



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 102014006335-8 B1**



**(22) Data do Depósito:** 17/03/2014

**(45) Data de Concessão:** 19/04/2022

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA POPULAÇÃO ISOLADA DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA IMATURAS (IDPSCS) E USO REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 35/28; A61K 8/98; C12N 5/0775; A61P 9/00; A61P 13/12; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 15/03/2013 US 61/800,245; 15/03/2013 US 61/791,594.

**(73) Titular(es):** AVITA INTERNATIONAL LTD.; FUNDAÇÃO BUTANTAN.

**(72) Inventor(es):** IRINA KERKIS; SABINA GLOZMAN.

**(57) Resumo:** CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA IMATURAS MULTIFUNCIONAIS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS. A presente invenção é direcionada para as células-tronco de polpa dentária imaturas multifuncionais terapêuticas (IDPSCs) e composições de linhagem múltipla de IDPSCs. A invenção é adicionalmente direcionada para o uso das IDPSCs e composições para reduzir o risco de e/ou tratar doenças degenerativas ou para outros fins medicinais e estéticos.

**MÉTODO PARA PRODUZIR UMA POPULAÇÃO ISOLADA DE CÉLULAS-  
TRONCO DE POLPA DENTÁRIA IMATURAS (IDPSCs) E USO  
REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este documento reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente US 61/791.594, intitulado "CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA IMATURAS MULTIFUNCIONAIS OBTIDAS POR UM SISTEMA DE CULTURA A LONGO PRAZO, ROBUSTO" para Kerkis, que foi depositado em 15 de março de 2013, e, também, o benefício do Pedido Provisório de Patente US 61/800.245, intitulado "APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA IMATURAS MULTIFUNCIONAIS" para Kerkis, que foi depositado em 15 de março de 2013, os conteúdos de cada qual que são por este meio incorporados por referência para todos os efeitos.

**INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DO MATERIAL  
DEPOSITADO ELETRONICAMENTE**

[002] Neste documento é incorporada por referência em sua totalidade uma listagem de sequência de nucleotídeo/aminoácido legível por computador submetida simultaneamente com este e identificada da seguinte forma: Um arquivo com 10.865 byte ASCII (texto) chamado "Seq\_List", criado em 14 de março de 2014.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[003] A presente invenção refere-se a composições de células-tronco de polpa dentária imaturas multifuncionais (IDPSCs), métodos para gerar quantidade clinicamente útil de IDPSCs da polpa dentária (DP) de um paciente ou único doador nas primeiras passagens com o menor risco de perder sua "certificação (*stemness*)" para utilizar as células-tronco assim obtidas na terapia de células-tronco e uso clínico e estético de composições terapêuticas orientada de linhagem múltiplas de IDPSC para prevenir e tratar doenças degenerativas e sintomas medicinais e estéticos. Pelos métodos apresentados neste documento, uma população mista de IDPSCs

multifuncionais é obtida que é especialmente enriquecida com marcadores neuroepiteliais. Estas células se originam principalmente (preferencialmente) de um nicho não perivascular e são obtidos apenas por meio de cultivo prolongado de explantes de DP tratados não enzimaticamente.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[004] Nas últimas décadas atenção considerável tem sido dirigida pela comunidade científica para a derivação de células, em particular as células-tronco (SCs), mantendo a capacidade de se diferenciar em células de tecido específicas. Este interesse foi alimentado por uma forte necessidade e desejo de desenvolver novas abordagens de substituição tecidos e células para curar o corpo enfermo e restabelecer as células e funções de tecidos danificados e afitos e partes do corpo.

[005] SCs são encontrados em todos os organismos multicelulares. Eles têm a capacidade de se autorrenovar e se desenvolver em diferentes células especializadas. Células-tronco de mamíferos são classificadas em dois tipos gerais, células-tronco embrionárias (células ES) encontradas durante o desenvolvimento embrionário precoce e células-tronco adultas (ASCs) encontradas nos tecidos do organismo, em fases posteriores e ao longo da vida.

[006] ASCs, também chamadas de células-tronco somáticas; possuem as mesmas características básicas de todas as SCs. Ou seja, elas são capazes de autorrenovação indefinida, às vezes durante toda a vida do animal e diferenciação em tipos de células especializadas. Nos mamíferos, as principais tarefas de ASCs são sustentar e curar os tecidos nos quais onde elas estão localizadas. Elas permanecem como células indiferenciadas que podem ser ativadas após o dano tecidual ou outras condições para formar vários tipos de células e reparar o dano tecidual (Friedenstein A et al. (1974). Precursores para fibroblastos em diferentes populações de células hematopoiéticas como detectado pelo método de

ensaio de colônia in vitro. *Exp Hematol* 2:83–92).

[007] Adicionalmente, ASCs secretam um grande número de moléculas bioativas dentro do tecido que agem modulando a resposta inflamatória do microambiente de células, controlando a angiogênese e proliferação de células envolvidas no processo de reparação tecidual e são, portanto, também conhecidos como pericitos (Caplan AI (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 217:318-324).

[008] No entanto ASCs têm capacidade limitada para diferenciação em comparação com células-tronco embrionárias pluripotentes e geralmente podem diferenciar para formar apenas tipos de célula específica de seu tecido de origem. Em contraste às células-tronco embrionárias, células-tronco adultas não são capazes de construir um organismo inteiro.

[009] São células ES, existentes durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário (fase de blastocisto, por exemplo), que possuem plasticidade verdadeiramente alta e pluripotência capacitando-as a diferenciarem as células derivadas de todas as camadas germinativas (Evans, M. e Kaufman, M. (1981) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6). Após a reintrodução em um blastocisto, células ES podem recomeçar seu desenvolvimento regular e podem colonizar os tecidos germinativos e tecidos de embriões adicionais.

[010] Células de ES cultivadas podem conservar um estado indiferenciado durante um longo período e inúmeras divisões celulares. Por outro lado células de ES cultivadas também podem ser induzidas para diferenciar. Por exemplo, quando cultivadas em suspensão, células de ES cultivadas em suspensão formam agregados tridimensionais de células de ES pluripotentes conhecidos como "corpos embrioides" (Ebs), que suportam especificação de célula para células de todas as três linhas de germe (Ling, V. e Neben, S. (1997) *In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies.* *J. Cell Physiol.* 171, 104-5).

[011] Em virtude de suas células-tronco embrionárias de pluripotência alta as células-tronco teoricamente seriam células ideais para usar em um grande número de aplicações médicas novas. No entanto, o uso de células de ES gerou muita controvérsia e significativas preocupações éticas e legais dificultam sua utilização na terapia de células-tronco. Tratamento a base de ASCs é muito menos controverso, a medida que não exigem a destruição de embriões humanos. Além disso, ASCs não produzem os teratomas e são de baixa imunogenicidade.

[012] Por estas razões ASCs não embrionárias tornaram-se o foco de muita pesquisa e trabalho. Após isolamento e expansão in vitro, ASCs são conhecidas como células-tronco mesenquimais (MSCs). MSCs são multipotentes e preservam a sua capacidade in vivo para diferenciar in vitro em vários tipos de células, tais como ossos, cartilagens e músculos.

[013] Infelizmente, os desafios para o uso prático de células-tronco adultas na terapia são numerosos. Elas são encontradas apenas em número infinitesimal e é extremamente difícil isolá-las em quantidades úteis. Além disso, sua capacidade propagativa é relativamente baixa e podem conter várias aberrações de DNA.

[014] Outra dificuldade inerente e desafio para usar as MSCs em terapia é que a sua capacidade de diferenciação é extremamente dependente de condições adequadas de isolamento e cultura. Assim, é evidente que para as MSCs cumprirem o seu potencial para tratar um grande número de doenças devastadoras é necessário conseguir o controle sobre as configurações de produção em grande escala.

[015] Há diferentes métodos de aumento, mas como regra geral, por causa da sensibilidade inerente de células-tronco ao seu ambiente, processos de grande escala precisam permanecer substancialmente semelhantes ao seu processo de pequena escala original para a manutenção de atributos de qualidade crítica. Davie, N.L. et al., (2012) Streamlining Cell Therapy Manufacture from Clinical to Commercial Scale.

BioProcess International 10(3), 24-29. Assim, se as células cultivadas para estudos clínicos iniciais são cultivadas em superfícies planas (tais como T-frascos ou bandejas), em seguida, ao alcançar operações de grande escala, essas células precisarão ser cultivadas da mesma forma. Mas isso pode ser difícil de implementar e limitar a capacidade de produção mais tarde. Da mesma forma, se um ponto final desejado de um processo de aumento é cultivar células em micro portadores, então o produto utilizado em estudos iniciais idealmente devem também ter sido produzidos utilizando cultura de suspensão. Se não, células do produto final provavelmente não serão comparáveis àquelas mais tarde usadas na clínica.

[016] Estratégias de aumento mesmo historicamente previsíveis (por exemplo, da pequena a maior Nunc Cell Factory) podem transmitir algumas mudanças celulares indesejadas, tais como a perda ou ganho de um determinado marcador ou a secreção interrompida ou ativada de uma citocina particular. No entanto, às vezes é o caso que tais mudanças resultantes de metodologias de aumento são irrelevantes para a função clínica do produto. Se puder ser provado que as determinadas alterações não afetam o mecanismo proposto de ação ou causam efeitos colaterais adversos, então o novo processo é susceptível de ser aceito pelos órgãos reguladores. Agências reconhecem isto, que é porque produtos precisam ser demonstrados como "comparáveis" e não "idênticos".

[017] Com efeito, métodos melhorados para isolamento e propagação de MSCs indiferenciadas são considerados vitais para o desenvolvimento da terapia de células-tronco adultas novas e medicina regenerativa.

[018] Um número de processos são conhecidos previamente para a obtenção de um grande número de MSCs de diferentes tecidos enquanto preservando sua capacidade para diferenciação. (Kuehle, I., e Goodell, M .A. (2002). O potencial terapêutico de células-tronco de adultos, B.M.J. 325,

372-376; Pittenger, M.F. e Martin, B.J. (2004) e células-tronco mesenquimais e seu potencial como terapêutica cardíaca. *Circ. Res* 95, 9-20).

[019] No entanto, estes métodos resultam em isolamento de MSCs tendo limitada capacidade de diferenciação, dando origem a apenas uma variedade limitada de tipos de células. Além disso, desde que o número de ASCs em tecidos seja muito baixo esses métodos resultam em culturas não homogêneas, contendo um grande número de células, que não são células-tronco.

[020] As principais fontes de MSCs usadas atualmente na medicina são a medula óssea e cordão umbilical. No entanto, o isolamento das populações puras de SCs pluripotentes e em grandes quantidades destes tecidos é difícil. Fontes alternativas para o isolamento de células-tronco altamente pluripotentes e homogêneas são necessárias, que irá aumentar significativamente a eficácia do tratamento de várias doenças.

[021] Tal fonte provável inclui MSCs derivadas de dentes e tecidos dentários. Os dentes apresentam uma fonte prontamente acessível para a obtenção de MSCs úteis para a reparação e regeneração de tecidos. Semelhante a outros órgãos do corpo humano, os dentes e seus tecidos circundantes são compostos por populações mistas de células, que incluem MSCs/pericitos multipotentes, células progenitoras e diferenciadas (Arthur et al. (2008). Células-tronco de polpa dentária de humano adultas diferenciam-se em direção a neurônios funcionalmente ativos sob as sugestões ambientais adequadas. *Stem Cells* 26: 1787–1795; Giordano G et al. (2011) Stem cells from oral niches: a review. *Ann Stomatol (Roma)* 2:3-8).

[022] Para conduzir expansão in vitro significativa de terapias de células-tronco das células-tronco é necessário gerar quantidades suficientes dessas células para tratar doenças humanas. Neste momento, não há modo confiável conhecido para gerar eficientemente um grande

número de populações de células-tronco de polpa dentária relativamente pura em cultura.

[023] Uma das razões para isso é que o potencial regenerativo diminui com a idade e que isso tem sido atribuído às deficiências funcionais de células-tronco adultas. Células em cultura suportam senescência após certo número de divisões celulares através do qual as células ampliam e finalmente param a proliferação (Wagner W et al.(2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. PLoS One 4:e5846).

[024] Outra razão importante para a dificuldade na produção em larga escala de células-tronco de polpa dentária é que o próprio processo de expansão induz senescência de células-tronco e a perda de sua certificação (*stemness*), como mostrado por um declínio na capacidade proliferativa e de diferenciação. Baxter et al. demonstraram o efeito da expansão in vitro na capacidade replicativa das MSCs correlacionando sua taxa de perda do telômero durante expansão in vitro com seu comportamento in vivo. Eles mostraram que até mesmo os protocolos que envolvem expansão mínima induzem um rápido envelhecimento das MSCs, com perdas equivalentes a cerca de metade do total de sua vida útil. (Baxter MA et al. (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells 22, 675–682).

[025] Além disso, a cultura prolongada de células-tronco se correlaciona com maior probabilidade de alterações genéticas, que é prejudicial para a sua utilização segura em ensaios clínicos e em terapias futuras. Por exemplo, Wang et al sugerem que os animais e cultura de célula diferem em sua capacidade de realizar rearranjos genômicos como um meio de manter a integridade dos telômeros quando os telômeros se tornam criticamente encurtados. (Wang Yet al. (2005). Um aumento na troca de cromátide-irmã de telômero em células-tronco embrionárias de

murino possuindo telômeros criticamente encurtados. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 19;102(29):10256-60).

[026] É evidente que a chave para a terapia de células-tronco bem sucedida está relacionada ao processo de colheita de células e a sua expansão. Esse processo deve permitir idealmente a produção de grandes quantidades de células-tronco próprias do paciente enquanto, ao mesmo tempo, mantendo a sua máxima capacidade de diferenciação. Desta forma pacientes que crio-preservam células-tronco de seus dentes decíduos como crianças ou fornecem células-tronco de seus dentes do siso ou molares em fases posteriores da vida poderiam beneficiar a capacidade plena terapêutica dessas células preciosas.

[027] É muito importante desenvolver protocolos para DSCs que irão reduzir o risco de tumorigenicidade devido a anormalidades genéticas adquiridas durante múltiplas ASCs de passagem. Foi demonstrado em vários estudos pré-clínicos que o sucesso e a eficiência do transplante de células-tronco dependem do tipo de células-tronco, sua capacidade proliferativa e de migração e o sítio da injeção.

[028] Portanto, métodos para a produção em larga escala ilimitada e consistente de ASCs altamente potentes de excelente qualidade e risco reduzido de tumorigenicidade em passagens iniciais derivadas do mesmo doador são desejáveis para o desenvolvimento da terapia de células-tronco adultas.

### **RESUMO DA INVENÇÃO**

[029] Um objeto da presente invenção é fornecer composições terapêuticas e métodos de utilização de IDPSCs orientadas de linhagem múltipla, de multifuncionalidade de não tumorigênico e não imunogênicas em que referida orientação e não tumorigenicidade é comprovada in vitro e in vivo. Prova in vitro de orientação de linhagem múltipla e é provado pela expressão de marcadores multifuncionais e multifuncionalidade para várias linhagens de células e linhagem múltipla provada in vivo baseia-se no

potencial de enxerto in vivo de IDPSCs em vários tecidos e caracterizada por funcionalidades específicas do tecido. Multifuncionalidade in vivo de prova forte baseia-se no transplante de útero das IDPSCs em vários tecidos sem tumorigenicidade e imunogenicidade. Prova adicional de não tumorigenicidade é p53, gene supressor de tumor, expressão em LP-IDPSCs e necessária em número de passagem baixa após colheita de LP que evita mutações de cariótipo e, portanto, também reduz o risco de tumorigenicidade. Vantagem adicional de métodos divulgados de tratamento por composições de IDPSCs são potenciais de imunogenicidade reduzidos pelo fato de que referidas IDPSCs são negativas para antígenos de histocompatibilidade principal de HLA-ABC e HLA-DR (MHC), portanto, permitem o transplante alogênico.

[030] Multifuncionalidade e orientação de linhagens neuroepiteliais fortes de IDPSCs da invenção oferecem múltiplos usos para medicina regenerativa, especialmente no tratamento e prevenção das doenças de CNS (incluindo mas não limitada a doenças neurodegenerativas), tratar doenças renais, distúrbios do pâncreas (diabetes), doenças de pele (não limitadas pela cicatrização), sintomas de perda de cabelo e auxiliar funções reprodutivas em mulheres (melhorar o funcionamento no útero) e homens (melhorar a espermatogênese). Multifuncionalidade comprovada no útero da IDPSC n fornece um método para tratar ou aliviar os sintomas de diversas condições patológicas ou fisiológicas, incluindo, mas não limitado a, doenças neurodegenerativas, insuficiência cardíaca, isquemia miocárdica, isquemia do membro, distúrbios reprodutivos, sintomas estéticos, desordens imunológicas, diabetes, acidente vascular cerebral e doenças de pele, fígado e renais por administrar a composição de terapêutica, compreendendo concentrados de IDPSCs , suspensão, mistura como um ingrediente ativo biológico isolado ou como um complemento para ingredientes terapêuticos adicionais, tais como, mas não limitado a, células, agentes de ingredientes ativos farmacêuticos, ou biológicos ou naturais.

[031] Aspectos da presente divulgação baseiam-se em duas abordagens: o cultivo de explante de órgão e tecido, previamente conhecido e utilizado para avaliação do efeito tóxico de drogas, substâncias terapêuticas e agentes biológicos, para ensaios cancerígenos e/ou para testes de susceptibilidade. No entanto, ambas as técnicas em combinação foram usadas pela primeira vez na presente invenção para isolamento de células-tronco da polpa dentária, que em condições de cultura de célula de combinação utilizadas para o cultivo de células de ES, permitiu a descoberta de um novo método não enzimáticos de isolar uma população de IDPSC.

[032] As vantagens de alguns dos métodos apresentados nesta divulgação podem ser compreendidas através das explicações abaixo.

[033] Um objetivo para cultura *in vitro* de partes de órgãos ou um órgão inteiro é manter a arquitetura de tecido de cultura de órgãos. Por exemplo, o parênquima e estroma são conservadas, tanto em termos de sua estrutura e função, e, assim, a cultura de órgãos assemelha-se ao órgão *in vivo* em questão. Cultura do órgão é amplamente utilizada na oftalmologia, como o método de escolha para a preservação das córneas de doador humano. Uma segunda abordagem é a cultura do explante utilizado para isolamento de células. O tecido é isolado sob condições assépticas, picadas e as peças são colocadas em uma louça de cultura de células contendo meio de cultura. Cultura de explante é uma cultura em que as células são deixadas em sua matriz extracelular circundante que imita mais exatamente o ambiente *in vivo* e ao longo do tempo, as células progenitoras migram para fora do tecido e aderem à superfície da louça de cultura.

[034] Ambas as abordagens têm semelhanças, já que preservam os ambiente e nichos de células-tronco. No entanto, o tecido é exposto durante o tempo de cultivo para uma hipóxia que apresenta uma grande vantagem para manter o estado indiferenciado de células-tronco. Portanto, a

transferência mecânica da polpa dentária, que é um pequeno órgão e peças de DP, explantes, é uma estratégia para isolar continuamente MSC que mantêm suas características primordiais inalteradas após o isolamento.

[035] É interessante notar que a estratégia escolhida para o isolamento de IDPSC (explante), que são as células de origem da crista neural, também foi utilizado para isolamento de células-tronco de crista neural "genuínas" migratórias do tubo neural. É também interessante notar que a estratégia escolhida para o isolamento de CTIPD (explante), que são as células de origem da crista neural, foi também adotada para isolamento de células de crista neural do tronco migratórias usando o explante do tubo neural.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[036] **Figura 1** ilustra nichos de células-tronco na polpa dentária (à esquerda) e a produção de uma população mista de células tronco/progenitoras de migração que são isoladas em células-tronco de polpa dentária imaturas (IDPSCs).

[037] **Figura 2** ilustra nichos de células-tronco dentárias (DSC) em dentes decíduos. A) Dentes primários são compostos de uma coroa e uma raiz. A1) Uma seção longitudinal de um dente primário mostra o nicho perivascular (a) indicado com uma seta. B) Reabsorção da raiz em um dente primário é mostrada. B1) Uma seção longitudinal da coroa mostrada em B) demonstra dois outros nichos de DSC na zona tico de célula subodontoblástica (b) e a zona pobre de célula contendo fibras de nervo amielínicas e fibroblastos (c) e atravessada por capilares sanguíneos. C) A ampliação dos nichos de DSC de B1) é mostrada.

[038] **Figura 3** ilustra uma imagem capturada com microscopia de contraste de fase demonstrando a diferenciação da IDPSC em direção a linhagens neurais. A) e C) mostram IDPSC diferenciada isolada dos dentes decíduos (DD). B) e D) mostram IDPSC diferenciada isolada do dentes adultos (ou seja, dentes permanentes) (DA). Observe a diversidade

morfológica dos neurônios. 20X objetiva.

[039] **Figura 4** exibe imagens de IDPSC após a diferenciação neural capturada com microscopia de luz e mostrada com coloração de hematoxilina e eosina (HE). A) 40X objetiva. Escala da barra 50  $\mu\text{m}$ . (B) 100X objetiva. (C) IDPSC diferenciada com morfologia como neurônio. Espinhas dendríticas típicas podem ser observadas. Uma espinha dendrítica é uma pequena protrusão membranosa do dendrito de um neurônio que normalmente recebe uma entrada de uma única sinapse de um axônio. 60X objetiva. Escala da barra 40  $\mu\text{m}$ . (D-F) Grânulos de Nissl em neurônios (mostrados com coloração marrom escuro). 20X objetiva. Escala da barra 40  $\mu\text{m}$ .

[040] **Figura 5** ilustra análises de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) durante a diferenciação neuronal de IDPSC. Utilizou-se uma sonda de hibridização fluorescente vermelha para o cromossomo 21. Núcleos estão coloridos com DAPI e aparecem azuis. Observe a presença de células poliploides (4n e 6n) e núcleos normais (2n). Objetivas A), D) e E) 40X; B) 20X; C) 63X.

[041] **Figura 6** ilustra a quantificação de células poliploides durante diferenciação neuronal *in vitro* de IDPSC. As percentagens de núcleos de células com dois, quatro e seis sinais de sonda de hibridização são indicadas.

[042] **Figura 7** ilustra a expressão em marcadores de linhagem neuronal em IDPSC diferenciada. A) Expressão de Nestin (também conhecida como nestina) em IDPSC indiferenciada. B) Expressão de nestin em IDPSC após a indução de diferenciação. C) - E) expressão da beta-tubulina (também conhecida como beta-tubulina) em IDPSC que adquiriu uma morfologia neuronal. F) Expressão do marcador glial, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em IDPSC diferenciada. J) e H) Expressão de NeuN, um marcador de células neuronais maduras, em IDPSC diferenciada. DAPI (azul) foi usado para visualização nuclear. A) - B) 20X objetiva. C) - H) 40X

objetiva.

[043] **Figura 8** ilustra imagens microscópicas de estruturas do tipo neurosfera formadas de IDPSC diferenciado. A) e B) retratam imagens usando microscopia de contraste de fase. C) mostra imunofluorescência positiva para Nestin. Objetivas foram 40 X para A) e B) e 63 X para C).

[044] **Figura 9** ilustra a análise de RT-PCR de expressão de genes neuronais em IDPSC diferenciada (pista 1) e indiferenciada (pista 2). Pista 1 demonstra a presença de mRNAs para beta-tubulina III, neurofilamentos médios e GFAP. Pista 2 mostra a expressão de neurofilamentos médios. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um gene de limpeza que foi usado como um controle de carregamento.

