



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



MILLA CRISTIAN DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E FENÓTIPO DE
CÉLULAS-TRONCO PULPARES DE DENTES
PERMANENTES CONSIDERANDO AS DIFERENTES
PASSAGENS CELULARES**

UBERLÂNDIA

2022

MILLA CRISTIAN DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E FENÓTIPO DE
CÉLULAS-TRONCO PULPARES DE DENTES
PERMANENTES CONSIDERANDO AS DIFERENTES
PASSAGENS CELULARES**

Monografia apresentada a Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos
necessários para a conclusão do curso

Orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Paula
Turrioni

UBERLÂNDIA

2022

MILLA CRISTIAN DE PAULA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E FENÓTIPO DE
CÉLULAS-TRONCO PULPARES DE DENTES
PERMANENTES CONSIDERANDO AS DIFERENTES
PASSAGENS CELULARES**

Monografia apresentada a Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos
necessários para a conclusão do curso

Uberlândia, 15 de Dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Ana Paula Hidalgo Turrioni

Prof^o. Paula Dechichi Barbar

Prof^o. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Dedico este trabalho a todo o curso de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia e seu corpo docente, em especial a Prof^a. Ana Paula pela orientação e colegas de curso. E por fim, a minha família, pelo apoio incondicional sem o qual a conclusão deste trabalho jamais seria possível.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade celular, quantidade, morfologia e fenótipo de células pulpares de dentes permanentes (DPSCs) em diferentes passagens após três meses de preservação a -80°C . As DPSCs obtidas a partir de terceiros molares hígidos através da técnica de explante tecidual foram expandidas em cultura, sendo congelados dois tubos criogênicos das passagens 3, 6, 10 e 12. Após 3 meses, as DPSCs foram descongeladas e semeadas em placas de 96 poços (20.000 células/poço) para avaliação da viabilidade (MTT, $n=9$), 24 poços (50.000 células/poço) para análise morfológica, contagem celular através da microscopia eletrônica de varredura (MEV, $n=2$) e em placa petri de 25 cm^2 (100.000 células/placa) para a análise em citometria de fluxo dos anticorpos CD44, CD146, STRO-1 e CD45. A análise dos dados empregou o teste ANOVA, complementado por Tukey ($p<0,05$). A avaliação de viabilidade e contagem celular demonstraram maiores valores para a #6 seguida da #10. Para a avaliação do fenótipo, observou-se que a #3 apresentou maior marcação de CD146 e STRO-1 (médias de 32,15% e 78,76% respectivamente), seguida da #6 (médias de 18,56% e 57,96% respectivamente). As passagens 10 e 12 apresentaram as menores marcações (médias de 4,66% e 5,38% para CD146 e 14,74% e 10,87% para STRO-1, respectivamente), não apresentando diferença estatística entre elas ($p>0,05$). Concluiu-se que as #6 e #10 de DPSCs foram as que tiveram melhores resultados quanto à viabilidade celular, quantidade e morfologia após 3 meses de criopreservação. Além disso, maior quantidade de células indiferenciadas foram observadas para as #3 e #6.

Palavras-chave: Diferenciação. Células tronco. Polpa dentária.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the cell viability, quantity, morphology and phenotype of pulp cells from permanent teeth (DPSCs) in different passages after three months of preservation at -80°C . The DPSCs passed from sound third molars through the tissue explant technique and were expanded in culture, with two cryogenic tubes from passages 3, 6, 10 and 12 being frozen. After 3 months, the DPSCs were thawed and seeded in 96-well plates (20,000 cells/well) for viability assessment (MTT, $n=9$), 24 wells (50,000 cells/well) for morphological analysis, cell count through scanning electron microscopy (SEM, $n=2$) and in a petri dish 25 cm² (100,000 cells/plate) for flow cytometric analysis of CD44, CD146, STRO-1 and CD45 herds. Data analysis used the ANOVA test, complemented by Tukey ($p<0.05$). The evaluation of viability and cell count showed higher values for #6 followed by #10. For the evaluation of the phenotype, it was observed that the #3 presented greater marking of CD146 and STRO-1 (means of 32.15% and 78.76% respectively), followed by #6 (means of 18.56% and 57.96% respectively). Passages 10 and 12 presented minor markings (means of 4.66% and 5.38% for CD146 and 14.74% and 10.87% for STRO-1, respectively), with no statistical difference between them ($p> 0.05$). It was concluded that the #6 and #10 DPSCs had the best results regarding cell viability, quantity and morphology after 3 months of cryopreservation. In addition, a greater amount of undifferentiated cells were observed for #3 and #6.

