



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marizia Trevizani

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTONAS VEGETAIS COMO
SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO EM CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS
HUMANOS**

JUIZ DE FORA

2017

MARIZIA TREVIZANI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTONAS VEGETAIS COMO
SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO EM CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS
HUMANOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador:

Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Co-orientadora:

Dra. Michele Munk Pereira

Juiz de Fora, MG

2017

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

Trevizani, Marizia.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS / Marizia Trevizani. -- 2017.

62 f.

Orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Coorientadora: Michele Pereira Munk

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. peptonas vegetais. 2. substituição do soro fetal bovino. 3. células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos. 4. células tronco. I. Maranduba, Carlos Magno da Costa, orient. II. Munk, Michele Pereira, coorient. III. Título.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS

Marizia Trevizani

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22/02/2017.

Banca examinadora:

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

Profa. Dra. Michele Munk
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Co-orientadora)

Dr. Dr. Mateus Rodrigues Pereira
Universidade Estácio de Sá
(Membro externo)

Prof. Dr. Fabiano Freire Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro Interno)

Prof. Dr. Leandro Marques de Resende
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Suplente)

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por permitir que eu alcance mais esta etapa da minha formação e também por sempre me guiar por caminhos retos e me mantendo perseverante em meus objetivos.

Ao meu pai Alexandre Trevizani por estar sempre ao meu lado e me incentivando, pelo amor incondicional, pela amizade e por muitas vezes abdicar de seus sonhos para que os meus e da minha irmã fossem possíveis. Por ser esse ser humano em quem me espelho, ressaltando sempre valores como a humildade e a honestidade.

À minha mãe Jaine Rose dos Santos por acreditar sempre no meu potencial, sempre enfatizando a importância de alcançar meus objetivos, pelo amor incondicional e pela grande amizade.

Às minhas irmãs Verônica Gabriela Vieira Trevizani e Manuela dos Santos Vagueiro de Sá pelo carinho e pelo estímulo em todos os momentos.

Às minhas filhas peludas: Amora, Cacau e Safira, por estarem sempre ao meu lado, alegrando minha casa me proporcionando momentos de grande alegria em meio aos estudos.

Aos amigos Júlio César Gomes Graça, Gustavo Torres, Francisco Carlos da Guia, Camila Maurman pelo incentivo constante, por todas as coisas que me ensinaram para que eu fizesse um bom trabalho, por dividirem sonhos e angústias durante todo esse tempo e serem um ombro amigo para todas as horas.

Ao orientador, professor e amigo Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba por ter me aceito nesta nova área da Genética, me ensinado muitas coisas, ser uma pessoa sempre solícita e disposta a ajudar. Agradeço pela paciência, palavras de incentivo e todo o conhecimento que eu adquiri com você.

À co-orientadora Dr. Michele Munk pela amizade, disponibilidade e ajuda.

A todos os amigos do Laboratório de Genética pelos momentos de descontração, conversas filosóficas, risadas e pela troca constante de ajuda e conhecimentos.

A todos os professores do Laboratório de Genética por auxiliarem na minha formação desde a Graduação em Ciências Biológicas e durante o mestrado terem sido sempre solícitos, amigos e incentivadores.

Aos professores membros da minha banca Dr. Fabiano Freire Costa e Dr. Mateus Rodrigues Pereira pela amizade, conselhos e pela disponibilidade de participar da minha defesa de mestrado.

Sem mais delongas, aos familiares e amigos que de alguma forma ajudaram que eu alcançasse mais este sonho.

O meu mais sincero agradecimento a todos vocês que tornaram este sonho possível e que auxiliaram na minha formação acadêmica e pessoal.

Dedico este trabalho a Deus, minha família e amigos que acreditaram em mim e em meus sonhos.

RESUMO

A evolução das técnicas de cultura de células levaram à necessidade de eliminar componentes de origem animal, de modo a evitar a contaminação bacteriana, viral ou priônica. As células-tronco da polpa dentária são células-tronco multipotentes que apresentam alta plasticidade, sendo capazes de se diferenciar em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. O presente trabalho tem como objetivo testar a utilização de peptonas vegetais (ervilha, trigo e soja) nas concentrações de 0,5%; 1% e 5% como possíveis substitutos para 10% de soro bovino fetal (SFB) em cultura de CTs. A proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT analisado em espectrofotômetro (VarioSkan). Realizou-se a diferenciação osteogênica e empregou-se a coloração Vermelho de Alizarina para testar o suporte de diferenciação. Medimos a concentração de deposição de cálcio ressuspendendo o conteúdo de Vermelho de Alizarina em solução alcoólica e analisando espectrofotometricamente. O ensaio de MTT e ensaios de diferenciação osteogênica permitiram concluir que a peptona de trigo a 1% foi a mais eficiente nas condições empregadas. A concentração de 5% de todas as peptonas utilizadas foi tóxica. Ao analisar os aminogramas das três peptonas, foi possível inferir que a maior eficiência da peptona de trigo pode estar relacionada à maior proporção de prolina e ácido glutâmico.

Palavras-chave: Célula-tronco, célula-tronco da polpa dentária decídua, peptona vegetal.

ABSTRACT

The evolution of cell culture techniques led to the necessity of eliminating components with animal origin, in order to prevent bacterial, viral or prionic contamination. Deciduous teeth dental pulp stem cells are multi potent stem cells which present high plasticity, being able to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. The present work aims at testing the utilization of vegetal peptones (pea, wheat and soy) at the concentrations 0.5%; 1%, and 5% as possible substitutes for 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in SCs culture. Cell proliferation was assayed by the MTT method analyzed on spectrophotometer (VarioSkan). We performed osteogenic differentiation and employed Alizarin Red staining in order to test the differentiation support. We measured the concentration of calcium deposition by ressuspending the alizarin red content in alcoholic solution and by analyzing spectrophotometrically. MTT and osteogenic differentiation essays allowed to conclude that wheat peptone at 1% was the most efficient in the conditions employed. The concentration of 5% of all the peptones utilized was toxic. Upon analyzing the aminograms of the three peptones, it was possible to infer that the higher efficiency of wheat peptone may relate to the greater proportion of proline and glutamic acid.

Keywords: Stem Cells; Deciduous teeth dental pulp stem cells; Vegetal Peptone

Lista de Figuras

1. Modelos básicos de divisão das células-tronco	30
2. Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Ervilha como substituto do soro fetal bovino.....	39
3. Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Soja como substituto do soro fetal bovino.....	39
4.Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Trigo como substituto do soro fetal bovino.....	40
5. Fotos das CTPDD no dia 3	41
6. Mineralização	43
7. CTPDD na diferenciação osteogênica	43
8. Aminograma referente à composição das peptonas vegetais estudadas	44

Lista de Tabelas

1. Componentes relevantes para o meio de cultivo23
2. Relação de proliferação celular em relação à exposição de diferentes peptonas vegetais43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

CT (Célula-tronco)

CTA (Célula-tronco adulta)

CTE (Célula-tronco embrionária)

CTM (Célula-tronco mesenquimais)

CTPD (Célula-tronco da polpa dentária)

CTPDD (Célula-tronco da polpa dentária decídua)

DMEM (Meio eagle modificado por Dulbecco)

ITS (insulina transferrina humana)

MEM (meio mínimo de Eagle)

ml (mililitro)

μM (microlitro)

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)

nm (nanômetro)

pH (Potencial de Hidrogênio)

SFB (Soro Fetal Bovino)

T3 (Triiodotironina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CULTIVO CELULAR	14
1.1.1 HISTÓRICO DO CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS	14
1.2 MEIOS DE CULTIVO	16
1.2.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO LIVRE DE SORO	20
1.2.2. ADAPTAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES AO MEIO LIVRE DE SFB	25
1.3. EXEMPLOS DE ESTUDOS COM O USO DE MEIOS DE CULTIVO ISENTOS DE SORO	26
1.3.1 LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS COMO SUBSTITUTO DO SORO PARA OS MEIOS DE CULTIVO	26
1.3.2. CULTURAS DE CÉLULAS CEREBRAIS EM MEIO LIVRE DE SORO	27
1.3.3 CULTURA DE FATIA DE CÉREBRO ORGANOTÍPICAS COM MEIO NEUROBASAL E B27 SEM SORO	28
1.3.4. MEIO DEFINIDO E MEIO CONTENDO SORO OCASIONALMENTE INDUZ AS CÉLULAS A UTILIZAREM DIFERENTES ROTAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL PARA A PROLIFERAÇÃO	28
1.3.5. OTIMIZAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DE CÉLULAS PARA CACO-2 HUMANAS PARA MELHORAR SUA DIFERENCIAÇÃO EM MEIO LIVRE DE SORO	28
1.5 . REVISÃO DO USO DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO	29
1.4.1. SELEÇÃO DA PEPTONA	30
1.5. EXEMPLOS DO USO DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SFB	30
1.6. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO	31
1.6.1 CÉLULAS-TRONCO DA PÓLPA DENTÁRIA DECÍDUA HUMANA (CTPDD)	32
1.7. LEIS SOBRE O USO DE CÉLULAS-TRONCO	34
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA HUMANA (CTPDD)	37
3.1.1 ISOLAMENTO	37
3.1.2 OBTENÇÃO DAS PEPTONAS VEGETAIS	37
3.1.3 CULTIVO CELULAR	37
3.2. VIABILIDADE CELULAR.....	38
3.5 COLORAÇÃO DE VERMELHO DE ALIZARINA	40
3.6 QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR AVALIAÇÃO DAS IMAGENS USANDO O SOFTWARE IMAGEJ	40
3.7 ESTATÍSTICA	40

4. RESULTADOS	41
4.1 EFEITOS DAS PEPTONAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CTPDD.....	41
5. DISCUSSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. CULTIVO CELULAR

Perfazendo mais de um século a padronização do cultivo de tecidos (cultura primária) trouxe grandes avanços científicos (CURI e PERES, 2005).Atualmente, esta técnica que pode ser aplicada tanto para tecidos animais quanto vegetais, consiste nas etapas de: isolamento, manutenção e proliferação celular em um sistema *in vitro*. As células mantidas em cultura não estão mais organizadas em tecidos, crescendo em recipientes estéreis, usualmente placas e frascos plásticos e descartáveis. O sistema *in vitro* deve conter condições especiais que propiciem a manutenção da viabilidade celular em laboratórios, independente do organismo que as originou em função de conter nutrientes e fatores essenciais ao tipo celular a ser estudado, assim como condições de pH, osmolaridade e temperatura controladas (AMARAL e MACHADO –SANTELLI, 2011).

Pesquisas que fazem o uso da técnica de cultivo celular representam um importante método para compreender os mecanismos celulares, assim como comparar o comportamento coletivo de diferentes linhagens celulares (VILELA M.J. et al., 2003).

1.1.1 HISTÓRICO DO CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS

No século XIX começaram os estudos de células isoladas e desde tal feito, importantes experimentos foram determinantes para a evolução do cultivo de células *in vitro*. Existia a necessidade da compreensão e constituição de um meio de cultivo para diversos tipos celulares. Os meios de cultivos suplementados que concebemos hoje são frutos de pesquisas básicas, onde não havia conhecimento necessário à adequação capaz de propagar células, assim como condições necessárias para o cultivo (temperatura, esterilidade, pH, osmolaridade, etc.).

Os primeiros relatos foram com amostras de anfíbios, animais pecilotérmicos. Em condições onde o controle de temperatura para a manutenção celular não era importante, em 1885 Wilhelm Roux cultivou fragmentos obtidos da placa neural de embriões de anfíbios. Doze anos depois, Loeb isolou células do tecido conectivo e do sangue de anfíbios. No ano de 1903, Jolly descreveu os processos envolvidos na divisão de leucócitos de salamandras (ASSIS et al., 2007).

Avanços científicos usando o cultivo celular já começavam a ser relatados e em 1907, Harrison fez a dissecação do tubo medular de um embrião de anfíbio e o cultivou em um coágulo linfático, assim demonstrou que axônios são produzidos como extensão de células nervosas únicas (UNCHERN, 1999). Os experimentos e resultados de Harrison são considerados um marco no desenvolvimento da técnica de cultivo de tecidos e células o que estimulou o desenvolvimento de novos métodos para a manutenção de células *in vitro* (ASSIS et al., 2007).

Montrose T. Burrows usou pela primeira vez a expressão “cultura de células”. Burrows (1910) durante a realização de seus estudos utilizou tecidos de embrião de galinha e os mergulhou em plasma sanguíneo, o que viabilizou o cultivo de tecidos do tecido cardíaco e do sistema nervoso do embrião. De acordo com Burrows, o plasma da galinha seria relevante por possuir alta concentração de fibrina e quantidades reduzidas de enzimas proteolíticas (REBELLO, 2014).

Alexis Carrel, em 1912, clínico francês contribuiu com dados sobre esterilidade e para o melhoramento dos frascos de cultivo celular. Durante seus experimentos mostrou a importância da assepsia rígida para a manutenção do cultivo, assim como a necessidade de substituir a fonte de nutrientes abarcados nos frascos de cultura. Carrel criou uma garrafa de cultura possuindo uma entrada inclinada, a qual permitia a substituição e adição do meio com maior facilidade. A posterior divulgação de seus estudos possibilitou que o cultivo celular pudesse ser viável por períodos de tempo maiores (AMARAL e MACHADO-SANTELLI, 2011).

Ulteriormente, Eberling realizou algumas modificações na técnica de Carrel o que permitiu o subcultivo de células do coração de galinhas já cultivadas. Eberling assegurou que continuou fazendo divisões do explante original por 34 anos e descartou as células restantes em 1946; a partir desse experimento nasceu a lenda do coração de galinha imortal (RAMALHO, 2007).

Outro avanço relevante para a manutenção do cultivo celular se deu em 1916. Peyton Rous e Fred Jones desenvolveram o método de subcultivo para explantes

utilizando tripsina no cultivo de células para a desagregação de células aderentes (ROUS e JONES, 1916).

Moscona estudou e descreveu o reconhecimento célula-célula entre a década de 50 e 70. A partir de seus experimentos, de como as células embrionárias se organizavam originando diferentes órgãos e tecidos notou-se que células de tecidos iguais permaneciam juntas enquanto células de tecidos diferentes não se misturavam (MOSCONA, 1961; SHEFFIELD e MOSCONA, 1970; GARBER e MOSCONA, 1972).

Em 1961, Hayflick e Moorhead foram os pioneiros na utilização de antibióticos para evitar a contaminação de cultivos de fibroblastos. A adesão do uso de antibióticos aos meios de cultivo permitiu que a técnica se tornasse continuamente utilizada, sendo empregada atualmente nos laboratórios de biotecnologia animal.