[045] **Figura 10** ilustra um espectro de precursores derivados de IDPSC glial. IDPSC indiferenciada expressa vimentina. Após a diferenciação de astrócito, as células expressam um subconjunto de marcadores, tais como vimentina, CD44 e nestin. Astrócitos maduros expressam GFAP.

[046] **Figura 11** ilustra um espectro de células do tipo neurônio derivadas de IDPSC de LP. IDPSC de LP expressa nestin, um marcador precoce da linhagem neuroepitelial. Após a diferenciação, IDPSC altera sua morfologia e começa a expressar nestin e beta-tubulina III (progenitores neuronais). Neurônios imaturos expressam beta-tubulina III enquanto neurônios mais maduros expressam NeuN e neurofilamentos durante o período de maturação.

[047] **Figura 12** ilustra quantificação de matéria branca poupada. A) Área colorida de azul rápido Luxol (LFB) utilizada para a quantificação de matéria branca. B) O gráfico representa os valores médios de matéria branca poupada, apresentando valores mais elevados em grupos de células-tronco de polpa dentária imaturas de humano (IDPSC) (\*  $p < 0,05$ ). C) Diagrama de compressão de lesão da medula espinhal no nível de T9 (parte superior da figura) e o segmento da medula espinhal usado para

quantificação das seções seriais (parte inferior da figura). D) e E) imagens ilustrando seções da medula espinhal coloridas por LFB usado para quantificação de matéria branca poupada dos grupos subaguda + DMEM (D) e subaguda + IDPSC (E) (DMEM, médio de Eagle modificado da Dulbecco).

[048] **Figuras 13A-13D** ilustram quantificação do fator neutrófico derivado de cérebro de fatores tróficos imuno-rotulados (BDNF), beta de fator de crescimento do nervo (NGF), neurotrofinas-3 (NT-3) e neurotrofinas-4 (NT-4). Nota a coloração mais forte em IDPSC-(também conhecida como células-tronco humanas polpa dentária ou HPDC) animais tratados para todos os fatores tróficos analisados em comparação com animais tratados com DMEM, especialmente BDNF e NGF, que mostrou áreas imuno rotuladas mais fortemente tanto nos grupos subagudos como crônicos (\* $p < 0,05$ ; \* \*  $p < 0,01$ ). Grupos subagudos são indicados por barras brancas enquanto grupos crônicos são indicados por barras pretas.

[049] **Figura 14** ilustra seções semi-finas e ultra-finas de medulas espinais de animais tratados com DMEM subagudos A) – C) e os animais tratados com IDPSC de LP D) – I). Em A), uma seção de semitina, existem várias cavitações (setas vermelhas curtas). Em B) é mostrada uma célula de Schwann (seta branca sólida), com suas típicas lâminas basais (baixo-relevo (*inset*)) e, C) processos de astrócito (ponta da seta), e várias microcavitações (asteriscos) são indicadas. D) mostra uma seção de semi-fina de um animal tratado com IDPSC com uma morfologia mais preservada. E) mostra muitas fibras preservadas (setas brancas longas) e macrófagos (setas pretas curtas). Em F) Células de Schwann (setas sólidas) e axônios de mielinizantes de oligodendrócitos (seta preta longa) são vistas. G) mostra um exemplo de ilhas regenerativas e H) representa um neurônio de aparência saudável preservada com terminais intactos, fazendo contatos sinápticos no seu corpo de célula, que são mostrados na ampliação maior em I). DMEM: Meio de Eagle modificado da Dulbecco.

[050] **Figura 15** ilustra seções semi-finas e ultra-finas de medulas espinais de animais tratados com DMEM crônico- (A, C e E), e tratados com IDPSC de LP (B, D e F). A) Macrófagos (setas vermelhas sólidas). B) Fibras preservadas em matéria branca (setas longas) e macrófagos (setas vermelhas curtas). C) Células de Schwann (estrela) e muitas cavitações (asteriscos). D) Algumas fibras preservadas (setas brancas). E) Astrocitose intensa (ponta de seta) típica de uma lesão crônica. F) Corpo celular de neurônio preservado com muitos contatos sinápticos terminando nele (área retangular). DMEM: Meio de Eagle modificado da Dulbecco.

[051] **Figura 16** ilustra a análise funcional dos grupos tratados com DMEM e IDPSC de LP. O teste de mobilidade global mostrou uma progressão da mobilidade global dos grupos subagudos e crônicos 35 dias após o tratamento. Os animais tratados com IDPSC (B e E) andaram distâncias mais longas (linhas azuis) no campo aberto do que o fizeram animais tratados com DMEM (A e D) durante o período de avaliação.

[052] **Figura 17** ilustra progresso no tratamento de um caso leve de cinomose canina, uma doença viral, após transplante de IDPSC de LP. A) e B) mostram antes do transplante de IDPSC. C) e D) mostram um mês após uma única aplicação de IDPSCs.

[053] **Figura 18** ilustra o progresso no tratamento de um caso grave de cinomose canina, uma doença viral, após transplante de IDPSC de LP. A) e B) mostram antes do transplante de IDPSC. C) e D) mostram um mês após uma única aplicação de IDPSCs.

[054] **Figura 19** ilustra células do tipo de cardiomiócito (CM) obtidas de IDPSC de LP. A) Fusão espontânea de IDPSC diferenciada. B-C1) Fenótipo do tipo CM e morfologia de IDPSC diferenciada.

[055] **Figura 20** ilustra fusões de célula espontâneas de IDPSC de LP através da co-cultura com outros tipos de células. A), A1) e A2) mostram células de medula óssea de camundongo cruzadas com IDPSC. A) Imagem mesclada. A1) IDPSC. A2) Células da medula óssea de camundongo. B),

B1) e B2) mostram fibroblastos humanos cruzados com IDPSC. B) Imagem mesclada. B1) IDPSC. B2) Fibroblasto humano.

[056] **Figura 21** ilustra IDPSC de LP (verde) habitando o miocárdio de músculo em um modelo de rato de infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária.

[057] **Figura 22** ilustra os resultados de uma análise da fusão espontânea e potencial miogênica de IDPSC de LP em cães de distrofia muscular de Golden retriever (GRMD). Marcadores diferentes, tais como núcleo anti-humano, anticorpos de distrofina anti-humana e sonda fluorescente de DNA contra o cromossomo Y humano, provêm evidências de IDPSC de LP habitando o músculo do cão.

[058] **Figura 23** ilustra um enxerto de IDPSC de LP dentro da medula óssea de camundongos. IDPSC de LP foram reconhecidas por um anticorpo específico, e as células na medula óssea foram identificadas com Dil, uma mancha de membrana lipofílica.

[059] **Figura 24** ilustra a expressão de CK18 e beta integrina 1 (CD29) de marcadores de células de Sertoli em IDPSC de LP indiferenciada.

[060] **Figura 25** ilustra uma representação esquemática de transplante de IDPSC de LP em testículos de camundongo.

[061] **Figura 26** ilustra transplante de IDPSC de LP em testículos de camundongo fértil. Morfologia de IDPSC (A). IDPSC manchadas com Vybrant (B). (C, D) No dia 1 após o transplante, IDPSC foram detectadas principalmente no compartimento celular onde as células de Leydig estão normalmente localizadas (E). Barra de escala: (A,B,E) 20µm; (C) 100µm; (D) 50µm.

[062] **Figura 27** ilustra transplante de IDPSC de LP em testículos de camundongo fértil. (A, B) No dia 9 após transplante de IDPSC (vermelho), foram detectados nas regiões intratubular (IT) e tubular (TS) em testículos de camundongos férteis. A) Microscopia confocal: epi-fluorescência e

contraste de interferência digital (DIC). (B) Epi-fluorescência. DAPI (azul) foi usado para visualização nuclear. (C) Controle negativo; camundongos injetados com salina. Barras (A) 20  $\mu\text{m}$ ; (B, C) 100  $\mu\text{m}$ .

[063] **Figura 28** ilustra transplante de IDPSC de LP em testículos de um camundongo fértil. (A, B) No dia 9 estas células formaram grupos fluorescentes contendo células com diferentes morfologias observadas no lúmen central (B). Espermatozoides de camundongos são indicados por setas vermelhas (B, C). Alguns deles apresentam morfologia semelhante ao espermatozoide humano (setas brancas) (B, C). Barras (A-C) 20  $\mu\text{m}$ .

[064] **Figura 29** ilustra imagens de testículos de camundongos inférteis transplantados com IDPSC de LP. Localização de IDPSC foi observada na periferia de TS, que são enxertados na túnica albugínea (A, B). (C) A seta branca indica prováveis espermátides redondas, enquanto a seta vermelha indica as células germinativas primordiais. Na (D) presença de uma Tétrade uma quarta espermátide é mostrada com Vibrante (manchado de IDPSC). Em (D1) é mostrada outra Tétrade isolada do mesmo testículo de camundongo como um controle negativo. PI (vermelho) (C) e DAPI (azul) (D, D1) usado para visualização nuclear. Barras (A, B) 20  $\mu\text{m}$ ; (C) 10  $\mu\text{m}$ .

[065] **Figura 30** ilustra células do tipo espermátide derivada de IDPSC de LP mostradas em vermelho em diferentes estágios de maturação em camundongos férteis (A-D). (A) Espermátide redonda. (B-C) espermátides alongadas. Barras 10  $\mu\text{m}$ .

[066] **Figura 31** ilustra a identificação do fenótipo em espermatozoides humano e de camundongo. Algumas células de espermatozoides fluorescentemente rotuladas (mostradas em vermelho) com morfologia bastante semelhante ao espermatozoide humano foram detectadas (A-C). (D) Uma morfologia tipo espermatozoide humano. (E) Morfologia do espermatozoide de camundongo. Barras 10  $\mu\text{m}$ .

[067] **Figura 32** ilustra uma análise citogenética. Análise de FISH

usando uma sonda específica para cromossomo X humano confirmou a presença de apenas um sinal X dentro de algumas células que sugere uma redução de cromossomos, que ocorre durante a meiose. Observe que as células formam pares, que é consistente com o fato de que se células diploides dividiram as células haploides seriam situadas perto umas das outras. Barras de escala 5  $\mu$ m.

[068] **Figura 33** ilustra a fusão celular. (A e A1) citoplasma de IDPSC de LP coloridas com Vybrant em vermelho; observe a morfologia do núcleo (DAPI, azul) em (A1). Citoplasma de células germinativas de camundongo é colorido em verde (B) com um aumento maior no nucléolo (B1). (C) Célula com dois núcleos fundidos e citoplasma colorido com verde. (D) Uma célula com dois núcleos fundido e citoplasma colorido de vermelho. (E) Sobreposição entre (C) e (D).

[069] **Figura 34** ilustra as flutuações nos níveis de ureia durante o curso do transplante de IDPSC de LP, que ocorreu em pontos de tempo 4, 7 e 9.

[070] **Figura 35** ilustra as flutuações nos níveis de creatinina durante o curso de transplante de IDPSC de LP, que ocorreu em pontos de tempo 4, 7 e 9.

[071] **Figura 36** ilustra as flutuações nos níveis de eletrólitos (potássio, cálcio e fósforo) no decurso do transplante de IDPSC de LP, que ocorreu em pontos de tempo 4, 7 e 9.

[072] **Figura 37** ilustra uma apresentação macroscópica do rim de gato que recebeu terapia de IDPSC de humano. A) Diferença em tamanho entre esquerda (tamanho grande)), recebeu IDPSC e o rim direito. B) Neoformação de aparência irregular é evidente no rim esquerdo.

[073] **Figura 38** ilustra uma apresentação histológica dos rins esquerdo (A-A2) e direito (B-B2).

[074] Barras de escala; A-B2 = 200 $\mu$ m. Infiltração de sangue (vermelha) também pode ser observada em B1 e B2. Em B2 preservação

da célula endotelial glomerular é visível.

[075] **Figura 39** ilustra a presença de IDPSC em rim de gato. A) Imunocoloração de glomérulo positiva com um anticorpo anti-IDPSC (vermelho). B) - C) Nos túbulos renais, anticorpo anti-IDPSC reage com células tubulares renais (vermelho). Imagens mescladas por microscopia confocal: contraste de interferência digital + microscopia fluorescente. Núcleo colorido com DAPI (azul). Barras de escala: A = 200  $\mu\text{m}$ , B e C = 100  $\mu\text{m}$ .

[076] **Figura 40** ilustra uma apresentação histológica de remodelação de pele demonstrada pela coloração de Tricromo de Masson: A) - A2) Imagens representativas de animais que receberam EGFP-IDPSC de LP. B) - B2) Imagens representativas de animais que receberam apenas PBS. Objetiva 20X.

[077] **Figura 41** ilustra um enxerto de EGFP – IDPSC de LP (verde) na pele lesada. Núcleos foram coloridos com iodeto de propídio (PI) (vermelho). Microscopia confocal: Microscopia fluorescente (Fm), DIC e DIC + Fm. Apresentação histológica, coloração H & E. Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

[078] **Figura 42** ilustra imagens representativas dos animais que receberam apenas o PBS. Núcleos foram coloridos com PI (vermelho). Microscopia confocal: Microscopia fluorescente (Fm), DIC e DIC + Fm. Apresentação histológica, coloração H & E. Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

[079] **Figura 43** ilustra o potencial neuronal e da retina de diferenciação de EP e IDPSC de LP. IDPSC de EP são capazes apenas de seguir a diferenciação neuronal, mas não retinal, expressando os marcadores de início de diferenciação neuronal nestin e beta-tubulina III. IDPSC de LP expressa primeiros marcadores ou de diferenciação neuronal e ou retinal (Pax 6 e Chx-10). Crx, Nrl e rodopsina são marcadores neuronais retiniais tardios, que são expressos por IDPSC de LP diferenciada mas não pela IDPSC de EP.

[080] **Figura 44** ilustra diferenciação de IDPSC de LP em direção a células retiniais. A) – F) Estágios de diferenciação. Em F) o estágio final de diferenciação de células retiniais é apresentada preferencialmente por fotorreceptores. Após a diferenciação, o número de células diminui significativamente. G) Linhagem do tempo de diferenciação.

[081] **Figura 45** ilustra a IDPSC de EP, neuroesferas aderentes, que não foram capazes de progredir através de diferenciação retinal. A) 10 X B)-D) 40 X.

[082] **Figura 46** ilustra IDPSC de LP, neuroesferas aderentes, que foram capazes de progredir através de diferenciação retinal. A) 10X; B)-D) 40X.

[083] **Figura 47** ilustra diferenciação neuronal de IDPSC de EP. A) - B) Contraste de fase mostrando células com morfologia tipo glial – 10X objetiva. C) - D) imunofluorescência mostrando a expressão da  $\beta$ -tubulina-III. C) 10X objetiva. D) 60X objetiva. E) - H) Expressão de GFAP – 40 X. E) imuno coloração de GFAP do núcleo do corpo e da célula. F) Núcleos coloridos com DAPI. G) Brightfield demonstrando a morfologia das células tipo gliais. H) Sobreposição de todos os filtros (DAPI + rodamina, Brightfield).

[084] **Figura 48** ilustra a expressão de CD73 (A, B) e vimentina (D, E) por IDPSC indiferenciada. C) – F) Controles de anticorpo secundário. Núcleos foram coloridos com DAPI (azul).

[085] **Figura 49** ilustra imunofluorescência e falta de expressão de marcadores específicos de células da retina como Pax-6, Chx-10, Crx, Nrl, calbindina e rodopsina em IDPSC de LP indiferenciadas.

[086] **Figura 50** ilustra citometria de fluxo e falta de expressão de marcadores específicos de células retiniais como Pax-6, Chx-10, Crx, Nrl, calbindina e rodopsina em IDPSC de LP indiferenciadas.

[087] **Figura 51** ilustra IDPSC de LP diferenciada mostrando diferentes tipos de morfologia neuronal, como células do tipo neurônio e

gânglio.

[088] **Figura 52** A) - B) Neuroesferas secundárias em suspensão – objetiva 20X. C) - D) Neuro-esferas secundárias aderidas – objetiva 10X. E) - F) Morfologia do tipo roseta – objetiva 20X.

[089] **Figura 53** ilustra expressão de CD73 em neuroesferas de IDPSC de LP diferenciadas e neurônios migratórios (A-F). Em (B) algumas células, que são negativas para este marcador, podem ser observadas.

[090] **Figura 54** ilustra expressão de Pax6 em células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizados em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-Pax-6 mostrou imunocoloração positiva em 50% das células diferenciadas.

[091] **Figura 55** ilustra a expressão de Chx10 em células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-Chx-10 mostrou imunocoloração positiva em 80% das células diferenciadas.

[092] **Figura 56** ilustra a expressão de Crx em células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Maior ampliação mostrou a localização nuclear desta proteína. Anticorpo anti-Crx mostrou imunocoloração positiva em 80% das células diferenciadas.

[093] **Figura 57** ilustra a expressão de NRL (localização nuclear e perinuclear) nas células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-NRL mostrou imunocoloração positiva em 20% de células diferenciadas.

[094] **Figura 58** ilustra a expressão de calbidina (localização de citoplasma) em células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-calbindina mostrou imunocoloração positiva em 20% de células diferenciadas.

[095] **Figura 59** ilustra a expressão de recoverina (localização de

citoplasma) em células precursoras retiniais derivadas de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-recoverina mostrou imunocoloração positiva em 20% de células diferenciadas.

[096] **Figura 60** ilustra expressão da rodopsina (localização de citoplasma) em células precursoras retiniais derivada de IDPSC de LP, que são organizadas em estruturas do tipo neuroesfera. Anticorpo anti-rodopsina mostrou imunocoloração positiva em 20% de células diferenciadas.

[097] **Figura 61** ilustra um Esquema 1 exemplificando as trompas uterinas do modelo experimental: o grupo de fetos tratados foi em 1, 3, 4 e 5 da trompa uterina direita (Cud); estes fetos receberam transplante de IDPSC de LP de EGFP. O grupo de controle de fetos esteve em 2 e 7 da trompa uterina esquerda (Cue); estas foram coletadas para o controle experimental.

[098] **Figura 62** ilustra a quantificação de enxerto de IDPSC de LP de EGFP e avaliação destas células de proliferação após transplante realizado por citometria de fluxo A, B) Quantificação de IDPSC de LP de EGFP de enxerto em um fragmento de tecido pulmonar. A) anticorpos anti-IDPSC (52,8%) e B) anti-HuNu (50,2%). C) Avaliação esquemática de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular após transplante em feto de cachorro. D) Análise quantitativa e comparativa de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular.

[099] **Figura 63** ilustra a quantificação de enxerto de IDPSC de LP de EGFP e avaliação destas células de proliferação após transplante realizado por citometria de fluxo A, B) Quantificação de IDPSC de LP de EGFP de enxerto em um fragmento de tecido muscular. A) anticorpos anti-IDPSC (52,8%) e B) anti-HuNu (50,2%). C) Avaliação esquemática de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular após transplante em feto de cachorro. D) Análise quantitativa e comparativa de

IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular.

[0100] **Figura 64** ilustra a quantificação de enxerto de IDPSC de LP de EGFP e avaliação destas células de proliferação após transplante realizado por citometria de fluxo A, B) Quantificação de IDPSC de LP de EGFP de enxerto em um fragmento de tecido renal. A) anticorpos anti-IDPSC (42,3%) e B) anti-HuNu (31,3%). C) Avaliação esquemática de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular após transplante em feto de cachorro. D) Análise quantitativa e comparativa de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular.

[0101] **Figura 65** ilustra a quantificação de enxerto de IDPSC de LP de EGFP e avaliação destas células de proliferação após transplante realizado por citometria de fluxo A, B) Quantificação de IDPSC de LP de EGFP de enxerto em um fragmento de tecido cerebral. A) Anticorpos anti-IDPSC (13,1%) e B) anti-HuNu (13,4%). C) Avaliação esquemática de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular após transplante em feto de cachorro. D) Análise quantitativa e comparativa de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular.

[0102] **Figura 66** ilustra a quantificação de enxerto de IDPSC de LP de EGFP e avaliação destas células de proliferação após transplante realizado por citometria de fluxo A, B) Quantificação de IDPSC de LP de EGFP de enxerto em um fragmento de tecido maternal de placenta. A) Anticorpos anti-IDPSC (64,8%) e B) anti-HuNu (65,6%). C), D) Avaliação esquemática de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular após transplante em feto de cachorro. E,F) Análise quantitativa e comparativa de IDPSC de LP de EGFP em diferentes fases do ciclo celular.

[0103] **Figura 67** ilustra expressão da proteína humana OCT3/4 (vermelho) em IDPSC de LP de EGFP (verde) enxertada entre fibras musculares do miocárdio canino fetal (A1-A3). A1-sobrepondo-se entre Oct3 / 4 e IDPSC de LP de EGFP demonstrando localização citoplasmática e nuclear A2) Expressão de proteína de EGFP em IDPSC de LP. A3)

Imunocoloração positiva para Oct  $\frac{3}{4}$  mostrando localização do tipo miócito. A1-A2=Fcm. A3-Fcm+CID. Barra de escala: A1-A3=5 $\mu$ m.

[0104] **Figura 68** ilustra uma análise de citometria de fluxo. Expressão de marcadores de células indiferenciadas (células de MSCs e ES) em IDPSC de LP de EGFP enxertada no miocárdio. A) controle de volume da célula. B-D) Expressão de Oct3 / 4-21.5% (C) CD146- 0,0% e (D)  $\beta$ 1-integrina-0.0%.

[0105] **Figura 69** ilustra uma análise de citometria de fluxo. Expressão de marcadores de células indiferenciadas (MSCs e células de ES) em IDPSC de LP de EGFP enxertadas no tecido muscular esquelético - Biceps. A) Expressão de Oct3 / 4 (45,4%) (B) Expressão de CD146 (0,4%) e (C) expressão de  $\beta$  1-integrina (36,7%).

[0106] **Figura 70** ilustra uma análise de citometria de fluxo. Expressão de marcadores de células diferenciadas em tecido cardíaco. A expressão positiva das proteínas cardíacas: miogenina (A), cardiotina (C) e negativa para CK-18 (B). Observamos expressão positiva de CD45 +, cuja quantidade varia no miocárdio (D) e no arco aórtico (E).

[0107] **Figura 71** ilustra uma análise de citometria de fluxo. Expressão de marcadores de células diferenciadas no tecido muscular esquelético - bíceps femoral. A expressão positiva das proteínas musculares: (A) Myo D1, (B) 7,5%Miogenina, (C) CK-18 com 7,7% e (D) 12,0% com CD45.

[0108] **Figura 72** ilustra expressão de proteína Oct3 / 4 (vermelha) humana em IDPSC de LP de EGFP (verde) enxertada no tecido canino de placenta fetal materno (A1-A3). A1) Imunocoloração positiva para Oct 3/4. A2) fluorescência direta de GFP observada em IDPSC de LP, A3) Sobreposição entre Oct3 / 4 e IDPSC de LP de EGFP é observada. FCM CID = A1 + A2-A3 = FCM; Barras de escala: A1-A3 = 10 $\mu$ m.

[0109] **Figura 73** ilustra uma análise de citometria de fluxo. Expressão de marcadores de células indiferenciadas (MSCs e células de ES) em IDPSC de LP de EGFP no tecido de placenta. A) Controle de volume de

células (B) Expressão de proteínas Oct3 / 4 com 12,6% (C) CD146 com 2,5% e (D)  $\beta$ -integrina com 18,3%.