Keywords: Differentiation. Stem cells. Dental pulp.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	07
2 – METODOLOGIA	09
2.1 - Obtenção de células pulpare de dentes permanentes (CPDP)	09
2.2 – Testes.....	10
3 – RESULTADOS.....	11
3.1 - Análise da viabilidade celular pelo teste de MTT	11
3.2 - Análise da morfologia e número de células por microscopia eletrônica de varredura	12
3.3 - Citometria de fluxo	13
3.3.1 - Marcação de CD44.....	13
3.3.2 - Marcação de STRO-1.....	14
3.3.3 - Marcação de CD 146.....	15
3.3.4 - Marcação de CD 45.....	16
4 - DISCUSSÃO.....	17
5 - CONCLUSÃO.....	20
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

A área de regeneração e reparo tecidual tem sido alvo de investigação em diversos estudos, apresentando notável evolução na literatura científica (Willerth et al., 2008; Pagnoncellin et al., 2022). O desenvolvimento de materiais e técnicas para a neo-formação tecidual apresentam-se como importante alternativa na presença de lesões teciduais ou até mesmo na substituição de órgãos totalmente danificados (Sharma et al., 2019). Entre as diferentes técnicas relatadas, destaca-se o uso de alguns biomateriais como: hidrogéis, Scaffolds, microesferas, nanofibras e Fibrina Rica em Plaquetas e Leucocitos (L-PRF) (Naderi et al., 2011, Xu et al., 2018; Khafagy et al., 2018; Zhang et al., 2020). Mais recentemente, a associação de células-tronco a estes materiais ou até mesmo o uso isolado destas células tem sido fortemente sugerido para o reparo de tecidos (Wolint et al., 2018; Martins et al., 2018).

As células-tronco ou também conhecidas como células estaminais podem ser encontradas e isoladas a partir de diferentes tecidos e órgãos (Majid et al., 2016; Íslam et al., 2020). Em virtude a sua plasticidade e ampla capacidade de proliferação é alvo constante de estudos na medicina e odontologia regenerativas (Pourlak et al., 2021). Destaca-se também emprego destas células em tratamentos de doenças como: degeneração neuronal, reabsorção óssea e diabetes de modelos animais (Neshati et al., 2010; Grayson et al., 2015; Luzuriaga et al, 2021).

Com relação às diferentes fontes de obtenção de células-tronco, a polpa dentária tem sido amplamente estudada, pois se apresenta como um tecido de fácil obtenção e possui características positivas de proliferação e diferenciação in vitro (Gangolli et al., 2018). Essas células podem ser obtidas a partir de dentes permanentes hígidos ou de dentes decíduos esfoliados hígidos (Sunil et al., 2012; Pagnoncelli et al., 2022). Por essa razão, as células derivadas da polpa dental podem ser obtidas e expandidas apresentando menor grau de invasividade ao seu doador, quando comparada a outras fontes minimizando problemas éticos (Gronthos et al., 2000; Yan et al. 2022). Tais células se originam da crista neural e expressam marcadores de células mesenquimais e

de células neuroecdermais (Okuno and Okano, 2021), também são consideradas multipotentes, possuindo a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais e neuronais (Gan et al., 2020).

De acordo com a literatura, existem duas formas de obtenção das células-tronco da polpa dentária: por digestão enzimática, onde a aplicação de enzimas específicas faz-se necessário (colagenase tipo I e dispase) (Turriani et al., 2021) e por explantes, onde pequenos pedaços de tecido pulpar são colocados em placas de cultura e mantidos em meios de cultura específicos, proporcionando a migração das células para o fundo da placa (Patil et al., 2018). Ainda não está elucidado na literatura se as células obtidas por estas duas técnicas apresentam diferentes características fenotípicas ou qual técnica de obtenção de células-tronco seria mais eficiente. Além disso, é possível observar uma variação fenotípica de acordo com a passagem em que a célula se encontra, durante sua expansão *in vitro*.

Nesse sentido, a caracterização detalhada, comparando os diferentes parâmetros que podem ser utilizados na obtenção de células-tronco, além da avaliação do comportamento destas células durante sua expansão em cultura é de grande importância para aplicação destas células no reparo ou regeneração tecidual. Estes dados são de extrema relevância para guiar estudos clínicos utilizando células-tronco para o tratamento de diferentes doenças. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a viabilidade celular, quantidade, morfologia e fenótipo de células pulpares na passagem 3 sem armazenamento em criopreservação e em diferentes passagens após três meses de preservação a -80°C.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção de células pulpares de dentes permanentes (CPDP)

Três terceiros molares hígidos foram obtidos durante o atendimento de pacientes na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Dentes estes que foram coletados diante da indicação prévia de exodontia. No momento do atendimento, cirurgião-dentista responsável apresentou o TCLE, explicando aos pacientes os possíveis riscos e benefícios de sua participação na pesquisa. Após assinatura do documento, o procedimento cirúrgico foi iniciado. Nenhum evento adverso ou intercorrência ocorreu com os participantes da pesquisa em razão de sua participação nela. O tecido pulpar de cada dente obtido foi mecanicamente removido da câmara pulpar e submetido à técnica de explante tecidual.

