 9.

Tabela 9: Frequência de células tetraploides (4n) ao longo das passagens P4 e P8

	P4	P8
n (n° de amostras)	4	4
n° de metáfases totais observadas	83	17
Células 4n	19	1
Frequência de 4n em relação às metáfases totais observadas	$19 / 83 = 0,2289 = 22,89\%$	$1 / 17 = 0,0588 = 5,88\%$

Outro sinal de instabilidade foi observado na amostra “DPSCs 4” em P4, que apresentou uma metáfase tetraploide com diplocromossomos (Figura 13), os quais aparecem somente na primeira divisão celular após o evento de endoreduplicação, sendo outro fenômeno que é relativamente comum em células cultivadas.



Figura 13. Amostra “DPSCs 4” na passagem P4. Diplocromossomos.

Não foram observadas alterações estruturais em nenhuma das metáfases analisadas neste trabalho.

## 5 DISCUSSÃO

Foram estudadas neste trabalho 8 amostras de DPSCs derivadas de 7 doadores, com o objetivo de avaliação da estabilidade citogenética das células cultivadas *in vitro*, visto que é uma etapa fundamental para a aplicação clínica.

Conforme descrito por Bonab et al. (2006), a obtenção de metáfases foi cada vez mais difícil ao longo do cultivo *in vitro*, pois, com o decorrer das passagens, a taxa de proliferação diminui progressivamente, até que as células então, entram em um estado senescente e param de proliferar (Figura 14).

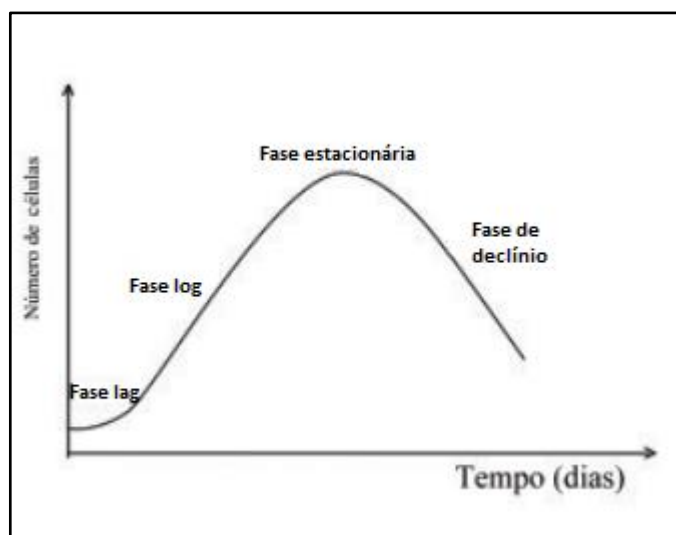


Figura 14. Curva de crescimento de células em cultura. Dividida nas seguintes fases de crescimento: Fase lag (período de adaptação no qual não ocorre proliferação após adição das células ao meio de cultivo), Fase log (a multiplicação celular é máxima e constante), Fase estacionária (a velocidade de crescimento diminui, o número de morte celular tende a ser equivalente ao número de células novas), Fase de declínio (há redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de células novas). Fonte: Alves & Guimarães (2014).

Isto foi evidenciado ao se fazer a comparação do número de metáfases observadas entre as duas passagens. Em P4, a média de metáfases encontradas foi 20, o que é considerado ideal para se fazer a interpretação dos resultados de forma segura. Já em P8, a média de metáfases encontradas foi 4.

Como destacado por Borgonovo et al. (2014), um ponto essencial em estudos com células-tronco é a padronização dos protocolos a serem utilizados. O tratamento hipotônico é crítico para o teste de cariotipagem, e sua padronização é crucial para a correta interpretação dos resultados. Uma exposição hipotônica curta pode não ser o suficiente para uma boa dispersão dos cromossomos metafásicos, resultando em muitos cromossomos sobrepostos; já a superexposição pode enfraquecer a membrana plasmática, eventualmente resultando em ruptura da mesma e perda de alguns cromossomos (hipodiploidia), fato que pode explicar, pelo menos em parte, do porquê muitas das metáfases analisadas neste trabalho não estavam completas, ou seja, possuíam menos do que 46 cromossomos.

A taxa mais elevada de hipodiploidia normalmente é observada em amostras que são mais sensíveis ao tratamento com solução hipotônica, como por exemplo, o observado na amostra “DPSCs 3” (Tabela 3 dos Resultados). Outro ponto a ser considerado é o tempo em que as lâminas permanecem secando na estufa, pois se permanecerem muito tempo lá a membrana plasmática pode se tornar enfraquecida e com isso a célula pode romper e perder alguns cromossomos, causando a impressão de pseudo-hipodiploidia, como descrito por Spurbeck J. (1996) e discutido por Lawce & Brown (2017).