Martin (1981) isolou e cultivou células-tronco (CT) pluripotentes de embrião de camundongo. Dezesete anos depois, James Thomson isolou e cultivou células-tronco embrionárias (CTE) humanas da fase de blastocisto, cedidas por clínicas de fertilização *in vitro*.

A partir de então, os meios de cultivo suplementados ou não, os quais são utilizados atualmente em muitos laboratórios ao redor do mundo, se devem a tais estudos antecedentes.

1.2 MEIOS DE CULTIVO

Métodos de estudos *in vitro* são muito importantes para avaliações fisiológicas, biológicas e farmacológicas a nível celular e tecidual, tendo um impacto no campo da biotecnologia, propiciando, por exemplo, a produção de componentes biológicos de interesse humano como vacinas e hormônios. Os meios de cultivo visam mimetizar as condições celulares e são amplamente utilizados para a cultura de células e tecidos. Para refinar as análises e a reprodutibilidade de protocolos é de suma relevância a padronização dos experimentos assim como estabelecer a composição do meio de cultivo.

Os diferentes organismos apresentam peculiaridades quanto ao cultivo de suas células. As células de mamíferos são amplamente estudadas e seu cultivo é realizado a 37°C em incubadora com a mistura de gás umidificado de 5% de CO₂ e

95% de O₂. Para o cultivo de células animais há diversos meios de cultivo que podem ser utilizados de acordo com o objetivo do estudo e tipo celular analisado.

A solução clássica de Ringer é o meio de cultivo simples compreendendo uma solução de concentrações de sais diferentes (RINGER E BUXTON, 1887). Para a manutenção das células e/ou tecidos de forma reprodutível e por longos períodos de tempo, os meios de cultivo devem conter outros componentes, assim como: substâncias de tamponamento do pH e nutrientes. Em relação a esse último, o pH adequado para o desenvolvimento de células de mamíferos é na faixa de 7,4 e não deve ficar abaixo de 7,0 durante o cultivo, pois dados da literatura mostram que um pH menor do que 6,8 é inibidor do crescimento celular (FRESHNEY, 2005).

Harry Eagle desenvolveu este tipo de meio em 1955 o qual ficou conhecido como meio mínimo de Eagle (MEM), que também continha em sua composição vitaminas, glicose e aminoácidos. Dulbecco realizou modificações no meio MEM (DMEM), o qual é usado para culturas de linhagens celulares até os dias atuais.

Para a manutenção e desenvolvimento das células *in vitro*, os meios de cultivo devem conter substratos para a realização do metabolismo celular, nutrientes essenciais para a proliferação celular, além de compostos que desempenham funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como co-fatores. Deste modo, além do meio possuir compostos específicos à linhagem estudada, ele deve conter açúcares, sais inorgânicos, lipídios, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas, fontes de carbono, hormônios, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água (MORAES et al., 2008).

Os açúcares são uma importante fonte energética, sendo o principal a glicose, o qual também é responsável pela formação do esqueleto carbônico das células. Os sais inorgânicos são relevantes no balanço iônico e da pressão osmótica (ECHALIER, 1997). Os lipídios são fundamentais no crescimento celular, como componentes de membranas e podem ainda transportar compostos lipossolúveis.

Aminoácidos são importantes para o crescimento celular e constituição de proteínas. Dependendo da linhagem celular analisada, será necessário um tipo e quantidade específica de aminoácidos. Aminoácidos como o glutamato, glutamina, serina, aspartato, arginina e metionina também são utilizados para a geração de energia (IKONOMOU et al., 2003). Outros aminoácidos como lisina, histidina, treonina, glicina, leucina, valina, tirosina, fenilalanina, isoleucina e triptofano são

consumidos durante a fase de crescimento celular e são incorporados em proteínas celulares.

Geralmente, as concentrações de aminoácidos e glicose são limitantes no crescimento celular. A falta destes mesmos compostos pode levar a interrupção do crescimento celular, ou até mesmo a morte celular.

Para melhorar o desempenho dos meios de cultivo e propiciar a manutenção de células por longos períodos os meios básicos precisam ser suplementados com outros fatores, tal como o soro. O soro é um suplemento do meio de cultura que estimula o transporte de fosfato, aminoácidos, glicose e aumenta a permeabilidade das membranas. Trata-se, fundamentalmente, de um complexo de proteínas para a nutrição celular, adesão, proteção biológica (antioxidantes e antitoxinas) e proteção mecânica (MORAES et al., 2008). O soro mais comumente utilizado é o Soro Fetal Bovino (SFB) que apresenta em sua composição mais de mil componentes diferentes, dentre estes 200 são definidos, como vitaminas, hormônios, aminoácidos, lipídios, nucleosídeos, proteínas de transporte (albumina, globina, transferrina), fatores de proliferação, fatores de ligação (fibronectina e laminina) e fatores de crescimento (STAINES, D. e PRICE, P., 2003). Essas substâncias são essenciais para o crescimento e manutenção de células em ambiente *in vitro*. Além disso, o SFB estimula o transporte de glicose, de fosfato e de aminoácidos e aumenta a permeabilidade das membranas. Entretanto, sua utilização no meio de cultivo pode causar dificuldades na recuperação e purificação de bioprodutos devido à presença de fatores de crescimento, proteínas e outros fatores não definidos.

Além disso, o uso do SFB é controverso por aspectos éticos e científicos. A coleta dos SFB é realizada em fetos de animais abatidos em abatedouro, sua composição varia de acordo com fatores sazonais e continentais, o que altera a partida do soro e dificulta a padronização dos experimentos. O SFB também pode gerar complicações imunológicas, pois possui proteínas que estimulam a imunogenicidade humana de modo persistente (JOHNSON, M.C. et al., 1990; MARTIN, M.J. et al., 2005). O SFB é blastogênico para linfócitos sanguíneos periféricos (COUTINHO A. et al., 1973) e sua presença no meio de cultura pode ser responsável por alterações antigênicas da membrana de células tumorais humanas (IRIE, R.F. et al., 1974). O SFB também induz o aumento da síntese de DNA em células do baço de ratos saudáveis (VOGT, A. et al., 1979), assim como resposta

citotóxica inespecífica em linfócitos humanos, o que não acontece quando as células são cultivadas em soro humano (ZIELSKE, J.V. e GOLUB, S.H., 1976).

Estudos mostraram que pacientes submetidos à cardiomioplastia usando miofibroblastos cultivados em SFB desenvolveram arritmias ventriculares e morte súbita (CHACHQUES, J.C. et al., 2004). Ademais, pacientes queimados que obtiveram transplantes de queratinócitos cultivados *in vitro* desenvolveram respostas imunes contra proteínas séricas, as quais levaram a rejeição destes enxertos (JOHNSON, L.F. et al., 1991). Além disso, o SFB é componente com o maior custo no meio cultivo, chegando a representar cerca de 80% do valor final (MORAES et al., 2008).

O uso de produtos de origem animal em cultivo celular é desestimulado para a produção de materiais biológicos (ZOON, 1993; VAN DER VALK et al., 2004; SCHIFF, 2005). Os lotes de SFB variam sazonalmente e continentalmente em sua composição, além de possíveis contaminações com vírus e príons (WESSMAN LEVINGS, 1999). Porém, é válido ressaltar que o SFB apresenta baixo risco para a transmissão de encefalopatia espongiforme bovina, já que o príon causador da doença não pode cruzar a barreira placentária. Este príon é raramente encontrado no sangue do animal, apresentando um tropismo para o sistema nervoso. Muitas doenças podem ser transmitidas através do SFB, o que torna a restrição a áreas endêmicas. Deste modo, de acordo com as normas do comércio internacional, o SFB deve ser obtido em áreas livres de doenças de gado, embora haja ferramentas para o controle de qualidade (ELOIT, M., 1999).

As variações apresentadas pelos lotes de SFB podem ser um empecilho para o desenvolvimento de uma pesquisa, assim como sua reprodutibilidade. Desta forma o uso de SFB em cultivos celulares apresenta algumas desvantagens, como: introdução de proteínas animais no meio de cultivo; presença de contaminantes como bactérias, vírus, príons e fungos; alto custo; diferenças em qualidade. Dentre as desvantagens apresentadas, a presença de contaminantes é a pior entre elas e tem gerado a necessidade do uso de meios de cultivo isentos de SFB (LEE, J. et al., 2009).

Existe, atualmente, um esforço mundial para obter alternativas para o uso de elementos xenobióticos em cultivos celulares (FALKNER, E., et al., 2006; BRUNNER, D. et al., 2010). Deste modo, é extremamente aconselhável o desenvolvimento de meios e sistemas de cultivo *in vitro* quimicamente definidos,

sem o uso de SFB como é recomendado pelo *Guidelines* para Boas práticas de Cultura Celular e ECVAM *Scientific Advisory Commite* (ESAC). Assim, há uma tendência na prática de diminuir mais precisamente, retirar o SFB ou outros produtos de origem animal dos meios de cultivo celular.

1.2.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO LIVRE DE SORO

Entre 1975 e 1980, Sato fez substituições do SFB por fatores de crescimento, hormônios específicos, fetuína, transferrina e mercaptoetanol, a fim de minimizar complicações decorrentes da utilização do SFB em 14 cultivos celulares. Estas substituições auxiliaram a substituir muitas das funções fundamentais do SFB. Barnes, entre 1981 e 1987 esclareceu a presença de muitos outros componentes que são relevantes para o crescimento celular: proteínas de adesão, proteínas de ligação, lipídeos carreadores, enzimas e inibidores, entre outros, isto tornou possível o crescimento e manutenção de linhagens celulares em meios livres de SFB (SATO e REID, 1978, apud TSAO et al., 2000; BARNES, 1987 apud TSAO et al., 2000). Entretanto, o progresso no desenvolvimento de meios livres de SFB foi relativamente lento pela inevitabilidade em se determinar os diferentes nutrientes, fatores de proteção e crescimento de cada linhagem celular e pela dificuldade em se identificar e purificar nutrientes presentes no SFB (TSAO et al., 2000).

Os componentes do soro são fisiologicamente relevantes para promover a proliferação celular, o que dificulta a sua substituição por compostos definidos. Pazos et al. (2004) destacam que apenas 10 a 20% das formulações de meios quimicamente definidos demonstraram ser eficientes. Por outro lado, vários estudos foram realizados investigando o comportamento celular em cultura e 100 diferentes tipos de formulações quimicamente definidas foram desenvolvidas e podem ser utilizadas com baixo custo e sem gasto de tempo (ZHRINGER, 2009). Baseados em vários estudos podemos destacar 4 tipos básicos de meio de cultura:

- Meio livre de SFB: não possuem soro, mas contem pequenas frações de proteínas de origem animal ou de extratos de plantas que os caracterizam como meio quimicamente indefinido.
- Meio livre de proteína: não contem proteínas de alto peso molecular, mas possui frações de peptídeos (proteínas hidrolisadas) e também são considerados meios quimicamente indefinidos.

- Meio livre de componentes derivados de animais: não contém componentes de origem animal e humana. Contudo, não são considerados quimicamente definidos, uma vez que podem conter bactérias, hidrolisados de leveduras e extratos de plantas.
- Meios quimicamente definidos: não possuem proteínas, hidrolisados ou nenhum componente de composição desconhecida. Hormônios, fatores de crescimento de origem animal ou de plantas, além de produtos recombinantes altamente purificados podem ser adicionados.

Inicialmente ao desenvolvimento de meios definidos livres de SFB, os meios livres de proteínas foram citados como relevantes. Em 1964, Ham propôs meios definidos livres de proteínas, que possuíam uma formulação complexa, incluindo elementos traço essenciais para o crescimento celular. Há algumas funções individuais do SFB que podem ser substituídas por suplementos de origem não protéica. Neste contexto, pode-se citar, por exemplo, o carregamento de ferro por citrato férrico substituindo a transferrina, lipoproteínas substituídas por emulsões de lipídios, proteção contra tensão e cisalhamento celular utilizando polióis, entre outros (TSAO et al., 2000). Recentemente, uma das formulações apresentadas por Ham, o meio Ham's F12, é usado comumente em uma mistura de 1:1 com o meio de cultivo DMEM com base para o desenvolvimento de meios livres de soro.

O meio de cultivo DMEM é uma modificação do meio MEM, feita por Dulbecco, que introduz ao meio MEM de Eagle uma concentração quatro vezes maior de: aminoácidos, vitaminas e aminoácidos não essenciais (DULBECCO e FREEMAN, 1959 apud BURGNER e BUTLER, 2006).

O meio de cultivo pode ser considerado como quimicamente definido quando contém apenas compostos altamente purificados e de composição definida. Estes meios de cultivo facilitam o controle de qualidade dos processos, formulação de protocolos, diminuindo a variabilidade da produção e aumentando a reprodutibilidade (MORAES et al., 2008), pois todos os componentes podem ser facilmente encontrados e produzidos (OZTURK, 2006), além de facilitarem o processo de purificação final.

A concentração e seleção de nutrientes nos meios de cultivo podem ser avaliadas através de extensivos processos de otimização. Muitas variáveis estão envolvidas no metabolismo celular e os componentes do meio podem interagir uns com os outros (OZTURK, 2006; MORAES et al., 2008).

Uma das alternativas ao uso do SFB é o uso do extrato de levedura, o qual atua como fonte de vitamina, além de fornecer também polissacarídeos e aminoácidos (IKONOMOU et al., 2003). O mecanismo de ação deste composto não é totalmente definido, entretanto a sua utilização é associada a resultados favoráveis do ponto de vista do crescimento celular.

O extrato do leite também se mostra alternativo ao uso do SFB. Embora o leite seja de origem animal, a diversidade de compostos que ele apresenta é menor do que encontrado no SFB, porém a suplementação do meio de cultivo com leite tem sido utilizada por alguns grupos de pesquisa (RAMIREZ et al., 1990).

Outro suplemento relevante quando se utiliza os meios isentos de soro são os lipídeos. Um concentrado de lipídico utilizado para o cultivo de células animais é composto por Pluronic® F68, Tween 80, tocoferol, ácidos graxos e colesterol. A concentração lipídica em meios livres de SFB está na faixa de 10 a 100µg/L (SHEN et al., 2004). Compostos como Pluronic® F68 são geralmente aplicados na proteção das células contra efeitos negativos provocados contra a agitação e aeração (REITER et al., 2005). Este composto pode substituir a albumina não somente como surfactante, mas também atua como carreador de lipídios. Ademais, pode prevenir que possíveis danos causados a membrana celular possam levar a morte celular antes que a reparação da membrana ocorra (CHAN e HARRIS, 2001).

O uso de hidrolisados de plantas tem sido intensificado devido aos problemas de contaminação com a suplementação com compostos de origem animal, o que tem gerado artigos e patentes (IKONOMOU et al., 2003). Porém o uso de tais substâncias de origem vegetal tem que possuir os suprimentos necessários à célula a fim de preservar a integridade celular e prover sua proliferação (SAKAI, K. et al., 2002).