Explante tecidual: A polpa dental foi lavada cuidadosamente com uma solução tampão e salina (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), rapidamente dissecada e posicionada em placa Petri de cultura de 35 mm (Corning Inc., Corning, NY, USA). O explante tecidual foi cultivado em DMEM/F-12 (DMEM/F-12, Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, USA) com adição de 15% de SFB, 100 u/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, USA) em ambiente controlado contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após três ou quatro dias, células com morfologia semelhantes a fibroblastos se formaram a partir dos explantes teciduais aderidos à placa. Após a identificação dessas células, o explante foi transferido para outra placa Petri sob as mesmas condições de cultura. Tal procedimento foi realizado repetidamente. As monocamadas celulares de células fibroblastóides foram lavadas duas vezes com PBS e colocadas em contato com 0,5 g/L de tripsina e 0,53 mmol/L de etilenodiamino tetra acético (EDTA) (Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, USA), por 3 a 5 minutos, a 37°C. A inativação da tripsina foi feita a partir da adição de meio de cultura com 10% de SFB. Após essa etapa, as células foram transferidas para uma garrafa de 25 cm² (Corning Inc., Corning, NY, USA).

2.2. Testes

As células foram expandidas em cultura, após atingir a passagem #3 foi realizada a análise em citometria de fluxos dos anticorpos CD44, CD146, STRO-1 e CD45 em placa petri de 25 cm² (100.000 células/placa). Em seguida foram congelados dois tubos criogênicos das passagens 3, 6, 10 e 12. Três meses após, foi feito o descongelamento das células, que foram semeadas em placas de 96 poços (20.000 células/poço) para avaliação da viabilidade (MTT, n=9), 24 poços (50.000 células/poço) para análise morfológica através da microscopia eletrônica de varredura (MEV, n=2) e em placa petri de 25 cm² (100.000 células/placa) para a análise em citometria de fluxo dos anticorpos CD44, CD146, STRO-1 e CD45.

3. RESULTADOS

Foram utilizados os testes One-Way ANOVA complementado por Tukey. O nível de significância de 5% foi considerado para as análises.

3.1. Análise da viabilidade celular pelo teste de MTT

Os resultados de viabilidade celular, obtidos por meio do teste de MTT, estão apresentados na Figura 1.

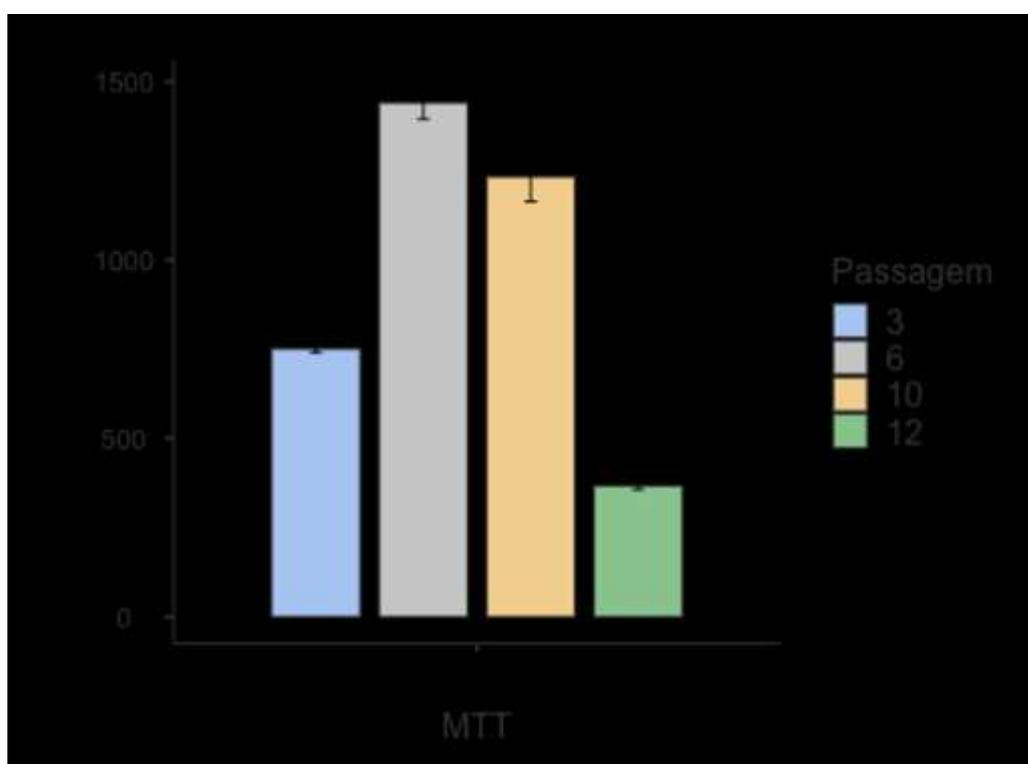


Figura 1: Viabilidade de células pulpres, comparando as diferentes passagens (#3, #6, #10 e #12). Teste ANOVA complementado por Tukey, n=5.

Foi possível observar que a passagem que apresentou células com maior viabilidade foi a passagem 6. Seguida da passagem 10. As passagens 3 e 12 apresentaram as células com menor viabilidade. Houve diferença estatística entre todos os grupos comparados ($p < 0,05$).

3.2. Análise da morfologia e número de células por microscopia eletrônica de varredura

Os resultados quantitativos gerados pela morfologia celular (MEV) estão apresentados na Figura 2.