[0110] **Figura 74** ilustra aumento de IDPSCs. Horizontalmente, o processo de emplacamento de DP *in vitro* (Dia 0, P0) seguido por aderência de DP e desenvolvimento de células (Dia 3-4) é mostrado. Este processo é seguido por tratamento enzimático (P1) das células e formação de várias colônias (CFU-f: Unidades Formadoras de Colônia-fibroblasto). Depois de 5 dias, tratamento enzimático é realizado para colher uma população de IDPSCs derivadas de colônias múltiplas (P2). Em seguida, expansão *in vitro* de IDPSCs (P3) é executada. Os números acima de cada prato na figura representam as quantidades aproximadas de IDPSCs colhidos em cada passagem. Verticalmente, o mesmo processo é mostrado ainda que após várias transferências mecânicas de DP.

[0111] **Figura 75** ilustra estratégias de isolamento, expansão *in vitro* e formação de banco SHED e IDPSC. O processo de isolamento de SHED por tratamento enzimático de emplacamento *in vitro* de SHED, DP (dia 0, P1) e formação de múltiplas colônias em uma população heterogênea é mostrado à esquerda. O processo de isolamento de IDPSC, mostrado à direita, inclui emplacamento *in vitro* de DP (Dia 0, P0) seguido por aderência de DP e desenvolvimento de células (Dia 3-4). Aumento de IDPSCs é um processo que inclui tratamento enzimático (P1) das células e formação de várias colônias (CFU-f: Unidades Formadoras de Colônia-fibroblasto). Depois de cerca de 5 dias, tratamento enzimático é realizado para colher uma população derivada de colônias múltiplas IDPSCs (P2). Em seguida, expansão *in vitro* de IDPSCs (P3) é executada. Os números acima dos frascos de cultura de célula na figura representam as quantidades aproximadas de IDPSCs colhidas em cada passagem. Verticalmente, o mesmo processo é mostrado ainda que após várias transferências mecânicas de DP.

[0112] **Figura 76** ilustra polpa dental e IDPSCs. A) DP altamente

vascularizada (setas pretas) apenas após a extração. B) Cultura de explantes de DP com IDPSCs em desenvolvimento. C) Cultura de IDPSCs na 1ª passagem. D) IDPSCs mostrando morfologia de células do tipo ES com um grande núcleo. E) IDPSCs mostrando morfologia do tipo MSC com vários pseudópodos. F) IDPSCs mostrando morfologia uniforme, assemelhando-se a células de ES e MSCs. G) Análise de cariótipo de IDPSCs (LP) mostrando cromossomos em pares e ordenados por tamanho e posição não revelou qualquer alteração numérica em número de cromossomos, como mostrado pela análise de banda de rotina G. Figuras 3A-3C e 3G foram geradas com microscopia de luz, enquanto figuras 3D – 3F resultou de microscopia eletrônica de transmissão. Ampliação para figura 3A = 20 X e para Figura 3G = 63 X; as barras de escala são para Figura 3B = 20 mm; para figuras 3C e 3F = 10 mm; e para figuras 3D e 3E = 3 mm.

[0113] **Figura 77** ilustra imunocoloração de BrdU de DP. A) DP cerca de 6 horas após emplacamento em meio de cultura. B) DP cerca de 48 horas após o cultivo in vitro. C) DP cerca de 72 horas após o cultivo in vitro. D) DP sem tratamento enzimático. E) DP com tratamento enzimático, mostrando que a camada de célula externa de DP é destruída por tal tratamento. Microscopia de luz foi usada para todas as imagens. As barras de escala nas figuras 4A - 4C = 20µm e em 4D-4E = 50 µm.

[0114] **Figura 78** ilustra expressão de nestin, STRO-1, vimentina e Oct3/4 em DP. Figuras 5A - 5H mostram expressão de nestin na zona rica em células (figuras 5A - 5C), a zona livre de célula (figuras 5D-5F) e na camada odontoblástica (figuras 5G - 5H). A) Múltiplas células positivas de nestin podem ser observadas. Setas pretas aqui e abaixo indicam células imunopositivas, e as setas brancas indicam células imunonegativas. B) Aparentemente MSCs indiferenciadas mostram localização de citoplasma de nestin. C) Células positivas de nestin com duas morfologias distintas: células do tipo epitelial (tipo ES) e células do tipo fibroblastos. D) Nestin

apresentando coloração de filamento intermediário no plexo nervoso. E) Um pequeno capilar com duas células positivas de nestin coloridas intensamente. F) Mesmo que em E) com células positivas de nestin na lateral do capilar (seta). G) e H) obontoblastos positivos em nestin podem ser observados. I) Controle negativo: utilizou-se apenas anticorpo secundário. J) células positivas de STRO-1 dentro de capilares (nicho perivascular) na zona livre de célula. K) Imunocoloração de STRO-1 muito pobre foi observada dentro do plexo do nervo da zona livre de célula. L) e M) Localização de célula positiva em vimentina (setas pretas) em zonas ricas em célula (L) e livres de célula (M). N) - Q) Localização de células positivas de Oct3/4 em zonas rica em célula (N) e livres de célula (O-Q). Microscopia de luz foi usada com barras de escala para 5A, 5D e 5F-5P = 20µm; e para 5B, 5C e 5Q = 5µm.

[0115] **Figura 79** ilustra a caracterização de EP e LP de IDPSCs. Figuras 6A1–6F1) Citometria de fluxo mostrando o EP de IDPSCs, que expressou altamente tais marcadores como SH2/CD105 (A1); SH3/CD73 (B1); Nestin (C1); vimentina (D1); fibronectina (E1). F1) Expressão baixa de Oct3/4 no EP; A2–F2) Citometria de fluxo mostrando LP de IDPSCs, que expressou os mesmos marcadores como EP. F2) Expressão mais elevada de Oct3/4 em LP do que em F1. A3–F3) imunofluorescência de LP de IDPSCs utilizando os mesmos marcadores como em (A2 – E2). F3) Localização nuclear de Oct3/4 pode ser observada. A3–F3) Epi-fluorescência, núcleos coloridos com DAPI (azul). Escala de barras para A3, B3, E3 e F3 = 5 µm e para C3 e D3 = 10 µm.

[0116] **Figuras 80A-D** ilustram expressão de Oct3/4 em populações de IDPSC cada uma isolada de quatro doadores não relacionados. A proporção de células positivas de Oct3/4 em cada população foi A) 25%; B) 47%; C) 12%; D) 5%, respectivamente.

[0117] **Figura 81** ilustra a taxa de proliferação e expressão de gene de IDPSCs depois de cultivo em três diferentes meios de cultura. A) Curva de

proliferação de LP antes de criopreservação; B) Curva de proliferação de LP após criopreservação. C) Expressão de gene de LP após criopreservação.

[0118] **Figura 82** ilustra os perfis de expressão de citometria de fluxo de IDPSC. A-B) Imunocoloração positiva de IDPSC de CD105 e CD73 para marcadores de células de ES humanas. C-D) Controles de IgG1 negativos adequados. E-G) Falta de expressão de marcadores endoteliais e hematopoiéticos tais como CD34, CD45 e CD43 por IDPSC. H) Imunocoloração positiva para CD13. Ficoeritrina (PE) e anticorpo secundário conjugado de FITC foram usados.

[0119] **Figura 83** ilustra os perfis de expressão de citometria de fluxo de IDPSC. A-b) Falta de expressão do HA-DR e HLA-ABC por IDPSC. C-H) Imunocoloração positiva para CD44 (86%), CD117 (80%), CD90 (100%), CD29 (99,5%), Nestin (99,2%) e vimentina (95,6%).

[0120] **Figura 84** ilustra citometria de fluxo e análise de RT-PCR de IDPSCs. A-E) Perfis de expressão de citometria de fluxo para fatores neurotróficos BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), GDNF (fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial), NGF- $\beta$  (fator de crescimento do nervo), NT-3 (neurotrofina-3), NT-4/5 (neurotrofina-4/5). F) Perfil expressão de citometria de fluxo para p75 por IDPSC. G) Análise de reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) da expressão dos fatores neurotróficos e p75 em IDPSC. Pista 1 – modelo de cDNA; Pista 2 – controle negativo, nenhuma transcriptase reversa; Pista 3 – Controle negativo, nenhum modelo. H) Análise de RT-PCR de expressão de p75; GAPD – gene das limpeza.

[0121] **Figura 85** ilustra IDPSC humana indiferenciada mostrando imunocoloração positiva com anticorpos específicos humanos contra as células-tronco límbicas e epitélio corneano. A) Reação imuno-positiva com p63 (verde) em localização nuclear de hIDPSC; B) imagem mesclada de coloração de p63 com núcleos coloridos com DAPI; C)  $\beta$ 1 integrina

apresenta localização na membrana; D) coloração de Vimentin, um filamento intermediário; E) Coloração de Conexina 43 na membrana celular; F) Coloração de ABCG2 na membrana plasmática; G) Coloração com um anticorpo K3/12 mostrou fraca imunocoloração positiva; H) Controle negativo de hIDPSC com anticorpo primário omitido e hIDPSC incubada com anticorpo secundário. Microscopia confocal foi usada para A), microscopia fluorescente (Fcm) para D)–G) Fcm, e Fcm + contraste de interferência diferencial (Epi + DIC) para H). Núcleos coloridos com DAPI são mostrados em azul. Barras de escala = 50  $\mu$ m. I) análise de RT-PCR de expressão de marcadores de células-tronco límbicas em hIDPSC: Pista 1, progressão 100 bp; Pista 2, tecidos da córnea humanos; Pista 3, tecido humano límbico; Pista, 4 hIDPSC. Análises de RT-PCR demonstraram presença de ABCG2, conexina 43 e mRNAs de K12 em hIDPSC, enquanto aqueles de K3 não foram encontrados em hIDPSC.

[0122] **Figura 86** ilustra expressão de marcadores de células ES em IDPSC. A) Análise da reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) de Oct3/4, Nanog, SOX2 e p53. B-C1) Reações imunopositivas com Oct3/4 e Nanog (verde) em hIDPSC com localização nuclear; B1 e C1) imagens mescladas, mostrando núcleos coloridos com DAPI. Ampliação 100 X. D) ensaio de PCR quantitativo mostrando a expressão percentual relativa de Oct3/4, Nanog, SOX2 em IDPSC em comparação com as células-tronco humanas de epitélios (hESC).

[0123] **Figura 87A** ilustra imagens de géis de agarose com produtos de RT-PCR para vimentina, tenascina-C, colágeno tipo 1 e fibronectina amplificada de hIDPSCs isoladas de dentes decíduos (DL-1 e DL-4) e de um terceiro molar (DL-2). **Figura 87B** ilustra uma análise de densitometria das bandas mostrada na **figura 87A**.

[0124] **Figura 88** ilustra imagens de imunofluorescência representativas de (A) vimentina, (B) colágeno tipo I, (C) fibronectina e (D) tenascina-C em células de DL-1 (hIDPSCs isoladas de um dente decíduo).

(A) Vimentina aparece como feixes em onda de filamento ramificado para fora do corpo central para alcançar os domínios periféricos da célula. (B) Colágeno do tipo I é revelado como pontos espalhados por todo o citoplasma com uma maior concentração em torno da área perinuclear. Fibronectina (C), bem como tenascina-C (D) aparece como pequenos pontos homoganeamente distribuídos por todo o citoplasma (ampliação original: 400X).

[0125] **Figuras 89A-B** ilustram a quantificação da expressão de p53 e **Figuras 89-C-D** ilustram a quantificação da expressão de CD44 em duas populações de IDPSC independentes isoladas de diferentes doadores. p53 foi expressa em 99,5% e 99,4% das células de IDPSC das duas populações enquanto CD44 foi expressa em 98,5% e 98,6% das células de IDPSC das duas populações.

[0126] **Figura 90** ilustra expressão da proteína de SOX2 em IDPSC, depois de vários ciclos. **Figura 90a** ilustra expressão da proteína de SOX2 em IDPSC depois de 15 ciclos de transferência mecânica e depois de cultura in vitro, passagens 2 (A) e 5 (B). Figuras 90A1 e 90B1 demonstram a localização intracelular dependente de célula de passagem de SOX2: A1-nuclear, A2-perinuclear. **Figura 90b** ilustra expressão da proteína de SOX2 em IDPSC depois de 45 ciclos de transferência mecânica e após cultura in vitro, passagens 2 (A) e 5 (B).

[0127] **Figura 91a** ilustra expressão de proteínas de SOX1 e  $\beta$ -tubulina na população final (LP) de neurônios derivados de hIDPSC. A. Núcleo (seta branca) de neurônios colorida com DAPI; A2. Imunocoloração positiva para SOX1 observada no núcleo (seta branca) dos neurônios; imunocoloração positivo em A3 para  $\beta$ -tubulina; A3. Imagens mescladas A-A2; A4. Grande ampliação de baixo-relevo (*inset*) em A3 demonstra a superposição de DAPI e SOX1 no núcleo dos neurônios (seta branca). Epifluorescência, barra de escala = 5 $\mu$ m. **Figuras 91b-e** ilustram enriquecimento de LP de hIDPSC com progenitores neurais e neurônios

após 15, 30 e 45 ciclos de transferência mecânica de polpa dentária e indução de diferenciação neural. A. Porcentagem de células negativas de SOX1, núcleo colorido apenas com DAPI (azul). Células positivas em SOX1 são apresentadas em verde. B. Porcentagem de células negativas de  $\beta$ -tubulina, núcleo colorido apenas com DAPI (azul). Células positivas de  $\beta$ -tubulina são apresentadas em vermelho.

[0128] **Figura 92a** demonstra um núcleo de neuroblastos de IDPSC positivamente imunocoloridos com anticorpo anti-BrdU e corpos neuronais, que reage positivamente com a classe de  $\beta$ -tubulina III.

[0129] **Figura 92b-c** mostra o enriquecimento da população de IDPSC diferenciada com neuroblastos um pouco diferenciados após números de ciclo crescentes de transferência mecânica de DP.

[0130] **Figuras 93a** ilustram enriquecimento de LP de hIDPSC com progenitores neurais e neurônios após 15, 30 e 45 ciclos de transferência mecânica de polpa dentária e indução de diferenciação neural. Células positivas em BrdU apresentam vermelho e núcleo verde de SOX2, que também são coloridos com DAPI (azul). **Figura 92b** demonstra a porcentagem de células positivas de BrdU e SOX2, mostrada em relação com o núcleo colorido com DAPI (azul).

[0131] **Figura 94a** ilustra um resumo gráfico de Cimadamore et al., 2011. **Figura 94b** ilustra um resumo de uma modalidade divulgada neste documento.

[0132] **Figura 95** ilustra coexpressão dos marcadores neurais em neuroblastos derivados de IDPSCs que formam neuroesferas e rosetas. A) Expressão de RAR-alfa (verde) dentro de neuroblastos derivados de IDPSCs induzidos para a diferenciação neural. B) e C) Expressão de CD271 (P75) em neuroesferas e neurônios diferenciados, respectivamente. D) Expressão de beta-3-tubulina. E) Anticorpo de NeuN, localização nuclear em neuroesferas. F), G) e H) Dineína – Lis1 - Ndel expressão complexa. I) e J) mielina P2 e expressão de O4, respectivamente. K) Expressão de

sinaptofisina. L) Expressão de CD146 e no M) controle. Barra de escala = 10µm, núcleo colorido com DAPI (azul).

[0133] **Figura 96** ilustra cariótipos masculinos de IDPSC de LP cultivadas in vitro em passagens cedo e tarde.

[0134] **Figura 97** ilustra um efeito da inoculação i.p. de IDPSCs na produção de citocinas pelas células pulmonares de camundongos C57Bl/6 i.t. infectados com cepas de Mtb e M. bovis diferidas em virulência.

[0135] **Figura 98** ilustra tecido de polpa dentária de dente do siso e coloração imuno-histoquímica para CD105. A. Aspecto geral do tecido, coloração de HE; a seta indica o nicho perivascular e a estrela indica o plexo do nervo. Reação de controle negativo: utilizou-se apenas anticorpo secundário. B. Coloração positiva para CD105, observada em plexo perivascular (seta preta) e vascular (seta laranja). C, D, F e G, mesmo em B, em ampliação maior. H. Coloração positiva para CD105 - plexo do nervo. Contracolorido com hematoxilina e eosina (HE).

[0136] **Figura 99** ilustra tecido de polpa dentária de dente do siso e coloração imuno-histoquímica para CD73 - SH3 e SH4. A. Aspecto geral do tecido, coloração de HE; seta indica o nicho perivascular. B. C. Coloração positiva para SH3 observada em vascular (seta preta) e perivascular (seta laranja). D - plexo de nervo, símile de células neuronais. E, F - coloração muito fraca para SH-4.

[0137] **Figura 100** ilustra tecido de polpa dentária do siso e coloração imuno-histoquímica para N-caderina (AC), ABCG2 (D, E) e Nanog (F). A. Aspecto geral do tecido, coloração de HE, coloração positiva para N-caderina. B, C. Maior aumento, coloração positiva para N-caderina observada no nicho perivascular (seta preta) (B) e sítio de pericitos (seta laranja) (C). D, E, expressão positiva de ABCG2 mostra a localização na membrana (seta preta). F. Coloração positiva para Nanog - fator de transcrição, menos intensa em comparação com ABCG2, localização citoplasmática (seta preta).

[0138] **Figura 101** ilustra análise comparativa de dente do siso de tecido de polpa dentária de coloração imuno-histoquímica para CD105 + e + CD73/SH3 e N-caderina. A. Tecido de aparência geral, coloração de HE, marcando CD105 +. B Aparência geral do tecido, coloração de HE, marcando CD73/SH3 +. C Mesmo que em (A), maior aumento. Nicho perivascular: seta preta indica células endoteliais, seta vermelha - pericitos. Mesmo em D. C. (B) maior aumento. Nicho perivascular: seta preta indica as células endoteliais. E a expressão positiva para N-caderina. Seta vermelha indica localização de pericitos, seta preta - células endoteliais.

[0139] **Figura 102** ilustra morfologia de fibroblastoide de células imunopositivas para CD105 (A) e células neuronais imunopositivas para o fac-símile de CD73/SH3 +. Setas pretas.

[0140] **Figura 103** ilustra uma região dorsal de um camundongo nude sem formar massas de células e/ou teratoma após a aplicação subcutânea de IDPSC humana.

[0141] **Figura 104** ilustra um terceiro dente molar.

[0142] **Figura 105** ilustra um fluxograma exemplar para um processo de liberação do lote para escala industrial de hIPDSC pelo método de LP para obter quantidades clinicamente relevantes para múltiplas dosagens de pacientes.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0143] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente, incluindo quaisquer figuras e apêndices, estão incorporadas neste documento por referência na mesma medida como se cada publicação individual ou pedido de patente indicado especificamente e individualmente para ser incorporado por referência.

[0144] A seguinte descrição inclui informações que podem ser úteis em aspectos de compreensão das divulgações. Não é uma admissão de que quaisquer das informações providas neste documento são estado da técnica ou relevantes para as invenções reivindicadas atualmente, ou que

qualquer publicação especificamente ou implicitamente referenciada é estado da técnica.

[0145] Como usado aqui, o verbo "compreender" como é usado nesta descrição e nas reivindicações e suas conjugações são usados em seu sentido não limitante para significar itens seguintes à palavra são incluídos, mas itens que não expressamente mencionados não são excluídos. Além disso, a referência a um elemento pelo artigo indefinido "um" ou "uma" não exclui a possibilidade de que mais de um dos elementos estão presentes, a menos que o contexto exija claramente que haja um e apenas um dos elementos. O artigo indefinido "um" ou "uma", portanto, normalmente significa "pelo menos um".

[0146] Como usado aqui, o termo "Matrigel" refere-se a uma mistura de proteína gelatinosa secretada pelas células de sarcoma de camundongo de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que se assemelha ao ambiente extracelular complexo encontrado em muitos tecidos.

[0147] Um "ciclo de colheita" constitui uma transferência de DP para um novo recipiente de cultura de célula após a aderência e o desenvolvimento das IDPSCs seguido da preservação (por exemplo, criopreservação) e/ou sub cultivo do desenvolvimento das IDPSCs.

[0148] Como usado aqui. "condições hipóxicas" compreendem cultivar as células sob condições de cultura compreendendo ou equivalentes a:

(i) um máximo de entre cerca de 0,5% e 1% ou um máximo de entre cerca de 0,5% e 15% de oxigênio (O<sub>2</sub>);

(ii) cerca de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1% ou 2% ou 5% de oxigênio (O<sub>2</sub>);

(iii) entre cerca de 0,1% e 2% de oxigênio (O<sub>2</sub>); ou

qualquer de (i), (ii) ou (iii) com 5-7% de CO<sub>2</sub>.

[0149] Como usado aqui, o termo "células-tronco" refere-se às células imaturas, não especializadas que, sob certas condições, podem diferenciar em células maduras, funcionais.

[0150] Como usado aqui, o termo hIDPSC refere-se a uma célula-tronco indiferenciada que é capaz de se diferenciar em um amplo espectro de tipos de células, incluindo mas não limitado às células de sistemas neurais, central e de periferia, por exemplo, os neurônios, astrócitos, células gangliais, e/ou oligodendrócitos.

[0151] Como usado aqui, o termo "LP" refere-se às IDPSCs após DP múltipla transferir pelo menos 15 ciclos. O termo "EP" refere-se às IDPSCs isoladas logo após extração de DP.

[0152] Como usado aqui, os termos "cultura celular" ou "célula culturada" referem-se a células ou tecidos que são mantidos, culturados, cultivados ou crescidos em um ambiente artificial, in vitro.

[0153] Como usado aqui, o termo "pluripotente" refere-se a células precursoras que têm a capacidade de formar qualquer célula adulta.

[0154] Como usado neste documento, o termo "indiferenciada" refere-se a células de cultura que exibem características morfológicas de células indiferenciadas, distinguindo-as de células diferenciadas.

[0155] Como usado aqui, o termo população "substancialmente homogênea" de células refere-se a uma população de células em que a maioria (por exemplo, entre cerca de 50% a cerca de 90%) do número total de células tem uma característica especificada de interesse (por exemplo, a expressão de SOX1, SOX2 e beta tubulina).

[0156] Como usado neste documento, o termo "co-expressa" se refere à detecção simultânea de dois ou mais marcadores moleculares, por exemplo, SOX1 e SOX2 e beta-3-tubulina, na mesma população de célula, de preferência na/sobre a mesma célula.

[0157] Como usado aqui, os termos "manutenção de cultura (celular)", "proliferação", "propagação", "expansão" e "crescimento", refere-se à sobrevivência continuada de uma célula ou população de células com um aumento nos números de células.

[0158] Como usado aqui no que diz respeito ao cultivo in vitro de

polpa dentária (DP), isolamento e expansão de IDPSCs, o termo "longo prazo" (LT) refere-se ao cultivo de DP por múltiplos ciclos de colheita de IDPSCs mais de 15, de preferência > 25, mais de preferência 25-60 ciclos, e mais de preferência 15-45 ciclos e mais, chamado "População posterior" (LP).

[0159] Como usado aqui em relação ao cultivo e expansão celular, o termo "escala de argel" refere-se ao isolamento de DP e cultivo de SC em condições que permitam, pelo menos, a duplicação das células após cada ciclo de colheita não enzimática.

[0160] Como usado aqui, o termo "células progenitoras neurais" refere-se a uma célula derivada de uma célula-tronco que pode produzir progenia que são capazes de diferenciarem-se em mais de um tipo de célula de CNS e PNS.

[0161] Como usado aqui, os termos "fatores neuroprotetores", "fatores de crescimento neuronais" ou "neurotrofinas" referem-se aos fatores que suportam a neurogênese selecionados a partir de, sem se limitar a NGF BDNF, NT3, NT4.