Sendo assim, destaca-se que as perdas cromossômicas observadas neste trabalho podem ter sido randômicas, o que ocorre normalmente em cultivo, possivelmente devido à falta de homogeneidade no tempo de exposição à solução hipotônica e ao tempo de secagem das lâminas na estufa. Nenhuma perda cromossômica foi clonal, e as amostras analisadas possuem cariótipo normal.

A tetraploidia (4n) pode ser encontrada em indivíduos normais, em vários tecidos somáticos, incluindo fígado e medula óssea em regeneração (FERGUSON-SMITH, 2013) sendo normalmente resolvida pelas células (ANDREASSEN et al., 2001). Em células cultivadas, sua presença se torna mais frequente. Na amostra “DPSCs 2”, analisada em P4, foi onde mais foram encontradas células hiperdiploides. Esta amostra foi analisada nas passagens

P4 e P8: quando analisada em P4, das 25 metáfases analisadas no total, 15 eram hiperdiploides (uma frequência de 60% nesta amostra). Esses dados demonstram que já em P4 temos um tempo de cultivo suficiente para aparecer uma porcentagem significativa de células tetraploides; porém, não houve aumento da frequência deste tipo de células em P8 (Tabela 9).

Células tetraploides são mais resistentes a danos físicos, conforme resultados obtidos por Castedo et al., (2006), e podem apresentar maior tamanho/volume celular, logo, respondendo menos à hipotonização (MARGUERAT & BÄHLER, 2012). Sendo assim, uma provável explicação do porquê foram encontradas tantas células hiperdiploides nesta amostra (“DPSCs 2”), seria uma possível reação diferencial à hipotonização. Outra possível explicação para isso, seria o fato de que certas amostras parecem ser mais instáveis do que outras, e essa propensão a mostrar sinais de instabilidade genética pode variar de doador para doador (BORGONOVO, 2016).

Outro sinal de instabilidade foi observado na amostra “DPSCs 4” em P4. Trata-se de uma metáfase tetraploide com diplocromossomos. As quatro cromátides que constituem um diplocromossomo são estruturalmente idênticas e se comportam da mesma forma; sob microscópio, os diplocromossomos apareceram formados por dois cromossomos completamente divididos, não mostrando conexão física em suas regiões centroméricas, mas parecem ser mantidos juntos por laços de fibra de cromatina conectando as duas cromátides vizinhas dos cromossomos irmãos (GOYANES & SCHVARTZMAN, 1981), como ilustrado na Figura 13 desta monografia. Os diplocromossomos são resultado de um evento de endoreduplicação, que ocorre ocasionalmente em todos os tecidos (EDGAR & ORR-WEAVER, 2001), porém, em células cultivadas sua presença se torna mais frequente (WALEN, 2007), demonstrando instabilidade celular, visto que são fruto de um erro na mitose.

Conforme descrito por SHI & KING (2005), a tetraploidia está relacionada a erros durante a divisão celular (erro durante a mitose), caracterizado pela regressão do sulco de clivagem, dando origem, assim, a células binucleadas. Problemas nesta fase da divisão celular (citocinese) estão, em geral, intimamente associadas à não disjunção cromossômica, resultando em células

tetraploides. Em células cultivadas *in vitro* a presença de tetraploidia e endoreduplicação demonstra instabilidade celular e isso justifica a necessidade de sempre fazer o controle citogenético como critério de liberação para o uso dessas células em transplantes e terapias celulares, visto que, a manutenção do cariótipo normal é um indicador confiável da estabilidade genética das células-tronco.

Neste trabalho, apenas um caso em específico (amostra “DPSCs 2” analisada em P4) apresentou uma porcentagem significativa de células hiperdiploides (15 células hiperdiploides em 25 células analisadas, representando uma frequência de 60% nesta amostra). Devido ao baixo “n” amostral neste trabalho (8 amostras), esse índice de células hiperdiploides acabou impactando no resultado final; caso fosse avaliado em número maior de amostras, essa proporção poderia variar. Portanto, os 20% de células que mostraram sinais de instabilidade cromossômica neste presente trabalho não podem ser interpretados como uma dúvida em relação à segurança do uso clínico das DPSCs, mas sim demonstram a importância de se realizar a análise citogenética dessas células que estão sendo cultivadas pois mostram sinais de instabilidade, o que também pode ser uma consequência de um baixo número amostral.