Várias substâncias de origem vegetal vêm sendo testadas para substituir o soro de origem animal sem que haja perdas na qualidade do cultivo, e dentre essas substâncias, as peptonas têm se destacado. Peptonas são polipeptídios pequenos e são produtos intermediários da hidrólise de proteínas (JAMES e SMITH, 2000). Dependendo do grau da hidrólise, as peptonas podem fornecer componentes que favorecem a adesão, nutrientes e análogos do fator de crescimento. Assim, peptonas de origem vegetal podem ser uma boa opção para a substituição do SFB nos meios de cultivo (SAKAI, K. et al., 2002; JUNG, E., et al., 2015).

Para a completa retirada do SFB dos meios de cultura é necessário adicionar suplementos para compensarem sua ausência. Com o objetivo de especificar os componentes importantes para o cultivo foi sugerido o seguinte modelo piramidal que demonstra uma especificidade crescente do meio de cultura (Tabela 1):

Tabela 1: Componentes relevantes para o meio de cultivo.

1° Nível	2° Nível	3° Nível	4° Nível	5° Nível	6° Nível
Meios basais	Aderência celular	Fatores de crescimento	Indução da diferenciação	Lipídios	Vitaminas
DMEM/Ham F-12	Colágeno tipo I, IV,	EGF, FGF, NGF, IGF-1,	Dexametasona	Ácidos graxos, colesterol	Ácido ascórbico
(50:50, v/v) + ITS.	laminina, fibronectina,	PDGF, VEGF, TGF- β .	Ácido ascórbico	e etacolamina.	(anti-oxidante),
	membrana basal				ácido retinoico.
	reconstituída - Matrigel				
	(regula a morfologia				
	celular).				

1.2.2. ADAPTAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES AO MEIO LIVRE DE SFB

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de obterem células adaptadas ao cultivo isento de SFB. Esta estratégia baseia-se na utilização de subcultivos sequenciais de células em meios com quantidades decrescentes de SFB para que estas passem por um processo de adaptação gradual de um meio com soro para um meio totalmente isento de soro. Porém, mudanças indesejadas podem ocorrer na população e estas serem selecionadas pelo processo de adaptação. Para uma eficiente adaptação das células é necessário o monitoramento da morfologia e função celulares durante o cultivo (GSTRAUNTHALER, et al., 1985; PFALLER et al., 1990; FEIFEL et al., 2002; NORABERG et al., 2005; NORABERG et al., 2009; SVENNINGSEN et al., 2003; JUNG, E., et al., 2015).

Diminuição do crescimento celular e viabilidade têm sido relatadas na literatura após a retirada total do SFB. Esta resposta a alterações nas condições de cultivo podem ser devido a uma perturbação de eventos associados com a progressão do ciclo celular e uma entrada em uma fase estacionária (BUTLER et al., 1998).

A diminuição do SFB no processo de adaptação pode gerar desvios nos resultados de glicosilação esperados para a linhagem, isto pode ocorrer devido a variações na concentração celular e na viabilidade celular obtida nessas fases, e a mudança natural do modo de crescimento celular durante a adaptação, de aderente à suspensão.

Para o cultivo celular isento de soro há vários métodos que podem ser utilizados como:

- a) Redução da concentração de soro: Essa etapa e/ou protocolo consiste em reduzir, em cada passagem, a porcentagem de SFB de 10% até a concentração de 0,1%. Quando o cultivo é realizado sem SFB é necessário a suplementação com hormônios (VAN DER VALK et al., 2010).
- b) Adaptação sequencial: as células são transferidas para uma mistura (uma contendo soro e outra sem) até atingir uma concentração isenta de soro (75%

do meio com soro e 25% sem soro; 50% com e 50% sem soro, 25% com e 75% sem soro). Já que este procedimento pode causar estresse nas células, recomenda-se que as células passem também pela concentração de 10% de soro e 90% livre de soro por 2 a 3 passagens antes da completa retirada do soro (VAN DER VALK et al., 2010).

- c) Adaptação com meio condicionado: as células são cultivadas normalmente em 10% de SFB. Ulteriormente a primeira passagem, as células são cultivadas em meio com 50% de meio condicionado e 50% em meio isento de soro. A segunda passagem em 50% de meio condicionado da primeira passagem e 50% em meio livre de soro. A terceira passagem em 25% do meio condicionado da segunda passagem e 75% isento de soro. Na quarta passagem as células são cultivadas em meio 100% isento de soro (VAN DER VALK et al., 2010).
- d) Adaptação “interior”: as células são cultivadas normalmente em 10% SFB até a confluência. Ulteriormente o meio de cultivo é alterado para um livre de soro e então a monocamada em confluência é tripsinizada e as células são cultivadas em meio isento de soro (VAN DER VALK et al., 2010).

1.3. EXEMPLOS DE ESTUDOS COM O USO DE MEIOS DE CULTIVO ISENTOS DE SORO

1.3.1 LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS COMO SUBSTITUTO DO SORO PARA OS MEIOS DE CULTIVO

Estudos anteriores demonstraram que o lisado de plaquetas permitiu o crescimento, a proliferação e a diferenciação de células renais de suínos e humanos, enquanto em cães foi possível o desenvolvimento de células renais em meio livre de soro (DMEN/Ham-F-12) suplementado com extrato de plantas (GSTRAUNTHALER et al., 1985). Outros estudos também demonstraram que o lisado de plaquetas permitiu o crescimento e a proliferação de células Raji em suspensão (PFALLER et al., 1990). Neste estudo, os fatores de crescimento, liberados do lisado, foram obtidos por congelamento e descongelamento em solução salina hipo-osmótica e avaliados por ELISA e Western blot. A capacidade de

indução de crescimento e proliferação mitótica do lisado de plaquetas foi avaliada em linhagens celulares contínuas por cálculo da densidade de células em cultura e pelo método do Resazurin. As taxas de crescimento e proliferação (medidas pela atividade da MAP kinase – ERK1/2) foram avaliadas no grupo cultivado em meio com 10% de SFB e comparadas com o grupo de 5% de lisado de plaquetas, como controle negativo foi usado o meio livre de soro. O lisado de plaqueta induziu específicas rotas de fosforilação e ativação do ERK1/2 em minutos, tempo semelhante à ação do SFB. Os dados demonstraram o alto potencial de substituição do soro pelo lisado de plaquetas (FEIFEL et al., 2002).

1.3.2. CULTURAS DE CÉLULAS CEREBRAIS EM MEIO LIVRE DE SORO

Estudos pioneiros demonstram que a manutenção em suspensão de células cerebrais de embriões de ratos em meio quimicamente definido permitiu a reprodução de eventos morfogenéticos como migração, proliferação, diferenciação, sinaptogeneses e mielinização. A partir desses estudos, a função de fatores de crescimento, hormônios e investigações neurotoxicológicas puderam ser realizadas com esse modelo experimental (HONEGGER et al., 1979; HONEGGER e MONNET-TSCHUDI, 2001). Outras vantagens do sistema de cultura 3D é que ele é altamente robusto, eficiente, de fácil manipulação e de excelente reprodutibilidade. Contudo, meios sem soro podem alterar a maturação das células neuronais, principalmente no que tange a mielinização, a frequência e intensidade da atividade elétrica (MONNET-TSCHUDI et al., 2000; ZURICH et al., 2003; FORSBY et al., 2009). A hipótese deste trabalho foi que substâncias presentes no soro como fatores lipídiossolúveis possam estar envolvidos no processo de maturação das células neuronais. Diferentes lipoproteínas foram isoladas de vários tipos de soro (soro fetal bovino, soro de recém-nascido bovino e plasma humano) e foram avaliadas as suas atividades na agregação de culturas de células cerebrais derivadas de embriões de ratos. Algumas macromoléculas foram identificadas e seus efeitos têm sido estudados para um posterior desenvolvimento de macromoléculas sintéticas (por exemplo, por Tecnologia do DNA recombinante).

1.3.3 CULTURA DE FATIA DE CÉREBRO ORGANOTÍPICIAS COM MEIO NEUROBASAL E B27 SEM SORO

Esse tipo de cultura pode ser utilizado nos estudos de doenças neurodegenerativas. O meio Neurobasal com B27 tem sido utilizado para cultivar esse tipo de células, porém, foram observadas necrose e morte de células em cultivo comparado com Soro Optimem (NORABERG et al, 2005; NORABERG, 2009). Vários estudos têm sido realizados para aperfeiçoar os meios de cultivo para células neuronais, e no início de 2010 a Sigma-Aldrich anunciou uma série de meios que estão sendo desenvolvidos e serão lançados para este fim.

1.3.4. MEIO DEFINIDO E MEIO CONTENDO SORO OCASIONALMENTE INDUZ AS CÉLULAS A UTILIZAREM DIFERENTES ROTAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL PARA A PROLIFERAÇÃO

Células do sistema nervoso central de ratos e de camundongos podem ser dissociadas e cultivadas *in vitro* em meios quimicamente definidos para estudos de interações célula-célula e ação de agentes tóxicos. Porém, alguns estudos evidenciaram que células da glia cultivadas em meio quimicamente definido usam diferentes rotas de transdução de sinal para proliferarem, quando comparado ao meio com soro (SVENNINGSEN et al., 2003). Contudo, ainda não está claro quais rotas são utilizadas. Para esclarecer essas alterações são necessários estudos comparando resultados *in vitro* e *in vivo* e ajustar os meios de cultura para fornecer um ambiente de cultivo *in vitro* com condições similares ao que ocorre *in vivo*.

1.3.5. OTIMIZAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DE CÉLULAS PARA CACO-2 HUMANAS PARA MELHORAR SUA DIFERENCIAÇÃO EM MEIO LIVRE DE SORO

As células Caco-2 são extraídas do adenocarcinoma de cólon humano e após cultura podem se diferenciar em enterócitos (SAMBUI et al., 2005). Essa linhagem

celular pode ser influenciada pelo sistema de cultivo e apresentam grande heterogeneidade na expressão de várias funções. Halleux e Schneider desenvolveram em 1991, um meio sem soro adaptado para hepatócitos e suplementado com insulina, fator de crescimento epidérmico, albumina-ácido linoléico, hidrocortisona e triiodotironina (T3) para as células Caco-2. As células cultivadas em membranas cobertas com colágeno, por exemplo, propiciaram um bom modelo de barreira do tecido intestinal. Outros autores utilizaram DMEM suplementado com ITS (insulina transferrina humana) e obtiveram um desenvolvimento morfológico normal com características funcionais padrão para essas células. Apenas a atividade da sucrase foi menor do que em células cultivadas com soro, porém sua atividade foi normalizada pela adição de T3. Outro estudo avaliou a utilização de vários suplementos (ITS, oleato, palmitato, colesterol, BSA, fatores de crescimento e hormônios) e foi verificado que a diferenciação de célula Caco-2 ocorreu em todas as condições, entretanto alguns pontos responderam de diferentes formas aos substitutos do soro.

1.5 . REVISÃO DO USO DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO

A absorção das peptonas, fisiologicamente está ligada a transportadores especializados, diferentes dos transportadores de aminoácidos. Dentro das células as peptonas são primeiramente cortadas por proteases e os aminoácidos livres resultantes desta quebra podem ser utilizados como nutrientes através do ciclo de Krebs ou também como precursores de ácidos nucléicos ou incorporados em proteínas. (SKOPICKI et al., 1991).

As peptonas são bons suplementos para o meio de cultivo que podem substituir o SFB, sendo utilizadas para estimular o crescimento de células de mamíferos. Os benefícios do uso de peptonas na cultura de células têm sido muito bem retratados na literatura durante anos, já que apresentam nutrientes de baixo peso molecular, aminoácidos livres e peptídeos (BD BIONUTRIENTES MANUAL TÉCNICO3ª EDIÇÃO; JAN, D.C.et al., 1994; HEIDEMANN, R. et al., 1999; MERTEN,O.W.,1999; PHAM, P.L.et al., 2005;BABCOCK, J.et al.,2007;SHIRATORI,M., 2007;GIRÓN-CALLE, J.et al., 2008;MOCHIZUKI, M.et al., 2009).

Uma vez que cada tipo celular pode ser cultivado de maneira mais eficiente de acordo com a peptona utilizada é de suma importância que se avalie qual peptona é a mais adequada para o cultivo de um tipo celular específico (BD BIONUTRIENTES MANUAL TÉCNICO 3ª EDIÇÃO, GIRÓN-CALLE, J. et al., 2008).

1.4.1. SELEÇÃO DA PEPTONA

Há disponíveis no mercado vários tipos de peptonas (de origem animal e vegetal). Para o melhor crescimento celular é importante avaliar o tipo de peptona a ser utilizado. A composição de cada tipo de peptona pode variar de um fabricante para outro, sendo assim a seleção da peptona mais adequada é extremamente relevante (BD BIONUTRIENTES MANUAL TÉCNICO 3ª EDIÇÃO; PRICE, P. et al., 2004; GRILLBERGER et al., 2006; BABCOCK, J. et al., 2007).

Os usos de peptonas de origem animal apresentam um bom desempenho (STOCKINGER, H. et al., 1991; ACUMEDIA, 2006; WILKINS, J. et al., 2009), porém assim como o uso de SFB, a utilização deste tipo de peptona pode ocasionar contaminação por vírus. Assim o uso de peptonas de origem vegetal é mais indicado para manter o cultivo livre de contaminantes de origem animal (PRICE P.J. et al., 2000; PRICE, P.J. et al., 2006; MOCHIZUKI, M. et al., 2009).

Se há a preocupação com os níveis de endotoxinas no processo, a triagem deve ser limitada entre as peptonas ultra-filtradas. Se a linhagem celular utiliza a expressão de glutamato sintetase, a peptona de trigo deve ser excluída da lista por ser rica em glutamina e a mesma é tóxica para a célula (BD BIONUTRIENTES MANUAL TÉCNICO 3ª EDIÇÃO; PRICE, P.J. et al., 2004; GRILLBERGER et al., 2006).

1.5. EXEMPLOS DO USO DE PEPTONAS VEGETAIS COMO SUBSTITUTO DO SFB

A fim de cultivar CT mesenquimais derivadas do sangue do cordão umbilical em meio isento de soro fetal bovino (SFB) e posteriormente avaliar sua proliferação utilizando o ensaio de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), Lee et al. (2009) utilizaram peptonas vegetais (trigo, ervilha, soja, batata e fava) na concentração de

1% em meio DMEM sem soro. Os resultados revelaram que apenas duas das peptonas avaliadas (trigo e ervilha) induziram a proliferação celular, apresentando uma taxa de proliferação de 20 e 25% respectivamente.