[0162] Como usado aqui o termo SOX1 de "biomarcadores neuronais" (para *região de determinação do sexo Y-caixa 1*) refere-se a um fator de transcrição que está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central inicial. SOX1 podem ser expressos particularmente no estriado ventral.

[0163] Como usado aqui, o termo "SOX2" refere-se a um progenitor neural e marcador de certificação (*stemness*) que é um fator de transcrição expressado por células-tronco multipotentes e de auto renovação do neuroepitélio embrionário (9). SOX2 pode ser expresso dividindo ativamente as células progenitoras neurais nas regiões neurogênicas em cérebro de ratos adultos e também pode ser expresso pela astroglia imunopositiva de proteína fibrilarmente ácida, amplamente distribuído no parênquima cerebral (10). SOX2 também é conhecida, em conjunto com

Oct4, SOX2 como fator de transcrição essencial para pluripotência (Ivanona et al., Nature 442:5330538 (2006); Métodos de preparação de células-tronco pluripotentes induzidas de camundongo são também conhecidos (Takahashi and Yamanaka, 2006). Indução de células de iPS geralmente requerem a expressão de ou exposição a pelo menos um membro da família de Sox e pelo menos um membro da família de Oct.

[0164] Como usado aqui, os termos " $\beta$ -tubulina de classe III", "beta.3-tubulina", "proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP-2), ou neurofilamento" referem-se aos elementos de microtúbulo expressados exclusivamente em neurônios e serve como um promotor neuronal específico, característico do marcador fenotípico de neurônios de precursores neuronais precoces.

[0165] Como usado aqui, o termo "bromodeoxiuridina" (5-bromo-2'-desoxiuridina, BrdU) refere-se a um nucleosídeo sintético que é usado na detecção de células de proliferação em tecidos vivos. BrdU pode ser incorporado em um DNA recém sintetizado de células de replicação (durante a fase de S do ciclo celular). Anticorpos específicos para BrdU então podem ser usados para detectar a substância química incorporada, indicando, assim, as células que foram replicando ativamente seu DNA. BrdU pode ser passado para células-filhas mediante replicação. BrdU tem demonstrado ser detectável ao longo de dois anos pós-infusão.

[0166] Como usado aqui, os termos "testes comportamentais" e/ou "função cognitiva" referem-se aos processos mentais de um sujeito animal ou humano em relação à coleta e/ou processamento de informações; o entendimento, raciocínio e/ou aplicação das informações e/ou ideias; a especificação de informações; processos de resolução de problemas e mentais como aprendizagem, percepção, e/ou consciência de ideias e/ou informações. Função cognitiva pode ser definida através de um ou mais testes ou ensaios para a função cognitiva, por exemplo testes de diagnóstico válidos e/ou teste cognitivo computadorizado.

[0167] Como usado aqui, o termo "doença degenerativa" inclui qualquer doença na qual morte celular ou disfunção está presente. Exemplos de doenças degenerativas incluem mas não estão limitados a doenças neurodegenerativas, disfunção cardíaca, infertilidade, insuficiência renal, doença de pele, doença autoimune, diabetes, doenças da retina e outras doenças oftalmológicas e doenças hiperproliferativas tais como o câncer.

[0168] Como usado aqui, o termo "neurogênese" refere-se à proliferação, migração, diferenciação e/ou sobrevivência de uma célula neural in vivo ou in vitro.

[0169] No contexto de algumas divulgações, o termo "doença neurodegenerativa" é definida como doença, na qual células do sistema nervoso central ou periférico são perdidos. Exemplos para doenças neurológicas e/ou neurodegenerativas são lesão da medula espinhal, lesões intracranianas ou intravertebrais incluindo, mas não se limitando a contusão, penetração, cisalhamento, compressão ou lesões de laceração da medula espinhal ou síndrome do bebê sacudido.

[0170] No contexto das divulgações aqui apresentadas, as doenças neurológicas também incluem eventos isquêmicos, ou isquemia ou distúrbios isquêmicas que podem ser definidos como qualquer estado local ou regional de hipóxia em células ou tecidos que são geralmente devido a um fornecimento inadequado de sangue (circulação), por exemplo, causado por um bloqueio ou obstrução de um vaso sanguíneo nesta área.

[0171] A hipóxia pode causar lesão aguda, como em hipóxia e/ou isquemia, incluindo, mas não limitado a, insuficiência cerebrovascular, isquemia cerebral ou infarto cerebral (incluindo isquemia cerebral ou infartos provenientes de trombose e oclusão embólica), isquemia retiniana (diabética ou não), glaucoma, degeneração da retina, esclerose múltipla, neuropatia óptica isquêmica, reperfusão após isquemia cerebral aguda, lesão hipóxico-isquêmica perinatal ou hemorragia intracraniana de qualquer

tipo (incluindo, mas não limitada a, hemorragia epidural, subdural, subaracnoide ou intracerebral).

[0172] De acordo com alguns aspectos, as IDPSCs das divulgações aqui demonstraram um novo tipo de potência, mencionado neste documento como "potência mista-maxi". Potência mista-maxi é uma mistura de características de potência múltipla de células-tronco mesenquimais (MSC) (cerca de 99% das IDPSCs portam marcadores MSC), característica de pluripotência de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC) (até 30%), enriquecimento de marcador de células tronco neuroepitelial (90%, onde a expressão de nestin está em 95% das células) e relativamente baixa expressão de STRO em contraste com DPSC obtida por outros métodos. Tais composições de potência mista-maxi de populações de IDPSC isoladas derivadas sob cultivo a longo prazo (LP) resulta em uma sinergia de propriedades regenerativas para diferenciação neuroepitelial. Além disso, tais composições de potência mista-maxi de populações de IDPSC são caracterizadas por alta escalabilidade e segurança (imunocompatibilidade e baixo risco de formação de tumor).

[0173] São descritos neste documento o padrão distinto e características de uma população mista de células-tronco de polpa dentária imaturas de humano isoladas do seu nicho, localizadas na região central da polpa coronária e radicular, que contém grandes troncos nervosos e vasos sanguíneos. Mais especificamente essa região pode ser identificada como a camada mais interna da polpa que é uma zona rica de célula e contém fibroblastos e células-tronco mesenquimais indiferenciadas em estreita associação com os vasos sanguíneos. Um fenótipo de célula-tronco de polpa dentária imatura nova é descrito e caracterizado pela expressão de *hallmarkers* de células-tronco embrionárias, mesenquimais, límbicas e neuronais/neuroepiteliais. As IDPSCs são células multipotentes, que são capazes de produzir os derivados das três camadas germinativas, a endoderme, ectoderme e mesoderme.

[0174] Durante o desenvolvimento e em um organismo adulto, as células-tronco podem ser encontradas em um microambiente especial chamado um nicho de células-tronco. Um nicho é um sítio especializado e anatômico, que interage com as células-tronco. Supõe-se que um nicho de células-tronco impede a diferenciação e, portanto, regula o seu destino. Durante o desenvolvimento embrionário, fatores de nicho agem sobre as células estaminais embrionárias, induzindo a sua proliferação e diferenciação. Estas mudanças ocorrem devido à alteração de genes e expressão de proteínas específicas, levando ao desenvolvimento de feto e formação de todo o organismo. Durante o período pós-natal da vida humana, especialmente na infância, nichos de células-tronco continuamente produzem células especializadas que são necessárias para o desenvolvimento completo. Em um organismo adulto, o nicho mantém células-tronco adultas em estado quiescente. Ativação de células-tronco ocorre em resposta à lesão tecidual quando o microambiente circundante está enviando sinais de células-tronco para promover autorrenovação, proliferação e diferenciação para restaurar os tecidos danificados. Vários fatores estão envolvidos na regulação do comportamento de células-tronco dentro do nicho. Primeiro, interações célula-célula entre as células-tronco, bem como as interações entre as células-tronco e as células diferenciadas vizinhas, interações entre células-tronco e moléculas de adesão, componentes da matriz extracelular, a tensão de oxigênio, fatores de crescimento, citocinas, e a natureza físico-química do ambiente incluindo o pH, força iônica (por exemplo, concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e metabólitos como ATP também são importantes. Tal interação recíproca entre as células-tronco e o nicho ocorre durante o desenvolvimento e é mantida durante a vida adulta.

[0175] Em um organismo adulto, células-tronco hematopoiéticas da medula óssea tem seu nicho composto de osteoblastos subendosteal, células endoteliais sinusoidais e células do estroma da medula óssea, como

fibroblastos, monócitos e adipócitos. O nicho de células-tronco intestinal é constituído por uma rede de fibroblastos/miofibroblasto subepitelial que rodeia as criptas intestinais. Tais nichos de células-tronco podem ser encontrados em todos os tecidos adultos. Conhecimento sobre nichos de células-tronco in vivo é muito relevante porque pode ajudar a desenvolver a cultura de células em condições in vitro e preservar certificação (*stemness*) de célula após o isolamento. Identificação de tais nichos dentro de diferentes tecidos e descoberta de seus componentes e funcionamento é essencial para terapias regenerativas. Esse conhecimento proverá informação sobre vários componentes, que é importante para a proliferação celular e diferenciação durante crescimento, expansão e diferenciação in vitro de células-tronco, que deve ser controlada em frascos ou placas a fim de prover uma quantidade suficiente do tipo de célula adequado antes de ser introduzidas de volta no paciente para a terapia. Células-tronco adultas permanecem em um estado indiferenciado em toda a vida adulta. No entanto, quando elas são cultivadas in vitro, muitas vezes sofrem um processo de "envelhecimento", no qual sua morfologia é alterada e sua capacidade proliferativa é diminuída. Corrigir as condições de cultivo de células-tronco adultas precisa ser melhorado para que células-tronco adultas possam manter sua certificação (*stemness*) ao longo do tempo.

[0176] Coroas de dentes contêm polpa coronal. A polpa coronal tem seis superfícies: a oclusal, a mesial, a distal, a bucal, a lingual e a de chão. Devido à contínua deposição de dentina, a polpa torna-se menor com a idade. Isto não é uniforme em toda a polpa coronal, mas progride mais rápido no chão do que nas paredes de telhado ou laterais. A região central da polpa coronária e radicular contém grandes troncos nervosos e vasos sanguíneos. Esta área é revestida perifericamente por uma área especializada odontogênica que tem três camadas (da mais interna para a mais externa). A camada mais interna da polpa é uma zona rica de célula, que contém fibroblastos e células-tronco mesenquimais indiferenciadas em

estreita associação com os vasos sanguíneos.

[0177] Identificação de um nicho de células-tronco também ajuda a isolar a população homogênea de célula-tronco adulta com característica única semelhante àquelas das células-tronco embrionárias humanas, então seu isolamento não envolve quaisquer considerações éticas. Tais células-tronco adultas são uma fonte promissora para medicina regenerativa e têm uma vantagem quando comparadas com células-tronco pluripotentes induzidas recentemente descritas, porque estas são células normais, que não requerem o uso de métodos de pré-seleção ou manipulação genética para isolamento.

[0178] Em uma modalidade, uma composição compreende uma população isolada de células-tronco de polpa dentária imaturas (IDPSCs), em que pelo menos 50% das IDPSCs expressam um marcador neuroepitelial p75. Em algumas modalidades, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das IDPSCs expressam um marcador neuroepitelial p75.

[0179] Em outra modalidade, a presente invenção fornece uma composição compreendendo uma população isolada de IDPSCs, em que pelo menos 50% das IDPSCs expressam um marcador de supressor de tumor p53. Em algumas modalidades, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das IDPSCs expressam um marcador de supressor de tumor p53.

[0180] Em um aspecto, menos de 50% das IDPSCs exprime um marcador selecionado de CD13 e CD31. Em outro aspecto, menos de 45%, menos de 40%, menos de 35%, menos de 30%, menos de 25%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, ou menos de 5% das IDPSCs exprime um marcador selecionado de CD13 e CD31. Em uma modalidade, as IDPSCs são negativas para marcadores de CD34, CD43 e CD45.

[0181] CD13 é um dos primeiros marcadores de células comprometidos com a linhagem mieloide e é dispensável para hematopoiese normal e funções de células mieloides. Ele desempenha um importante papel funcional em vasculogênese e é identificado como um regulador crítico da angiogênese. Em células não hematopoiéticas, CD13 foi encontrada em células endoteliais, células epiteliais, certas áreas renais, células do cérebro, medula óssea, osteoclastos. Como uma peptidase extracelular, CD13 funciona para clivar aminoácidos neutros isolados da terminação N de pequenos peptídeos. Por exemplo, no cérebro CD13 cliva peptídeos opioides e encefalinas para regular sinalização neuronal, e no intestino, este cliva peptídeos para facilitar a reabsorção de aminoácido. CD31 é também conhecido como molécula de adesão celular endotelial de plaquetas (PECAM-1).

[0182] Em outra modalidade, pelo menos 50% de IDPSCs produzem um fator neurotrófico selecionado do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF), beta de fator de crescimento do nervo (beta-NGF), neurotrofina-3 (NT3), neurotrofina-4 (NT4) e neurotrofina-5 (NT5). Alternativamente, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das IDPSCs produzem um fator neurotrófico selecionado de BDNF, GDNF, beta-NGF, NT3, NT4 e NT5.

[0183] Fatores de crescimento que são especificamente expressos no cérebro e que afetam o desenvolvimento neural in vivo e in vitro incluem fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de glia (GDNF) e fator neurotrófico ciliar (CNTF). BDNF é um membro da família do fator de crescimento do nervo que promove a diferenciação in vitro de NSC, células subependimais humanas e precursores neuronais para neurônios e promove o desenvolvimento de neurito de células-tronco hipocarnais in vivo. Diferenciação exclusiva de BDNF e EGF em neurônios

positivos de tirosina hidroxilase foi vista. GDNF é um membro da superfamília TGF. Em neurogênese precoce, GDNF é expresso na neuroectoderme anterior, sugerindo que ele pode desempenhar um papel chave no desenvolvimento neuronal. GDNF promove a sobrevivência dos neurônios motores no nervo periférico e músculo e tem habilidades neurotróficas e de diferenciação.

[0184] Em certos aspectos, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das IDPSCs expressam nestin. Em outros aspectos, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10% ou menos de 5% da IDPSCs expressam Oct3/4.

[0185] Em uma modalidade, uma composição compreendendo uma população de linhagem múltipla fenotipicamente uniforme das IDPSCs pós-natais de humano isoladas é caracterizada por um perfil molecular multifuncional de:

(a) IDPSCs de perfil de célula-tronco neuroepitelial em que pelo menos 80% das IDPSCs expressam um marcador selecionado de nestin, p75, membro G de subfamília de cassete de ligação de ATP 2 (ABCG2), p63, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais (GDNF), fator de crescimento do nervo-beta (beta-NGF), neurotrofina-3 (NT3), NT4 e NT5; e

(b) IDPSCs de perfil de pericito em que menos de 20% dos IDPSCs expressam um marcador selecionado de STRO-1 e CD146;

(c) IDPSCs de perfil de células tronco mesenquimais em que pelo menos 80% da população expressa um marcador selecionado de CD105, CD73, CD90, CD29, CD44, CD117, vimentina, fibronectina, fosfatase alcalina (ALP), alfa-fetoproteína (AFP), tenascina-C, metaloproteinase-1 de matriz (MMP-1), MMP-2, MMP-9, sindecano 1 (SDC1), SDC2, SDC3, SDC4, p53 e colágeno tipo 1;

(d) IDPSCs de perfil de células-tronco pluripotentes em que de 2% a

30% das IDPSCs expressam pelo menos um marcador selecionado de Oct3/4, SOX2, Nanog, TRA1-60, TRA1-81 e SSEA4; e

(e) IDPSCs de perfil de células-tronco mesenquimais em que os IDPSCs são negativos para os antígenos de histocompatibilidade principal de (MHC) de HLA-ABC e HLA-DR.

[0186] HLA (antígenos de leucócitos humanos) foram originalmente definidos como antígenos de superfície celular que mediam doença de enxerto versus hospedeiro, que resultou na rejeição de transplantes de tecidos de doadores incompatíveis com HLA. Tenascin é abundante em tecidos embrionários e durante o processo de reparação de tecidos.

[0187] Em algumas modalidades, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das IDPSCs expressam um marcador selecionado de nestin, p75, membro 2 da subfamília G do cassete de ligação de ATP (ABCG2), p63, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF), beta de fator de crescimento nervoso (beta-NGF), neurotrofina-3 (NT3), NT4 e NT5.

[0188] Em outras modalidades, inferior a 20%, inferior a 15%, inferior a 10% ou inferior a 5% das IDPSCs expressam um marcador selecionado de STRO-1 e CD146. Em alguns aspectos, de 2% a 30% ou qualquer faixa neste (por exemplo, a partir de 5% a 30%, de 10% a 30%, de 2% a 10%, de 2% a 20%) das IDPSCs expressam pelo menos um marcador selecionado de Oct3/4, SOX2, Nanog, TRA1-60, TRA1-81 e SSEA4.

[0189] Em outro aspecto, uma composição compreende uma população de linhagem múltipla fenotipicamente uniforme de IDPSCs pós-natais de humano isoladas, em que referida população de IDPSCs pós-natais de humanos é obtida como um desenvolvimento de DP cultivada pelo menos durante 10 ciclos de colheita sob condições hipóxicas.

[0190] Em certas modalidades, IDPSCs de LP são transferidas

mecanicamente sem tratamento enzimático. Isto pode preservar a DP e permite uma orientação de linhagem múltipla induzida por hipóxia das IDPSCs.

[0191] Em algumas modalidades, as IDPSCs são cultivadas com um substrato de matriz extracelular (ECM) compreendendo fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina, polilisina, proteoglicanos de sulfato de heparan, entactina ou uma combinação destes. O substrato de ECM pode ser Matrigel.

[0192] As IDPSCs podem ser isoladas como um desenvolvimento da DP cultivada pelo menos durante 5 ciclos, pelo menos 10 ciclos de colheita, pelo menos 15 ciclos de colheita, pelo menos 20 ciclos de colheita, pelo menos 25 ciclos de colheita, pelo menos 30 ciclos de colheita, pelo menos 35 ciclos de colheita, pelo menos 40 ciclos de colheita, pelo menos 45 ciclos de colheita, pelo menos 50 ciclos de colheita, pelo menos 55 ciclos de colheita ou pelo menos 60 ciclos de colheita.

[0193] As IDPSCs podem ser isoladas da polpa dentária (DP) de um dente, selecionado a partir de um dente decíduo, um dente permanente e um terceiro molar.

[0194] De acordo com alguns aspectos, esta divulgação também provê um método de produção de uma população isolada de IDPSCs. Vantagens exclusivas, providas por esse método se relacionam com a capacidade de aumentar a produção das IDPSCs e a utilidade clínica resultante das IDPSCs. As doses terapêuticas publicadas de células usadas nas tentativas clínicas de sistema nervoso central (SNC) com células-tronco estão na faixa de  $10 \times 10^6$  a  $10 \times 10^9$  células por dose.

[0195] Em uma modalidade, os números médios das células geradas após 5-10 passagens das IDPSCs são as seguintes.

[0196] A partir de  $5 \times 10^5$  células após digestão enzimática após 5 passagens,  $3 \times 10^8$  IDPSCs será produzido, e depois 10 passagens  $5 \times 10^9$  células de IDPSC serão produzidas. Uma polpa dentária (DP) após 15

ciclos de colheita (cerca de 1,5 mês com ciclos de colheita ocorrendo uma vez a cada cerca de 3 dias) produzirá  $5 \times 10^{12}$  IDPSCs na passagem 5 usando as IDPSCs de EP cultivadas com tratamento enzimático. Usando IDPSCs de LP e transferência mecânica sem tratamento enzimático, depois de 15 ciclos de colheita de cerca de  $3 \times 10^{13}$  IDPSCs vão ser produzidas na passagem 5. Um adicional de  $3 \times 10^{13}$  IDPSCs são produzidas após 30 ciclos de colheita e um adicional de  $5 \times 10^{13}$  após 50 ciclos de colheita usando IDPSCs de LP e transferência mecânica sem tratamento enzimático.

[0197] Uma vantagem adicional do método é que a taxa de proliferação de células isoladas de DP por cultura de explante é mantida constante e geralmente quadruplica a cada 3-4 dias. Taxa de proliferação de células isoladas de DP usando tratamento enzimático geralmente triplo a cada 3-4 dias.

[0198] Em uma modalidade, esta divulgação fornece um método de produzir uma população isolada de IDPSCs compreendendo:

- (a) extrair DP de um dente;
- (b) colocar a DP em um recipiente estéril e lavar a DP com uma solução estéril com antibióticos;
- (c) opcionalmente, remover a solução estéril com antibióticos e picar a DP em um meio de cultura de base;
- (d) transferir mecanicamente a DP em outro recipiente com um meio de cultura;
- (e) cultivar a DP até o desenvolvimento e aderência das IDPSCs ser observados; e
- (f) repetir etapas (d) e (e) pelo menos 5 vezes para permitir que o desenvolvimento e aderência das IDPSCs de múltiplos nichos dentro da DP.

[0199] O cultivo da DP pode prosseguir por pelo menos 1 dia, pelo menos 2 dias, pelo menos 3 dias, pelo menos 4 dias, pelo menos, 5 dias,

pelo menos 10 dias ou, pelo menos 15 dias. As etapas (d) e (e) podem ser repetidas pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 35 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 45 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 55 vezes ou pelo menos 60 vezes.

[0200] A DP pode ser criopreservada e descongelada antes de transferir mecanicamente o explante de DP para dentro de outro recipiente com um meio de cultura. Em alguns aspectos, clonogenicidade é preservada tanto antes quanto após a criopreservação. A eficiência de clonogenicidade antes e/ou após a criopreservação pode ser superior a 75%, superior a 80%, superior a 85%, superior a 90%, superior a 95%, superior a 96%, superior a 97%, superior a 98% ou superior a 99%.

[0201] Um método desta divulgação pode incluir a passagem das IDPSCs em uma subcultura com ou sem tratamento com protease. A subcultura pode ser repetida um máximo de 10 vezes, um máximo de 9 vezes, um máximo de 8 vezes, um máximo de 7 vezes, um máximo de 6 vezes, um máximo 5 vezes, um máximo de 4 vezes, um máximo de 3 vezes, um máximo 2 vezes ou um máximo de 1 vez.

[0202] Em algumas modalidades, o cultivo da DP por cerca de 3 dias gera uma população isolada de pelo menos  $1 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $2 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $3 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $4 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $5 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $6 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $7 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $8 \times 10^5$  IDPSCs, pelo menos  $9 \times 10^5$  IDPSCs ou pelo menos  $1 \times 10^6$  IDPSCs.

[0203] Em certos aspectos, o meio de cultura é meio DMEM/F12 ou meio MEM-alfa. O meio de cultura pode ser suplementado com cerca de 5% a cerca de 20% do soro bovino fetal, cerca de 1% de aminoácidos não essenciais, cerca de 1% de L-glutamina ou um substituto de L-glutamina, e cerca de 1% de um antibiótico.

[0204] Aspectos desta divulgação também abrangem uma população

isolada de IDPSCs geradas por qualquer um dos métodos divulgados neste documento.