Enfatiza-se que as células analisadas neste trabalho demonstraram manter o cariótipo normal ao longo do cultivo celular, corroborando assim a afirmação da manutenção da estabilidade citogenética de MSCs em geral, de diferentes fontes, durante cultivo celular, já comprovada em dezenas de estudos (BERNARDO et al., 2007; SENSEBÉ et al., 2012; JONES et al., 2013; SCHEERS et al., 2013; MARTINS et al., 2014 ; PALUMBO et al, 2018), e a manutenção da estabilidade citogenética de DPSCs, especificamente, conforme já demonstrado por RAIK et al., 2020.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na pesquisa feita na forma de revisão bibliográfica e com base na análise das amostras e posterior interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, foi notória a importância do estudo das células-tronco mesenquimais, visto que devido às suas características e propriedades particulares, demonstram imenso potencial de aplicação numa ampla gama de doenças e distúrbios e possíveis aplicabilidades na Medicina Regenerativa, Terapia Celular, Terapia de Tecidos e Bioengenharia. O estudo das DPSCs, especificamente, tem atraído atenção especialmente no que diz respeito às doenças neurodegenerativas.

O projeto que deu origem a esta monografia está em fase de pesquisa experimental e já apresenta resultados promissores quanto ao potencial uso clínico das DPSCs.

Neste trabalho, com o intuito de analisar a manutenção da estabilidade das DPSCs cultivadas, ficou clara a necessidade do uso de protocolos padronizados em relação ao isolamento e condições de cultura das DPSCs, visto que estes asseguram a posterior análise correta das amostras e a interpretação dos resultados de forma segura.

A avaliação da estabilidade citogenética por meio da técnica de Análise Cromossômica com bandeamento G, se mostrou muito informativa e eficaz.

Foi detectado o surgimento de células tetraploides, um fenômeno que já é conhecido em células cultivadas *in vitro*, mas não foi detectado em nenhum caso o surgimento de aberração cromossômica clonal. Também não foi detectada nenhuma alteração estrutural nas amostras analisadas. Portanto, houve manutenção da estabilidade citogenética nas amostras de DPSCs analisadas neste trabalho, mesmo após diversas passagens de cultivo celular, visto que houve manutenção do cariótipo normal, demonstrada através da análise citogenética com bandeamento G, comprovando a segurança da técnica de cultivo destas células *in vitro* e demonstrando que os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos de maneira satisfatória.



## REFERÊNCIAS

- AHMED, M. et al. "Therapeutic potential of dental pulp stem cell secretome for Alzheimer's disease treatment: an in vitro study." **Stem Cells International**, vol. 2016, Article ID 8102478, 11 pages, 2016.
- ALVES, H. et al. "A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells". **J. Cell Mol. Med.** 2010, 14, 2729–2738
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo Celular. In: AMENDOEIRA, M.; CAPUTO, L. MOLINARO, E. **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Escola Politécnica em Saúde Joaquim Venâncio e Instituto Oswaldo Cruz, 2014. v.2. 215-253.
- AMINI-NIK, S. et al. "Stem cells derived from burned skin - The future of burn care." **EBioMedicine** 37 (2018) 509–520.
- ANDREASSEN et al. "Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1". **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 5, p. 1315-1328, 2001.
- APEL, C. et al. (2009). "The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease". **J. Neural. Transm.** 116, 71–78. doi: 10.1007/s00702-008-0135-3
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC09: Requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular, que fornecem células humanas e seus derivados para pesquisa clínica e terapia. Brasília, 2011. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/623ecb0047458efe9836dc3fbc4c6735/RDC\\_09\\_2011.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/623ecb0047458efe9836dc3fbc4c6735/RDC_09_2011.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 08 dez. 2022.
- ASKARI, M. et al. "Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation," **Neuroscience**, vol. 305, pp. 197–208, 2015
- AWAIS, A. et al. "Human Dental Pulp Stem Cells Exhibit Osteogenic Differentiation Potential." **Open Life Sci.** 2020; 15: 229–236.
- BEHRENS, A. et al. "Impact of genomic damage and ageing on stem cell function." **Nature cell biology**, vol. 16,3 (2014): 201-7. doi:10.1038/ncb2928
- BEN-DAVID U, MAYSHAR Y, BENVENISTY N. "Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells". **Cell Stem Cell**. 2011;9:97–102.

BERNARDO, M.E. et al. "Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms". **Cancer Res.** 2007;67:9142–9

BONAB, M.M. et al. "Aging of mesenchymal stem cell in vitro." **BMC cell biology** vol. 7 14. 10 Mar. 2006, doi:10.1186/1471-2121-7-14

BORGONOVO, T. et al. (2014). "Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center". **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 36(3), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>

BORGONOVO, T. et al. "Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation". **Molecular Cytogenetics** (2015) 8: 94. doi: 10.1186/s13039-015-0197-5

BORGONOVO, Tamara. Avaliação da integridade genômica de células-tronco cultivadas. 2016. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016.

