

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Rômulo Sudré Caputo

**SUPLEMENTOS DE MEIOS DE CULTURA PARA CÉLULAS TRONCO DA POLPA
DENTÁRIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA**

Juiz de Fora
2024

Rômulo Sudré Caputo

**SUPLEMENTOS DE MEIOS DE CULTURA PARA CÉLULAS TRONCO DA POLPA
DENTÁRIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial à obtenção do título
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marcio Resende do Carmo

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sudré Caputo, Rômulo .

Suplementos de meios de cultura para células-tronco da polpa dentária : uma revisão de literatura / Rômulo Sudré Caputo. -- 2024.
23 p.

Orientador: Antônio Marcio Rezendo do Carmo
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia, 2024.

1. Células-tronco. 2. Polpa. 3. Proliferação. 4. Meio de cultura. 5. Suplementos. I. Rezendo do Carmo, Antônio Marcio , orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
REITORIA – FACODONTO – Coordenação do Curso de Odontologia

Rômulo Sudré Caputo

**Suplementos de meios de cultura para células tronco da polpa dentária:
uma revisão de literatura**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Aprovado em 11 de setembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Márcio Rezende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Flávio Narciso Carvalho
Centro Universitário Estácio

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e àqueles que acompanharam meu progresso e busca incessante por uma odontologia de excelência. Dedico também ao professor Antônio Marcio, pois essa conquista só foi possível graças a sua orientação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Miguel Ângelo Caputo e Mariana Sudré, os quais sempre enfatizaram a necessidade do esforço, humildade e humanidade. Pai, mesmo em sua ausência sei que aonde estiver, sente orgulho e torce por mim;

Agradeço ao Dr. André Padilha e sua família (Jane, Guilherme e Ricardo), por todo o apoio e carinho durante essa etapa, jamais irei esquecer sua generosidade e apoio nos momentos mais sórdidos e difíceis que podemos passar em nossa vida;

Agradeço a Agostinho de Souza e sua família (Solange, Larissa e Pammela), os quais sempre me apoiaram e orientaram, seguindo o preceito de que devemos buscar nossas melhores versões;

Agradeço à Zeli Bonfá Caputo e Maria Aparecida Sudré, minhas avós, que me permitiram seguir essa caminhada, sempre me apoiando e motivando, seja com humor, seja com orientações e críticas;

Agradeço também ao professor Antônio Marcio por todo o auxílio durante essa etapa, muito obrigado meu amigo;

Por fim, agradeço aos meus amigos mais leais, João Vitor Gasparoni, Samuel Teixeira, David Carneiro, Gian Schiavon e Liana Lucina por me acompanharem nessa e em outras jornadas que virão.

“A soberba precede a ruína, e a altivez de espirito precede a queda.”
(PROVÉRBIOS 16:18).

SUPLEMENTOS DE MEIOS DE CULTURA PARA CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo do artigo em questão foi investigar o impacto da Suplementação em Meios de Cultura de células tronco, apresentando seus principais impactos e uso em meios de cultura. Para esta revisão, diversos artigos foram analisados entre os anos de 1955 e 2022, em diferentes bases de dados (PubMed, Lilacs, Embase e Scielo). Após a análise, 15 artigos foram selecionados, tendo sido completamente lidos e analisados.

Palavras-chave: Células-tronco, polpa, proliferação, meio de cultura e suplementos.

SUPPLEMENTS OF DENTAL PULP STEM CELLS CULTURE MEDIA: A NARRATIVE REVIEW

The aim of the article in question was to investigate the impact of Supplementation in Stem Cell Culture Media, presenting its main impacts and use in culture media. For this review, several articles were analysed between 2015 and 2022 in different databases (PubMed, Lilacs, Embase and Scielo). After analysis, 15 articles were selected, which were completely read and analysed.