Em 2011, Durrani, A. et al., utilizaram peptonas vegetais (soja, arroz e trigo) combinadas a poliamina (cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina e ornitina, etc.) que podem ser selecionadas de acordo com o crescimento celular do tipo específico de célula a ser estudada, para verificar qual das três peptonas seria a melhor para cultivar células recombinantes de mamíferos. Durante as análises eles afirmaram que para o cultivo isento de SFB e a utilização de peptonas vegetais tem que se avaliar qual o melhor tipo de peptona vegetal que apresenta níveis de proliferação celular para o tipo específico celular estudado, já que diferentes tipos celulares irão se combinar melhor a uma peptona vegetal de acordo com os aminoácidos encontrados em sua composição. Os resultados mostraram que para as células recombinantes de mamíferos avaliadas as peptonas de trigo e arroz apresentaram maior nível de proliferação seguidas pela peptona de soja.

Jung, E., et al. (2015) investigaram peptonas vegetais como substitutos do SFB para induzir a produção de colágeno do tipo I em fibroblastos dérmicos. Eles observaram que as peptonas vegetais promoveram uma proliferação celular significativa e a produção de colágeno do tipo I e esse aumento de proliferação e produção de colágeno se dá pela indução pelas peptonas vegetais da proteína de ligação β da via de fosforilação que pode ser medida pela ativação de Raf-ERK p90 ribossomal S6 quinase-CCAAT/ *enhancer* sinalização.

Assim, peptonas vegetais podem ser utilizadas como alternativa ao uso do SFB para o cultivo e proliferação celular.

1.6. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas que apresentam a capacidade de auto renovação (células-mães originam células-filhas) e possuem capacidade de diferenciação em diferentes linhagens celulares dependendo do estímulo que a célula é exposta (MORRISON et al., 1997). As CT apresentam dois diferentes modelos básicos de divisão: determinístico ou estocástico. No primeiro, após a divisão sempre será gerada uma CT “filha” e uma célula diferenciada. Já o segundo, algumas CT geram somente CT “filhas”; outras CT geram apenas células

diferenciadas e outras geram um outro tipo de CT e uma célula diferenciada (Fig.1) (CARVALHO, 2001).

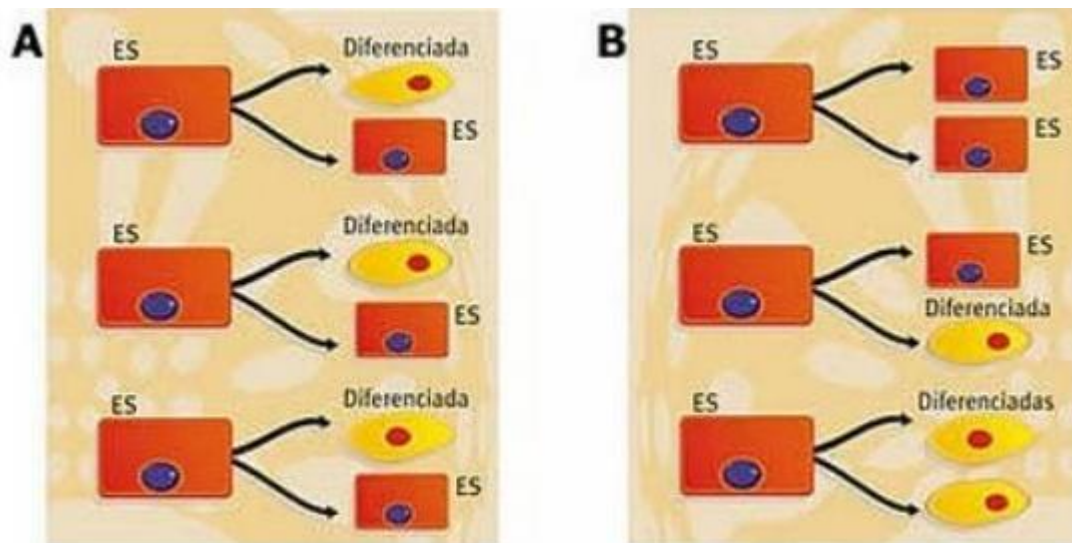


Fig1. Modelos básicos de divisão das células-tronco. Fonte: (CARVALHO, 2001). A – determinístico, B – estocástico.

Pappa e Anagnou (2009) afirmam que as CT podem ser classificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação: - CT totipotentes: presentes no zigoto possuem capacidade de originar todos os tipos celulares e os tecidos extra-embrionários - CT pluripotentes: CT embrionárias possuem capacidade de originar os tecidos extra-embrionários; - CT multipotentes: CT adultas possuem a capacidade de se diferenciar apenas linhagens celulares do tecido de origem.

1.6.1 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA HUMANA (CTPDD)

As CT são células não especializadas, capazes de tornarem-se células especializadas, apresentam capacidade de autorrenovação e potencial para diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares (PARKER et al. 2004; KERKIS et al., 2006). Ou seja, quando uma CT se divide, cada nova célula tem o potencial de permanecer como CT ou tornar-se outro tipo celular com novas funções, por um processo chamado de divisão assimétrica (CAPLAN, 1991; ALHADLAQ e MAO, 2004; BIANCO et al., 2006; KIESSLING et al., 2003; FIONA et al., 2000).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são um tipo de células-tronco adultas (CTA) e podem ser isoladas da medula óssea (CAPLAN, 1991), tecido adiposo (AGGARWAL et al., 2005), músculo esquelético (DZIONEK et al., 2000), sinóvia

(OYOSHI et al., 2006), baço, timo (MAUS et al., 2001), pulmão, sangue fetal (VON WULFFEN et al., 2007), líquido amniótico (LAI et al., 2010) e polpa dentária decídua (GRONTHOS et al., 2000). Vários estudos têm demonstrado os grandes potenciais do uso de CTM para engenharia tecidual (BIANCO, ROBEY E SIMMONS, 2008; PROCKOP et al., 2010). Entre as muitas características vantajosas das CTM está o fato de estas células poderem ser isoladas a partir de vários tecidos e possuírem potencial para serem expandidas em cultura e diferenciarem de multilinhagens (SANTOS et al., 2011).

Vários tipos de CT têm sido isoladas da dentição humana que incluem, Células-Tronco da Polpa Dentária Humana (CTPD) (GRONTHOS et al., 2000), Células-Tronco do Ligamento Periodontal (SEO et al., 2004), Células-Tronco da Papila Apical (HUANG et al., 2009), Células Progenitoras do Germe Dental (IKEDA et al., 2008) e Células-Tronco de Dentes Decíduos Humanos (CTPDD) (do Inglês, *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – SHED*) (MIURA et al., 2003).

As CTPDD foram identificadas como sendo uma população de células autorrenováveis, altamente proliferativas e capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo células neuronais, adipócitos e odontoblastos (MIURA et al. 2003; TIRINO et al. 2011). Além disso, demonstram propriedades de CT típicas as quais incluem clonogenicidade, proliferação celular extensiva e multipotência, e se destacam por possuírem mais eficiência em determinadas características quando comparadas com CT isoladas de medula óssea, como maior potencial imunossupressor (YAMAZA et al., 2010). Estudos mais aprofundados de uma população mais restrita de CTPD humanas demonstraram uma rápida expansão e proliferação *in vitro* e a expressão de alguns marcadores de CTM, tais como o STRO-1 e CD146 (MIURA et al., 2003).

O fato das CTPDD serem isoladas de dentes decíduos e de alguns trabalhos mostrarem que estas células expressam Nestin (molécula presente em células da linhagem neuronal e em células originadas da crista neuronal embrionária) e Oct-4 (marcador embrionário) acredita-se que as CTPDD possuem a facilidade de diferenciarem-se para células das linhagens mesenquimal e ectodermal (CHAI et al., 2000; HUANG et al., 2009; MIURA et al., 2003; YAMAZA et al., 2010). Além disso, trabalhos têm mostrado a capacidade imunomoduladora das CTPDD (PIERDOMENICO et al., 2005; SILVA, et al., 2014). Essas células também se

destacam por um fato importante, pois desenvolvem tecidos que podem conter CT distintas dos tecidos maduros (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2009).

A obtenção de CT oriundas de dentes torna-se um atrativo para utilização em terapia celular, por possuírem fácil acesso e por ser um tecido que normalmente seria descartado. A extração do tecido da polpa do dente é altamente eficiente, o local de coleta é fácil e as células possuem ampla capacidade de diferenciação e interatividade com biomateriais, tornando ideal para reconstrução de tecidos (YOU-YOUNG et al., 2007; D`AQUINO et al., 2008). As suas limitações estão no risco de contaminação durante a coleta e a restrita quantidade de células inicialmente disponível para terapia (GRONTHOS et al., 2000).

Portanto, as CTPDD são interessantes do ponto de vista de sua fácil obtenção, uma vez que apresentam um procedimento invasivo mínimo e é uma fonte de tecido de fácil acesso em comparação com outros tecidos humanos, tais como a medula óssea e tecido adiposo (YAMAZA et al., 2010), por conseguinte, eliminaria os problemas éticos que aumentam no que diz respeito à sua utilização em medicina regenerativa e engenharia tecidual (PATEL, S.S. 2013).

1.7. LEIS SOBRE O USO DE CÉLULAS-TRONCO

A manipulação do material genético humano é regida pela Constituição Federal de 1988. Assim, o ser humano é protegido, tanto do interesse individual quanto do interesse da sociedade.

Dentre os países da América Latina, o Brasil foi o primeiro país a aderir às pesquisas com CT de acordo com o artigo 5º da Lei nº 11.105/05, de Biossegurança.

A Lei de Biossegurança impõe algumas condições para o uso de CT, como o congelamento mínimo de três anos, a aquiescência dos genitores e a aprovação do comitê de ética. De certo que há outros meios para a obtenção de CT, como a extração do próprio paciente, cordão umbilical ou placenta (CT adultas), que geram menos debates quanto a sua utilização. Embora tais CT não são totipotentes ou pluripotentes, sendo que podem produzir apenas alguns tipos de tecidos do corpo humano e ainda há o problema da histocompatibilidade.

A RDC 33/06 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Lei de Biossegurança também devem ser aplicadas no funcionamento e regulamentação dos bancos de células e tecidos germinativos. A RDC nº33/2006 reza padrões técnicos e de qualidade em todo o processo de obtenção, transporte, processamento, armazenamento, liberação, distribuição, registro e utilização dos materiais biológicos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012).

A Resolução da ANVISA 9/2011 objetiva estabelecer os requisitos mínimos para o funcionamento de Centros de Tecnologia de células humanas e seus derivados para fins de terapia ou pesquisa. Em seu artigo 28, reza:

A utilização de produtos de origem animal deve ser evitada.

§1º Se utilizados produtos de origem animal, estes devem possuir certificação de ausência de agentes infecciosos e contaminantes.

§2º Para fatores de crescimento, devem ser estabelecidas medidas de identidade, pureza e potência para assegurar reprodutibilidade das características da cultura celular.

Assim sendo, a substituição do SFB é de total interesse e a busca por reagentes que possam ter tais propriedades são necessárias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a proliferação, senescência e plasticidades das CTPDD cultivadas na presença de peptonas vegetais como substitutos do SFB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qual das três peptonas vegetais (ervilha, trigo e soja) obtém a maior proliferação das CTPDD, assim como a manutenção da morfologia padrão das células;
- Avaliar dentre as peptonas vegetais (ervilha, trigo e soja), qual a melhor concentração testada (0,5; 1 e 5%), visando a maior proliferação e manutenção morfológica das CTPDD;
- Avaliar através do uso de microscópio fotônico a morfologia das CTPDD quanto ao uso das peptonas vegetais (ervilha, trigo e soja) e comparando com o SFB;
- Diferenciar as CTPDD para linhagem osteogênica após o seu cultivo com a peptona vegetal que apresentar o melhor desempenho fisiológico dentre as três peptonas vegetais analisadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA HUMANA (CTPDD)

3.1.1 ISOLAMENTO

O isolamento das CTPDD foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (Parecer. No. 003/2011) e se encontram armazenadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC – CONEP 22/2015) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.1.2 OBTENÇÃO DAS PEPTONAS VEGETAIS

Inicialmente, as peptonas de origem vegetal (trigo e ervilha) foram obtidas em colaboração com a Solabia Biotecnológica LTDA, na pessoa do Dr. Carlos Eduardo V. O. Cruz, Diretor Executivo da empresa. A peptona de soja foi cedida pela colaboração com o laboratório de Microbiologia da UFJF pela pessoa do professor Dr. Cláudio Galuppo Diniz.

3.1.3 CULTIVO CELULAR

As CTPDD isoladas foram descongeladas e cultivadas ($5,4 \times 10^6$ células/ml) em meio α -MEM (Gibco) suplementado com 1% de antibióticos, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-glutamina e 10% de SFB em placas de 96 poços. O cultivo foi realizado em estufa incubadora (Incubadora modelo REVCO3000 Technologies, Asheville, USA) a 37° C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. As CTPDD (70% de confluência) foram desagregadas enzimaticamente por ação de tripsinapor cerca de 3 minutos para se desprenderem do fundo da garrafa. Em

seguida, a tripsina foi inativada com meio DMEM acrescido de 10% (v/v) SFB, e a suspensão centrifugada (Spectrafuge 6C, Lab net Internacional Inc.) em tubo falcon a 252 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de meio DMEM suplementado. Determinou-se o número celular a partir da câmara de Neubauer. Do volume total ressuspensionado diluiu-se um volume de 0.8 μL (aproximadamente $7,2 \times 10^4$ células) em 200 μL de DMEM. Em duas placas de cultura de células de 96-poços, adicionou-se 200 μL de DMEM e 1 μL das células diluídas por poço, para realizar as análises de 3 e 5 dias. As células foram incubadas por 24 horas.

Após 24 horas, observou-se em microscópio a aderência das células à placa. O meio contendo SFB foi removido dos poços e acrescido os meios contendo peptonas vegetais (ervilha, trigo e soja) em diferentes concentrações (soluções de 0,5%; 1%; 5% (v/v)) e suplementadas com 1% (v/v) de Penicilina/Estreptomicina, aminoácidos essenciais e L-glutamina. Como controle interno foi usado SFB na concentração padrão de 10% (v/v).