BUNNELL, B.A. "Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells." **Cells**, 2021, 10, 3433. <https://doi.org/10.3390/cells10123433>

CASTEDO, M. et al. "Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells". **EMBO J.** 2006;25(11):2584-2595. doi:10.1038/sj.emboj.7601127.

CATALINA, P. et al. "Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review". **Cell Biol Int.** 2007;31:861–9.

CHAI, Y. et al. "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis." **Development** (Cambridge, England), vol. 127,8 (2000): 1671-9. doi:10.1242/dev.127.8.1671.

CHAN RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. **Biol Reprod.** 2004; 70:1738 –1750.

CHANG, C. et al. "Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media". **Journal of the Formosan Medical Association** (2014) 113, 956-965.

CHUN, S. et al. "Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic Neuron-like Cells in Vitro". **J Korean Med Sci.** 2016; 31: 171-177. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2016.31.2.171>

COHEN S, Hargreaves KM. Caminhos da Polpa. 9º ed. Elsevier Ltda. 2007.

CRISAN, M. et al. "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." **Cell stem cell**, vol. 3,3 (2008): 301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003

CROCI, S. et al. "Human Dental Pulp Stem Cells Modulate Cytokine Production *in vitro* by Peripheral Blood Mononuclear Cells From Coronavirus Disease 2019 Patients." **Front. Cell Dev. Biol.** 8:609204. doi: 10.3389/fcell.2020.609204. 2021

DOMINICI, M. et al. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." **Cytotherapy** vol. 8,4 (2006): 315-7. doi:10.1080/14653240600855905

EDGAR, B. A., & ORR-WEAVER, T. L. "Endoreplication Cell Cycles: More for Less". **Cell**, vol. 105 (2001): p 297-306. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00334-8)

FERGUSON-SMITH, M.A. "Human Chromosome Aberrations". **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2<sup>nd</sup> edition, vol.3 (2013). Doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00237-0.

FRACARO, Letícia. Análise comparativa da expressão gênica das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e da polpa dentária diferenciadas em linhagens do sistema nervoso. Tese de doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019.

FREITAS, Daniele Pinheiro de. Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente humano: caracterização e estudos funcionais em modelo experimental de epilepsia. Tese de doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ - Salvador - Bahia. 2011.

GNANASEGARAN, V. et al. "Effect of dental pulp stem cells in MPTP-induced old-aged mice model," **European Journal of Clinical Investigation**, vol. 47, no. 6, pp. 403–414, 2017.

GNANASEGARAN, V. et al. Govindasamy, V. Mani, and N. H. Abu Kasim, "Neuroimmunomodulatory properties of DPSCs in an *in vitro* model of Parkinson's disease," **IUBMB Life**, vol. 69, no. 9, pp. 689–699, 2017.

GOVINDASAMY, V. et al. "Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Islet-like Aggregates." **Journal of Dental Research**, vol. 90, n. 5, 2011

GOYANES, V. J., & SCHVARTZMAN, J. B. (1981). Insights on diplochromosome structure and behaviour. **Chromosoma**, 83(1), 93–102. <https://doi.org/10.1007/BF00286018>

GRIMES, B. R. et al. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. **Stem Cells and Developments**, v. 18, n. 5, p. 717-724, 2009.

GRONTHOS, S. et al. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97,25 (2000): 13625-30. doi:10.1073/pnas.240309797

GRONTHOS, S. et al. "Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells." **Journal of Dental Research** 81 (2002): 531 - 535.

GUIMARÃES, E. et al. "Transplantation of Stem Cells Obtained From Murine Dental Pulp Improves Pancreatic Damage, Renal Function, and Painful Diabetic Neuropathy in Diabetic Type 1 Mouse Model." **Cell Transplantation**, Vol. 22, pp. 2345–2354, 2013

GUO, S-L. et al. "Promotion of the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Oligodendrocytes by Knockdown of Heat Shock Protein 27". **Dev Neurosci** 2022;44:91–101

HERBERTS, C.A, KWA M.S, Hermens H.P. "Risk factors in the development of stem cell therapy". **J Transl Med.** 2011; 9:29.

IOHARA, K. et al. (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: Subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*, 26(9), 2408–2418. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0393>

ISCN (2016): **An International System For Human Cytogenomic Nomenclature**. McGowan-Jordan, J., Simons, A., & Schmid, M. (2016).

JONES, M. et al. "Genetic stability of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in the Quantum System". **Cytotherapy**. vol. 15, n. 11, p. 1323-1339. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.024>

KARAÖZ, E. et al. "Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells." **Histochemistry and cell biology**, vol. 136,4 (2011): 455-73. doi:10.1007/s00418-011-0858-3.