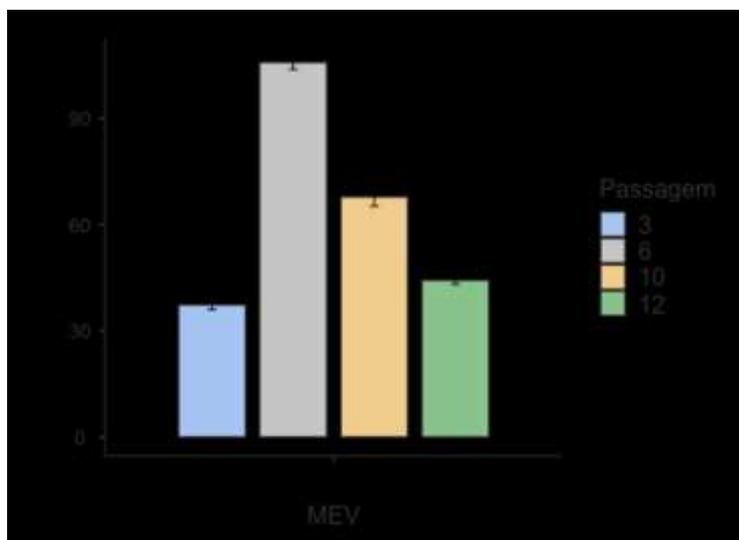


Figura 2: Média do número de células adquirido em cada um dos 5 quadrantes da imagem gerada por MEV, comparando as diferentes passagens (#3, #6, #10 e #12). Teste ANOVA complementado por Tukey, n=5.

Foi possível observar que a passagem que apresentou maior número de células foi a passagem 6. Seguida da passagem 10. As passagens 3 e 12 apresentaram menor número de células. Houve diferença estatística entre todos os grupos comparados ($p < 0,05$). Com exceção das passagens 3 e 12, que não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

As imagens geradas por MEV estão apresentadas na Figura 3:

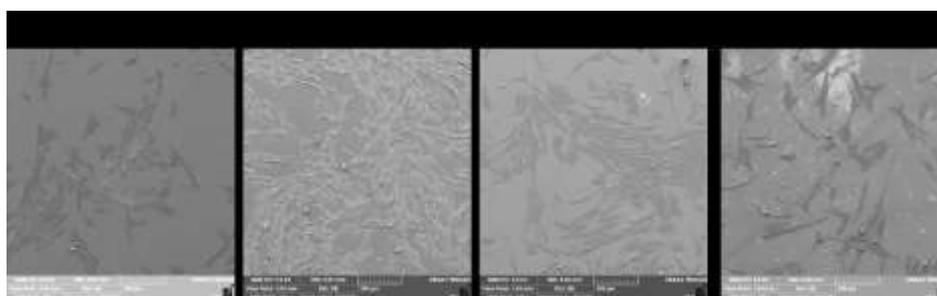


Figura 3: Imagens de células pulpares geradas por MEV, comparando as diferentes passagens celulares (#3, #6, #10 e #12). Aumento de 200x.

De acordo com as imagens geradas, foi possível observar células pulpares, com formato fibroblastóide, com prolongamento odontoblásticos aderidos ao substrato da lamínula de vidro, para todas as passagens avaliadas. Entretanto, um maior número de células foi observado para as passagens 6 e 10.

3.3. Citometria de fluxo

3.3.1. Marcação de CD44

A figura 4 abaixo apresenta os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD44 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana (n=6), para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80°C .

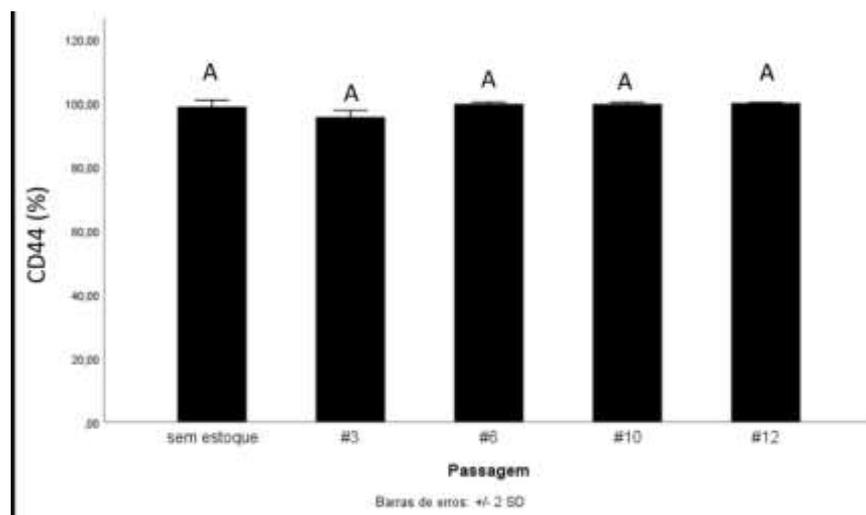


Figura 4: Gráfico de barras apresentando os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD44 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana, para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80° . Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. ANOVA complementado por Tukey ($p < 0,05$), $n=6$.

Foi possível observar que as passagens #6, #10 e 12# (médias de 99,57%; 99,54% e 99,83% respectivamente) apresentaram uma marcação maior de CD44 quando comparadas à passagem #3 (média de 95,45%).