[0205] Em algumas modalidades, as células-tronco do método divulgado são células-tronco da polpa dentária. Células-tronco da polpa dentária são um tipo de células-tronco somáticas que está presente no tecido da polpa dentária dentro da dentina dos dentes, e que é capaz de se diferenciar em polpa dentária, dentina e afins (capaz de se diferenciar principalmente em odontoblastos). Células-tronco da polpa dentária podem ser obtidas extirpando o tecido da polpa dentária de (i) um dente extraído por uma questão de conveniência no tratamento ortodôntico ou um dente extraído devido à doença periodontal e afins, ou (ii) um dente do siso (também conhecido como terceiro molar) extraído por razões de conveniência no tratamento ortodôntico ou de tratamento de periodontite do dente do siso e afins.

[0206] Embora qualquer dente que retenha tecido da polpa dentária possa ser usado como uma fonte de células-tronco da polpa dentária, é preferível selecionar um dente que seja rico em células-tronco da polpa dentária com elevado potencial de proliferação.

[0207] Uma fonte adequada de células-tronco da polpa dentária é um tecido de polpa dentária, derivado de um dente do siso de uma pessoa jovem (por exemplo, em humanos, com cerca de 12 a 16 anos) tendo o dente do siso extraído para fins ortodônticos. Dentes do siso nessas idades estão ainda no meio de formação da raiz dentária durante a fase inicial de diferenciação dentária e são caracterizados por uma grande abundância de tecido da polpa dentária, uma densidade relativamente alta de células-tronco da polpa dentária e um potencial muito elevado para sua proliferação.

[0208] Devido ao fato de os dentes do siso às vezes serem extraídos para fins ortodônticos em outras faixas etárias e também porque o tecido da polpa dentária pode ser obtido em dentes que não sejam os dentes do siso,

extraídos por razões de conveniência, a disponibilidade desses dentes extraídos é alta.

[0209] Outras fontes potenciais de células-tronco de polpa dentária incluem dentes extraídos para o tratamento da doença periodontal, dentes do siso extraídos devido à periodontite no dente do siso e afins. Neste caso, existem desvantagens do aumento do risco de contaminação e uma menor quantidade de tecido de polpa dental obtido. No entanto, devido à facilidade de obtenção desses dentes dos adultos (especialmente idosos), estes materiais podem servir como uma importante fonte de células-tronco de polpa dentária quando for desejado o transplante autólogo de células ou tecidos diferenciados destas células.

[0210] As células-tronco da polpa dentária que podem ser usadas na presente invenção podem ser derivadas de todas as espécies animais, incluindo mamíferos. Embora as células-tronco da polpa dentária possam ser coletadas de qualquer espécie animal, é particularmente preferível que as células-tronco da polpa dentária sejam coletadas do paciente ou de outra pessoa que compartilhe o mesmo tipo de antígeno de leucócitos humanos (HLA) devido à ausência de rejeição do enxerto, quando as células-tronco obtidas são usadas para a medicina regenerativa humana. Quando as células-tronco não são administradas (ou seja, transplantadas) em um ser humano, mas são usadas como, por exemplo, uma fonte de células para triagem a fim de determinar a presença ou ausência de sensibilidade ao fármaco e reações adversas a medicamentos, o paciente células-tronco da polpa dentária deve ser recolhidas do paciente ou de outra pessoa, compartilhando o mesmo polimorfismo do gene correlacionando a susceptibilidade à droga e reações adversas à droga.

[0211] Várias empresas criaram o banco de dentes a fim de isolar as MSCs/pericitos dos tecidos dentários e para explorar o potencial desta abordagem nova e inovadora para preservar as células-tronco de dentes decíduos e outras fontes dentárias. Nos EUA, StemSave, BioEden e Store-

A-Tooth são empresas envolvidas no setor de banco de células-tronco do dente. No Japão, os primeiros bancos de dentes foram estabelecidos na Universidade de Hiroshima e na Universidade de Nagoya.

[0212] Aspectos desta divulgações aqui descritos se referem a um método para determinação da única e previamente não isolada população mista de células-tronco adultas humanas derivadas de germe dentário (o germe dentário são células embrionárias primitivas que são os precursores dos dentes), polpa dentária primária de dentes decíduos, terceiro molar e dentes permanentes (ver Lizier et al.(2012) PLoS ONE 7: e39885).

[0213] A referida população mista compreende MSCs/ pericitos / neuroepiteliais / células-tronco pluripotentes capazes de se diferenciarem em camadas germinativas embrionárias da endoderme, ectoderme e mesoderme.

[0214] Mais especificamente, a referida população mista compreende células-tronco mesenquimais (MSCs) é pelo menos 96%-99% caracterizada por CD105+, CD73+, CD90+, CD29, CD44, CD117(c-kit), Vimentina, Fibronectina, fosfatase alcalina (ALF), Alfa-Fetoproteína (AFP), tenascina, metaloproteinases de matriz 1,2,9, sindecanos 1,2,3,4, p53, colágeno tipo 1 e 52% de CD13, bem como CD45-,CD34- e HLA ABC (baixo), assinatura de expressão de HLA-DR. O referido perfil da assinatura da célula definido por biomarcador é típico de MSCs com as características do tipo de célula multipotente clássica.

[0215] Além disso, a referida população mista compreende MSCs/pericitos pelo menos 24% caracterizados por STRO-1 e 36% caracterizados por CD146 (MUC18) e assinatura de expressão. O referido perfil da assinatura da célula definido por biomarcador é típico de MSCs com características do tipo de célula multipotente derivada de nicho perivascular.

[0216] Adicionalmente, a referida população mista compreende as células-tronco pluripotentes/MSCs pelo menos 2% a 30% caracterizadas

por uma assinatura de expressão de SSEA4, Oct3/4, SOX2, Nanog, TRA1-60 e TRA1-81. O referido perfil da assinatura da célula definido por biomarcador é típico de características do tipo de célula pluripotente.

[0217] Inesperadamente, a referida população mista compreende células-tronco neuroepiteliais/MSCs pelo menos 95% de Nestin, pelo menos 85% de p75 (receptor do fator de crescimento do nervo, CD271/p75(NTR) inibe a diferenciação de células-tronco mesenquimais em linhagens osteogênicas, adipogênicas, condrogênicas e miogênicas), ABCG2 (ABCG2 é um membro de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC), estabelece um papel importante na promoção da proliferação de células-tronco e na manutenção do fenótipo da célula-tronco), p63 (p63 é essencial para o potencial proliferativo de células-tronco em epitélios estratificados; expressão de p63 e ABCG2 no limbo corneoescleral: Implicações para a purificação de células-tronco), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF), fator de crescimento do nervo-beta (beta-NGF), neurotrofina-3 (NT3), NT4, 5, pelo menos, 20% de  $\beta$ -tubulina III (fraco), Conexina 43 e assinatura de expressão de citoqueratina - K12. O enriquecimento das IDPSCs de população mista com o referido perfil da assinatura da população de célula definido por biomarcador é único e inesperado. Esta população de células promete enorme pesquisa e aplicações terapêuticas.

[0218] Portanto, de acordo com um aspecto destas modalidades, é fornecida uma população de células IDPSC compreendendo células-tronco enriquecidas caracterizadas por biomarcadores neuroepiteliais/MSCs, de preferência vários fatores, neuroprotetores, tais como p75 e p63, BDNF, GDNF, beta-NGF, NT3, NT4/5.

[0219] Uma modalidade adicional se refere a um método de derivação contínua de IDPSC de cultivo prolongado de explante ex vivo dentário de DP através de vários ciclos de colheita.

[0220] O referido método permite que um número quase ilimitado e inesperado de ciclos de colheita/derivação e pode, portanto, reduzir o número de passagem de IDPSCs para obter um número de células semelhante aos métodos anteriormente relatados.

[0221] O referido método divulgado é fácil de executar e diminui a probabilidade da ocorrência de mutações genômicas espontâneas e eventuais anomalias no cariótipo, que possam surgir durante várias passagens em células-tronco que ocorrem em métodos tradicionais para a derivação de IDPSCs usando a digestão enzimática da polpa dentária.

[0222] Além disso, os aspectos desta divulgação referem-se ao processo de diferenciação realizado a partir de tais células e concentrados contendo essas células, bem como para as células diferenciadas obtidas a partir do referido processo e concentrados contendo essas células.

[0223] O número de células-tronco que apresentam um fenótipo de MSC/pericito é diverso em diferentes populações de MSCs de tecidos dentários e apresenta variações individuais. Portanto, é uma vantagem significativa para o cultivo derivado de doador único para vários lotes, incluindo variabilidade, consistência e reprodutibilidade reduzidas.

[0224] Por exemplo, usando tal método, é possível derivar uma quantidade terapeuticamente suficiente de IDPSCs de passagem baixa derivadas de DPs de um único doador, que podem ser obtidas de pelo menos um dente decíduo ou, opcionalmente, quatro dentes superiores e quatro dentes "de leite" inferiores que podem ser armazenados ou conservados e utilizados conforme necessário.

[0225] É geralmente aceito que os pericitos estão isolados do nicho perivascular; este nicho também foi encontrado na polpa dentária (Shi and Gronthos, 2002). Uma descoberta surpreendente deste documento é a derivação das IDPSCs de nichos tanto não perivascular quanto perivasculares. IDPCSs enriquecidas com marcadores neuroepiteliais derivadas de não perivasculares são, neste documento, obtidas pela

primeira vez usando métodos de cultivo prolongado.

[0226] Uma modalidade adicional se refere a um método de cultura prolongada de explantes de DP em condições hipóxicas para derivação de IDPSCs do nicho de células-tronco perivasculares.

[0227] Uma modalidade adicional se refere a um método de cultura prolongada de explantes de DP em condições fornecimento de nutrição reduzido para derivação de IDPSCs do nicho de células-tronco não perivasculares.

[0228] Também são divulgadas neste documento populações de células com potencial de pluripotência, como demonstrado pela localização nuclear de expressão de Oct3/4, que pode ser reduzida de 10% para < 2% durante a cultura prolongada.

[0229] Ao propagar células-tronco para criopreservação ou uso em paciente, a FDA recomenda que as células não sejam passadas por mais de 15 passagens.

[0230] Isso ocorre a fim de reduzir o risco de mutação do cariótipo e tumorigenicidade relacionadas com o número elevado de passagem e para reduzir a plasticidade de diferenciação in vivo. Portanto, após a criopreservação mais 2-5 passagens podem ser expandidas antes da administração clínica, dependendo do procedimento a ser aplicado. Essa limitação no número de passagens limita o número de células-tronco que podem ser coletadas para aplicações clínicas.

[0231] Uma modalidade adicional refere-se a um método em que um número clinicamente suficiente de IDPSCs pode ser obtido em um número baixo de passagens.

[0232] Em uma modalidade adicional, um explante de único doador é biopreservado em cultura por até seis meses ou mais com derivação preferível de IDPSCs em P0 durante três dias até colônias monoclonais viáveis serem formadas. Tal explante é então substituído para o próximo ciclo de derivação de colheita sequencial, tal cultivo contínuo pode levar a

10 ciclos por mês durante pelo menos cinco meses para um total de 50 transferências e ciclos de derivação em P0. De cada transferência e ciclo de derivação, IDPSCs são propagadas e passadas um máximo de 5 vezes antes da criopreservação ou do uso.

[0233] Como indicado acima, os aspectos das divulgações aqui apresentados baseiam-se em parte na surpreendente descoberta de que as células-tronco imaturas da polpa dentária (IDPSC) podem ser isoladas de nichos de células-tronco presentes nos dentes. Esses nichos podem ser encontrados em, mas não são exclusivos da, polpa dentária de dentes decíduos. Foram encontrados nichos adicionais localizados em redes nervosas da zona livre de células, na camada mais interna da polpa da zona rica em células e na camada mais externa, que contém os odontoblastos na zona livre de célula (ver **Figuras 1 e 2**). A existência desses nichos é consistente com a origem da crista neural de células-tronco dentárias (DSC) e o isolamento de uma população mista de células-tronco neuroepiteliais e mesenquimais na IDPSC.

[0234] Uma importante vantagem de usar a IDPSC isolada para medicina regenerativa é o fato de que elas apresentam menos risco de tumorigenicidade. Os inventores desenvolveram uma estratégia nova para isolamento, manipulação e criopreservação de IDPSC, que leva à cultura a longo prazo destas células com um número limitado de passagens *in vitro*. Com esta estratégia, números praticamente ilimitados de IDPSC em passagens iniciais (5 ou menos) podem ser produzidos. Ver Lizier et al. (2012) PLoS ONE 7:e39885.

[0235] Foi demonstrado que células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASC) têm uma afinidade para produzir tumor *in vivo*. Parece que essa afinidade de ASC correlaciona-se com seu isolamento do nicho perivascular (Zhang et al. 2010). IDPSCs podem ser isoladas de diferentes nichos na polpa dentária, minimizando assim o risco de formação de tumor. Lizier et al. (2012) PLoS ONE 7:e39885. Nesta divulgação, divulgamos uma

nova linhagem de DSCs de dentes decíduos (hIDPSC) que pode ser isolada de nichos distintos diferentes (não perivasculares) na polpa dentária ou de tecido interno desprovido de oxigênio/vascular-nutriente/isquêmico de explante DP, minimizando assim o risco de formação de tumor.

[0236] As composições de IDPSC de algumas modalidades são administradas em uma quantidade farmacologicamente eficaz. Como usado aqui, a frase "quantidade farmacologicamente eficaz" refere-se a uma quantidade suficiente para tratar uma doença, condição ou distúrbio. O nível da dose eficaz pode ser determinado de acordo com a gravidade da doença; idade, peso, saúde e sexo de um paciente; a sensibilidade à droga em um paciente; o tempo, rota e taxa de liberação da administração; a duração do tratamento; ou elementos, incluindo drogas que são misturadas ou usadas simultaneamente com a composição de algumas modalidades, ou outros elementos conhecidos no campo da medicina. Por exemplo, a dosagem das IDPSCs varia dentro de uma grande faixa e é determinada de acordo com as exigências dos indivíduos em casos específicos. Geralmente, no caso de administração parentérica, as IDPSCs geralmente são administradas em um montante de cerca de  $1 \times 10^6$ , cerca de  $1 \times 10^7$ , cerca de  $1 \times 10^8$ , cerca de  $1 \times 10^9$ , ou cerca de  $1 \times 10^{10}$  células/kg do peso corporal do indivíduo. Além disso, a composição de algumas modalidades e outras substâncias para tratamento de doença conhecidas na técnica podem ser simultaneamente ou sequencialmente administradas a um indivíduo.

[0237] As composições de IDPSC de algumas modalidades podem ser administradas localmente ou sistemicamente, podem exigir que manipulações *ex vivo* ou *in vivo* obtenham atividade terapêutica para induzir um efeito local (por exemplo, um efeito regenerativo direto de IDPSC em contato com tecido degenerativo afetando proliferação celular/morte celular, a funcionalidade e integridade do tecido) e/ou devido a um efeito sistêmico (por exemplo, liberando fatores tróficos protetores e reduzindo os níveis de

citocinas pró-inflamatórias).

[0238] Rotas de administração de IDPSCs são selecionadas a partir de métodos médicos conhecidos para tratamento de dano estético ou clínico degenerativo reprodutivo, e/ou para a prevenção de danos futuros a tecidos, células e ao sujeito. Tratamento de IDPSC neste documento abrange a anulação, inibição substancial, retardo ou reversão da progressão de uma condição, melhorando substancialmente sintomas clínicos ou estéticos de uma doença ou impedindo ou reduzindo substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos ou estéticos de uma doença. De acordo com outro aspecto, é estabelecido um uso de uma composição de IDPSC em conjunto com outras células terapêutica ou outro medicamento para proteger um sujeito de dano degenerativo estético ou clínico ou perda de tecido, funcionamento de célula, ou para aliviar um sintoma existente e/ou um sintoma futuro de qualquer doença mencionada aqui, sem se limitar aos exemplos descritos neste documento.

[0239] Em algumas modalidades, a administração da composição é realizada em conformidade com qualquer um dos métodos ou tratamentos descritos no Pedido Provisório de Patente depositado conjuntamente pelos presentes inventores, intitulado "MULTIFUNCTIONAL IMMATURE DENTAL PULP STEM CELLS OBTAINED BY A ROBUST, LONG-TERM CULTURING SYSTEM", E TENDO Nº DE SÉRIE U.S. 61/791.594, cujo conteúdo é incorporado em sua totalidade ao presente por meio de referência. mais particularmente, os aspectos desta divulgação referem-se a um método para a obtenção de um número clinicamente suficiente de dtscs de um paciente sem alterações genéticas e biológicas aberrantes, com base na cultura de explante de tecido e transferência mecânica (não enzimática) em cultura a longo prazo de DP.

[0240] De acordo com uma modalidade, a DP é mantida em cultura após transferência mecânica durante vários meses. Avaliaram-se as seguintes características: morfologia, expressão de fenótipos específicos de

MSC e proteínas da célula ES e genes, cariótipo, taxa de crescimento e capacidade de diferenciação de IDPSCs logo após extração de DP (população precoce, EP) e após várias transferências de DP (população tardia, LP). Alguns desses parâmetros foram avaliados após criopreservação e com cultivo de IDPSCs em três diferentes meios de cultura. O uso de anticorpo contra BrdU incorporado na DP logo depois o emplacamento e três dias após o cultivo de DP gerou uma percepção sobre o mecanismo de geração de IDPSCs por cultura de explantes. Além disso, para distinguir SCs em DP, coloração imuno-histoquímica contra nestina, vimentina, Oct3/4 e STRO-1 foi executada.

[0241] É também divulgado neste documento um método de obtenção de uma população pura de MSCs típicas, que também é quase pura em relação a células-tronco da crista neural (NCSC) e células-tronco neuroepiteliais. Uma parte dessa população (não mais de cerca de 24%) pode ser apresentada como SHED e outra parte é apresentada por MSCs + NCSC + células-tronco pluripotentes. É impossível separar essas populações com esses métodos como citometria de fluxo e grânulos magnéticos.

[0242] Outra modalidade oferece a possibilidade de separar as células SHED, seguindo o método de LP, por uma abordagem mais robusta e com maior número de células do que usando a tecnologia tradicional de dissociação enzimática de DP ou um método de desenvolvimento de EP de DP.

[0243] Nomeadamente, o enriquecimento da população neuroepitelial é progressivamente enriquecido com estes marcadores após ciclos de colheita.

[0244] A DP também pode superar algum tratamento mecânico, tal como perfurar, ou picar como um método alternativo para obter tais células. Geralmente as primeiras células se desenvolvem cerca de uma semana depois de emplacamento de DP; a hipótese é que as células podem migrar

do plexo nervoso posteriormente porque estão mais profundamente na DP do que nos vasos sanguíneos. Por outro lado, o nicho de subodontoblastica, que também pode produzir estas células, situa-se perifericamente e o tratamento enzimático pode destruí-lo. Tratamento mecânico, como picagem de DP, é especialmente útil quando a polpa é grande.

[0245] Além disso, os marcadores neuroepiteliais podem ser induzidos por componentes de formulação de meios de cultura de célula externos ou equilíbrio de gás, induzindo condições de cultura de células de "tensão"/hipóxicas. Por exemplo, a expressão de marcador de células-tronco pluripotentes pode ser induzida por hipóxia.

[0246] Uma modalidade adicional refere-se à utilização dos métodos divulgados para produzir uma nova linhagem de DPSCs que sejam derivadas de vários nichos de origem perivascular e não perivascular. A derivação de origem não perivascular é induzida devido à privação de nutrientes e oxigênio para nichos de DP internos durante a condições de cultura prolongada / hipóxica, e, portanto, células de nicho interno migram para a superfície. Tais células caracterizam-se pela expressão nuclear de OCT 4 e expressão robusta de marcadores ectodérmicos / NPC, como nestina, p75, p63 e outros.

[0247] De acordo com alguns aspectos, as composições de IDPSC desta divulgação são administradas em uma quantidade terapeuticamente eficaz que é suficiente para resultar em uma redução dos danos degenerativos ou sintomas estéticos da doença ou podem ser administradas através de várias rotas de administração, incluindo tópica (cutânea e intraocular), local, transmucosa (incluindo bucal, sublingual), parenteral / sistemicamente (incluindo subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravascular e intra-articular) e, de preferência, administração parenteral.

[0248] IDPSCs indiferenciadas ou induzidas a se submeterem à

diferenciação especial (progenitoras) podem ser administradas a um sujeito que apresente doença degenerativa, por exemplo, ser injetadas diretamente nos locais/cavidade/*milieu* da doença, transplantadas em outro lugar no corpo, ou podem ser aderidas a uma estrutura ou veículo de distribuição e cirurgicamente inseridas/transplantadas/enxertadas em um local aceitável no corpo. hIDPSC não são imunogênicas e não precisam, na maioria dos casos, do uso do protocolo de imunossupressão, mas em alguns casos de super sensibilidade e reatividade imunológica, a imunomodulação pode necessária ou doadores imunologicamente correspondentes são preferencialmente utilizados. IDPSCs podem ser administradas a um sujeito com sintomas anormais ou degenerativos obtidos de qualquer forma, incluindo os obtidos em consequência da idade, trauma, doença (neuro) degenerativa, de preferência. Os presentes inventores descobriram que as IDPSCs são muito eficazes no tratamento de doenças neurológicas, entre outras doenças.

[0249] IDPSCs podem ser introduzidas localmente ou sistemicamente no sujeito a fim de tratar uma doença degenerativa, tais como, mas não limitadas a, uma doença neurodegenerativa, distúrbio reprodutivo, ectodérmico ou diabetes, em um sujeito através da administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma quantidade de IDPSCs diferenciada ou indiferenciadas.

[0250] Os Pedidos de Patente US N°2003/0219898, 2003/0148513 ensinam o implante de células-tronco para diferentes tratamentos terapêuticos de condições neuro degenerativas. IDPSCs são preferencialmente através de um procedimento cirúrgico ou injeção intratecal ou intraventricular. As Patentes N° U.S. 5.762.926; 5.650.148; 5.082.670 ensinam métodos de transplante neural ou enxertia envolvendo o transplante de células no sistema nervoso central ou em cavidades ventriculares ou subduralmente para a superfície de um cérebro hospedeiro (ou seja, transplante extraparenquimal). Métodos de distribuição

intracerebral adicionais incluem transplante intraparenquimal por injeção. Várias injeções podem ser feitas usando este procedimento. Vários enxertos podem consistir em uma mistura de tipos de células, e/ou combinar transgenes inserido dentro das células. Transplantação em cavidades pode ser preferida para enxerto de medula espinhal. O enxerto de células transplantadas no cérebro exigirá a sucção ou limpeza da cavidade ou preenchimento da lesão, etc. A administração parenteral mais preferível é a administração intratecal. Para tratar a diabetes, IDPSCs indiferenciadas ou diferenciadas em células tipo beta podem ser administradas por injeção subcutânea, injeção intraperitoneal, injeção sob a cápsula renal, injeção na veia porta e injeção no baço, ou por implantação sob a cápsula renal, através da veia porta hepática, ou no baço; a IDPSC pode ser implantada usando o veículo/estrutura de distribuição ou técnicas de encapsulamento.

[0251] As composições de IDPSC de algumas modalidades podem ser administradas através de várias vias de administração, incluindo tópicas (incluindo bucal, sublingual, dérmica e intraocular), parenteral (incluindo subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravascular e intra-articular) e administração transdérmica e, preferencialmente, administração parentérica. A administração parenteral mais preferível é a administração intratecal. Os presentes inventores descobriram que as IDPSCs são muito eficazes no tratamento de doenças neurológicas, entre outras doenças.