3.2.VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar o padrão de proliferação das células, foi utilizado o ensaio de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue, Sigma), usando o protocolo do fabricante. Foram plaqueadas inicialmente (Dia 0) 500 células por poço em uma placa de 96-poços (CORNING, USA) e as leituras foram realizadas nos dias 3 e 5. O meio de cultivo foi removido e foi adicionado 90 μL de meio de cultura suplementado com 10 μL de MTT. Em seguida, a placa foi mantida no escuro na incubadora a 37°C por 4 horas e, após esse período, o meio acrescido com MTT foi removido e 100 μL de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A placa foi mantida no escuro na incubadora a 37°C por 1 hora, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e como controle 100 μL de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) a absorvância de 570, 650 e 690nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3. PLASTICIDADE

As células cultivadas em meios contendo peptonas, de acordo com a concentração ideal observada por tratamento estatístico, foram diferenciadas para linhagens osteogênicas e coradas com vermelho de alizarina (Sigma), usando protocolos padrões e de rotina do laboratório GENETEC. A concentração de depósitos de cálcio foi avaliada ressuspensando o corante alizarina com solução alcoólica e lendo a concentração em espectrofotômetro (VarioSkan).

3.4 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA IN VITRO

Uma densidade inicial de 5×10^3 células (Passagem P7) foram semeadas (D0) em placas de 24-poços (Corning) e cultivadas por 24 horas com meio de basal de cultivo celular e incubadas em estufas com 5% CO₂ e temperatura de 37°C para aderirem ao fundo da placa. No dia seguinte (D1), o meio basal foi substituído pelo meio de indução osteogênica contendo DMEM-*Low Glucose* (LGC Biotecnologia), soluções de 10^{-7} M de dexametasona (Sigma), 50 µM de 2-fosfato ácido ascórbico (Sigma), 2 mM de β-glicerolfosfato (Sigma) e suplementado com as peptonas de soja 0,5%, trigo 1% e ervilha 1%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 µM de L-glutamina e 0,01 µM de aminoácidos não essenciais. Durante o experimento foi mantido um grupo controle negativo cultivado em meio contendo DMEM-*Low Glucose*, 50 µM 2-fosfato ácido ascórbico, 2µM β-glicerolfosfato e suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 µM L-glutamina e 0,01 µM de aminoácidos não essenciais. O β-glicerolfosfato foi adicionado somente no dia 10 (D10) do tratamento e a cultura foi mantida por 21 dias, trocando-se o meio a cada três dias, como descrito por Zuk et al. (2002).

Após a diferenciação osteogênica (21 dias), a placa de cultura foi submetida a coloração com vermelho de alizarina como será descrito a seguir, e fotografada com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F).

3.5 COLORAÇÃO DE VERMELHO DE ALIZARINA

As culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (v/v) por 24 horas e coradas com a técnica Vermelha de Alizarina, específica para diferenciação osteogênica, que foi realizada como se segue. As placas foram lavadas com água destilada e as células foram fixadas com etanol a 70% (v/v) durante 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas mais uma vez com água destilada e as placas mantidas abertas até secagem total à temperatura ambiente. Depois, as placas foram preenchidas com uma solução contendo 1% (v/v) de Vermelho de Alizarina e 1% (v/v) de hidróxido de amônio na proporção 10:1, respectivamente, e mantidas sob agitação leve à temperatura ambiente por 45 minutos (FORMA ORBITAL SHAKER, THERMO, EUA). O excesso de coloração foi removido após agitação e as placas foram mantidas abertas até à secagem. Finalmente, 10 campos aleatórios de visão de cada linhagem foram fotografados com o auxílio do microscópio invertido em fase (NIKON TS100F, Japão).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR ESPECTROFOTÔMETRO

Para quantificar os depósitos de cálcio impregnados pela coloração Vermelho de Alizarina, em cada poço foi adicionado 250 μ L de uma solução de extração (1% (v/v) de ácido acético e 1% (v/v) de metanol na proporção de 4:1). Posteriormente, as placas foram levadas para o agitador (FORMA ORBITAL SHAKER, THERMO, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

O conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa e 200 μ L da solução de extração foram utilizados como solução em branco para calibrar o espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC VARIOSKAN FLASH, EUA). A concentração de cálcio foi relacionada com a absorvância a 495 nm.

3.7 ESTATÍSTICA

Para avaliação da proliferação das CTPDD e quantificação da mineralização, todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para as variáveis analisadas, foi utilizado a ANOVA *two way*; quando a diferença apresentada era

significante, aplicou-se o teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado em todos os testes estatísticos foi o GraphPadPrism7 (GRAPHPAD SOFTWARE INC.).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DAS PEPTONAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CTPDD

A proliferação celular das CTPDD foi avaliada após substituição do SFB e manutenção das células na presença de diferentes concentrações de peptonas por 3 e 5 dias.

Tanto para trigo quanto para soja e ervilha, concentrações maiores que 1% testadas foram citotóxicas para as células, o que inviabilizou dar continuidade para estudo na concentração de 5%. Assim sendo, as concentrações de 0,5% e 1% foram consideradas nesse estudo.

Em relação à peptona de Ervilha (Figura 2), para as concentrações testadas, não houve diferença estatística no dia 3, o mesmo não sendo observado no dia 5 de cultivo celular. Dados estatísticos mostram uma redução significativa ($p < 0,05$) mostrando que na concentração de 0,5% as CTPDD proliferaram 33,71% a menos em relação ao controle. Em relação a concentração de 1% de peptona de ervilha, a redução foi de 37,71% ($p < 0,05$).

A análise da Peptona de Soja nas mesmas concentrações estudadas revelou que no dia 3 não houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Porém, quando as células são expostas a cinco dias de cultivo, observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) somente aquelas suplementadas na concentração de 1%, cuja redução de proliferação foi de 33,32% (Figura 3).

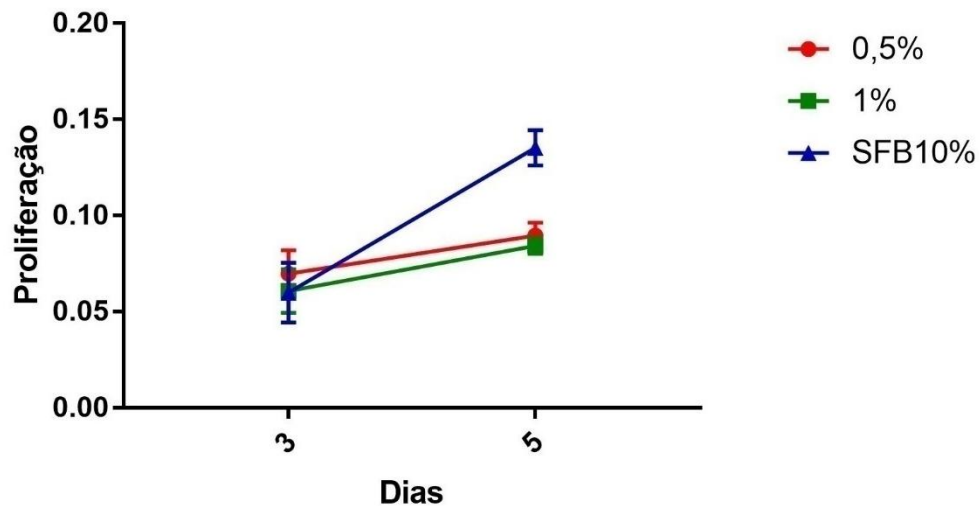


Fig.2– Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Ervilha como substituto do soro fetal bovino.

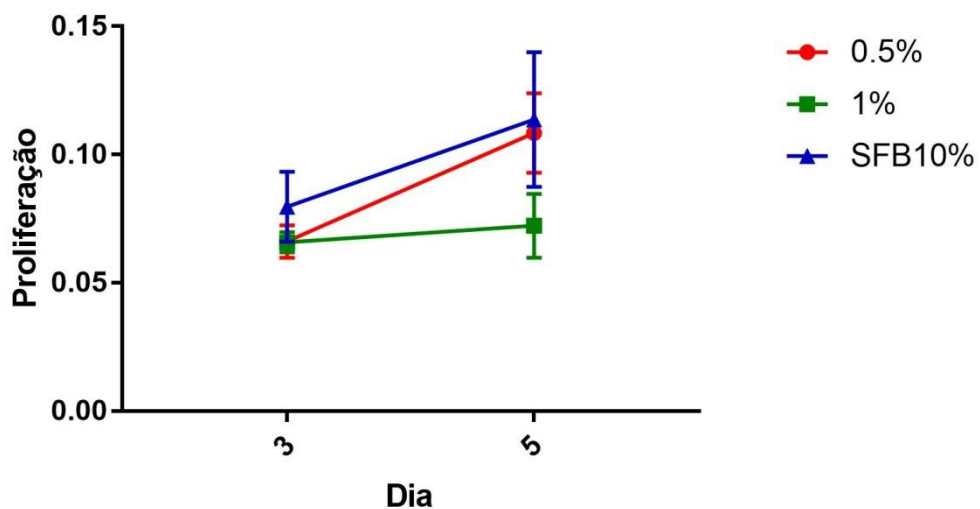


Fig.3 - Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Soja como substituto do soro fetal bovino.

Para a avaliação da peptona de Trigo, evidenciamos por meio de microscópio invertido que as células apresentavam confluência menor que aquelas cultivadas na presença do SFB (controle). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as duas concentrações testadas, sendo que no dia 3 evidenciamos redução mais acentuada de 57,07% na proliferação de células expostas a concentração de peptona de trigo 0,5% e na concentração de 1%, a redução avaliada foi de 43,64% (Figura 4). No dia 5, observa-se para aquelas células suplementadas com 0,5% uma redução de 60,79% e para 1% a redução de 64,98%.

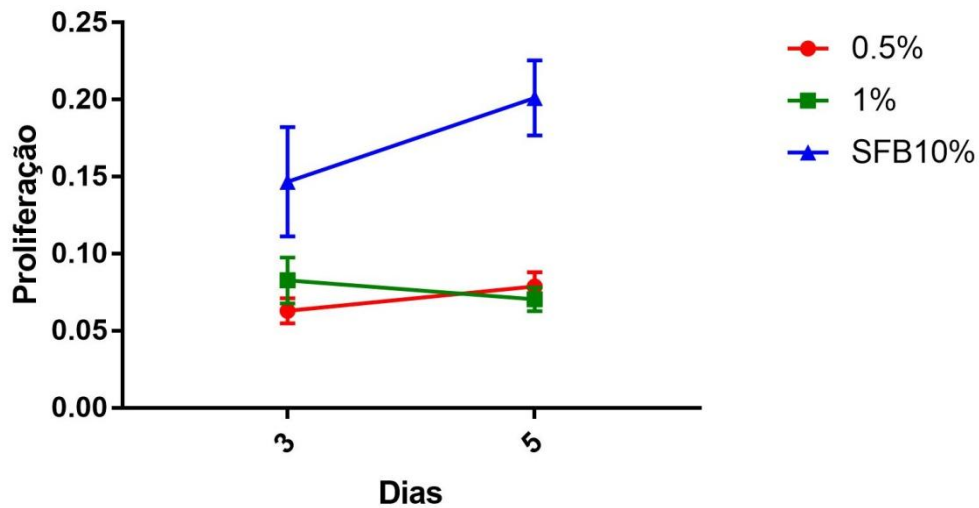


Fig.4 - Proliferação das CTPDD na presença da peptona de Trigo como substituto do soro fetal bovino.

Como apresentada na Figura 5, observamos nas culturas celulares suplementadas com peptona de Trigo alterações morfológicas de um modo dependente da concentração. Onde as células cultivadas nas concentrações de 0,5% e 1% mantiveram a morfologia fibroblastóide típica das CTPDD e as células cultivadas na concentração de 5% mostram uma morfologia diferente da usual, indicando toxicidade.

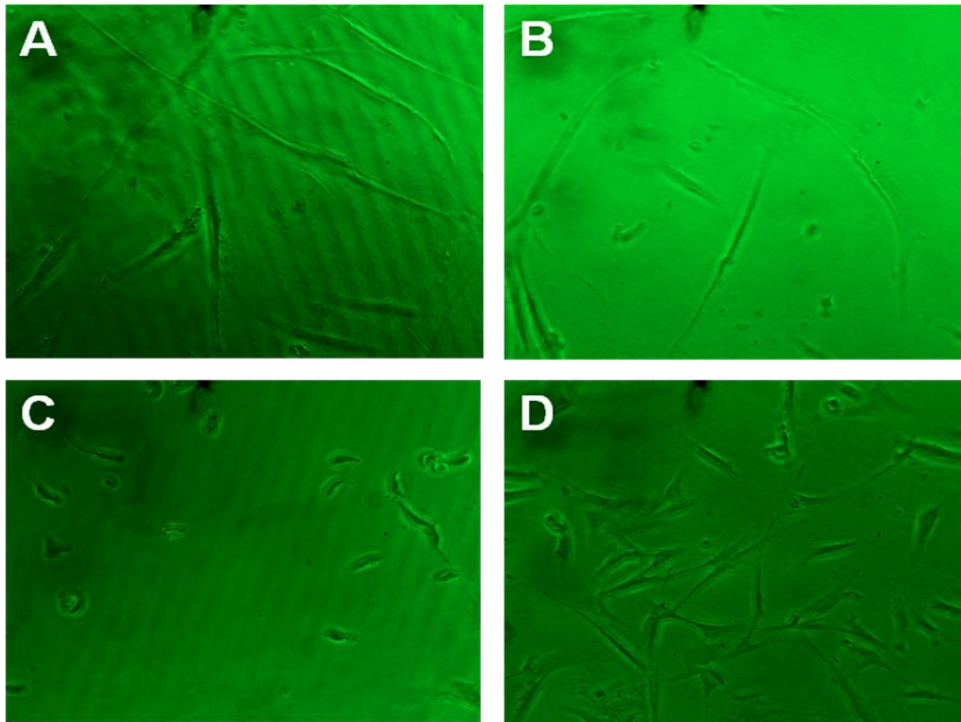


Fig.5 - Micrografias das CTPDD no dia 3. (A) Peptona de trigo 0,5%; (B) Peptona de trigo 1%; (C) Peptona de trigo 5%; (D) SFB. Objetiva de 10X.

Na Tabela 2 são apresentadas as relações de eficiência de proliferação em relação às células cultivadas em meio com SFB (controle). Para a peptona de Trigo, a eficiência de proliferação no dia 3 foi maior para a concentração de 0,5% (51,54%) em relação a concentração de 1% (41,76%). Entretanto, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no dia 5 para ambas as concentrações. Fazendo a mesma análise para a peptona de Ervilha, observamos que a peptona apresentou as menores eficiências para proliferação celular, tanto no dia 3 quanto no dia 5, para ambas concentrações avaliadas. O estudo com a peptona de soja revelou uma eficiência proliferativa do dia 3 para a concentração de 0,5% (60,45%) e a de 1% (41,24%). No dia 5 a eficiência de proliferação foi inferior na concentração de 0,5%, sendo de apenas 5,5%, na concentração de 1% foi 35,78%.