KING N.M., PERRIN, J. "Ethical issues in stem cell research and therapy". **Stem Cell Research & Therapy**, vol. 5,4 85. 7 Jul. 2014. doi: 10.1186/scrt474.

KONG, Y. et al. "Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis". **Stem Cell Res Ther** (2021) 12:474. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02526-z>

KRAWCZENKO, A. et al. "Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 2425. <https://doi.org/10.3390/ijms23052425>

LAMM, N. et al. "Genomic instability in human pluripotent stem cells arises from replicative stress and chromosome condensation defects". **Cell Stem Cell**, 2016, 18, 253–261.

LAWCE, H.J., BROWN, M.G. (2017). Chapter 2: Cytogenetics: an overview. In *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (eds M.S. Arsham, M.J. Barch and H.J. Lawce). <https://doi.org/10.1002/9781119061199.ch2>

LEONG, T. et al., "Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms," **Stem Cells Translational Medicine**, vol. 1, no. 3, pp. 177–187, 2012.

LEROU, P. "Embryonic Stem Cell Derivation from Human Embryos". In: Schwartz, P., Wesselschmidt, R. (eds) Human Pluripotent Stem Cells. **Methods in Molecular Biology**, vol 767. Humana Press, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_3)

LI, H. et al. "Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. Ann. N. Y. **Acad. Sci.** 2016, 1370, 109–118.

LIRAS, A. "Future research and therapeutic applications of human stem cells: General, regulatory, and bioethical aspects". **J. Transl. Med.** 2010, 8, 131.

LONGONI, A. et al. "The chondrogenic differentiation potential of dental pulp stem cells." **European Cells and Materials**, vol. 39, p. 121-135, 2020.

LUO, L. et al. "Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair". **Stem Cells International**, vol. 2018.

MADHOUN A. A. et al." Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review". **Front. Cell Dev. Biol**, 2021, 9:717624. doi: 10.3389/fcell.2021.717624.

MARGUERAT, S., BÄHLER, J. "Coordinating genome expression with cell size". **Trends in Genetics**, vol.28, n. 11, 2012.

MARTINO, S. et al. "Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine". **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 338-351, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.015>

MARTINS, J.P. et al. "Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data". *Stem Cell Res Ther* 5, 9 (2014). <https://doi.org/10.1186/scrt398>

MASUDA, K. et al. "Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders." **International journal of molecular sciences**, vol. 22,5 2269. 25 Feb. 2021, doi:10.3390/ijms22052269.

MATEUS Lisboa (Figura 5 – página 20).

MATTEI, V. et al. "Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect?". *Stem Cell Reviews and Reports* (2021) 17:1635–1646. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10162-6>

MEAD, B. et al. "Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury," **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 54, no. 12, pp. 7544–7556, 2013.

MEAD, B. et al. "Mesenchymal stromal cell-mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma," **Cytherapy**, vol. 18, no. 4, pp. 487–496, 2016.

MENG, X. et al. "Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. **J Transl Med**. 2007. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>

NAKAMURA, S. 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." **Basic Research Biology**, vol 35, n. 11, p. 1536-1542, 2009. doi:<https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.07.024>.

NERI, S. (2019). Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. In **International journal of molecular sciences** (Vol. 20, Issue 10). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms20102406>

NITO, C. et al. (2018). Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates brain damage following acute cerebral ischemia. **Biomed. Pharmacother**. 108, 1005– 1014. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.084

OZHATHIL, D. K., et al. (2021). "A Narrative Review of the History of Skin Grafting in Burn Care. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, 57(4), 380. <https://doi.org/10.3390/medicina57040380>

PALUMBO, P. et al. "Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview". **Int. J. Mol. Sci**. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19071897>

PAYÃO, S.L, SEGATO R, SANTOS R.R. "Genetic control of cultivated human stem cells". **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2009;31 Suppl. 1:15–8

PISCIOTTA, A. et al. "Stem cells isolated from human dental pulp and amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice." **Stem Cell Research & Therapy** (2015) 6:156 DOI 10.1186/s13287-015-0141-y

PRANKE, Patrícia. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 33-38, Sept. 2004. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252004000300017&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252004000300017&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 04 Dez. 2022.

RAIK, S. et al. "Assessment of Post-thaw Quality of Dental Mesenchymal Stromal Cells After Long-Term Cryopreservation by Uncontrolled Freezing". **Appl Biochem Biotechnol**. 2020;191(2):728-743. doi:10.1007/s12010-019-03216-6

SANEN, W. et al. "Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair?," **Journal of**

**Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 11, no. 12, pp. 3362–3372, 2017.

SASAKI, S. et al., “PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration,” **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, vol. 5, no. 10, pp. 823–830, 2011.