#### *Restauração e Renovação Capilar*

[0252] O folículo piloso passa por três fases durante o crescimento: uma fase de crescimento (anágena), fase de regressão (catágena) e uma fase de repouso (telógena). O crescimento capilar é um processo contínuo, que perdurou durante a vida do organismo. Portanto, o folículo piloso deve ter um nicho de células-tronco, que são constantemente ativas e especialmente no tempo da regeneração do folículo piloso. De acordo com os conhecimentos atuais, as células-tronco do folículo piloso, que se

originou da crista neural, residem na área de protuberância do folículo piloso perto da glândula sebácea. Estas células se expressam em nestina em um estado indiferenciado, que é um marcador de células-tronco neurais e do folículo piloso. Tais células-tronco de expressão de nestina encontradas na área de protuberância dos folículos pilosos formariam a bainha externa e interna do folículo piloso durante a fase anágena. Foi demonstrado que essas células-tronco podem não só produzir o folículo piloso, como também podem regenerar ou pelo menos curar feridas na epiderme. Além disso, as células-tronco do folículo piloso podem ser convertidas em neurônios. Eles formaram o neuroesferas, que, por sua vez, formaram os neurônios, células gliais, queratinócitos, células musculares lisas e outros tipos de células. Quando células-tronco do folículo piloso foram injetadas por via subcutânea em camundongos, elas formaram neurônios. Depois de transplantadas em camundongos, na área de protuberância do folículo piloso, elas instigaram vasos sanguíneos a indicarem o potencial das células-tronco do folículo piloso a formar células endoteliais. As células-tronco do folículo piloso podem também melhorar significativamente a taxa de regeneração do nervo e a restauração da função nervosa. Estes resultados demonstram a pluripotência das células-tronco do folículo piloso e seu uso potencial em medicina regenerativa. Essas células-tronco têm características que combinam algumas vantagens de células-tronco adultas e embrionárias. Semelhante a células-tronco embrionárias, elas têm um alto grau de plasticidade, podem ser isoladas em altos níveis de pureza e podem ser expandidas em cultura.

[0253] Células-tronco da polpa dentária imaturas humanas também se originaram da crista neural. Foi demonstrado o compartilhamento de características semelhantes com células-tronco embrionárias e células-tronco do folículo piloso, expressando nestina e outros marcadores de células-tronco embrionárias. Elas são capazes de formar neuroesferas e se diferenciar em neurônios, células gliais, epitélio, queratinócitos, células

musculares lisas e outros tipos de células, apresentando um alto grau de plasticidade. Elas são também podem ser isoladas em quantidade abundante da região central da polpa dentária coronal e radicular, especificamente da região, que pode ser identificada como uma camada mais interna da polpa, uma zona de rica em células-tronco indiferenciadas, apresentando alto nível de pureza e podem ser expandidas facilmente na cultura. Quando essas células-tronco da polpa dentária imaturas humanas (IDPSC), quando reintroduzidas no embrião em desenvolvimento, formaram fetos quiméricos e apresentaram contribuição em diferentes tecidos e órgãos, especialmente densa enxertia na epiderme. Surpreendentemente, IDPSCS cultivadas em LP mantêm sua certificação (*stemness*) também após criopreservação. Após transplante de GFP (proteína verde fluorescente) expressando IDPSC por via subcutânea em camundongos, elas preencheram o folículo piloso e produziram várias GFP expressando fios de cabelos.

[0254] Estas células são facilmente acessíveis e podem levar ao uso dos dentes do próprio paciente como fonte de terapia no caso de calvície sem a controvérsia ou problemas médicos de células-tronco embrionárias. Com base nestas descobertas, IDPSC também podem ser úteis para tratar a doença de Parkinson, esclerose múltipla, doença de Hirschsprung, derrame, neuropatias periféricas e ALS. Certos defeitos cardíacos e defeitos ósseos (degeneração, defeitos craniofaciais congênitos) também podem ser tratados através de terapia de reposição de células-tronco da crista neural. Elas também podem ser expandidas em cultura em milhões de células sem perder marcadores de células-tronco.

[0255] As IDPSC podem tornar-se as células-tronco de escolha, capazes de substituir outra fonte de células-tronco epidérmicas da crista neural no futuro para a medicina regenerativa, já que (1) estão prontamente disponíveis em essencialmente qualquer um, (2) são facilmente cultivadas e expandidas, (3) são altamente pluripotentes, (5) não apresentam questões

éticas como as células-tronco embrionárias e células-tronco fetais, (6) não produzem teratomas, (7) são imunocompatíveis.

#### *Regeneração da Pele*

[0256] Terapias baseadas em células-tronco abrem novas vias para a regeneração da pele após lesão e doença. Existem vários nichos funcionais de células-tronco na pele, que se sabe serem coletivamente responsáveis por pistas microambientais físicas e químicas que permitem o potencial regenerativo de todas as camadas da pele humana. Estudos pré-clínicos demonstraram que fatores parácrinos secretados por células-tronco após sua distribuição tópica no local lesionado podem melhorar cicatrização de feridas crônicas e são o principal mecanismo pelo qual as células-tronco podem melhorar a reparação. Foi observado que até mesmo meios condicionados de células-tronco mesenquimais (MSCs) promovem a cicatrização de feridas através da ativação das células hospedeiras.

[0257] IDPSC já expressam vários marcadores, que são associados com nichos de células-tronco da pele. Assim, as células-tronco epiteliais da protuberância e IDPSC têm características comuns, incluindo a expressão de citoqueratinas, integrinas e p63. Por outro lado, estudos recentes mostraram que uma população de células dentro da papila dérmica de folículos pilosos pode funcionar como células-tronco adultas. Este nicho de células-tronco dérmicas contém uma única população de células progenitoras, que expressam o fator de transcrição SOX2 que também é expresso por IDPSC.

[0258] Portanto, a terapia baseada em IDPSC pode ser promissora na superação da cicatrização de feridas, incluindo queimaduras e outros distúrbios degenerativos da pele. Os efeitos parácrinos (liberação de fatores de proteção) e regenerativos (plasticidade de diferenciação e autorrenovação) em IDPSCs podem promover o progresso da remodelação da pele. A criação de um microambiente adequado é a questão-chave para as células-tronco sobreviverem e participarem na regeneração e repararem

o tecido da pele. O sucesso da regeneração tecidual depende da vascularização local ideal e a integração bem sucedida do implante na matriz extracelular e efeitos anti-cicatrizantes.

[0259] Em uma modalidade, IDPSC é usada para desenvolver a cicatrização de feridas e desafios de remodelação da pele, tais como:

1. Cicatrização, tais como úlceras intratáveis da pele resultantes de diabetes, isquemia e doenças do colágeno representam problemas significativos com poucas soluções.

2. As feridas de queimadura são um desafio extremamente difícil, queimaduras foram relatada como sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade global.

3. Terapia bio-dermocósmética para qual melhora a firmeza da pele, reduz rugas, bem como atrasa o processo de envelhecimento, resultando em tecido envelhecido que tem a aparência, crescimento e diferenciação semelhantes aos da pele jovem.

[0260] São divulgados neste documento resultados notáveis sugerindo que o enxerto destas células nos vasos sanguíneos pode auxiliar a neovascularização, que é fundamental para o processo de remodelação do tecido. Além disso, a regeneração do colágeno prova potencial tratamento de perda de integridade da pele ferida e/ou envelhecida. A ausência de resposta imunológica sugere o uso de IDPSC para o tratamento de distúrbios imunológicos (por exemplo, Vitiligo) ou para os pacientes com pele queimada.

[0261] Em uma modalidade, a terapia por IDPSC divulgada pode ser aplicada como a implantação de célula, ou através de distribuição local, ou infusão sistêmica, de IDPSCs autólogas ou alogênicas para restaurar a viabilidade ou a função dos tecidos deficientes.

### *Espermatogênese*

[0262] Foi demonstrado que o transplante de células-tronco espermatogoniais de camundongos férteis para os testículos de

camundongos receptores inférteis resulta em espermatogênese derivada de doador e também na transmissão de material genético do doador para os filhotes de animais receptores. Transplante de células germinativas fornece um bioensaio para estudar a biologia de células germinativas do sexo masculino, desenvolvem sistemas de isolamento e cultura de células-tronco espermatogoniais para examinar os defeitos na espermatogênese e tratar a infertilidade masculina. Embora mais amplamente estudado em roedores, o transplante de células germinativas foi aplicado a grandes mamíferos. Em animais domésticos, incluindo suínos, caprinos e bovinos, bem como em primatas, células germinativas podem ser transplantadas para um testículo de um receptor guiadas por canulação ultrassonográfica nos testículos. O transplante de células germinativas foi bem-sucedido entre espécies não relacionadas (porcos e cabras) e sem usar o protocolo de imunossupressão, enquanto transplante em roedores requer o uso de animais singênicos ou parceiros imunocompatíveis.

[0263] No entanto, SSC tem sido mais amplamente caracterizada em camundongos e a biologia de SSC humana é desconhecida, uma vez que não há métodos disponíveis para seu estudo. A caracterização das células-tronco humanas, independentemente da origem de tecidos, tem sido difícil porque as experiências de transplante e manipulações envolvendo seres humanos são eticamente problemáticas.

[0264] Nesse sentido, o uso de animais experimentais no transplante de células-tronco humanas está sendo usado como uma alternativa prática para estudar a biologia dessas células. Por exemplo, foi realizado o xenotransplante de células hematopoiéticas da medula óssea humana em camundongos imunodeficientes e usado para identificar marcadores de HSC de origem humana, bem como a eficiência de transferência do gene humano por HSC. Transplantes xenogênicos usando animais experimentais é uma poderosa abordagem para a compreensão da biologia das células-tronco e do desenvolvimento de aplicações clínicas de células-tronco,

minimizando as preocupações éticas, associadas à experimentação em humanos.

[0265] Foi relatada, recentemente, uma tentativa de transplante de células germinativas humanas em testículos de camundongos. Os resultados indicaram que nenhuma célula germinal humana sobreviveu nos testículos de camundongos, sugerindo que essas células provavelmente morreram devido à incompatibilidade entre as células germinativas humanas e o ambiente testicular animal ou à rejeição imunológica. Em contraste, estudos anteriores demonstraram que as células-tronco da linhagem genética de primatas (babuíno) podem colonizar os testículos de camundongos imunodeficientes, pelo menos durante seis meses. Embora estas células sejam diferenciadas apenas por espermatogônias, este resultado mostrou que as células-tronco dos primatas não só sobreviveram em testículo de camundongos, como também foram capazes de se proliferar.

[0266] Células-tronco da linhagem genética chamadas células-tronco espermatogoniais (SSCS) que foram encontradas no período pós-natal em mamíferos são essenciais para a espermatogênese (processo de produção de esperma), e com oócitos de fêmeas, são essenciais para a continuidade da espécie. SSC residem na membrana basal de túbulos seminíferos dos testículos e são cercadas por células de Sertoli somáticas, que formam um microambiente ou nicho. Dentro do nicho, sinais extracelulares e fatores de crescimento regulam a diferenciação de SSC para autorrenovação ou para expansão e o início do processo de diferenciação de espermatogênese, resultando na produção de esperma maduro depois de 40 dias em camundongos e 64 dias em humanos (Loeffler et al., 1997, Harrison et al., 1980). O tempo de etapas sequenciais em espermatogênese é fortemente regulamentado por genes de células germinativas e células de Sertoli que suportam o processo de diferenciação.

[0267] Além disso, o transplante de células-tronco nos testículos dos

animais é uma poderosa ferramenta para estudar a capacidade biológica de células-tronco se diferenciar em gâmetas masculinos, para avaliar os fatores que influenciam este processo, para investigar a funcionalidade de testículos e as razões que causam infertilidade. Estes estudos irão aumentar significativamente a nossa compreensão da funcionalidade os testículos e a capacidade de controlar e preservar a fertilidade masculina.

[0268] Os resultados divulgados sugerem o potencial de diferenciação de hIDPSC em células germinativas e células que apoiam destino germinativo. Estes dados indicam o possível uso de IDPSC para restauração de fertilidade humana após, por exemplo, câncer, que frequentemente leva à infertilidade devido à aplicação de quimioterapia. Estes dados sugerem que IDPSC são capazes de enxertar em diferentes compartimentos nos tubos seminíferos de camundongos. Diferenciação de IDPSC parece ser mais rápida em camundongos férteis, sugerindo a importância do ambiente para a enxertia celular e diferenciação de células-tronco. Quando transplantadas em testículos de ratos, é possível observar IDPSC seguindo a ordem sequencial da diferenciação do epitélio seminífero de camundongos e células assemelhando-se a espermátides redondas, alongadas e até esperma, embora com baixa eficiência. Nossos dados sugerem também que o ambiente de utilização dos túbulos seminíferos dos animais pode ser uma ferramenta modelo para atingir células de esperma humanas de doador compatível. Descobrimos que a fusão entre células de camundongos e células de origem humana pode ocorrer, no entanto, a fusão entre núcleos não foi detectada.

[0269] Levantamos a hipótese que para a reconstrução da espermatogênese em xenotransplante (modelo animal infértil), devemos, primeiro, limpar o ambiente. As células que dão suporte à espermatogênese produzem proteínas humanas, que afetam a progressão de SSC e facilitam a espermatogênese. Analisando os dados publicados, podemos concluir que, até a presente data, os esforços dos cientistas foram

dirigidos predominantemente para o uso de SSC para verificar a sua capacidade de entrar na espermatogênese. SSC são células comprometidas com espermatogênese e, portanto, foram um fracasso na diferenciação, e essas células não receberam o sinal normal do ambiente em que foram transplantadas.

[0270] Células de Sertoli são células sustentaculares, ou seja, - células "enfermeiras" localizada na periferia de um túbulo seminífero. Elas também são chamadas de "células-tronco", uma vez que fornecem nutrição e suporte mecânico para células espermatogoniais. Elas também são responsáveis por estabelecer e manter o nicho de células-tronco da linhagem genética, garantindo a sua renovação e diferenciação em células espermatogoniais maduras regulando o progresso que termina na liberação de esperma.

[0271] hIDPSC NÃO são imunogênicas e não precisam do uso do protocolo de imunossupressão. Elas são células migratórias e podem ser amplamente distribuídas nos testículos de camundongos, enquanto SSC não podem migrar.

#### *Insuficiência renal*

[0272] Insuficiência renal (RF) (também falha do rim ou insuficiência dos rins) é uma condição médica na qual o rim falha em filtrar adequadamente produtos residuais do sangue. Para testar se o alto nível de expressão dos marcadores ectodérmicos permitirá a terapia por IDPSC em pacientes veterinários gatos com RF (exemplo de caso representativo de RF é descrito com base na análise escrita de tratamento/sintomas por especialistas veterinários, outros exemplos, não descritos aqui, foram aplicados para tratar doença de RF em diversos animais de estimação via solicitação/preocupação informada pelos hospedeiros).

[0273] Divulgamos uma composição para terapia celular com IDPSC compreendendo os IDPS e um método para tratar a doença de RF em espécies mamíferas, incluindo os seres humanos, utilizando IDPSC

derivadas de LP cultivadas in vitro, de preferência. Nomeadamente, é mostrado que IDPSC expressam CD146 e VEGF após transplante no modelo de rato de insuficiência renal, indicando a importância de marcadores endoteliais. Considerados em conjunto, estes dois estudos demonstram efeito de proteção renal e benefícios clínicos de transplante IDPSC em doença renal aguda (rato) e crônica (gato).

[0274] Uma modalidade de administração local intra-renal pode ser proposta. Em outra modalidade, IDPSCs são administradas i.v./sistemicamente na dose de aproximadamente  $0,01-1 \times 10^6$  células por kg de peso corporal através de infusão intravenosa em solução salina tamponada ou qualquer outro veículo adequado para administração sistêmica conhecido no estado da técnica. Infusões são repetidas posteriormente em níveis terapêuticamente ativos, por exemplo, a cada 1-3 semana até melhoria significativa na função renal e, em seguida, intervalo de infusão aumentado para 1-6 meses, conforme a condição do paciente. Em uma modalidade adicional, a composição pode incluir outras células e/ou agentes terapêuticos ativos e/ou genes para distribuir para tratar paciente de RF.

[0275] A insuficiência renal é uma doença que apresenta alta incidência em cães e gatos, causando considerável morbidade e mortalidade entre estas espécies (Lees, GE, 2004). Assim, mesmo usando as terapias convencionais, ocorre lesão estrutural, favorecendo a redução da massa renal associada a deficiência no metabolismo e consequente perda das funções fisiológicas dos rins, culminando em falência múltipla de órgãos. As terapias médicas convencionais, fluidos e aconselhamento de dieta, bem como correções para as complicações médicas que causam a doença, são geralmente ineficazes quando a creatinina sérica for superior a 6 mg/dl e a ureia exceder 90 mg/dl, levando a este ponto, uma deterioração significativa na qualidade de vida do animal (Fischer, Jr., et al, 2004).

[0276] Descrevemos neste documento uma composição contendo

IDPSCs e um método para tratar a doença renal crônica em gatos e outras espécies, incluindo cães e humanos, utilizando IDPSCs humanas alogênicas expandidas in vitro. Neste sentido, as terapias de células-tronco mostram uma possibilidade de grandes perspectivas, já que a regeneração dos tecidos danificados é uma expectativa de cura permanente plausível desta doença.

*Enriquecimento de Populações Tardias de hIDPSC com Progenitores Neurais e Neurônios*

[0277] Outros aspectos desta divulgação se relacionam ao enriquecimento da população final de hIDPSC com progenitores neurais e neurônios após 15, 30 e 45 ciclos de transferência mecânica da polpa dentária e indução de diferenciação neural. A CNS é originada da ectoderme, mais precisamente do pool de células-tronco neuroepiteliais (NSCs) multipotentes. Esta população de células é constituída por, pelo menos, dois grupos diferentes de precursores neurais: um primeiro grupo pode crescer em culturas de monocamada; um segundo grupo geralmente forma neuroesferas (ou seja, se desenvolvem em cultura de suspensão). Apesar desta diferença, os dois tipos de células demonstram o mesmo potencial de diferenciação (Noble et al., 2011, Kempermann, 2011).

[0278] NSC são simetricamente divididas e, sob condições adequadas, podem ser rapidamente convertidas em neuroblastos, precursores de divisão assimétrica, que são capazes de desenvolver-se em neurônios após uma fase de migração. Neuroblastos são ligeiramente mais diferenciados do que NSCs e podem produzir trânsito, amplificando a população celular. A capacidade de dividir é a principal diferença entre neuroblastos e os neurônios, que são pós-mitóticos. Neuroblastos se diferenciam e amadurecem em neurônios, mas não em outros tipos de células.

[0279] Destino de NSCs, entre outros mecanismos, é regulado através de sinais que emanam dos tecidos circundantes. NSCs são encontradas

em regiões específicas, chamados de nichos de células-tronco que fornecem as pistas microambientais que regulam a proliferação, autorrenovação e diferenciação de células-tronco.

[0280] São conhecidas hoje duas fontes potenciais de célula-tronco com potencial neural de diferenciação: primeiro, precursores neuronais fetais obtidos de aborto e, segundo, células-tronco pluripotentes (células ES, iPSCs) induzidas a precursores neuronais diferenciados *in vitro*. Precursores neuronais fetais provocam muitos problemas éticos, enquanto existem alguns riscos de segurança associados à utilização humana de ES e iPSCs que atrasam aplicações terapêuticas. Métodos alternativos de terapias neurodegenerativas outros tipos humanos de células-tronco são necessários para explorar os usos de terapia celular para tratamento de doenças neurológicas. Métodos para transplantação células-tronco e progenitoras são descritos nas Patentes Nº U.S. 5.928.947; 5.817.773 e Publicação PCT No WO 01/176507. Estes métodos incluem a expansão em cultura de células e o transplante de células-tronco neuroprotetoras indiferenciadas, e/ou através de transplante de células precursoras neurais, e/ou células neuronais totalmente diferenciadas. Intervenções terapêuticas de célula podem envolver tanto o transplante de células quanto a estimulação de células progenitoras neurais endógenas. Métodos convencionais têm várias desvantagens e limitações, e novas fontes de células para a terapia neuroprotetora/neuroregenerativa de células-tronco são necessárias. Também de importância é prever o potencial neuroprotetor de células para a terapia de células-tronco utilizando marcadores moleculares.

[0281] Células-tronco da polpa dentária foram isoladas por Gronthos et al. 2000, Shi et al. WO 02/07679. Sharpe (WO 01/60981) reivindicou a produção de células progenitoras do dente de células-tronco embrionárias ou células-tronco adultas ou cultura de tecidos. A Publicação da Patentes Nº 2002/0119180 reivindicou um método e a produção de um dente

biológico da genética do terceiro dente molar (Young et al. 2002). A invenção divulgada na Patente US Nº **8.192.987** refere-se geralmente a células-tronco pluripotentes, incluindo células-tronco pluripotentes tipo embrionárias, como derivadas de dentes.

[0282] Aspectos das divulgações apresentados neste documento referem-se a uma composição de hIDPSCs que expressa em conjunto marcadores SOX1, SOX2 e beta-3-tubulina e, especialmente, os métodos de tratamento de condições neurológicas. Também são divulgados aqui composições e métodos de enriquecimento de marcadores expressos em conjunto durante a cultura de células hIDPSCs de LT, aumentando assim o compromisso da linhagem neuroectodérmica de tais hIDPSCs de LP. São divulgado aqui novos métodos para o tratamento de doenças neurodegenerativas utilizando hIDPSCs obtidas através de ciclos de colheita de LT e enriquecidas com biomarcadores neuronais específicos, tais como, mas não limitados a, SOX1, e SOX2, beta-3-tubulina. Este método é útil para triagem de marcadores que afetam o compromisso linhagem neural de hIDPSCs e detêm maior potencial para tratar doenças CNS e PNS, mantendo o cariótipo normal e sem formação de teratoma detectado in vivo. Além disso, as modalidades contempladas fornecem uma população substancialmente homogênea de células enriquecidas com população de células que expressam em conjunto os referidos marcadores neuronais de certificação (*stemness*) (SOX1, SOX2 e beta-3-tubulina), mantendo o cariótipo normal e não carregando risco de formação de teratoma. É provável que a população homogênea seja vantajosa para o tratamento da doença em humanos (mamíferos). Outras vantagens das terapias baseadas em células divulgadas neste documento incluem, mas não estão limitadas a, incorporação de células do tecido do sistema nervoso central, tecido do sistema nervoso periférico. Tais células incorporadas têm potencial para diferenciar ou evoluir para neuronais, gliais ou outras células para substituir ou facilitar a reparação do tecido

danificado, traumatizado ou em degeneração, resultando, assim, em um tratamento mais permanente da condição neurológica, degenerativa, de lesão aguda, traumatizada.

[0283] São também incorporados neste documento os métodos divulgados de cultivo *in vitro* longo a prazo do tecido da polpa dentária (DP) para produzir um número ilimitado de células-tronco chamadas hIDPSCs no Pedido Provisório de Patente US N° 61/791.594, cujo conteúdo está incorporado neste documento por referência, na sua totalidade. O oxigênio é um dos sinais críticos que podem afetar as propriedades da célula-tronco sob homeostase do tecido normal. Curiosamente, baixos níveis de oxigênio, ou hipóxia, são uma marca registrada de nichos de células-tronco (Panchision, 2009).

[0284] Surpreendentemente, foi observado em amostras biológicas que foram armazenadas durante cultura celular em longo prazo /LT de hIDPSCs que, durante esse processo, o tecido dentário diminui gradualmente, criando assim a hipóxia dentro do tecido da polpa. Mais surpreendentemente, células-tronco da polpa dentária imaturas humanas (IDPSCs) isoladas da DP após 30 vezes de ciclo transferência/colheita mecânica (população final (LP) de IDPSC) e testadas em sua capacidade de produzir neurônios *in vitro* demonstraram capacidade aumentada para diferenciação neural, bem como o enriquecimento de uma população de IDPSC em LP pré-comprometida com precursor neuronal quando comparado com IDPSC isolado após 15 ou 25 ciclos de transferência/colheita mecânica (população precoce (EP)).