Tabela 2 - Relação de proliferação celular em relação a exposição de diferentes peptonas vegetais

	3 Dias		5Dias		Proliferações vs controle (%)	
	Mean	SD	Mean	SD		
Controle (FBS)	0,123	0,011	100	0,186	0,226	100
Pep Trigo 0,5%	0,060	0,004	48,46	0,062	0,077	33,33
Pep Trigo 1%	0,072	0,011	58,24	0,062	0,064	33,33
Controle (FBS)	0,064	0,062	100	0,13	0,127	100
Pep Ervilha 0,5%	0,044	0,039	68,75	0,087	0,1	60,77
Pep Ervilha 1%	0,051	0,048	79,69	0,079	0,087	60,77
Controle (FBS)	0,15831	0,131744	100	0,109	0,087	100
Pep Soja 0,5%	0,062606	0,061874	39,55	0,103	0,141	94,50
Pep Soja 1%	0,093029	0,070328	58,76	0,07	0,066	64,22

4.2 AVALIAÇÃO DAS PEPTONAS NO CULTIVO DE CÉLULAS INDUZIDAS A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para realizar a diferenciação osteogênica, foram utilizadas as concentrações de 1% para as peptonas de trigo e ervilha, e 0,5% para a peptona de soja.

Foi observado nos experimentos envolvendo a peptona de Ervilha que o cultivo de células foi drasticamente reduzido a ponto de não haver células aderentes à placa em 21 dias de cultivo. Dessa forma o experimento foi descartado.

As peptonas de trigo e soja mostraram resultados positivos quanto à diferenciação se comparadas com o controle. Em relação ao controle, a peptona de trigo se mostrou mais eficiente para a diferenciação de CTPDD sendo registrado depósitos de cálcio 12,33% maior (Fig.6) enquanto que a Soja é evidenciado uma mineralização de 87,26%.

Os resultados da diferenciação também podem ser observados na Figura 7, sendo representado em coloração marrom áreas referentes à mineralização das células induzidas a formação de osteoblastos. Os resultados da diferenciação mostraram que a peptona de trigo foi a que mais se aproximou do controle.

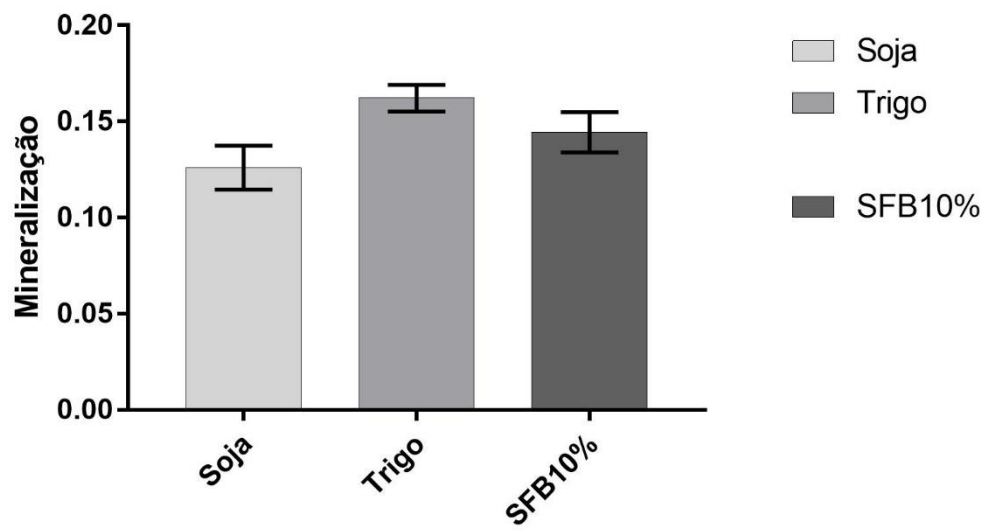


Fig.6 -Mineralização

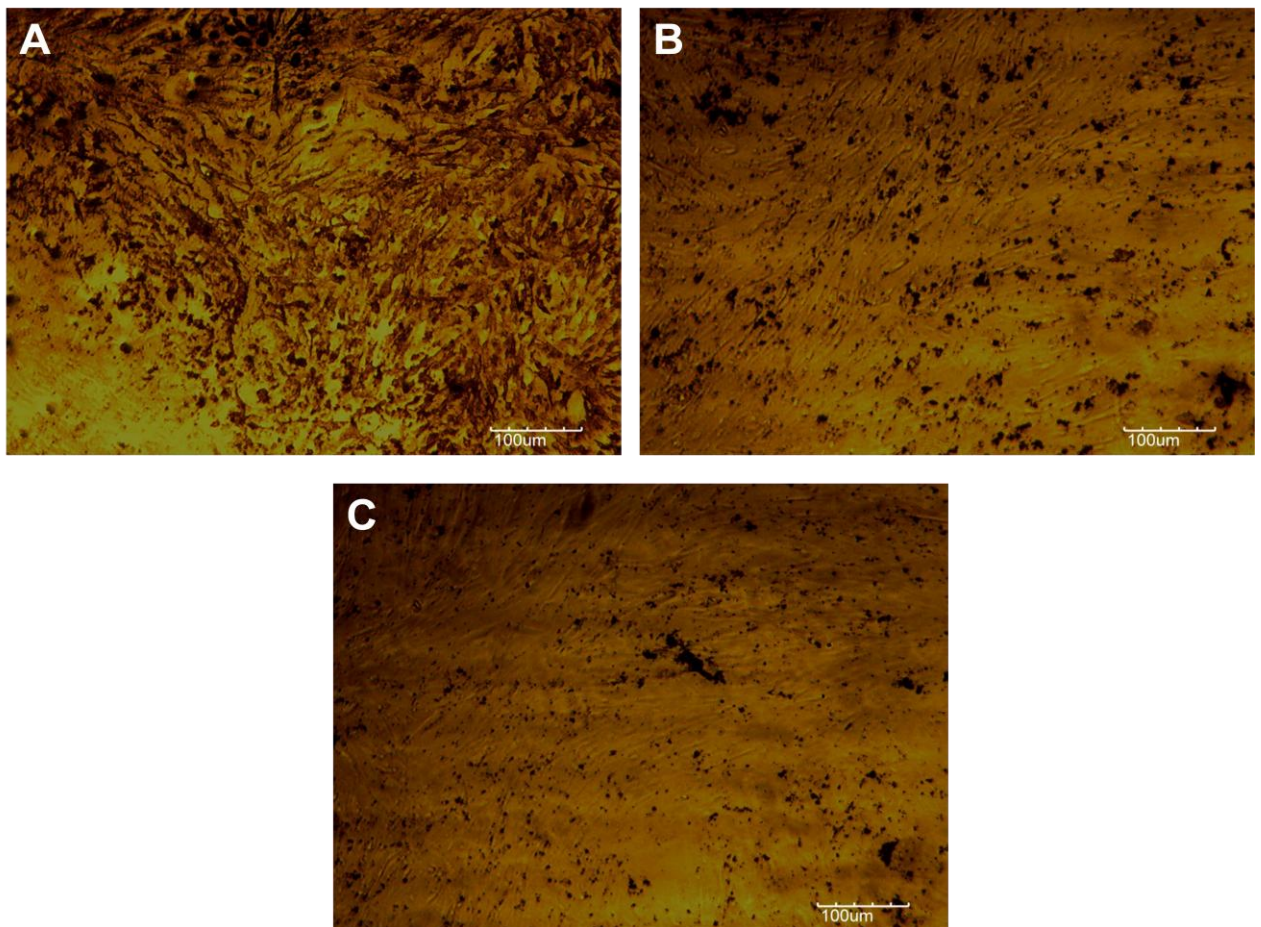


Fig 7. Micrografias das CTPDD na diferenciação osteogênica. A- Peptona de soja; B- Peptona de trigo; C- Soro Fetal Bovino (Controle).

4.3 AMINOGRAMA

Na Figura 8 é mostrado o aminograma das três peptonas analisadas, observamos que a peptona de trigo, que se mostrou dentre as três a mais eficiente se comparada ao controle, apresenta o maior nível de ácido glutâmico e prolina.

As células em proliferação metabolizam glutamina em múltiplas vias para a bioenergética e biossíntese (ÁGUIA ET AL., 1956 E KOVACEVIC E MCGIVAN, 1983). As células podem oxidar parcialmente glutamina de uma forma análoga à oxidação parcial de glicose durante a glicólise aeróbica (REITZER ET AL., 1979). Esta via ("glutaminolysis") contribui para a produção celular de NADH e lactato. Ao contrário da glicólise aeróbica, no entanto, a glutaminólise usa várias etapas do ciclo TCA, levando ao reconhecimento geral do fato de que a glutamina é uma fonte de energia para as células em proliferação. Sendo assim, a peptona de trigo pode ter sido a mais eficiente para o cultivo e diferenciação das CTPDD pela alta concentração de ácido glutâmico.

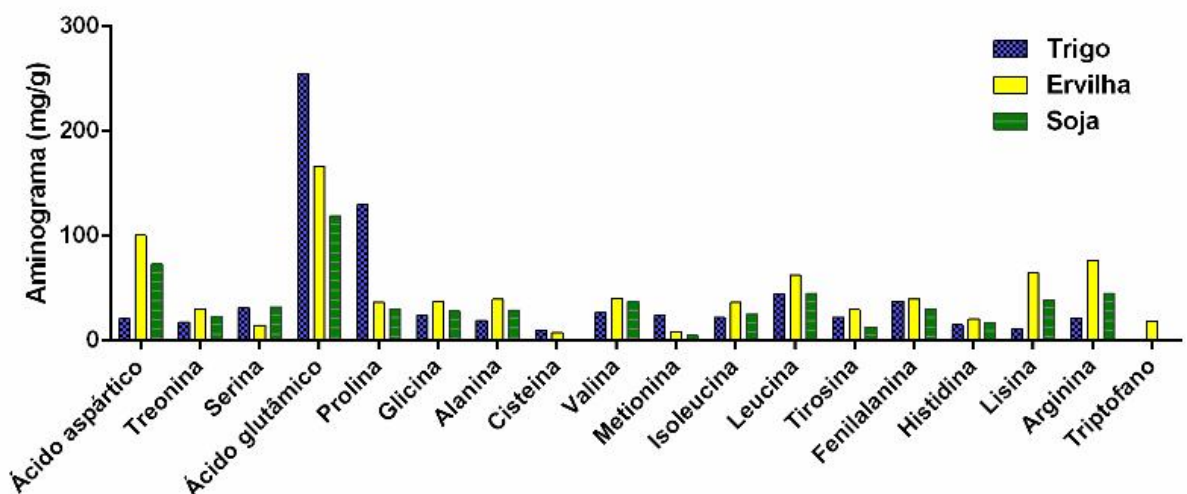


Fig.8- Aminograma referente à composição das peptonas vegetais estudadas.

5. DISCUSSÃO

Agências de vigilância sanitária de muitos países impõem a necessidade de substituição do SFB nos cultivos celulares humanos em função da possibilidade de cruzamento de patógenos entre as espécies. Existe hoje no mercado soro de origem

bovina, mas altamente controlado em termo de composição e em termos microbiológicos, tal como o Soro Hyclone® (USA), que além do elevado custo, tem independente do lote sua composição química bem definida.

Um esforço crescente tem sido feito por pesquisadores visando achar um substituto do SFB e, até o presente momento, o soro de origem bovina ainda continua sendo o padrão ouro em termos de eficiência em proliferação celular.

A Resolução da ANVISA 9/2011 reza em seu artigo 28, citado na introdução, que produtos de origem animal devem ser evitados em cultura de células e se utilizados, devem seguir critérios rigorosos a fim de evitar possíveis contaminações. Deste modo, sobre a substituição de componentes de origem animal, as peptonas de origem vegetal se tornam interessantes. Neste trabalho pudemos testar de forma inédita o uso das peptonas de soja, trigo e ervilha no cultivo de CTPDD. Observamos que a eficiência de proliferação celular por cultivos de três e cinco dias em concentrações de 0,5% e 1% variavam entre si, sendo que a peptona de ervilha é descrita na literatura como sendo a mais eficiente pra CT do sangue do cordão umbilical. Nas CTPDD a substituição do SFB pela peptona de ervilha foi a menos eficiente quando comparadas as peptonas de soja e trigo. A diferenciação osteogênica em meio à presença de peptona de ervilha resultou em morte celular ao longo do cultivo e no final de 21 dias de diferenciação, nenhuma célula foi observada aderente as placas de cultivo.

Os estudos com as peptonas de soja e trigo foram continuados e observamos no dia 3 que na concentração de 0,5% para ambas as peptonas, a proliferação foi superior a 50% quando compradas ao controle, porém no dia 5 somente a peptona de trigo foi melhor em termos de eficiência. Para a concentração de 1%, as proliferações no dia 3 para ambas as peptonas foram muito parecidas, sendo a eficiência quase o dobro para o trigo no 5º dia de cultivo em relação a soja.

A diferenciação osteogênica usando as concentrações de 0,5% para a peptona de soja e 1% para a peptona de trigo foram realizadas e os depósitos de cálcio quantificados. Observamos que a peptona de trigo apresentou muito mais áreas mineralizadas, sendo até mesmo superior ao controle, o qual foi somente suplementado com SFB. Esses dados corroboram com outros da literatura no sentido que cada tipo celular tem que ser testado determinando assim a eficiência das peptonas de origem vegetal.

A análise do aminograma das três peptonas revelou que a peptona de Trigo apresenta em maiores quantidades Ácido Glutâmico e Prolina. A glutamina tem sua fonte primária no músculo esquelético, de onde é liberada na corrente sanguínea e transportada para muitos tecidos, sendo o aminoácido livre mais abundante no organismo (YOUNG E AJAMI, 2001; NEWSHOLME ET AL., 2003A). A glutamina desempenha um papel essencial, promovendo e mantendo a função de vários órgãos e células, tais como o rim (CONJARD ET AL., 2002), neutrófilos (PITHON-CURI ET AL., 2003), intestino (RAMOS LIMA ET AL., 2002) e coração (KHOGALI ET AL., 2002).

A concentração intracelular de glutamina varia entre 2 e 20 mM dependendo do tipo de célula, enquanto que a sua concentração extracelular é em média de 0,7 mM (NEWSHOLME ET AL., 2003B). A captação de glutamina é caracterizada por células que se dividem rapidamente, tais como enterócitos, fibroblastos e linfócitos (WIREN ET AL., 1998). A glutamina é um importante precursor de peptídeos e proteínas, purinas e pirimidinas, participando assim na síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos (SZONDY E NEWSHOLME, 1989).