SCHEERS, I. et al. “Human umbilical cord matrix stem cells maintain multilineage differentiation abilities and do not transform during long-term culture.” **PloS one**. vol. 8,8 e71374. 9 Aug. 2013, doi:10.1371/journal.pone.0071374

SCOTT-CONNER, C. et al. “Quantitation of rate of wound closure and the prediction of death following major burns”. **Burns Incl Therm Inj**. 1988; 14: 373-8.

SENSEBÉ L., BOURIN P. “Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes”. **Transplantation**. 2009; 15 Suppl. 9:S49–53.

SENSEBÉ, L. et al. “Limited Acquisition of Chromosomal Aberrations in Human Adult Mesenchymal Stromal Cells”. **Cell Stem Cell Letters**. V.10, n. 1, p. 9-10, 2012.

SHEIKHOESLAMI, A. et al. “Evaluating differentiation potential of the human menstrual blood-derived stem cells from infertile women into oocyte-like cells.” **Reproductive Biology**, vol. 21, n. 1, 100477, 2021.

SHI, Q.; KING, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1038-1042, 2005.

SONG, S. et al. “Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro,” **Journal of Neuroscience Research**, vol. 93, no. 6, pp. 973–983, 2015.

SONG, J. et al. “Human dental pulp stem cells are more effective than human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in cerebral ischemic injury,” **Cell Transplantation**, vol. 26, no. 6, pp. 1001–1016, 2017.

SPURBECK, J. Dynamics of chromosome spreading. In: Spurbeck J.L., Zinmeister A.R., Meyer K.J., Jalal S.M. *Am J Hum Genet* 1996; 387-393, 1996.

TAKAHASHI, K. et al. “Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. **Nature Protocols** 2, 3081–3089, (2007).

TAN, J. et al. “Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome.” **Human Reproduction**, vol. 31, n. 12, p. 2723–2729, 2016

TATULLO, M. et al. "Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine". **Jornal Tissue Engeneering Regenerative Medicine** 2015; 9: 1205–1216. doi: 10.1002/term.1899

UEDA, T. et al. "Characteristics and Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cells on Neurodegenerative Diseases. **Front. Neurosci.** 14:407, 2020 doi: 10.3389/fnins.2020.00407

VERMA, K. et al. "Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview." **Dental research journal**, vol. 11, n.3, p. 302-308, 2013.

VISHNUBALAJI, R. et al. "Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis." **Cell Tissue Res** (2012) 347:419–427 DOI 10.1007/s00441-011-1306-3

WALEN, K. H. "Bipolar Genome Reductional Division of Human Near-Senescent, Polyploid Fibroblast Cells," **Cancer Genet Cytogenet**, Vol. 173, 2007, pp.43-50. DOI:10.1016/j.cancergencyto.2006.09.013

WANG, J.; ZUZZIO, K.; WALKER, C. L. (2019). Systemic dental pulp stem cell secretome therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Sci.** 9:165. doi: 10.3390/brainsci9070165

WANG Y. et al. "Safety of mesenchymal stem cells for clinical application". **Stem Cells Int.** 2012; 2012:6520–34.

WANG, Y. et al., "Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease." **Cell Biology International**, vol. 41, no. 6, pp. 639–650, 2017

YAMADA, Y. et al. "Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review." **International journal of molecular sciences** vol. 20,5 1132. 6 Mar. 2019, doi:10.3390/ijms20051132

YAMAMOTO, K. et al. "Analysis of the neuroregenerative activities of mesenchymal stem cells in functional recovery after rat spinal cord injury," **Methods in Molecular Biology**, vol. 1213, pp. 321– 328, 2014.

YANG, X. et al. "Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord," **Journal of Neural Engineering**, vol. 14, no. 2, article 026005, 2017

ZAYED, M.; IOHARA, K. "Immunomodulation and Regeneration Properties of Dental Pulp Stem Cells: A Potential Therapy to Treat Coronavirus Disease 2019". **Cell Transplantation**, vol. 29: 1–9, 2020.



ZHANG, X. et al. "Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy," *Cell and Tissue Research*, vol. 366, no. 1, pp. 129–142, 2016.

ZHAO, K. et al. "Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation". **Biol. Blood Marrow Transpl.** 2015, 21, 97–104.

## ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pág. 1/2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo "Avaliação da expressão de marcadores neuronais em subpopulações de células-tronco derivadas de polpa de dente permanente", que tem como objetivo comparar as subpopulações das células-tronco mesenquimais de polpa de dente permanente (terceiro molar/dente do siso) em relação a população total dessas células. Acreditamos que os resultados obtidos desta pesquisa sejam importantes pois podem ajudar a desenvolver estudos futuros, envolvendo células-tronco e doenças do sistema nervoso.

#### PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua participação no referido estudo será permitir, imediatamente após a exodontia (extração do dente), que seja feita a coleta do dente extraído. Fica-se evidente que a partir deste material serão realizadas as análises necessárias no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR.

#### RISCOS E BENEFÍCIOS

Alerta-se que, da pesquisa a se realizar, não haverá benefícios para o participante e o procedimento de exodontia não será alterado. Compreende-se que o dente extraído e coletado não será utilizado para qualquer fim terapêutico e não terá nenhum valor comercial. As amostras serão utilizadas apenas para esta pesquisa no laboratório. Em relação a pesquisa, os riscos são: acesso dos dados por terceiros ou identificação dos participantes, além de constrangimento por ser abordado para participar da pesquisa. Para minimizar estes riscos, apenas um pesquisador será responsável pela coleta do material e por ter acesso às informações do participante.

#### SIGILO E PRIVACIDADE

Salienta-se que a privacidade do participante será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, identificá-lo, será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

#### AUTONOMIA

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que se queira saber antes, durante e depois da participação. Também fica informado de que possa recusar a participar do estudo, ou retirar o consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e, por desejar sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que se recebe.

#### RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

No entanto, caso tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, bem como a acompanhantes, haverá ressarcimento dos valores gastos. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da participação no estudo, será devidamente indenizado, conforme determina a lei.

#### CONTATO

A pesquisadora envolvida com o referido projeto é Leticia Fracaro (PUC-PR) com eles poderá ser mantido contato pelo telefone (41) 3271-2219.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo

RUBRICA DO SUJEITO DE PESQUISA

RUBRICA DO PESQUISADOR

executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41) 3271-2103 entre segunda e sexta-feira das 08h00 às 17h30 ou pelo e-mail [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br).

#### DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Dados do participante da pesquisa	
Nome:	
Telefone:	
É fumante:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
E-mail:	
Qual a frequência que ingere bebida alcoólica?	<input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> 1-2 vezes por semana <input type="checkbox"/> 3-4 vezes por semana <input type="checkbox"/> 5-6 vezes por semana <input type="checkbox"/> Todos os dias

Curitiba \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

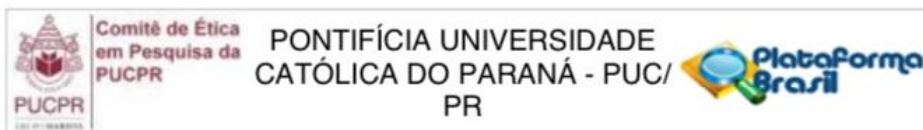
\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

RUBRICADO SUJEITO DE PESQUISA

RUBRICA DO PESQUISADOR

## ANEXO 2

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES NEURONAIS EM SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE POLPA DE DENTE

**Pesquisador:** Letícia Fracaro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 58272722.0.0000.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

**Patrocinador Principal:** CNPQ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.409.680

**Apresentação do Projeto:**

Extraído do arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células adultas, multipotentes e funcionalmente definidas como tendo capacidade de autorrenovação, capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares e extensa atividade parácrina e imunomoduladora. A necessidade de padronização na definição das CTM, o Comitê de Células-tronco teciduais e mesenquimais da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT), propôs três critérios mínimos: as CTM devem ser células aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrões de cultura; mais que 95% da população deve ser positiva para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativa (menos que 2% da população) para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II; devem ser capazes de diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições in vitro. As CTM podem ser isoladas, expandidas em cultura e caracterizadas in vitro. Devido a sua localização, as CTM podem ser obtidas de diversos tecidos do organismo. O tecido dentário apresenta diferentes fontes de CTM, dentre elas as células-tronco da polpa de dente permanente (DPSC – do inglês dental pulp stem cells). A polpa de dente é o tecido conjuntivo frouxo localizado no

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155

**Bairro:** Prado Velho

**CEP:** 80.215-901

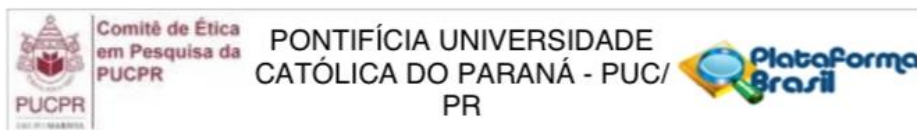
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3271-2103