[0285] De acordo com alguns aspectos, descobrimos que o número de precursores neuronais se proliferando ativamente (neuroblastos) em precursor neural de IDPSC pré-comprometida está relacionado com o número de ciclos de transferência de DP.

#### *Biomarcadores SOX1 e SOX2*

[0286] Proteína SOX1 (para região de determinação do sexo Y-caixa

1) refere-se a um fator de transcrição que está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central inicial. SOX1 é um conhecido marcador característico de um sistema nervoso em desenvolvimento. A expressão de SOX1 na placa e tubo neural parece correlacionar com progenitores mitoticamente ativos que ainda não estão empenhados em uma fase final. SOX1 define os precursores neurais de divisão de CNS embrionária e expressa particularmente no corpo estriado ventral (Pevny et al., 1998; Kempermann et al., 2003).

[0287] SOX2 é um dos fatores de transcrição mais antigos conhecidos expressos no tubo neural em desenvolvimento e é expresso em determinadas células do cérebro adulto. SOX2 é comumente conhecido para desempenhar um papel crítico no sistema nervoso central. Recentemente, Terskikh e colegas (2011) elucidaram o papel de SOX2 no sistema nervoso periférico. Eles desenvolveram um modelo baseado em hESC, no qual células migratórias passam por transição epitélio para mesenquimal (EMT) para adquirir propriedades das células da crista neural (NC). Eles descobriram que progenitor de NC migratória regula negativamente SOX2, mas em seguida começa a re-expressar SOX2 conforme eles se diferenciam para formar agregados tipo gânglio da raiz dorsal (DRG). O regulamento negativo de SOX2 foi suficiente para induzir a EMT e resultou em apoptose maciça quando foi induzida a diferenciação neuronal. Eles também mostram que SOX2 se liga diretamente a NGN1 (neurogenina 1) e promotores MASH1 e é necessário para sua expressão. Quando as células-tronco da crista neural foram impedidas de re-expressar SOX2, elas morrem ou podem dar origem a células glia ou músculo liso. Assim, a função de SOX2 é manter as células multipotentes ou pluripotentes para se tornar neurônios mais tarde no desenvolvimento.

*SOX2 em Modelos de Doença Neurodegenerativa: Modelos de Doença Huntington (HD)*

[0288] Molero e colaboradores (2009) revisaram um modelo de HD.

Neste modelo, os déficits cognitivos progressivos se desenvolvem na idade de 9 meses, sugerindo possível disfunção hipocampal (Kandasamy et al, 2010). Observaram que melhora de autorrenovação de NSC em estágios embrionários tardios juntamente com altos níveis de SOX2, um fator que media autorrenovação de NSC, multi-linhagem potencial e neurogênese. Outros grupos mostraram que em nicho células-tronco neurais hipocampais em um modelo de rato transgênico da doença de Huntington, um declínio progressivo associado à doença na proliferação das células progenitoras hipocampais acompanhado por uma expansão do pool de células-tronco quiescentes positivas para SOX2 retendo marcação de 5-bromo-2-desoxiuridina de animais transgênicos.

[0289] Após o transplante para o cérebro em desenvolvimento, eles se incorporam extensivamente no cérebro hospedeiro, demonstram ampla distribuição, migram ao longo de correntes migratórias estabelecidas no cérebro hospedeiro, diferenciam-se em uma forma específica da região em progênie das três linhagens neurais fundamentais, indicando sua capacidade de responder a sinais locais e participar no desenvolvimento e na histogênese do hospedeiro vivo.

[0290] Esta combinação de propriedades definidoras irá identificar as linhas de células progenitoras neurais da invenção, independentemente do método usado para seu isolamento. Um método é para o transplante de células-tronco indiferenciadas que podem se diferenciar em células precursoras neurais e, então, em neurônios totalmente diferenciados (incluindo neurônios, astro-glia ou oligodendrócitos). Outro método é para transplante de IDPSCs pré-diferenciadas ou indiferenciadas que são capazes de liberar fatores neuroprotetores em áreas afetadas do sistema nervoso. Além disso, o uso do método de transplante hIDPSCs descrito de neuro-regeneração pode ser baseado na administração em paciente de precursores neuronais previamente diferenciado para ex vivo ou neurônios totalmente diferenciados ou suas combinações.

[0291] De acordo com alguns aspectos, uma composição de cultura celular compreende (expressando conjuntamente) hIDPSC positiva para SOX1 e SOX2, que são células-tronco da crista neural. SOX1 e SOX2 podem ser obtidos através de cultura de células em LT. Enriquecimento dos fatores de transcrição aumenta para cultura de em LP, que possui alto potencial de diferenciação neuronal, mantém cariótipos normais e não carrega o risco de teratoma in vivo.

[0292] De acordo com outro aspecto, um método para a obtenção de uma população homogênea de hIDPSC compreende a obtenção da população completa através de ciclos de colheita mecânica/não enzimática em LT. O número de ciclos de colheita pode incluir mais de 25 ciclos, cerca de 45 ciclos ou mais de 45 ciclos. Uma modalidade do método pode incluir cultivo adicional das células obtidas e passagem de uma célula aderente plástica da cultura de células. A célula aderente plástica tipicamente (i) se auto renova, (ii) se diferencia em células de linhagem endodérmica, mesodérmica ou ectodérmica, e (iii) expressa marcadores SOX1, SOX2 e 3-beta-tubulina. Uma modalidade do método pode incluir a administração adicional do produto a um paciente como uma composição farmacêutica em um portador/veículo farmacêutico aceito para terapia celular para tratar doenças de CNS.

[0293] De acordo com outro aspecto, uma composição de progenitor (neuroblastos) neural homogêneo mitoticamente ativo compreendendo (expressando conjuntamente) tais marcadores como SOX1, SOX2 e beta-3-tubulina que ainda não estão empenhados em um estágio final.

[0294] De acordo com outro aspecto, um método para a obtenção de uma população homogênea de IDPSCs pré-diferenciadas é composto por uma ou mais das etapas a seguir. Obtenção de neuroesferas derivadas de IDPSCs por cultivo de IDPSC em condições não aderentes (suspensão). Após a aderência à louça plástica para formar roseta neural, em que as células dentro da roseta são apresentadas pela (i) ampliação de trânsito de

uma população celular de neuroblastos positivos para SOX1, SOX2 e BrdU e beta-3-tubulina que são ligeiramente mais diferenciadas do que IDPSC;

(ii) neuroblastos diferenciadas terminalmente em LINHAGENS NEURONAIS DE SISTEMAS NEURAIS CENTRAIS e PERIFÉRICOS – (incluindo precursores neuronais, astroglia, oligodendrócitos e células ganglionares) após um microambiente induzido in vitro ou in vivo externo;

(iii) uso como uma composição farmacêutica em um portador/veículo farmacêutico aceito para terapia celular para tratar doenças de CNS através da administração a um paciente; e/ou (iv) uso como uma composição farmacêutica em um portador/veículo farmacêutico aceito para terapias contra o câncer, incluindo a terapia gênica para tratar neuroblastoma e retinoblastoma, mas não limitado a esses tipos de tumor.

[0295] De acordo com outro aspecto, LP substancialmente homogênea de hIDPSCs compreende uma célula que expressa conjuntamente um marcador selecionado a partir do, mas não se limitando ao, grupo composto por SOX1, SOX2 ou beta-3-tubulina.

[0296] Várias modalidades das divulgações contempladas são ainda adicionalmente ilustradas pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitantes. Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido, bem como as Figuras, estão incorporados neste documento em sua totalidade para referência para todos os fins.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1. Diferenciação Neural de IDPSCs**

[0297] IDPSC foram cultivadas antes de confluência, que é igual a  $2 \times 10^6$  em  $25 \text{ cm}^2$  em meio de cultura de base. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS e o meio de cultura de base foi modificado para meio de cultura de Neurobasal suplementado com 2% de B27 (NB + B27). O meio de cultura deve ser mudado em 3-4 dias. Depois de uma semana, as células foram colhidas após um tratamento com 0,25%

de tripsina/EDTA por 2-3 min e neutralizadas com o mesmo meio de cultura. Após centrifugação a 800xg por 5 min, obteve-se o pélete de célula e o sobrenadante foi removido. Em seguida, DPSC é suavemente desagregada em NB + B27 e semeada em seis louças de petri de 9,6 cm<sup>2</sup>. Ácido retinoico foi adicionado em uma concentração final de 0,1 µM por 24 horas, após o que neurônios maduros foram obtidos.

[0298] Usando esse protocolo para diferenciação neural, diferenciação de IDPSC em neurônios e células gliais, simultaneamente, a mesma placa de cultura foi observada (**Figura 3**).

### **Exemplo 2. Análise do Fenótipo Neuronal**

[0299] Além disso, a fim de estudar a morfologia de neurônios, foi usada coloração de hematoxilina e eosina (H & E) (**Figura 4**). Foi possível observar tanto a rede formada por diferenciação de células e células que mostraram a morfologia daquelas no processo de aquisição de um fenótipo neuronal (**Figuras 4A-4 C**). Vermelho neutro foi usado para coloração de grânulos de Nissl em neurônios (**Figura 4D-4F**), que são o retículo endoplasmático rugoso com rosetas de ribossomos livre e são o sítio de síntese de proteínas.

### **Exemplo 3. Identificação de Aneuploidia e Fusão Celular como Características Importantes para Suporte Opcional de uma Subpopulação de Células Ganglionares da Retina (RGCs) Tetraploides**

[0300] Durante o processo de diferenciação neural, verificou-se que algumas células eram binucleares (ou multinucleares). Este fato seria uma indicação de que a fusão celular ocorreu em IDPSC durante a diferenciação. Na **Figura 4E** pode ser observado um neurônio com múltiplos núcleos. Estes dados citológicos confirmaram hibridação in situ por fluorescência (FISH) (**Figura 5**).

[0301] Contagens de sinais de hibridização para o cromossomo humano 21 nos núcleos de IDPSCs diferenciadas foram executadas pro FISH e demonstraram uma taxa de fusão celular estimada em cerca de

25% do núcleo de células com mais de dois sinais de sonda de hibridização (**Figura 6**). Em geral, 250 núcleos foram contados.

[0302] Utilizou-se, para realizar a análise FISH, uma sonda específica LSI 21 (Vysis) para a região do cromossomo 21 associada com síndrome de Down. O protocolo FISH foi usado de acordo com as instruções do fabricante (Vysis - Abbott), brevemente descritas abaixo.

[0303] Após a lavagem com PBS das lamínulas, estas células diferenciadas foram fixadas em 4% de formaldeído por uma semana e armazenadas a 4°C. Em seguida, o material sobre as lamínulas estava desidratado em álcool serial (70%, 90% e 100%, Merck) por 3 minutos em temperatura ambiente, e as lamínulas foram secadas ao ar. O material foi desnaturado a 72°C, com solução de desnaturação (70% de formamida em 2xSSC, NaCl / citrato de sódio; Sigma). O material foi novamente desidratado em álcool serial durante 3 minutos cada no gelo e seco com ar. As sondas foram adicionadas a este material e as lamínulas foram mantidas em uma câmara úmida a 37°C para a hibridização, por um período de 16 horas (durante a noite). Após este período, as lamínulas foram lavadas duas vezes em uma solução contendo 50% de formamida em 2XSSC, seguido de duas lavagens em 2 X SSC e 1% de Tween 20 (Merck) diluído em 4XSSC, por 3 minutos cada lavagem. Finalmente, as lamínulas foram montadas com DAPI contendo Vectashield, e análises foram realizadas sob um microscópio de fluorescência.

#### **Exemplo 4. Expressão de Biomarcadores Neurais Após Protocolos de Diferenciação**

[0304] A expressão de proteínas específicas de diferenciação neural foi realizada usando a imunofluorescência com anticorpos contra marcador precoce de diferenciação neuronal, nestina (**Figuras 7A-7B**); contra um marcador de células neuronais, beta-tubulina, (**Figuras 7C-7E**); contra uma proteína glial, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (**Figura 7F**); e contra um marcador de células neuronais maduras, NeuN (**Figuras 7J-7H**) nos

neurônios derivados de IDPSC. Todos estes marcadores foram expressos em células tipo neurônio IDPSC.

[0305] Usamos anticorpos para nestina monoclonal e para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de camundongo comprados da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA) e  $\beta$ -tubulina III da Chemicon. Utilizou-se o seguinte protocolo de imunocoloração: IDPSC crescendo em lamínulas foram lavada duas vezes em tampão de lavagem (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween-20), fixado com 4% de paraformaldeído e permeabilizado com 0,1% de Triton X-100. Após o bloqueio com 5% de albumina de soro bovino, as células foram incubadas com anticorpos primários diluídos por 1 hora em temperatura ambiente. Anticorpos primários foram diluídos a 1:100. Após lavar três vezes em tampão de lavagem, anticorpos secundários apropriados marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou Cy3 foram adicionados por 30 min a uma diluição de 1:100. Os slides do microscópio foram montados em meio de montagem Vectashield (Invitrogen) com ou sem DAPI. A análise foi realizada usando imagens digitais que foram adquiridas com uma câmera CCD refrigerada (PCO, VC44) e processadas com software ISIS (MetaSystem, Belmont, MA, EUA).

[0306] Durante a diferenciação neural de IDPSC, a formação de estruturas semelhantes à neuroesfera também foi observada (**Figuras 8A-8B**). Quando realizamos a imunofluorescência contra nestina, constatou-se que o interior dessas estruturas era positivo para nestina (**Figura 8C**), o que indica a presença de progenitores neurais dentro destas esferas.

[0307] A diferenciação neural também foi confirmada pela expressão de genes neurais como beta-tubulina, neurofilamentos médios e GFAP usando reação em cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) (**Figura 9**).

[0308] Os resultados referentes à capacidade de IDPSC de se diferenciar em células neuronais são resumidos para o astrócito e destinos

de célula neuronal nas **Figuras 10 e 11**, respectivamente.

### **Exemplo 5: Uso Terapêutico de IDPSC em um Modelo do Camundongo de Lesão na Medula Espinhal**

[0309] Camundongos fêmeas adultas com 6 – 8 semanas de idade foram anestesiadas com quetamina e xilazina (100 e 15 mg/kg, respectivamente) e submetidas a uma lesão de compressão para 1 min no nível T9, por meio de um clipe vascular de 30g (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT), conforme descrito por Marques e colaboradores (2009). Após a cirurgia, os animais foram autorizados a se recuperar em uma almofada quente e receberam 1 mL de solução salina para compensar a desidratação e perda de sangue e injeções de enrobaytril (2,5 mg/kg/d de SC). As bexigas foram expressas manualmente duas vezes por dia até o retorno da função urinária espontânea.

[0310] O transplante de IDPSC foi realizado da seguinte forma. As células foram transplantadas em dois pontos de tempo diferentes a fim de comparar a recuperação entre um lesão subaguda e uma crônica. O grupo subagudo recebeu tratamento 7 dias após a lesão: injeção de médio porte em um volume total de 4  $\mu$ L (subaguda + DMEM, n = 8) ou IDPSC ( $8 \times 10^5$  em 4  $\mu$ L, n = 8, subaguda + IDPSC). O grupo crônico recebeu o meio 28 dias após a lesão (crônica + DMEM, n = 8) ou IDPSC (crônica + IDPSC, n = 8) com a mesma concentração e volume. Em todos os grupos, as células foram injetadas no epicentro da lesão, usando uma seringa Hamilton de 10  $\mu$ L. Um grupo de simulação que não recebeu nenhuma célula mas foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos foi incluído como um controle.

[0311] Preservação de matéria branca foi medida como segue. A análise desta quantificação mostrou uma melhor conservação de áreas de matéria branca nos grupos de IDPSC do que nos grupos DMEM (**Figura 12**). O grupo de simulação exibiu valores normais e superiores (63,23 – 1,2%) em comparação com os grupos de lesão com distribuição normal. Os

animais tratados com IDPSC apresentaram valores em torno de 46,85 – 1,97% para o grupo subagudo e 43,49 – 2,89% para o crônico, enquanto os animais que receberam apenas DMEM como tratamento apresentaram valores inferiores de cerca 38,03 – 4,28% e 39,00 – 2,54% para os grupos subagudo e crônico, respectivamente. A preservação da matéria branca foi calculada em termos de percentagem de matéria branca poupada na área lesada. Todos os valores são ilustrados na **Figura 12**, que também mostra uma visão esquemática do local da lesão e das amostras de medula espinhal usadas para esta quantificação (**Figuras 12D e 12E**).

[0312] A quantificação do fator neutrófico derivado de cérebro de fatores tróficos imuno-rotulados (BDNF), fator beta de crescimento do nervo (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), e neurotrofina-4 (NT-4) foi também realizada nas seções da medula espinhal (**Figuras 13A-13D**). Os anticorpos primários usados foram: BDNF anti-humano de coelho (1:100; PreproTech, Rocky Hill, NJ), NGF anti-humano de coelho (1:100; PreproTech), NT-3 anti-camundongo de cabra (1:100; PreproTech), NT-4 anti-camundongo de cabra (1:100; PreproTech). Após a incubação primária, os slides foram lavados e incubados com os anticorpos apropriados: Alexa 488 anti-coelho de cabra (1:600; Sigma-Aldrich) ou Alexa 488 anti-cabra de coelho (1:600; Sigma-Aldrich) por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de três lavagens e lamínula com Fluoromount (Sigma-Aldrich). Para estudos de quantificação, foram utilizados 12 animais (3 por grupo). As imagens de imunofluorescência foram analisadas com Image-Pro Plus (versão 6.0), avaliando a razão entre a área manchada e a área de campo real. Utilizaram-se seis seções de cada animal, e estas seções foram separadas a 100 µm de distância uma da outra. De cada seção, duas fotos foram capturadas usando o objective 10X a fim de abranger a seção transversal inteira da medula espinhal. Depois disso, os fatores tróficos BDNF, NGF-b, NT-3, e NT-4 foram quantificados usando essas imagens. Os dados foram analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism com um

Análise de Variância simples (One way ANOVA) e Tukey.

[0313] Embora o fator trófico coloração tenha mostrado baixa imunorreatividade porque os fatores tróficos são solúveis e, portanto, se espalham muito rapidamente no tecido, uma diferença no padrão de coloração entre os grupos pode ser observada (dados não mostrados). Em geral, o grupo tratado com IDPSC mostrou um aumento de imunorreação por área em relação ao grupo tratado com DMEM, especialmente no grupo subagudo, que mostrou níveis mais elevados de todos os fatores tróficos analisados. Para o grupo crônico, observamos apenas as diferenças entre o grupo tratado com IDPSC e o grupo tratado com DMEM para quantificação por BDNF e NGF. A coloração mais forte foi observada em animais tratados com IDPSC para todos os fatores tróficos analisados em comparação com animais tratados com DMEM, especialmente BDNF e NGF, que mostraram uma área imuno-rotulada significativamente maior em grupos subagudos e crônicos (**Figuras 13A-13D**).

[0314] Todas as análises estatísticas foram realizadas com o Graph Pad Prism 4.0. Os resultados são expressos como média – SEM e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados importantes.

[0315] Para microscopia eletrônica, oito semanas depois dos animais receberam o transplante de células, eles foram anestesiados com quetamina e xilazina conforme descrito acima, e perfundidos intracardialmente com uma solução de 4% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído em 0,1 M tampão de fosfato (pH 7,4). Foram extraídos medulas espinhais, divididas em três segmentos diferentes (epicentro da lesão e rostral e caudal) e pós-fixados por imersão em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilatado com 0,8% de ferrocianeto de potássio por 6 horas à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas três vezes com 0,1 M tampão de fosfato (pH 7,4), desidratadas com uma série de acetonas classificadas, embebidas em resina e polimerizadas por 48 horas a 60°C. Seções semi-finas (500 nm) e ultra-finas foram feitas usando um

ultramicrotomo RMC. As seções semi-finas foram coradas com azul de toluidina e observadas sob um microscópio Zeiss (Axioscop 2 Plus), e as imagens foram adquiridas utilizando o programa Axiovision versão 4.5 (Zeiss). As seções ultra-finas foram coletadas em grades de cobre, manchadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

[0316] **As figuras 14 e 15** mostram seções semi-finas e ultra-finas de todos os grupos. Observamos que, em geral, a análise ultraestrutural dos animais que receberam DMEM na fase subaguda (**Figuras 14A – 14C**) a ou na fase crônica (**Figuras 15A, 15C e 15E**) revelou desorganização do tecido com muitas cavitações (setas vermelhas curtas na **Figura 14A** e asteriscos nas **Figuras 14C e 15C**), e astrocitose forte (ponta de seta em **Figura 15E**), poucas fibras preservadas (**Figuras 14B e 14C**), e algumas células de Schwann mielinizantes suas lâminas basais típicas (seta sólida na **Figura 14B** e estrela na **Figura 15C**).

[0317] Ambos os grupos subagudos e crônicos que receberam transplante de IDPSC mostraram melhor preservação de tecidos. No grupo subagudo de IDPSC (**Figuras 14D–14I**), pudemos observar um grande número de fibras preservada dentro da matéria branca (grandes setas na **Figura 14E**) e um notável número de macrófagos com muitas inclusões citoplasmáticas, os restos de mielina e lipídios no seu interior (seta preta na **Figura 14E**). Células de Schwann intactas (seta sólida na **Figura 14F**) e axônios remielinizantes de oligodendrócitos (seta preta na **Figura 14F**); ilhas regenerativas (**Figura 14G**) e alguns neurônios preservados também foram observados. Alguns destes neurônios mostraram vários contatos sinapse conservados (porções artificialmente coloridas na **Figura 14H**). A análise ultraestrutural do grupo crônico de IDPSC (**Figuras 15B, 15D e 15F**) mostrou muitas fibras preservadas (setas longas na **Figura 15B**), alguns axônios de mielinizantes de células de Schwann (setas na **Figura 15D**) e preservou os neurônios com contatos de sinapse (retângulo na **Figura**

**15F).**

[0318] A análise comportamental foi realizada da seguinte forma. Os animais foram avaliados antes da lesão, 1 d após a lesão e semanalmente por até 8 semanas após o transplante de células. Para analisar a recuperação, foi utilizado o teste de mobilidade global descrito por Marques e colaboradores (2009), que avalia a melhora locomotor gravando os animais em um campo aberto por 1 min com uma webcam (5 quadros por segundo). Depois disso, a velocidade (cm/seg) que os animais alcançam durante este período de 1 min. foi medida utilizando o software ImageJ. O teste da escala BMS (Basso Mouse Scale) também foi realizado (Basso et al., 2006), que é uma escala de 9 pontos que indica as capacidade e locomoção e características locomoção tais como o movimento do tornozelo, posição da pata, suporte de peso, passos plantares, coordenação do membro posterior e membro anterior e estabilidade do tronco. Para análise estatística, a média das pontuações obtidas a partir dos membros posteriores esquerdo e direito (HL) foi usada para estabelecer um resultado individual por animal. Testes One-Way ANOVA e Tukey para comparações post-hoc foram determinados.