Rhoads et al. (1997) mostraram que a glutamina ativa ERKs e JNKs (quinases reguladas por sinal extracelular e jun kinase, respectivamente), proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal estimuladas por fatores de crescimento em células IEC-6 e IPEC-J2 (linhagem de células epiteliais de intestino de porco) resultando num aumento da transcrição do gene dependente de AP-1 e dos níveis de mRNA de c-Jun. AP-1 e c-Jun são fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na divisão celular. A glutamina tem sido, portanto, postulada para potenciar os efeitos dos fatores de crescimento sobre a proliferação e reparação celular. A glutamina pode estimular a expressão de adenilosuccinato sintase (ADSS-1), que pode regular a proliferação celular através da ativação da proteína quinase A e mTOR em cardiomiócitos neonatais de ratos (XIA et al., 2003).

A L-prolina é um aminoácido não-essencial exógeno e induz uma transição entre CTE de camundongos para CTM (COMES S. ET al., 2013). Este processo totalmente reversível se assemelha a transição epitelial-a-mesenquimal, que é essencial para o desenvolvimento normal e contribui para a progressão do câncer. D'Aniello, C. et al. (2015) mostraram que CTE cultivadas na falta de L-prolina tem a sua proliferação limitada e pode levar a morte celular. Estudo anteriores

mostraram que apenas a privação da L -prolina entre todos os NEAAs limita a formação de colônias de células *in vitro* (WANG J. ET AL., 2009).

Assim, nota-se grande relação entre o ácido glutâmico e a prolina na proliferação celular e pode-se estabelecer uma relação entre a peptona de trigo ter apresentado uma maior eficiência do que as demais peptonas analisadas.

Novos estudos devem ser realizados para avaliar o papel das peptonas como substitutos do SFB, avaliando se as peptonas afetam características imunofenotípicas, como a expressão de genes marcadores de CT. Para o cultivo das CTPDD, o presente estudo sugere que as peptonas possam ser usadas como substitutos do SFB, porém é sugerida a suplementação de algumas citocinas visando melhorar a eficiência da proliferação celular.

6. REFERÊNCIAS

Advanced Bioprocessing. **BD Bionutrients technical manual (3 rd revised edition)**, 8-20. [Online] Available

at:http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/br_3_2547.pdf

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, **105 (4)**: 1815-1822.

ALHADLAQ, A.; AND MAO, J. J. 2004. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells and development**, **13 (4)**: 436–448.

AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. 2011. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20.

ASSIS, M.F.L.; SANTO, E.C.O.; JESUS, I.M.; JESUS, M.I.; PINTO, W.V.M; MEDEIROS, R.L.F.; SILVA, D.F.L. 2007. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cad. saúde colet., Rio de Janeiro**, v. **15**, n. **3**, p. 425-432.

BABCOCK, J.; SMITH, S.; HUTTINGA, H.; MERRILL, D. 2007. Enhancing performance in cell culture. **Genetic engineering & Biotechnology news**, **27(20)**, 47-+.

BARONI, L.L. 2008. Cientistas brasileiros criam linhagem de células-tronco. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?materia=16753>. Available at: 10 de março de 2016.

BIANCO, P.; KUZNETSOV, S. A.; RIMINUCCI, M.; GEHRON ROBEY P. 2006. Postnatal skeletal stem cells. **Methods Enzymol**, **419**: 117–148.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, **2 (4)**: 313-319.

BRASIL. **Lei nº 11.105/05, de 24 de março de 2005. Lei de Biossegurança.** Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm> Available at: 15 mar 2016.

BRASIL, **Resolução RDC nº 9, ANVISA, de 14 mar 2011.** Disponível em: <http://www.poderesaude.com.br/portal/images/stories/Publicaes_SIM_-_16.03.2011_1.pdf>. Available at: 15 mar 2016.

BRASIL, **Resolução ANVISA RDC nº 33, de 17 de fevereiro de 2006.** DOU de 20 fev 2006.

BRASIL. **Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011.** <conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf> Available at: 15 mar 2016.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**. **27**(1):53-62.

BURGENER, A., BUTLER, M. 2006. "Medium Development". In: In: Ozturk, S.S., Hu, W., (Eds) **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-based Therapies**, capítulo 3, New York Taylor e Francis.

BURROWS, M.T. 1910. The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body. **J. Amer. Med. Ass.**, v.55, p. 2057-2058.

BUTLER, M., HUZEL, N., BARNABÉ, N., BAJNO, L. e GRAY, T. 1998. Intracellular fatty acid composition affects cell yield, energy metabolism and cell damage in agitated cultures. In "New developments and new applications in Animal Cell Technology" (Merten, O-W., Perrin, P. and Griffiths, B. Eds.) **European Society for Animal Cell Technology 15**, 197-203.

CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic**, **9** (5): 641-650.

CARVALHO, A. C. C. 2001. Células-tronco: a medicina do futuro. **Ciência Hoje**, v. **29**, n. **172**, p. 28.

CHACHQUES, J. C.; HERREROS, J.; TRAININI, J.; JUFFE, A.; RENDAL, E.; PROSPER, F.; GENOVESE, J. 2004. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *International journal of cardiology*, 95, S29-S33.

CHAI, Y.; JIANG, X.; ITO, Y.; BRINGAS, P. JR.; HAN, J.; ROWITCH, D. H.; SORIANO, P.; MCMAHON, A. P.; SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**, **127** (8): 1671-1679.

CHAN, S.Y., HARRIS, K. 2001. "Preparation of recombinant factor VIII in a protein free medium", **Patente norte Americana nº US 6171825B1**.

COMES, S.; GAGLIARDI, M.; LAPRANO, N.; FICO, A.; CIMMINO, A.;PALAMIDESSI, A. 2013. L-proline induces a mesenchymal-like invasive program in embryonic stem cells by remodeling H3K9 and H3K36 methylation. **Stem Cell Reports** **1**: 307–321.

CONJARD, A.; BRUN, V.; MARTIN, M.; BAVEREL, G.; FERRIER, B. 2002. Effect of starvation on glutamine ammoniagenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. **Biochemistry J** 368:301–308.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. **Código de Ética Odontológica**, 2012. Resolução CFO - 118/2012.20 f.

COUTINHO, A.; MÖLLER, G.; ANDERSSON, J.; BULLOCK, W. W. 1973. In vitro activation of mouse lymphocytes in serum free medium: effect of T and B cell mitogens on proliferation and antibody synthesis. **European journal of immunology**, **3(5)**, 299-306.

CURI, R.; PERES, C. M. 2005. Como cultivar células. 1th ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, v.1. 283p.

D'ANIELLO, C.; FICO, A.; CASALINO, L.; GUARDIOLA, O.; DI NAPOLI, G.; CERMOLA, F.; MINCHIOTTI, G. 2015. A novel autoregulatory loop between the Gcn2-Atf4 pathway and L-Proline metabolism controls stem cell identity. **Cell Death and Differentiation**, **22(7)**, 1094–1105. <http://doi.org/10.1038/cdd.2015.24>

DURRANI, A.; ALI, A.; DURRANI, S.; SHAIKH, J. B.; UPADHYAY, A.; KHAN, Z. H. 2011. Non-animal peptone for serum free cultivation of recombinant mammalian and animal cells. **International Journal of Biology**, **3(1)**, 140.

DZIOŃEK, A.; FUCHS, A.; SCHMIDT, P.; CREMER, S.; ZYSK, M.; MILTENYI, S.; BUCK, D. W.; SCHMITZ, J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **The Journal of Immunology**, **165 (11)**: 6037-6046.

EAGLE, H. 1955. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. **Experimental Biology and Medicine**, **v. 89**, n. 3, p. 362-364.

EAGLE, H., OYAMA, V. I., LEVY, M., HORTON, C. L., & FLEISCHMAN, R. (1956). The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 218, 607-616.

ECHALIER, G. 1997. *Drosophila cells in Culture*, **Academic Press**.

ELOIT, M. 1999. Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control. **Developments in biological standardization**, **99**, 9.

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, **v.292**, p.154-156.

FALKNER, E.; APPL, H.; EDER, C.; LOSERT, U.M.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W. 2006. Serum free cell culture: the free access online database. **Toxicol In Vitro**. **20(3)**:395-400.

FEIFEL, E., OBEXER, P., ANDRATSCH, M., EULER, S., TAYLOR, L., TANG, A., WEI, Y., SCHRAMEK, H., CURTHOYS, N.P., GSTRAUNTHALER, G. 2002. P38 MAPK mediates acid-induced transcription of PEPCK in LLC-PK1-FBPase+ cells. **American Journal of Physiology – Renal Physiology** **283**, F678–F688.

FIONA, M. W. AND BRIGID, L. M. H. 2000. Out of eden: stem cells and their niches. **Science: Stem Cell Research and Ethics**, **287 (5457)**: 1427-1430.

FORSBY, A.; BAL-PRICE, A.K.; CAMINS, A.; COECKE, S.; FABRE, N.; GUSTAFSSON, H.; HONEGGER, P.; KINSNER-OVASKAINEN, A.; PALLAS, M.; RIMBAU, V.; RODRIGUEZ-FARRE, E.; SUNOL, C.; VERICAT, J.A.; ZURICH, M.G. 2009. Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. **Toxicology in Vitro** **23 (8)**, 1564–1569.

FRESHNEY, R. I. 2005. Culture of specific cell types. **John Wiley & Sons, Inc.**

GARBER, B.B.; MOSCONA, A. A. 1972. Reconstruction of brain tissue from cell suspensions: I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain. **Developmental biology**, v. **27**, n. 2, p. 217-234.

GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; ALAIZ, M.; YUST, M.M.; MEGÍAS, C.; & MILLÁN, F. 2008. Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. **Cytotechnology**, **57(3)**, 263-272.

GOMES, R.G.C.; GRINFELD, S. 2008. Células-tronco: um breve estudo. **Odontologia Clínica-Científica**. **7 (1)**: 29-33.

GRAZINOLI, G.R.; FABÍOLA, S.R.G. 2013. Consentimento informado em genética forense. **Acta bioethica**,**19(2)**, 299-306. Available at: 20 de março de 2016, http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2013000200015&lng=es&tlng=pt.10.4067/S1726-569X2013000200015.

GRILLBERGER, L. (Vienna, AU), REITER, M. (Vienna, AU); MUNDT, W. (Vienna, AU); DORNER, F. (Vienna, AU). 2006. Animal protein-free media for cultivation of cells. **United States Patent 20060094104**.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, **97 (25)**: 13625-13630.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. 1985. Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). **American Journal of Physiology** **248 (4 Pt 2)**, F536–544.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cells trains. **Experimental cell research**, v. **25**, n. 3, p. 585-621.

HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; QI, H.; RULE, J.; ROZALES, C.; PARK, S.; CHUPPA, S.; RAY, M.; MICHAELS, J.; KONSTANTINOV, K.; NAVEH, D. 1999. The use of peptones as media additives for high-density perfusion cultures of animal Cells. **Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products**, 195–197.

HONEGGER, P.; MONNET-TSCHUDI, F. 2001. Aggregating neural cell cultures. In: **Fedoroff, S., Richardson, A. (Eds.), Protocols for Neural Cell Culture, third ed. Humana Press**, Totowa, NJ, pp. 199–218.

HONEGGER, P.; LENOIR, D.; FAVROD, P. 1979. Growth and differentiation not aggregating fetal brain cells in a serum-free defined medium. **Nature** **282 (5736)**, 305–308.

HORST, O.V.; MIQUELLA, G.C.; ANDREW, H.J.; TEJAL, D.; OPHIR, D.K. 2012. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. **Dental Clinics of North America** **56**:495–520.

HUANG, G. J.; GARCIA-GODOY, F. 2014. Missing concepts in De novo pulp regeneration. **Journal of dental research**, 0022034514537829.

IKEDA, E.; YAGI, K.; KOJIMA, M.; YAGYUU, T.; OHSHIMA, A.; SOBAJIMA, S.; TADOKORO, M.; KATSUBE, Y.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; GO, M. J.; ADACHI, H.; YOKOTA, Y.; KIRITA, T.; OHGUSHI, H. 2008. Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease. **Differentiation**, **76 (5)**: 495–505.

IKONOMOU, L.; SCHENEIDER, Y. J.; AGATHOS, S.N. 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Cap. 62, p. 1-20.

IRIE, R. F.; KENJI, I.; MORTON, D. L. 1974. Characteristics of heterologous membrane antigen on cultured human cells. **Journal of the National Cancer Institute**, **53(6)**, 1545-1551.

JAMES, D.; SMITH, S.R. 2000. Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. **Cytotechnology** **33**, 27– 36.

JAN, D. C.; JONES, S. J.; EMERY, A. N.; AL-RUBEAI, M. 1994. Peptone, a low-cost growth-promoting nutrient for intensive animal cell culture. **Cytotechnology**, **Volume 16**, Number 1.

JOHNSON, M.C.; MEYER, A.A.; DESERRES, S.; HERZOG, S.; PETERSON, H.D. 1990. Persistence of fetal bovine serum proteins in human keratinocytes. **Journal of Burn Care & Research**, v. **11**, n. 6, p. 503-509, 1990.

JOHNSON, L. F.; HERZOG, S. R.; PETERSON, H. D.; MEYER, A. A. 1991. Antigenic cross-reactivity between media supplements for cultured keratinocyte grafts. **Journal of Burn Care & Research**, **12(4)**, 306-312.

JUNG, E.; CHO, J.Y.; PARK, D.; KIM, M. H.; PARK, B.; LEE, S. Y.; LEE, J. 2015. Vegetable peptones increase production of type I collagen in human fibroblasts by inducing the RSK-CCAAT/enhancer binding protein- β phosphorylation pathway. **Nutrition Research**, **35(2)**, 127-135.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. 2006. Isolation and characterization of sub-population of dental pulp stem cells

expressing OCT-4 and other key embryonic stem cells markers. **Cells Tissues Organs**, **184** (3-4): 105-16.

KIESSLING, A. A. E ANDERSON, S. C. Human Embryonic Stem Cells. 2003. An Introduction to the Science and Therapeutic Potential. **USA: Jones and Bartlett Publishers**, Inc 2003: 164.

KHOGALI, S.E.; PRINGLE, S.D.; WERYK, B.V.; RENNIE, M.J. 2002. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? **Nutrition** **18**:123–126.

KOVACEKI, Z.; & McGiVAN, J.D. (1983). **Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance**. *Physiological Reviews* 63, 547-605.

LAI, H. Y.; YANG, M. J.; WEN, K. C.; CHAO, K. C.; SHIH, C. C.; LEE, O. K. 2010. Mesenchymal stem cells negatively regulate dendritic lineage commitment of umbilical-cord-blood-derived hematopoietic stem cells: an unappreciated mechanism as immunomodulators. **Tissue Engineering: Part A**, **16** (9): 2987-2997.

LEE, J.; HWANG, H.; JUNG, E.; HUH, S.; HYUN, J.; PARK, D. 2009. Promotion of stem cell proliferation by vegetable peptone. **Cell proliferation**, **42**(5), 595-601.