3.3.2. Marcação de STRO-1

A figura 5 abaixo apresenta os dados da porcentagem de marcação do anticorpo STRO-1 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana (n=6), para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80°C .

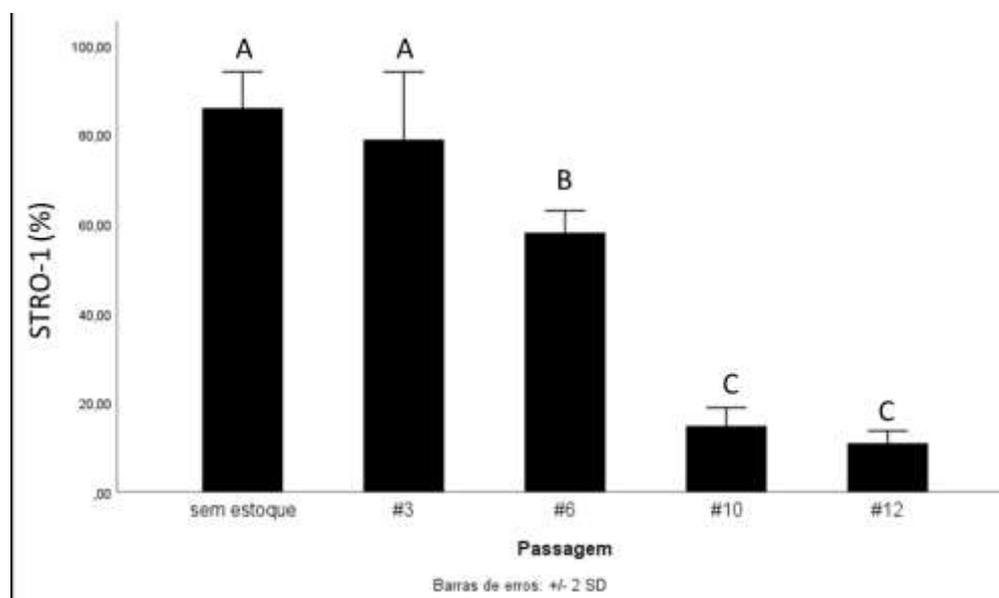


Figura 5: Gráfico de barras apresentando os dados da porcentagem de marcação do anticorpo STRO-1 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana, para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80°C . Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. ANOVA complementado por Tukey ($p < 0,05$), $n=6$.

A passagem #3 apresentou maior marcação de STRO-1 (média de 78,76%) com diferença estatística com os demais grupos ($p < 0,05$), seguida da passagem #6 (média de 57,96%), que também se diferenciou estatisticamente de todos os grupos ($p < 0,05$). As passagens #10 e #12 apresentaram as menores

marcações (médias de 14,74% e 10,87% respectivamente) e não apresentaram diferença estatística entre elas ($p>0,05$).

3.3.3. Marcação de CD 146

A figura 6 abaixo apresenta os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD146 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana ($n=6$), para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80°C .

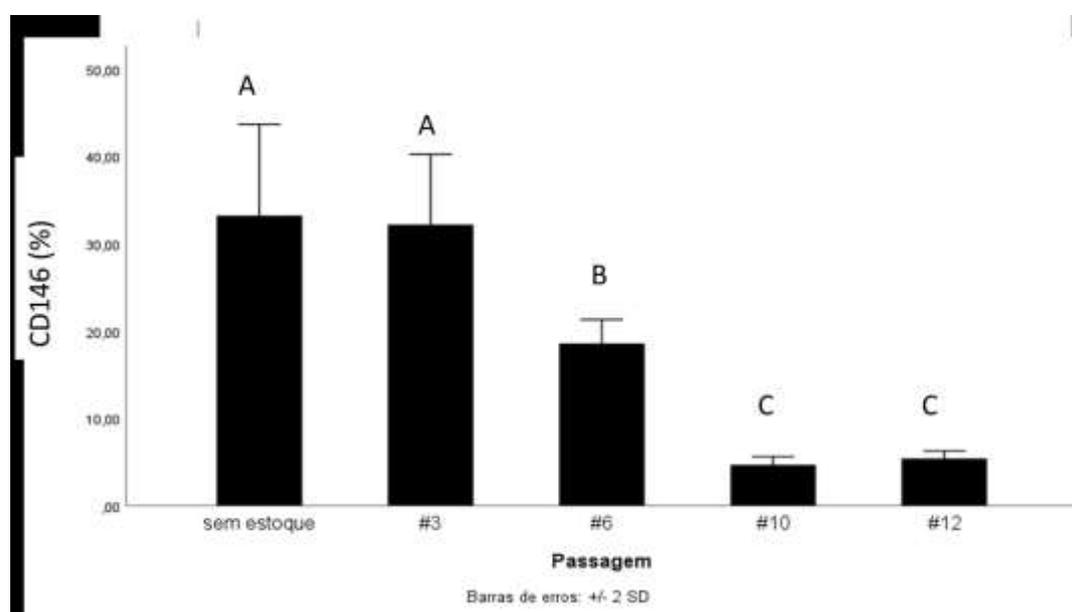


Figura 6: Gráfico de barras apresentando os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD146 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana, para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80° . Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. ANOVA complementado por Tukey ($p<0,05$), $n=6$.