**Fax:** (41)3271-2103

**E-mail:** nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 5.409.680

centro do dente. Essas DPSC são células de fácil obtenção, oferecem baixo risco aos pacientes e apresentam alta taxa de proliferação in vitro quando comparadas as células derivadas de medula óssea. Foi demonstrado que as DPSC quando isoladas e cultivadas apresentam diferentes morfologias, podendo assim haver duas populações diferentes de DPSC. As células serão isoladas e cultivadas com meio e soro fetal bovino. As células serão caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo e induzidas a diferenciação em duas linhagens (adipogênica e osteogênica) e coradas com corantes específicos para análise conforme sugerido pela ISCT e serão submetidas as análises de unidades formadoras de colônias fibroblastóides. Será realizada a análise cariotípica e teste de micronúcleo, pesquisando anormalidades cromossômicas. Serão avaliados também o potencial de proliferação das amostras. Será analisado a expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).

**Objetivo da Pesquisa:**

Extraído do arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão de marcadores neuronais de subpopulações de células-tronco derivadas da polpa de dente permanente.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Extraído do arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO

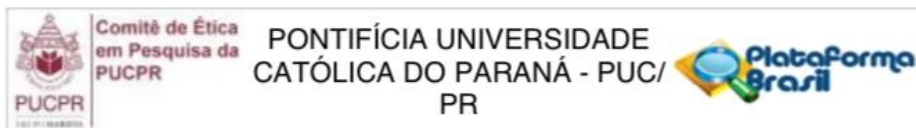
Riscos:

Para o participante doador da polpa dentária não há riscos, pois, a obtenção dos dentes é resultado de descarte de exodontia recomendada por cirurgião dentista. Em relação a pesquisa, os riscos são: acesso dos dados por terceiros ou identificação dos participantes, além de constrangimento por ser abordado para participar da pesquisa. Para minimizar estes riscos, apenas um pesquisador será responsável pela coleta do material e por ter acesso às informações do participante. Este pesquisador tem experiência na abordagem de participantes para coleta de material biológico, reduzindo a possibilidade de constrangimento durante a abordagem.

Benefícios:

<b>Endereço:</b> Rua Imaculada Conceição 1155	<b>CEP:</b> 80.215-901
<b>Bairro:</b> Prado Velho	
<b>UF:</b> PR	<b>Município:</b> CURITIBA
<b>Telefone:</b> (41)3271-2103	<b>Fax:</b> (41)3271-2103 <b>E-mail:</b> nep@pucpr.br





Continuação do Parecer: 5.409.680

Os benefícios não se aplicam diretamente aos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Extraído do arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO

Serão coletados dez dentes permanentes (3º molar) de adultos da faixa etária entre 18 e 25 anos. O estudo se dará pela caracterização das células-tronco

mesenquimais derivadas da polpa de dente permanente pela diferenciação da população total e subpopulação em duas linhagens

(adipogênica e osteogênica), pela caracterização da população total e subpopulação imunofenotípica para marcadores de células-tronco

mesenquimais e marcadores neuronais, ensaio de unidade formadora de colônias – fibroblastóides (CFU-F), ensaio de proliferação, análise

cariotípica, teste de micronúcleo e RT-PCR para genes específicos do tecido neuronal.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver item conclusões ou pendências e lista de inadequações

**Recomendações:**

No TCLE, no espaço para assinatura, alterar "sujeito da pesquisa" por "participante da pesquisa"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto de pesquisa aprovado, pois em consonância com os ditames éticos e legais das Resoluções nºs 466/12 e 510/16, ambas do CNS.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

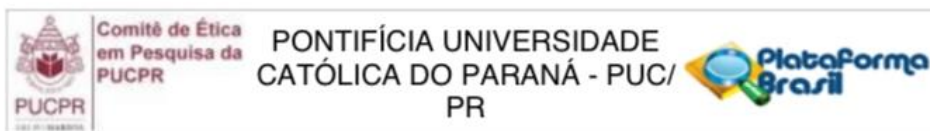
Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê.

Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155  
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901  
 UF: PR Município: CURITIBA  
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 5.409.680

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1933115.pdf	28/04/2022 17:28:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para_maiores_de_18anos_20_04_2022_v2.pdf	28/04/2022 17:27:11	Leticia Fracaro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_CEP_Leticia_Fracaro_abr_2022.pdf	28/04/2022 15:05:29	Leticia Fracaro	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Clinica_M_M_abr_2022.jpeg	28/04/2022 14:50:19	Leticia Fracaro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_Projeto_proponente_Leticia_Fracaro_sub_abr_2022.pdf	28/04/2022 12:20:58	Leticia Fracaro	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_de_aceite_do_Patrocinador_CN Pg_Leticia.pdf	28/04/2022 09:42:30	Leticia Fracaro	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 16 de Maio de 2022

Assinado por:  
Ana Carla Efig  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155  
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br