LEI DE BIOSSEGURANÇA. Disponível em:

<<http://jus.com.br/revista/texto/141113/lei-de-biosseguranca-lei-n-11-105-2005>>. Available at: mar. 2016.

LYMPERI, S.; LIGOUDISTIANOU, C.; TARASLIA, V.; KONTAKIOTIS, E.; ANASTASIADOU, E. 2013. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. **The Open Dentistry Journal**, **7**: 76-81.

MARTIN, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **78**(12), 7634-7638.

MAUS, U.; HEROLD, S.; MUTH, H.; MAUS, R.; ERMERT, L.; ERMERT, M.; WEISSMANN, N.; ROSSEAU, S.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F.; LOHMEYER, J. 2001. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but up regulate CD14. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. **280**, n. 1, p. L58-L68.

MERTEN, O.W. 1999. Safety issues of animal products used in serum-free media. PMID: 10404888 [**PUBMed-indexed for MEDLINE**].

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **100** (10): 5807–5812.

MOCHIZUKI, M. 2009. Feline Cell Capable of Being Cultured Without Animal-Derived Protein, and Method for producing virus and method for producing vaccine using there of. **Paentdocs, IPC8 Class: AA61K3912FI**.

MORAES, A.M; MENDONÇA, R.Z.; SUAZO, C.A.T.2008. Meios de cultura para células animais. In: Moraes , A.M.; AUGUSTO, , E.F.P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. 1º Edição.** São Paulo: Roca. Cap. 5, p.105-121.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v. **88**, p. 287-298.

MONNET-TSCHUDI, F.; ZURICH, M. G.; SCHILTER, B.; COSTA, L. G.; HONEGGER, P. 2000. Maturation-dependent effects of chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogs on acetylcholinesterase and neuronal and glial markers in aggregating brain cell cultures. **Toxicology and applied pharmacology**, **165(3)**, 175-183.

MOSCONA, A. 1961. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: a quantifiable approach to cell interactions in vitro. **Experimental cell research**, **22**, 455-475.

NEWSHOLME P, LIMA MM, PROCOPIO J, PITHON-CURI TC, DOI SQ, BAZOTTE RB, CURI R. 2003a. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazil Journey Medicine Biology Reshearch** **36**:153–163.

NEWSHOLME P, PROCOPIO J, LIMA MM, PITHON-CURI TC, CURI R. 2003b. Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry** **21**:1–9.

NORABERG, J. 2009. Organotypic brain slice cultures. **SciTopics**. Avialable at: <http://www.scitopics.com/Organotypic_Brain_Slice_Cultures.html>(accessed 16.02.16).

NORABERG, J.; POULSEN, F.R.; BLAABJERG, M.; KRISTENSEN, B.W; BONDE, C.; MONTERO, M.; MEYER, M.; GRAMSBERGEN, J.B.; ZIMMER, J. 2005. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. **Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, **4(4)**, 435-452.

OTSU, K.; KUMAKAMI-SAKANO, M.; FUJIWARA, N.; KIKUCHI, K.; KELLER, L.; LESOT, H.; HARADA, H. 2014. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. **Front Physiol**, **5**, 36.

OYOSHI, M. K.; BARTHEL, R.; TSITSIKOVET, E. N. 2006. TRAF1 regulates recruitment of lymphocytes and, to a lesser extent, neutrophils, myeloid dendritic cells and monocytes to the lung airways following lipopolysaccharide inhalation. **Immunology**, **120 (3)**: 303-314.

PAPPA, K. I.; ANAGNOU, N. P. 2009. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? **Regenerative Medicine**, v. **3**, n. 4, p. 423-433.

- PARKER, G. C.; ANASTASSOVA-KRISTEVA, M.; BROXMEYER, H. E.; DODGE, W. H.; EISENBERG, L. M.; GEHLING, U. M.; GUENIN, L. M.; HUSS, R.; MOLDOVAN, N. I.; RAO, M.; SROUR, E. F.; YODER, M. C. 2004. Stem cells: shibboleths of development. **Stem Cells and Development**, **13 (6)**: 579-584.
- PATEL, D. M.; SHAH, J.; SRIVASTAVA, A. S. 2013. Therapeutic potential of Mesenchyme stem cells in regenerative medicine. **Stem Cells International**, 2013:1-15.
- PAZOS, P.; BOVERI, M.; GENNARI, A.; CASADO, J.; FERNANDEZ, F.; PRIETO, P. 2004. Culturing Cells Without Serum: Lessons Learnt Using Molecules of Plant Origin. **Altex**, v.21, p. 67-72.
- PEREIRA, L.V. 2008. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, **3**: 7-14.
- PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G.; LOIDL, P. 1990. Morphology of the differentiation and maturation of LLC-PK1 epithelia. **Journal of Cellular Physiology** **142 (2)**, 247–254.
- PHAM, P. L., PERRET, S., CASS, B., CARPENTIER, E., STLAURENT, G., BISSON, L., KAMEN, Y.; DUROCHER, Y. 2005. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. **Biotechnology and bioengineering**, **90(3)**, 332-344.
- PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E.; MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P. 2005. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, **80(6)**:836-842.
- PITHON-CURI, T.C.; SCHUMACHER, R.I.; FREITAS, J.J.S.; LAGRANHA, C.J.; NEWSHOLME, P.; PALANCH, A.C.; DOI, S.Q.; CURTI, R. 2003. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **Am J Physiol** **284**:C1355–C1361.
- PRICE, P. J.; GORFIEN, S.; DANNER, D. 2000. Animal cell culture media comprising peptides derived from rice. **U.S. Patent n. 6,103,529**.
- PRICE, P.J.; GORFIEN, S.; DANNER, D.; PLAVSIC, M. 2004. Animal cell culture media comprising non-animal or plant-derived nutrients. **Free Patents online, United States Patent 20040171152**. [Online] Available: www.freepatentsonline.com.
- PROCKOP, D. J.; KOTA, D. J.; BAZHANOV, N.; REGER, R. L. 2010. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **14 (9)**: 2190-2199.
- PRODUCTGUIDE. 2006. Media Ingredients, Peptones and Hydrolysates. **ACUMEDIA**. [Online] Available: <http://www.neogen.com/acumedia/pdf/mediaingredients.pdf>

OZTURK S.S. 2006. Cell Culture Technology- An Overview, In: Ozturk, S.S., Hu, W., **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-based Therapies**, capítulo 1, New York: Taylor & Francis.

RAI, S.; KAUR, M.; KAUR, S. 2014. Applications of Stem Cells in Interdisciplinary. **Dentistry and Beyond: An Overview. Annals of Medical and Health Sciences Research, 3(2).**

RAMALHO, B. R. 2007. Terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea e ácido hialurônico em calvária de coelhos. Bauru. 140p. **(Dissertação de Mestrado) - Universidade do Sagrado Coração, SP.**

RAMIRES, O.T.; SURESHKUMAR, G.K. e MUTHARASAN, R. 1990. Bovine colostrum or Milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma. **Biootechnology and Bioengineering, vol. 35**, p. 882-889.

REBELLO, M. A. 2014. Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais. **1th ed. Rio de Janeiro: Rubio**, 208p.

REITZER, L. J., WICE, B. M. & KENNEL, D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2669-2676

REZENDE, M.M.; GARRIDO, R.G. 2014. Dentes como fonte de Células-Tronco: uma alternativa aos dilemas éticos. **Revista de bioética y derecho, n. 31**, p. 66-80.

RINGER, S.; BUXTON, D.W. 1887. Concerning the action of calcium, potassium, and sodium salts upon the cell heart and upon the skeletal muscles of the frog. **J. Physiol 8:15-19.**

RHOADS JM, ARGENZIO RA, CHEN W, RIPPE RA, WESTWICK JK, COX AD, BERSCHNEIDER HM, BRENNER DA. 1997. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. **Am J Physiol 272:G943–G953.**

ROUS, P.; JONES, F.S. 1916. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells. **The Journal of experimental medicine, New York, v. 23**, n. 4, p. 549-555.

SAKAI, K.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, C.; YAMAJI, H.; FUKUDA, H. 2002. Effects of phosphatidic acid on recombinant protein production by Chinese hamster ovary cells in serum-free culture. **Biochemical engineering journal, 10(2)**, 85-92.

SAMBUY, Y.; ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M.L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology 21 (1)**, 1–26.

SANTOS, J. L.; PANDITA, D.; RODRIGUES, J.; PÊGO, A. P.; GRANJA, P. L.; TOMÁS, H. 2011. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods,

strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. **Current Gene Therapy**, **11 (1)**: 46-57.

SCHIFF, L. J., 2005. Review: production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal** **41**, 3-4, 65-70.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, **364 (9429)**:149–155.

SHEFFIELD, J.B.; MOSCONA, A.A. 1970. Electron microscopic analysis of aggregation of embryonic cells: the structure and differentiation of aggregates of neural retina cells. **Developmental biology**, v. **23**, n. 1, p. 36- 61.

SHIRATORI, M. Ph.D. 2007. Fractionation and Characterization of a Peptone Used in CHO Cell Culture Processes. **Cell culture development work shop CHI (Cambridge health tech institute)**, 17-18.

SHEN, C. F.; HAWARI, J. e KAMEM, A. 2004. Micro quantitation of lipids in serum-free cell culture media: a critical aspect is the minimization of interference from medium components and chemical reagents. **Journal of Chromatography B.**, vol. **810**, p.119-127.

SILVA, F. S.; RAMOS, R. N.; ALMEIDA, D. C.; BASSI, E. J.; GONZALES, R. P.; MIYAGI, S. P. H.; MARANDUBA, C. P.; SANT'ANNA, O. A. B. E.; MARQUES, M. M.; BARBUTO, J. A. M.; CAMARA, N. O. S.; MARANDUBA, C. M. C. 2014. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHEDs) Induce Immune Modulatory Profile in Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Plos One**, **9 (5)**: e98050.

SKOPICKI, H.; FISHER, K. ; ZIKOS, D.; BLOCH, R.; FLOURET, G.; PETERSON, D. 1991. Multiple carriers for dipeptide transport: Carrier mediated transport of glycyl-L-proline I renal BBMV. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, **261(4)**, F670-F678.

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R. S.; WANG, S.; SHI, S. 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. **Journal of Endodontics**, **34 (2)**:166-171.

STAINES, D. ; PRICE, P. 2003. Managing serum requirements for cell culture. **Baltimore:GIBCO® Cell Culture**. p.87.

STOCKINGER, H. 1991. Serum-free culture medium for mammalian cells. **United State Patent n. 5.063**,157.

SVENNINGSEN, A.F.; SHAN, W.S.; COLMAN, D.R.; PEDRAZA, L. 2003. Rapid method for culturing embryonic neuron-glia cell cocultures. **Journal of Neuro Science Research** **72 (5)**, 565–573.

SOUZA, L.M. 2008. Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes. **Tese de Mestrado. USP.**

SZONDY Z, NEWSHOLME EA. 1989. The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of [3H]thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. **Biochem J** **261**:979–983.

TIRINO, V.; PAINO, F.; D'AQUINO, R.; DESIDERIO, V.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, G. 2011. Methods for the Identification, characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. **Stem Cell Review**, **7 (3)**: 608-615.

TSAO, Y. S., GOULD, S. L., ROBINSON, D. K. 2000. "Animal cell culture media", In: Spier, R. E. (eds), **Encyclopedia of Cell Technology**, John Wiley & Sons, New York.

UNCHERN, S. 1999. Basic techniques in animal cellculture. In: **Drug Delivery System Workshop**. Bangkok, Thailand. p.19-20.

VAN DER VALK, J., MELLOR, D., BRANDS, R., FISCHER, R., GRUBER, F., GSTRAUNTHALER, G., HELLEBREKERS, L., HYLLNER, J., JONKER, F. H., PRIETO, P., THALEN, M., BAUMANS, V., 2004. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology In Vitro** **18**, 1, 1-12.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; SVENNINGSEN, Å. F.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M.L.; GSTRAUNTHALER, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro**, **24(4)**, 1053-1063.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; MENDES, R. L.; SANTOS, A. A. D. 2003. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **39(1)**, 67-72.

VOGT, A.; MISHELL, R. I.; DUTTON, R. W. 1969. Stimulation of DNA synthesis in cultures of mouse spleen cell suspensions by bovine transferrin. **Experimental cell research**, v. **54**, n. 2, p. 195-200.

VON WULFFEN, W.; STEINMUELLER, M.; HEROLD, S.; MARSH, L. M.; BULAU, P.; SEEGER, W.; WELTE, T.; LOHMEYER, J.; MAUS, U. A. 2007. Lung dendritic cells elicited by Fms-like tyrosin 3-kinase ligand amplify the lung inflammatory response to lipopolysaccharide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **176 (9)**: 892-901

WADA, N.; WANG, B.; LIN, N.H.; LASLETT, A.L.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M. 2011. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. **Journal of periodontal research**, **46(4)**, 438-447.

WESSMAN, S. J., LEVINGS, R. L., 1999. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Developments in Biological Standardization* 99, 3-8.

WILKINS, J.; SHIRATORI, M.K.; BREECE, T. 2008. Biologically active c-terminal arginine-containing peptides. **U.S. Patent Application n. 12/231, 917.**

WIREN M, MAGNUSSON KE, LARSSON J. 1998. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocyte-like cell lines. **Internacional Biochemistry Cell Biology**30:1331–1336.

XIA Y, WEN HY, YOUNG ME, GUTHRIE PH, TAEGTMEYER H, KELLEMS RE. 2003. Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. **J Biol Chem** 278:13143–13150.

YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. 2010. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Therapy Research, 1 (5):** 1-10.

YOUNG VR, AJAMI AM. 2001. Glutamine: The emperor or his clothes? **Jouney Nutrition** 131:2449–2459.

WANG, J.; ALEXANDER, P.; WU, L.; HAMMER, R.; CLEAVER, O.; MCKNIGHT, S.L. 2009. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. **Science** 325: 435–439.

ZÄHRINGER, H., 2009. Leckerlis für die Zellen. **Laborjournal, vol. 4,** pp. 74-81.

ZIELSKE, J. V.; GOLUB, S. H. 1976. Fetal calf serum-induced blastogenic and cytotoxic responses of human lymphocytes. **Cancer research, 36(10),** 3842-3846.

ZOON, K. C. 1993. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. **Center for Biological Evaluation and Research, Food and Drug Administration,** Rockville, MD : 7-8.

ZURICH, M.-G.; MONNET-TSCHUDI, F.; COSTA, L.G.; SCHILTER, B.; HONEGGER, P. 2003. Aggregating brain cell cultures for neurotoxicological studies. **In: Tiffany Castiglioni, E. (Ed.), In Vitro Neurotoxicology: Principles and Challenges.** Humana Press, Totowa, NJ.