Keywords: Stem cell, pulp, proliferation, culture medium and supplements.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGF	Fator de crescimento da epiderme
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblasto
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
ECGF	Fator de crescimento para células endoteliais
IGF- ₁	Somatomedina C
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
NGF	Fator de crescimento nervoso
TGF- _α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF- _β	Fator de crescimento transformante beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	13
3 ARTIGO CIENTÍFICO	14
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Alvarez (2012): células tronco são pequenas células que não possuem características fenotípicas de células presentes em tecidos adultos (epitelial, conectivo, muscular, neural e imunológico) mas são capazes de gerar células diferenciadas de diferentes tipos encontradas nesses tecidos. Existem quatro tipos de células tronco: duas fisiologicamente estão presentes em diferentes estágios da vida – células tronco embrionárias e células tronco adultas – uma é induzida por engenharia tecidual (células tronco pluripotentes induzidas) e há células patológicas presentes no câncer, possuindo algumas propriedades de células tronco.

“Muitas investigações foram realizadas para definir as características essenciais das células tronco. Tais propriedades devem ser comuns em todas as células tronco conhecidas, ou pelo menos em uma célula dos quatro grupos descritos anteriormente, e apresentar um dos seguintes funcionais aspectos: 1) expressão de marcador de pluripotência, 2) ativação de vias de transdução encaminhadas para manter as características de célula tronco, 3) característica de estágio proliferativo, 4) si comportar de forma pluripotente em vitro, e (5) como si comportam após serem reintroduzidas in vivo” (Alvarez, 2012, p. 89).

O primeiro registro de Células Tronco da Polpa do Dente foi feito por Gronthos (2000), usando conhecimento de reparo dentinário e encontrando ausência de dados sobre o processo. Após isso, isolaram, proliferaram e compararam as Células Tronco da Polpa do Dente com Células da medula óssea, resultando na descoberta de um novo tipo de célula.

2 PROPOSIÇÃO

Esta revisão de literatura se justifica pela necessidade de compreender mais profundamente o impacto da suplementação dos meios de cultura de células tronco, contribuindo para evidenciar o comportamento das células, o processo de proliferação celular, fatores de risco como senescência e proliferação de outros microrganismos no meio.

3 ARTIGO CIENTIFICO

Diferentes fatores demonstraram influenciar no meio de cultura tal como relatado por diversos pesquisadores. Além disso, uma vasta literatura pode ser avaliada, contudo, quando analisamos os meios é possível criar uma lista com 13 elementos que podem impactar na taxa de proliferação e proteção a infecções.

Meio livre de soro: Meio livre de soro não requer suplementação com soro, mas contém discretamente proteínas ou frações de proteínas de crescimento (tecidos de animais ou extratos de plantas) sendo considerados quimicamente indefinidos.

Meio livre de proteína: O meio livre de proteína não contém grandes moléculas ou frações de proteína, mas contém frações de peptídeos (proteínas hidrolisadas) e são quimicamente definidos. Meios livre de proteínas facilitam o processamento e recombinação das mesmas em produtos celulares.

Meio livre de componentes derivados de animais: O meio não contém componentes de origem animal ou humano. Esse meio não é necessariamente definido (quando contém bactérias ou leveduras hidrolisadas, ou extratos vegetais).

Meio quimicamente definido: Meio quimicamente definido não contém proteínas, seja hidrolisada ou não, além de não conter compostos desconhecidos.

Hormônios purificados concentrados ou fatores de crescimento podem ser adicionados seja de origem animal ou vegetal, ou suplementados com produtos recombinantes.

Fonte: Elaborada pelo autor com base em Van der Valk et al, 2010.

Aminoácidos: "Quimicamente, aminoácidos são moléculas que apresentam um grupo carboxila (-COOH), além de um grupo amino (-NH₂). Essa definição engloba

um grande número de moléculas, mas nem todas surgem naturalmente” (Salazar et al, 2016, p.1162). Essas moléculas são divididas em dois grupos: essenciais (é composto por moléculas que não podem ser produzidas naturalmente) e não essenciais (são moléculas que podem ser produzidas naturalmente).