Para a marcação de CD146, observou-se que a passagem #3 apresentou maior marcação (média de 32,15%) com diferença estática com os demais grupos ($p<0,05$), seguida da passagem #6 (média de 18,56%), que também se diferiu estatisticamente de todos os grupos ($p<0,05$). As passagens #10 e #12 apresentaram as menores marcações (médias de 4,66% e 5,38% respectivamente) e não apresentaram diferença estatística entre elas ($p>0,05$).

3.3.4. Marcação de CD 45

A figura 7 abaixo apresenta os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD45 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana (n=6), para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80° C.

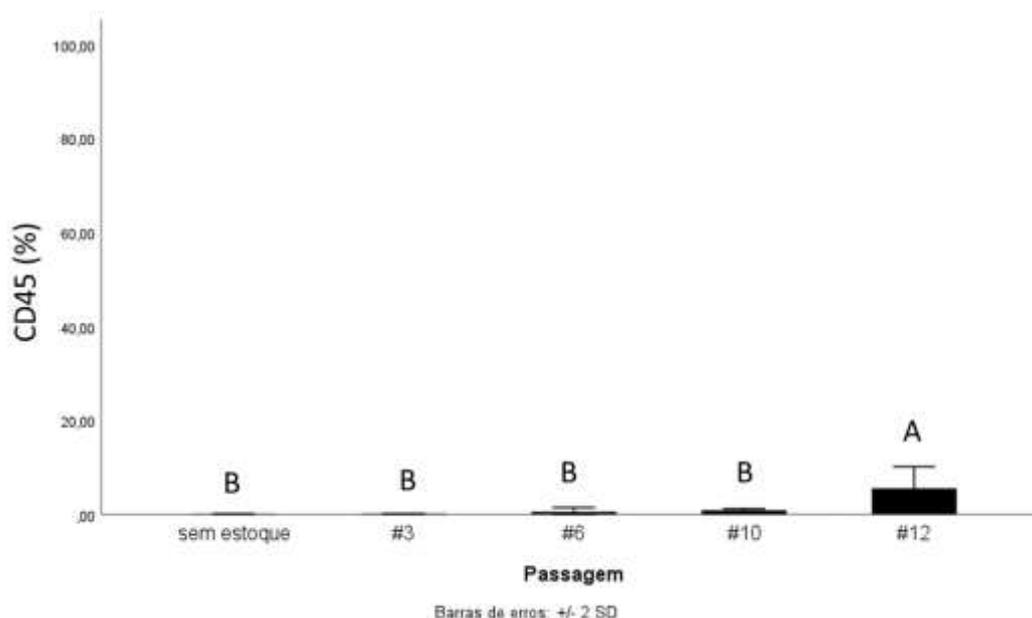


Figura 7: Gráfico de barras apresentando os dados da porcentagem de marcação do anticorpo CD45 detectada por citometria de fluxo, em células da polpa dentária humana, para o grupo sem armazenamento e para as diferentes passagens celulares, após 3 meses de criopreservação em -80°. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. ANOVA complementado por Tukey ($p < 0,05$), $n=6$.

Foi possível observar que as passagens #3, #6 e #10 não se diferiram estatisticamente apresentando medias de 0,13%, 0,53% e 0,84% para CD45. A passagem #12 diferiu das demais ($p < 0,05$), apresentando média de marcação de 5,53%.

4. DISCUSSÃO

É importante definir as condições ideais considerando o isolamento e as aplicações de células-tronco da polpa dentária (CTPDs) em diferentes terapias, pois fatores como idade do doador, número de passagens e técnicas podem interferir na qualidade e no fenótipo das células. No presente estudo, observou-se que, na criopreservação em -80 oC por 3 meses, a passagem celular interferiu na viabilidade e número de células, bem como nas concentrações de anticorpos CD44, CD146, STRO-1 e CD45. Entretanto, as imagens em MEV indicaram uma falta de diferenças morfológicas entre os grupos. Esses resultados são importantes para nortear futuras pesquisas clínicas que utilizarão as células-tronco no tratamento de diversos tipos de doenças.

De acordo com o Comitê de células-tronco mesenquimais e tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) são células-tronco mesenquimais (MSCs), portanto, são positivas para pelo menos CD73, CD90, CD105 e negativas para Antígenos de superfície CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a e HLA-DR1 (Ledesma-Martínez et al., 2016). No entanto, outros autores relataram a expressão de nestina, vimentina, STRO-1, CD146, CD44, CD34, Oct3/4, NANOG, Sox2, CD 29, CD166, CD13, CD117, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 (Akpınar et al., 2014; Matsui et al., 2018; Turrioni et al., 2021). Um marcador específico que identifica exclusivamente DPSCs ainda não foi relatado, pois este tipo celular possui funções biológicas que dificultam a identificação de marcadores específicos (Rodas-Junco et al, 2017). No presente estudo, três dos diferentes marcadores citados foram utilizados para verificar a possível variação fenotípica entre as passagens após criopreservação.

O número de passagens é um fator que pode interferir nas funções celulares. Huihui Wang et al. (2018) analisaram duas passagens 4 e 20 de DPSCs e SHEDs considerando a morfologia, apoptose, proliferação e imunofenotipagem celular para antígenos CD73-, CD90-, CD105-, CD34-, CD11b-, CD19-, CD45- e HLA-DR-. Os autores encontraram que houve alteração morfológica e perda do potencial proliferativo das células em

passagens consecutivas, além de aumento progressivo no percentual de apoptose em passagens tardias e apesar de manterem características imunofenotípicas de células mesenquimais estaminais (MSCs) com altas taxas de expressão positiva de CD73, CD90 e CD105, e baixa expressão de CD34, CD11b, CD19, CD45 e HLA-DR durante a expansão a longo prazo. Ao analisar apenas as DPSCs é possível observar uma diminuição da expressão de CD73 e CD105 e discreto aumento da expressão de CD34, CD11b, CD19, CD45 e HLA-DR na passagem 20 em comparação com a #4. Corroborando com o encontrado no presente estudo que traz esta inédita informação, demonstrando acentuada diferença, tanto na viabilidade como nas marcações de células-tronco.

Semelhante ao presente estudo, Turrioni et al. (2021) avaliaram a influência, da técnica de obtenção, da idade do doador e das passagens 2, 5 e 8 para células de dentes permanentes e descobriram que o número de células do doador mais velho apresentou a pior capacidade de proliferação na passagem 8, não sendo discrepante quando comparado aos demais doadores. Nesse mesmo estudo não foram encontradas diferenças significativas em relação aos marcadores de células-tronco avaliados (Turrioni et al. 2021). É importante destacar que, a ativação apoptótica pode ocorrer após a 10^a passagem (Lizier et al., 2012). Também foi relatado que até a passagem 8, as células podem apresentar altos níveis de marcadores de células-tronco e uma boa taxa de proliferação (Lizier et al., 2012). Nosso estudo avaliou uma passagem tardia (passagem 12) e demonstrou um possível ponto de corte para uso na regeneração. Além do fator passagem, houve a presença do fator armazenamento, que se mantiveram semelhantes quando comparados os grupos de mesma passagem 3 cultura imediata ou em criopreservação (3 meses em -80 °C), revelando a ausência de diferença estatística relevante ($p > 0,05$).

O estudo realizado por Ming Yan et al. (2020) comparando cultura imediata e criopreservação em solução crioprotetora com concentração de DMSO a 5% e DMSO a 10%, demonstrou que não há diferença na expressão de marcadores de superfície CD105, CD90, CD34, CD45 and STRO-1 entre os grupos. Os resultados contribuem com o encontrado na presente pesquisa.

Neste estudo, a solução utilizada foi o DMSO a 10% associado ao soro fetal bovino e meio de cultura. Tais medidas contribuíram para que células armazenadas por um longo período, fossem utilizadas sem prejuízo às suas propriedades biológicas.

No presente estudo, o meio de armazenamento utilizando congelamento rápido foi selecionado, para esclarecer se este processo de armazenamento poderia ser utilizado para banco de células ou armazenamento a longo prazo de células em experimento. Os resultados sugerem que este meio de armazenamento deveria ser evitado, para ambas as situações. Apesar dos importantes achados relacionados às células-tronco do tecido pulpar, muitas investigações são necessárias para permitir o uso adequado das DPSCs em tecidos regenerativos em humanos. Alguns estudos investigam questões importantes como o uso de scaffolds em associação com as células e o comportamento celular.

5. CONCLUSÃO

Concluiu-se que as passagens 6 e 10 de células pulparem obtidas de dentes permanentes foram as que tiveram melhores resultados quanto à viabilidade celular, quantidade e morfologia após 3 meses de preservação em -80oC. Além disso, maior quantidade de células positivas para CD44, CD146 e STRO-1 foram observadas para as passagens 3 e 6 criopreservadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpinar G, Kasap M, Aksoy A, Duruksu G, Gacar G, Karaoz E. Phenotypic and proteomic characteristics of human dental Pulp derived mesenchymal stem cells of a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int.* 2014; 2014: 457059. <https://doi.org/10.1155/2014/457059>

Gangolli RA, Devlin SM, Gerstenhaber JA, Lelkes PI, Yang M. A Bilayered Scaffold Provides Differential Cues for the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2018 Jul 7. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0041.

Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Mar;11(3):140-50. doi: 10.1038/nrendo.2014.234. Epub 2015 Jan 6 <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 13625-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>

Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, and Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod.* 2009; 35:673-681. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.01.019>

İslam A, Özverel CS, Yilmaz HG. Comparative evaluation of low-level laser therapy on proliferation of long-term cryopreserved human dental pulp cells isolated from deciduous and permanent teeth. *Lasers Med Sci.* 2021 Mar;36(2):421-427. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03090-3>

Khafagy YW, AbdElfattahAM, Moneir W, Salem EH. Leukocyte- and platelet-rich fibrin: a new graft material in endoscopic repair of spontaneous CSF leaks. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018 Jul 7. doi: 10.1007/s00405-018-5048-7.