Antibióticos: Segundo Farzaneh (2021); culturas de células tronco usualmente contém antibióticos e antimicóticos como a penicilina, estreptomicina, gentamicina, e anfotericina B para evitar a proliferação de bactérias, fungos e outros contaminantes. Numerosas publicações reconhecem sérios efeitos de antibióticos e antimicóticos nas propriedades de células tronco humanas in vitro, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e instabilidade genética.

Fatores de Anexo: “Diversos transportadores tem sido relatado. O suporte de andaime (scaffold) é apropriado para diversos propósitos como anexar células, migração, proliferação, diferenciação, e a função de produzir constructos teciduais específicos. Uma das principais propostas seria prover suporte para reinserir células transplantadas, mas os suportes apresentam preocupações quanto sua natureza de degradação, citotoxicidade e reações imunológicas por parte do receptor” (Tsutsui, 2021, p. 37). Além disso, andaimes não apresentam padronização, começando com a premissa que podem mostrar diferentes resultados em diferentes pesquisas.

Meios Basais: “Com o tempo, foi ficando mais claro que todos os tipos celulares possuem seus próprios requisitos para a suplementação de meios de cultura. Portanto, um meio de cultura universal (livre de soro) para células e tecidos pode não ser viável. Diferentes tipos celulares possuem diferentes receptores envolvidos na sobrevivência, crescimento, diferenciação e liberam diferentes fatores para seu desenvolvimento. O limite para o desenvolvimento é usando um meio de cultura que contenha Soro Fetal Bovino, devido ao seu bom funcionamento, sendo excelente por

diversas razões” (Van der Valk et al, 2010, p. 1055). “Além disso, o meio basal contém suplementação essencial chamada de ITS (insulina, transferrina e selênio). Insulina, o primeiro componente é reconhecido como essencial em células de cultura desde 1924 e é atualmente o hormônio mais comum utilizado. Transferrina é também uma proteína essencial onde sua principal ação é transferir ferro para dentro das células. Selênio é um traço elemental essencial e age particularmente em selenoproteínas que protegem as células contra estresses oxidativos” (Van der Valk et al, 2010, p. 1055).

Glutamina: “A liberação de glutamina para a circulação é controlada principalmente por órgãos chave no metabolismo, como intestino, fígado e músculos esqueléticos. Durante funções catabólicas a glutamina é essencial para o funcionamento metabólico, que pode ser comprometido pelo mal funcionamento da homeostase inter-tecidual de aminoácidos. Por essa razão, glutamina é atualmente parte do protocolo de nutrição suplementar clínica e/ou recomendada para indivíduos imunossuprimidos” (Cruzat et al, 2018, p. 1). Em contrapartida, glutamina se transforma em glutamato e outros compostos que tornam o meio mais tóxico, tornando difícil a viabilidade de células tronco, por conta disso, o uso de “GlutaMAX” é recomendado. “GlutaMAX é uma L-alanina-L-glutamina dipeptídeo que não se degrada em amônia durante o armazenamento ou incubação. O mecanismo de dipeptídeo envolve uma gradual liberação de peptídeos durante a cultura, o qual gradual sofre hidrólise no meio. Baseado nas características do GlutaMAX, levantamos a hipótese que a substituição da glutamina por GlutaMAX pode reduzir a apoptose de blastocisto suínos e prolongar a vida útil do meio” (Zhao et al, 2016, p.369).

Fator de Crescimento: “Fatores de crescimento são geralmente adicionados ao meio basal para aumentar a proliferação celular e estimular funções específicas na

célula. Tradicionalmente, fatores de crescimento e outros suplementos são adicionados a granel em soro fetal bovino. A maioria dos fatores de crescimento são extremamente específicos quanto ao tipo celular. Outros são de uso mais geral podendo apresentar diversos efeitos positivos em diferentes tipos celulares” (Van der Valk et al, 2010, p.1056). “Soro contém diversos hormônios, como insulina, hormônios adrenocorticais (hidrocortisona, dexametasona), hormônios esteroides (estradiol, testosterona e progesterona), etc. Os fatores de crescimento incluem fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento da epiderme, fatores de crescimento plaquetários, dentre outros” (Yang e Xiong, 2012, p. 6).