Ledesma-Martínez E, Mendonza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:4709572. <https://doi.org/10.1155/2016/4709572>

Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, and Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012; 7:e39885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039885>

Gan L, Liu Y, Cui D, Pan Y, Zheng L, Wan M. Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application. *Stem Cells Int*. 2020;2020:8864572. <https://doi.org/10.1155/2020/8864572>

Luzuriaga, J., Polo, Y., Pastor-Alonso, O., Pardo-Rodríguez, B., Larrañaga, A., Unda, F., ... & Ibarretxe, G. (2021). Advances and perspectives in dental pulp stem cell based neuroregeneration therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3546. <https://doi.org/10.3390/ijms22073546>

Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e51777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051777>

Majid, S., Fry, R. R., Goyal, S., & Chawla, J. P. S. (2016). Stem cells in dentistry: A boon to oral and maxillofacial surgery. *IOSR-JDMS*, 15(1), 62-68.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014; 16(2): 266-77. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.016>

Martins JG, Camargo SEA, Bishop TT, Popat KC, Kipper MJ, Martins AF. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *CarbohydrPolym*. 2018 Oct 1;197:47-56. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.062. Epub 2018 May 25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.062>

Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui TW. CD146 positive human dental Pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Human Cell*. 2018, 31: 127-138. <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0198-2>

Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl*. 2011 Nov;26(4):383-417 <https://doi.org/10.1177/0885328211408946>

Neshati, Z., Matin, M.M., Bahrami, A.R. and Moghimi, A. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Insulin-producing Cells and Their Impact on Type 1 Diabetic Rats, *J PhysiolBiochem*, 2010: 66: 181–187. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0013-y>

Okuno H, Okano H. Modeling human congenital disorders with neural crest developmental defects using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Regen Ther*. 2021;18:275-280. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.08.001>

Pagnoncelli, R. M., & Feiden, C. A. N. (2022). Células tronco e engenharia tecidual: revisão de literatura Stem cells and tissue engineering: a literature review. *Brazilian Journal of Health Review*, 5(2), 4889-4900. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n2-076>

Patil VR, Kharat AH, Kulkarni DG, Kheur SM, Bhonde RR. Long term explant culture for harvesting homogeneous population of human dental pulp stem cells. *Cell Biol Int*. 2018;42(12):1602-1610. <https://doi.org/10.1002/cbin.11065>

Pourlak, T., Ghodrati, M., Mortazavi, A., Dolati, S., & Yousefi, M. (2021). Usage of stem cells in oral and maxillofacial region. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 122(4), 441-452. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2020.10.003>

Rodas-Junco BA, Villicaña. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue Eng Regen Med* (2017) 14(4): 333-347. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0036-3>

Sakai, T., Ling, Y.Q., Payne, T.R. and Huard, J. the Use of Ex Vivo Gene Transfer Based on Muscle-derived Stem Cells for Cardiovascular Medicine, *Trends Cardio Med*, 2002: 12: 115–120. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00161-X)

Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life*. 2019 Jul-Sep;12(3):225-229. doi: 10.25122/jml-2019-0032. PMID: 31666821.

Sunil P M, Manikandhan R, Muthu M S, Abraham S. Stem cell therapy in oral and maxillofacial region: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012;16:58-63
<https://doi.org/10.4103/0973-029X.92975>

Wang H, Zhong Q, Yang T, et al. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6551-6559.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8725>

Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. 2008 Jul 9. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008—. PMID: 20614610.
<https://doi.org/10.3824/stembook.1.1.1>

Wolint P, Bopp A, Woloszyk A, Tian Y, Evrova O, Hilbe M, Giovanoli P, Calcagni M, Hoerstrup SP, Buschmann J, Emmert MY. Cellular self-assembly into 3D microtissues enhances the angiogenic activity and functional neovascularization capacity of human cardiopoietic stem cells. *Angiogenesis*. 2018 Jul 16. doi: 10.1007/s10456-018-9635-4.

Xu F, Yang Y, Yang T, Dai T, Shao X, Xu H, An R, Liu Y, Liu B. The use of allogenic adipose-derived stem cells in combination with platelet-rich fibrin for the treatment of cartilage defects in rabbit ear. *Am J Transl Res*. 2018 Jun 15;10(6):1900-1907.

Yan M, Nada OA, Smeets R, Gosau M, Friedrich RE, Kluwe L. Compare features of human dental pulp cells cultured from pulp tissues with and without cryopreservation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2020 Dec 15. doi: 10.5507/bp.2020.061.

Zhang Y, Wu D, Zhao X, Pakvasa M, Tucker AB, Luo H, Qin KH, Hu DA, Wang EJ, Li AJ, Zhang M, Mao Y, Sabharwal M, He F, Niu C, Wang H, Huang L, Shi D, Liu Q, Ni N, Fu K, Chen C, Wagstaff W, Reid RR, Athiviraham A, Ho S, Lee MJ, Hynes K, Strelzow J, He TC, El Dafrawy M. Stem Cell-Friendly Scaffold Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Dec 14;8:598607.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598607>