Fator de crescimento	Célula alvo (comum)	Célula alvo (especifico)
EGF	Epiblasto, mesoblasto	Queratinócito, fibroblasto, condrócito, etc
bFGF	Mesoblasto, neuroectoderma	Células endoteliais, fibroblasto, condrócito, mioblasto, etc
FGF	Mesoblasto, neuroectoderma	Fibroblasto, células vasculares
ECGF	Células endoteliais	Células endoteliais
IGF-1	Maioria das células	
PDFG	Células mesenquimais	Fibroblasto, miócito, neurógliia
NGF	Células sensoriais, células do sistema simpático	Neurócito, neurônio
TGF- α	Células mesenquimais estimuladas	
TGF- β	Inibir epiblasto	

Fonte: Elaborada pelo autor com base em Yang e Xiong, 2012.

Hormônios: “Células que crescem in vivo sempre são reguladas por somatomedina e hormônios. Diversos pesquisadores demonstraram que somatomedina e outros hormônios são muito importantes para manter o funcionamento celular e status (diferenciação e indiferenciação). Alguns hormônios promovem efeitos de crescimento em diferentes tipos celulares. Por exemplo, insulina pode promover o uso de glicose e aminoácidos nas células. Alguns hormônios são específicos quanto a célula, como a hidrocortisona que pode promover o crescimento em células da epiderme e a prolactina que induz a proliferação de células epiteliais mamarias” (Yang e Xiong, 2012, p. 4).

Lipídios: “O papel dos ácidos graxos e lipídios em culturas celulares há muito tempo é negligenciado. Lipídios servem como armazenamento de energia, como estrutura constituinte da membrana celular e em transporte e sinalização. Alguns lipídeos estão disponíveis no meio basal. No entanto, ácidos graxos essenciais e etanolamina são suplementos recomendados. Suplementos solúveis em água são atualmente comercializáveis. Soro de albumina é um carreador de ácidos graxos e lipídeos” (Van der Valk et al, 2010, p. 1055).

Inibidores de Protease: “Na presença de inibidores de protease, tanto o crescimento das fibras colágenas quanto a deposição extracelular de fibras colágenas são elevadas. Além disso, inibidores de protease trabalham sinergicamente com ácido ascórbico, um conhecido reagente que aumenta a deposição de matriz, mais a frente aumenta a deposição de fibras colágenas no espaço extracelular” (Han et al, 2015, p. 197).

Proteínas: O uso de proteínas não é essencial em grande número de casos, mas com células tronco é amplamente recomendado por Francis (2010), as proteínas melhoram a performance de crescimento celular, transportar pequenas moléculas

como: lipídeos, aminoácidos, hormônios, peptídeos, metais e outras pequenas moléculas.

Proteínas hidrolisadas: Proteínas hidrolisadas são usadas em diversos tipos de cultura celular, em diversos artigos há relato de efeitos benéficos e em outros são relatados redução de crescimento e taxa de proliferação (provavelmente por conta da redução de pH). Segundo Hyung et al (2017), o uso desses suplementos oriundos de *Mytilus edulis* (mexilhão comum), causa diferenciação de células tronco de roedores em osteoblastos; roedores, assim como humanos, são mamíferos, logo isso provavelmente ocorre em células tronco humanas também.

Microelementos: Como descritos por Eagle (1955), microelementos são comumente diluídos em água e distribuídos homogeneamente em meios de cultura; devido sua necessidade em metabolismo celular, causam um grande impacto em crescimento celular e proliferação.

Vitaminas: “Vitaminas são profundamente envolvidas em vários metabolismos e processos de sinalização básicos e muitos deles são requisitados para funções específicas das células tronco. Além da modulação convencional de células tronco através de vias de sinalização e fatores de crescimento, a modulação por vitamina pode ser uma abordagem crítica para a manutenção celular e diferenciação. Estudos sobre vitaminas como A, B3 e C demonstraram que algumas vias são vitamino-dependentes, sendo recomendadas para a manipulação. No entanto, muitas vitaminas não foram sistematicamente exploradas em diferentes estudos sobre células tronco” (Godoy-Parejo et al, 2020, p. 1783).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melhor possibilidade para o cultivo de células tronco da polpa do dente deve ser semelhante à composição da própria polpa. Portanto, necessita apresentar aspecto alcalino, presença de O₂, e como não é possível vedar o meio de cultura tal qual a polpa, o uso de antibióticos/antimicóticos para prevenir infecções é indicado; o meio basal deve conter microelementos, carboidratos, hormônios de crescimento e lipídeos; glutamina (é indicado o uso de GlutaMAX); proteínas (o uso de proteínas hidrolisadas é contraindicado, tendo em vista que estas podem induzir a diferenciação celular) e vitaminas.

Os seguintes suplementos são indicados, mesmo que não sejam obrigatórios para o êxito do meio: fator de anexo (o uso de andaimes - "scaffold" - demonstra uma alta na taxa de proliferação e crescimento celular, permitindo aos pesquisadores mais praticidade e eficiência) e inibidor de protease (embora permita maior fixação, resistência, coesão e elasticidade, o substrato dificulta a transferência das células para outro meio de cultura e pode aumentar a taxa de diferenciação, visto que não há estudos que realizaram essa análise).

Resultados descritos por diversos autores concluíram que é possível realizar proliferação sem diferenciar as células, mas o limite dessa condição é desconhecido. Oscilações nos meios de cultura e contato com células diferentes induzem a expressão de genes que podem desencadear o processo de diferenciação.

Além disso, não é possível afirmar qual é o limite de passagens, tendo em vista que o "desgaste" dos telômeros pode causar apoptose ou desencadear uma malignização das células, alterando seu material genético; o que dificulta a aplicação da bioengenharia.

Analisando isso é possível compreender a necessidade de novos estudos, buscando o conhecimento do processo de diferenciação, proliferação e destruição dos telômeros das células tronco da polpa do dente.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C. V. et al. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 49(2), p. 89-111, 2012.
- CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. **Nutrients**, v. 10(11), p. 1564, 2018.
- EAGLE H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122(3168), p. 501-514, 1955.
- FARZANEH, M. Concise Review; Effects of Antibiotics and Antimycotics on the Biological Properties of Human Pluripotent and Multipotent Stem Cells. **Bentham Science**, v. 16(4), p. 400-405, 2021.
- FIKE, R. et al. Advanced Granulation Technology (AGT(TM)). An alternate format for serum-free, chemically-defined and protein-free cell culture media. **Cytotechnology**, v. 36(1-3), p. 33-39, 2001.
- FRANCIS, G.L. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. **Cytotechnology**, v. 62(1), p. 1-16, 2010.
- GODOY-PAREJO, C. et al. Roles of vitamins in stem cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77(9), p. 1771-1791, 2020.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P.G., SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97(25), p. 13625-13630, 2000.
- HAN, S., LI, Y.Y., CHAN, B.P. Protease inhibitors enhance extracellular collagen fibril deposition in human mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, p. 197, 2015.
- HYUNG, J.H., AHN, C.B., JE, J.Y. Blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate promotes mouse mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts through up-regulation of bone morphogenetic protein. **Food Chemistry**, v. 242, p. 156-161, 2017.
- MINGHUI, Z. et al. GlutaMAX prolongs the shelf life of the culture medium for porcine parthenotes. **Theriogenology**, v. 85(3), p. 368-375, 2015.
- SALAZAR, A., KEUSGEN, M., VON HAGEN, J. Amino acids in the cultivation of mammalian cells. **Amino Acids**, v. 48(5), p. 1161-1171, 2016.
- TSUTSUI, T.W. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. **Dovepress**, v. 13(4), p. 400-405, 2021.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24(4), p. 1053-1063, 2010.

YANG, Z., XIONG, H. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. **InTech**, v. 1, p. 3-18, 2012.

ZHAO, M.H., KIM, N.H., CUI, X.S. GlutaMAX prolongs the shelf life of the culture medium for porcines parthenotes. **Theriogenology**, v. 85 (3), p. 368-375, 2015.