[0319] Para o teste de mobilidade global, os animais de simulação não mostraram qualquer alteração em sua locomoção e apresentaram valores normais de cerca 16,21 – 1,73 cm/seg. O grupo subagudo que recebeu IDPSC (6,94 – 1,85 cm/seg) apresentou valores superiores em relação ao grupo DMEM (3,71 – 0,95 cm/seg), e a melhora na locomoção começou 7 dias após o transplante de células (ou seja, 14 dias após a lesão da medula espinal (SCI)) e foi mantida ao longo das semanas subsequentes do estudo. Os animais crônicos mostraram uma ligeira melhora 7 dias após o tratamento. No entanto, 14 dias após o transplante de células, eles exibiram maior velocidade de locomoção, com uma média em torno de 6,6 – 2,03 cm/s versus 4,15 – 1,07 cm/seg no grupo DMEM. Em ambos os grupos que receberam IDPSC, os animais não alcançaram taxas normais, mas eles

mostraram um melhor padrão exploratório, andando muito mais e cruzando o campo aberto várias vezes durante o teste. **A Figura 16** ilustra o deslocamento desses animais 35 dias após o transplante de IDPSC.

[0320] A melhora funcional mostrada por animais tratados com IDPSC também pode ser atribuída à liberação de fatores neurotróficos por essas células. Isto pode agir através do estímulo da brotação colateral, que pode ultrapassar a área da lesão e fazer novos contatos sinápticos, melhorando o resultado funcional (Cummings et al., 2005). Esta é uma explicação plausível, porque muitos neurônios saudáveis, contatos de sinapse intactos e axônios preservados foram encontrados na análise ultraestrutural. Este estudo demonstrou um importante potencial terapêutico do transplante de IDPSC, como aplicado nas fases subagudas e crônicas de SCI compressiva de camundongo. IDPSC apareceram como excelentes candidatas para tratamentos baseados em células-tronco para serem usadas em testes humanos num futuro próximo.

#### **Exemplo 6. Estudo Pré-Clínico de Potencial Neurológico de IDPSC em Casos Clínicos de Cinomose e Hiperqueratose dos Coxins**

[0321] A Cinomose é uma doença viral de cães, e esse vírus pertence ao grupo de paramixovírus. Em humanos, o vírus do sarampo também é um membro deste grupo. Em aproximadamente metade dos casos, é fatal. Impossível de ser curada, a cinomose é uma doença viral grave que ataca o corpo de um cão em todas as frentes. Pode causar uma infecção persistente no sistema de nervoso central do cão, resultando em uma doença desmielinizante multifocal progressiva. Uma vez que um animal desenvolve sintomas neurológicos da doença, tais como convulsões ou paralisia, suas chances de sobreviver são mínimas e sua qualidade de vida é obrigada a se tornar progressivamente pior. Assim, estes animais são geralmente sacrificados.

#### Relatos

[0322] Os animais foram inscritos em um procedimento experimental,

após a obtenção do consentimento livre e esclarecido assinado pelos proprietários dos animais e em conformidade com as diretrizes internacionais de cuidado animal. O tratamento foi realizado também sem qualquer custo para os proprietários e os animais receberam acompanhamento a longo prazo após o tratamento.

[0323] Foram inscritos oito cães de raças variáveis com idade entre 4 a 6 anos e com peso entre 8 kg a 16 kg em que a cinomose foi diagnosticada e que apresentaram tais sintomas como vômitos, diarreia, febre e outros. Antes do transplante de células, estes cães receberam antibióticos para combater a tosse e pneumonia, o que não forneceu qualquer melhora clínica. Seguindo a capacidade do cachorro de afastar os efeitos do vírus, eles adquiriram os sintomas de uma forma neural desta doença, tais como paralisia das patas traseiras ou de ambas as patas traseiras e das patas da frente.

[0324] O transplante de IDPSC xenogênica foi realizada somente após o efeito do vírus ser encerrado. IDPSCs indiferenciadas, que foram criopreservadas em passagens 3-5, foram usadas. As células foram descongeladas antes do transplante e lavadas duas vezes em PBS estéril pré-aquecido (37C) após centrifugação durante 5 min a 800 xg. Naquele momento, a viabilidade das células foi testada usando coloração azul de tripano e foi de aproximadamente 98% de células vivas. O número de células usadas em cada aplicação foi estabelecido em conformidade com os pesos do cão e variou entre  $2 \times 10^6$  (8 kg) a  $4 \times 10^6$  (16 kg). As células foram suspensas em um volume médio de  $\pm 0,5$  mL de solução fisiológica estéril para posterior injeção intravenosa. O cão recebeu um anestésico injetável, a dose do qual foi calculada de acordo com o peso do cão e sensibilidade de certas raças a anestésico. De acordo com a severidade da doença, os cães receberam única ou múltiplas aplicações (não mais que três). IDPSCs foram transplantadas sem qualquer protocolo de imunossupressor. Nenhum dos animais mostraram sinais de rejeição imune

após transplantes de IDPSC simples ou múltiplos.

[0325] Logo após a primeira aplicação de IDPSC, todos os animais apresentaram melhora significativa dos sintomas da forma neurológico da Cinomose. Os animais, que eram capazes apenas de rastejar, começaram a se levantar a meia altura, enquanto aqueles que eram capazes de se levantar a meia altura começaram a se levantar e andar. Os animais, que eram capazes apenas de rastejar, começaram a se levantar, enquanto aqueles que eram capazes de se levantar, começaram a andar de vagar. Cada animal tinha sua própria dinâmica de cura e aqueles que tinham sua musculatura mais fortalecida demonstraram dinâmica acelerada de melhora. Os cães que apresentavam sintomas clínicos mais avançados e só conseguiram rastejar, demonstraram significativa melhora após a terceira aplicação de IDPSC e, mesmo com dificuldade, estes animais foram capazes de andar. Em seguida, a fim de obter o melhor resultado clínico, eles foram submetidos a procedimentos de fisioterapia.

[0326] Nas **Figuras 17** e **18** representativas, dois animais com formas neurológicas de cinomose moderadas e severas (antes da aplicação da célula) e sua progressão de cura (após a aplicação de célula) são apresentados. O animal com uma forma neurológica leve apresentou paralisia das patas traseiras (**Figuras 17A** e **17B**), que foram completamente restauradas após uma única aplicação de IDPSC (**Figuras 17C** e **17D**), e o animal era capaz de andar e se sustentar nas patas durante períodos de tempo suficiente. O animal com uma forma neurológica grave apresentou tanto convulsões quanto paralisia das patas da frente e traseiras (**Figuras 18A** e **18B**). As convulsões desapareceram após a primeira aplicação de IDPSC, e o cão foi capaz de andar uma curta distância até mesmo apresentando os sintomas da doença de ser incapaz de mover as patas corretamente (**Figuras 18C** e **18D**). Este cão recuperou quase completamente todos os movimentos após a terceira aplicação de IDPSC.

[0327] Em um acompanhamento 4 meses mais tarde, todos os animais recuperaram seu movimento, apresentando até capacidade de correr. Em um acompanhamento 2 anos mais tarde, os animais demonstraram que o transplante de IDPSC era seguro e foram capazes de manter o desempenho físico de cães, que eram aparentemente saudáveis. Nenhum dos animais demonstrou a formação de tumor, que supostamente pode ser causada por transplante de células-tronco.

### **Exemplo 7. Diferenciação Miogênica de IDPSC**

[0328] Além disso, a diferenciação de IDPSC em células tipo cardiomiócitos (CM) foi observada (**Figura 19**). IDPSC pode adotar um fenótipo e morfologia tipo CM *in vitro* após fusão (**Figura 19A**) ou diferenciação (**Figuras 19B - 19C1**).

[0329] A apoptose em cardiomiócitos é crítica para a disfunção cardíaca progressiva que culmina na insuficiência cardíaca congestiva. Células da medula óssea podem ajudar a restaurar a função cardíaca após isquemia por meio de sua fusão com cardiomiócitos, resgatando assim células do coração de apoptose. Fusão celular preserva cardiomiócitos contra apoptose após infarto do miocárdio, proporcionando assim uma nova abordagem para terapias regenerativas cardíacas de direcionamento. (Yang et al., 2012). IDPSC também podem ser uma boa opção para uso em insuficiência cardíaca devido à sua capacidade de fusão espontânea natural, que pode ser demonstrada *in vitro* (**Figura 20**). Fibroblastos primários provenientes de pele humana (PHSF), células da medula óssea de camundongo (MBMC) e IDPSC foram isolados e lavados duas vezes com solução tampão fosfato livre de cálcio e magnésio Dulbecco (DPBS, Invitrogen) e dissociados com 0,25% de tripsina/solução de EDTA (Invitrogen). A suspensão foi centrifugada e o um pélete de célula foi ressuspensionado em DMEM (Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen) contendo uma tintura fluorescente verde (Dio) (Vybrant CM-Dio Cell-Labeling Solution; Molecular Probes, Invitrogen) enquanto a

suspensão de IDPSC foi ressuspensa na mesma solução contendo corante fluorescente de vermelho (Dil). As células foram incubadas durante 15 minutos a 37°C, lavadas duas vezes em DPBS e misturadas com células IDPSC: PHSF e IDPSC: MBMC foram semeadas em uma proporção de 1:1. Fusão celular espontânea eficiente foi observada em ambos os experimentos (**Figura 20**).

[0330] Essas IDPSC indiferenciadas ( $10^6$ ) também foram transplantadas no modelo do rato de infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária, que foi induzida como descrito (Selye H, Bajusz E, Grassos S, Mendell P. Simple techniques for the surgery occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. (1960) 11: 398-407). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as Diretrizes Internacionais para a Conduta Ética para o Cuidado e Uso de Animais. Cinco Wistar machos jovens foram usados, que pesavam entre 200-250 gramas. As células foram administradas por injeção Intramiocárdica direta logo após a indução de infarto do miocárdio. Depois de um mês, habitação de IDPSC estava no miocárdio músculo (**Figura 21**). Anticorpo anti-IDPSC, que foi obtido conforme descrito em Kerkis et al., (2006) *Cells Tissues Organs* 184:105-116, foi usado para analisar a habitação de IDPSC.

[0331] A capacidade de fusão espontânea e potencial miogênico in vivo de IDPSC com células e tecidos musculares receptores também foi demonstrada na distrofia muscular (GRMD) em cães golden retriever. Para minimizar os efeitos da variabilidade inter e interfamiliar anteriormente observada em GRMD, foram usados cães da mesma ninhada. Utilizaram-se seis animais afetados (3 machos e 3 fêmeas) nascidos após a reprodução de um macho afetado com uma fêmea portadora através da inseminação artificial. Cada gênero recebeu  $6 \times 10^7$  de IDPSC através da injeção arterial. Um macho não injetado e uma fêmea não injetada foram analisados como controles de idade correspondente. Para verificar o efeito potencial em longo prazo do tratamento com IDPSC, os animais foram

tratados mensalmente, começando aos 44 dias de idade. Em pontos de tempo diferente, biópsias foram obtidas e habitação e diferenciação de IDPSC foram estudadas. Como visto na **Figura 22**, IDPSC diferenciadas em e fundidas com miócitos nos cães GRMD injetados, indicadas pela coloração de distropina humana nos músculos do cão.

### **Exemplo 8. Habitação de IDPSC em Medula Óssea de Camundongos**

[0332] IDPSC foram adicionalmente caracterizados pela sua capacidade de enxertia após injeção intraperitoneal em camundongos nude BALB/c (n = 15) com  $10^6$  células de cada linhagem de testada (n = 4). Quando os camundongos foram sacrificados 2 semanas mais tarde, depois da injeção de IDPSC, observou-se enxertia densa dessas células na medula óssea dos camundongos (**Figura 23**).

### **Exemplo 9. Diferenciação de IDPSC em Células de Suporte da Espermatogênese e Células Tipo Espermatogônias após Transplante em Testículo de Camundongo**

[0333] Foi curioso que IDPSC expressaram marcadores chave de células de Sertoli quando indiferenciadas, como desmina, vimentina e citoqueratina-18 e CD29 (integrina beta 1) (**Figura 24**). A partir desses dados, parecia provável que estas células teriam todas as vantagens que justificam a testar sua capacidade de se diferenciar em células de Sertoli e outros tipos de células espermatozoniais. Em um experimento piloto, duas culturas de IDPSC humana (hIDPSC) foram transplantadas em testículos de camundongos férteis e inférteis (por irradiação) conforme descrito na **Figura 25**.

[0334] A suspensão de células ( $10^5$  células) foi manchada com uma tinta fluorescente Vybrant (**Figura 26A-26B**) e injetada em testículos de camundongo normal ou testículos de camundongo esterilizados por irradiação gama (cepa CD-1). Irradiação (150 rads) realizou-se três vezes (1 mês) e as células foram aplicadas um mês após a irradiação. Os

camundongos de controle foram injetados com solução salina. Os animais foram sacrificados 3 e 9 dias após a injeção. As seções finas congeladas (5 µm) foram preparadas usando um protocolo de rotina. A presença de IDPSC nos testículos dos camundongos foi avaliada por fluorescência emitida pelo corante Vybrant.

[0335] Em camundongos férteis, 1 dia após a injeção, as células foram detectadas principalmente nos compartimentos de Leydig e células de Sertoli (**Figuras 26C-26E**). Após 3 e 9 dias, as IDPSC foram encontradas perto do lúmen onde mais células espermatogônias diferenciadas são geralmente localizadas (**Figuras 27 e 28**). IDPSC demonstraram uma distribuição de agregados dentro desses compartimentos e a fluorescência foi observada apenas em algumas regiões tubulares (TS), indicando a presença de IDPSC; no entanto, a maioria das TS nos camundongos não mostrou qualquer sinal de células. Em camundongos de controle, em TS onde solução salina não foi injetada, nenhum sinal de fluorescência foi observado (**Figura 27**). Em camundongos inférteis, no dia 9, após injeção de IDPSC no testículos irradiados, as IDPSC foram observadas principalmente na parte periférica das TS enxertadas na túnica albugínea, que é composta de tecido conjuntivo denso (**Figura 29**).

[0336] No dia 9, após a injeção de IDPSC, observou-se a formação de células germinativas humanas. As análises foram realizadas utilizando o anticorpo anti-IDPSC (verde) que especificamente reconhece IDPSC (**Figura 29C**). Observou-se a presença de tétrades indicando a ocorrência de meiose (**Figuras 29D-29D1**).

[0337] A formação de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento de IDPSC manchadas com Vybrant (vermelho) também foi observada (**Figuras 30 e 31**). Análises FISH com sondas de cromossomo X humano demonstram a presença do cromossomo X humano em compartimentos de interesse (**Figura 32**). No entanto, a fusão

entre células humanas e de camundongo poderia ocorrer, e é difícil imaginar como células tetraploide apresentariam progresso através da meiose (**Figura 33**).

[0338] Observamos a fusão entre IDPSC manchadas com Vybrant (vermelho) e células isoladas de testículos de camundongos coradas em verde quando elas estavam co-cultivadas in vitro. A fusão entre estas células foi observada com dupla coloração do citoplasma, bem como com a presença de duas células bi-nucleares com o núcleo, mostrando morfologias distintas que correspondem a células humanas e de camundongo (**Figura 33A-33B1**).

[0339] Além disso, mostramos que hIDPSC foram capazes de preencher o sítio das células de Sertoli, Leydig e mioides após 60 dias em camundongos inférteis, apresentando as características morfológicas acima mencionadas (dados não mostrados).

#### **Exemplo 10. Tratamento da Insuficiência Renal em Gato com IDPSC**

[0340] Um gato persa macho, 11 anos, sexo masculino, chegou ao Hospital Veterinário para cuidados clínicos, apresentando sintomas de desidratação moderada, poliúria, polidipsia, perda de apetite, apatia e perda de peso. Exame físico dos parâmetros vitais mostrou alterações no grau de hidratação, que foi cerca de 7%. Avaliação da função renal foi feita medindo ureia > 250 mg / dl, creatinina 11,1 mg/dl, densidade específica da urina 1012 e pela avaliação de ultrassom dos rins, ambos os quais mostraram perda parcial do limite córtico-medular, tamanho pequeno, ecogenicidade cortical elevada. As medições dos rins, esquerdo e direito, respectivamente, foram 1,7 cm de largura por 2,0 cm de comprimento e 2,0 cm de largura por 2,5 cm de comprimento. Não foram observadas alterações hematológicas.

[0341] Após um diagnóstico clínico de Insuficiência Renal Crônica (CRF), eletrólitos (Na) 155 mg/dl, (K) 3,0 mg/dl, (Ca) ionizado 8,4 mg/dl e (P) 7,7 mg/dl foram medidos. Tratamento de suporte imediato foi iniciado

por injeção intravenosa de 250 ml de Ringer com lactato (RL) mais 3,5 ml de cloreto de potássio (solução de KCl em 19,1%), 2 mL do composto B e 0,5 mL de ranitidina. Com exceção do potássio, esta terapia foi mantida durante os primeiros 12 dias, e depois a administração por via subcutânea (SC) de 0,5 mL de ranitidina foi iniciada. Neste período, a melhora clínica observada ocorreu 5 dias após o início da terapia de suporte e as concentrações de ureia e creatinina atingiram o mínimo de 174,1 mg/dl e 5,3 mg/dl, respectivamente. O animal fugiu para brincar e apresentou normorexia, mas ainda apresentava poliúria/polidipsia.

#### Terapia com IDPSC

[0342] A primeira terapia com IDPSC humana foi feita 27 dias após o início da terapia de suporte, com a segunda e a terceira após 41 dias e após 50 dias. Durante a primeira terapia celular, o animal recebeu  $2 \times 10^6$  de IDPSC indiferenciadas em LP, diluídas em 1mL de solução estéril de fosfato: 0,6 mL foram aplicados por via intrarenal (somente no rim direito) e 0,4 mL foram aplicados por via subcutânea. Para este procedimento, o animal recebeu analgesia com 5mg/kg de morfina e foi induzido com um isoflurano anestésico inalado em um aquário.

[0343] Durante os 12 dias após a terapia com IDPSC e enquanto ainda recebia o tratamento de suporte descrito acima, o animal tinha um quadro clínico sem alterações e sem qualquer outro tratamento específico. Um mês após a terapia com IDPSC, observou-se 80% de melhora. O animal demonstrou uma diminuição na ingestão de água e a produção de urina. Neste período, as concentrações de ureia e creatinina alcançaram o mínimo de 172 mg/dl e 4,4 mg/dl, respectivamente.

[0344] Uma segunda terapia com IDPSC foi feita 43 dias após a primeira sob as mesmas condições. Durante 29 dias após a segunda terapia celular, o animal manteve-se bem. Trinta dias após a segunda tomografia, apresentou um quadro de apatia e normocítica/normocrômicas não regenerativa.

[0345] A terceira terapia celular foi realizada 50 dias após a segunda terapia celular sob as mesmas condições e o animal ficou bem. Sete dias após a terceira terapia celular, o animal estava bem, brincando, ganhou peso, normorexia e normodipsia normúria. Neste período, as concentrações de ureia e creatinina alcançaram o mínimo de 136,2 mg/dl e 3,8 mg/dl, respectivamente.

[0346] Quatro meses e doze dias após a terceira terapia celular, o animal apresentou concentrações de ureia e creatinina em 198,1 mg/dl e 4,4 mg/dl, respectivamente. Após este período, o animal começou a apresentar apatia com frequentes episódios de êmese e mucosas pálidas, mas não apresentava poliúria/polidipsia e o peso manteve-se estável. Um tratamento com eritropoietina foi instituído em dose de 2000 UI de 100 UI/kg, três vezes por semana e Combiron foi prescrito a 24 mg/mL e ½ mL BID até novas recomendações. Dezesesseis dias após o tratamento, o hemograma voltou ao normal e o animal estava bem.

[0347] Nas **Figuras 34-36**, são resumidas as flutuações em ureia, creatinina e eletrólitos durante a terapia celular. As medições foram realizadas 12 vezes, e os números 4, 7 e 9 correspondem a transplantes de IDPSC. **A Figura 35** mostra que a terapia com células IDPSC estabilizou o nível de creatinina, que foi mantido baixo e estável. Embora o nível de ureia apresente flutuações durante este período, ele apresenta tendência a diminuir ao longo de um tempo (**Figura 34**) bem como eletrólitos (**Figura 36**).

[0348] Após um mês adicional da chegada do animal, apresentando êmese e fraqueza muscular na flexão ventro-cervical. Instituiu-se terapia com fluidos de Ringer com lactato por via venosa, 0,3 mL de Plasil e suplementação de potássio de 3 mL (19,1% de solução de KCl), sem exceder uma velocidade de 0,5 mEq/kg/hora. Quatro horas mais tarde, o animal teve uma convulsão e morreu. Os exames realizados quando o animal chegou demonstraram potássio 4,1 mg/dl, ureia 156 mg/dl e

creatinina 4,4 mg/dl, com uma média dos valores mantidos durante todo o tratamento e, portanto, indicado que a provável causa da morte não era a insuficiência renal.

[0349] Logo após a morte, com a permissão do dono, os rins foram removidos e fixados em 10% de formaldeído. Macroscopicamente, houve uma diferença significativa no tamanho dos rins direito e esquerdo (**Figura 37A**) com o rim esquerdo marcado por uma neoformação de aparência irregular (**Figura 37B**) e consistência semelhante ao rim esquerdo. Essa diferença foi observada anteriormente por ultrassonografia.

[0350] A avaliação histológica demonstrou diferença significativa entre o rim direito, que recebeu transplante de IDPSC através da injeção por via intrarenal, e o rim esquerdo (**Figura 38**). O rim esquerdo apresenta fibrose extensa (**Figuras 38A-38A1**) com membranas basais glomerulares espessadas e proliferação mesangial em um glomérulo (**Figura 38A2**). O rim direito mostra uma morfologia mais preservada (**Figura 38B**) com fibrose mínima (**Figura 38B1**) e um glomérulo preservado (**Figura 38B2**). Entre outros efeitos positivos do transplante de IDPSC, infiltração de sangue (vermelha) no rim direito era evidente, como observado nas **Figuras 38B1 e 38B2**. Além disso, A **Figura 38B2** mostra preservação das células endoteliais glomerulares, que não são visíveis na **Figura 38A2**.

[0351] A presença de IDPSC no rim do gato foi confirmada pela análise de imunofluorescência usando um anticorpo anti-IDPSC (**Figuras 49A - 39C**).

### **Exemplo 11. Efeito de IDPSC em Remodelação Rápida da Pele e Prevenção contra Cicatrizes**

[0352] IDPSC marcadas com Proteína Verde Fluorescente Reforçada (EGFP) por LP (EGFP-IDPSC) foram cultivadas como descrito (Lizier et al., (2012) PLoS ONE 7:e39885). Camundongos Swiss (8 semanas de idade; fêmea; peso corporal, 20 g de -23) foram utilizados. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, e um modelo de imobilização de

ferida excisional foi gerado. Em breve, após a remoção do pelo da superfície dorsal e anestesia, duas feridas excisionais de pele de 5mm de espessura total foram criadas em cada lado da linhagem média em 12 ratos. Cada ferida recebeu  $10^5$  células (LP EGFP-IDPSC) diluídas em 100  $\mu$ L de PBS, e as células foram injetadas por via intradérmica em torno da ferida em quatro locais de injeção. Um grupo de controle recebeu somente PBS. Nenhum protocolo de imunossupressão foi aplicado. A incisão foi saturada com nylon (4-0). Os animais ficaram alojados individualmente. Testamos o adesivo na pele de camundongos antes desta experiência e não observamos qualquer irritação cutânea ou reação alérgica. Os animais foram sacrificados após 7 dias.

[0353] Exame histológico foi realizado da seguinte forma. Amostras de tecido foram fixadas em 3% de paraformaldeído por 24 horas e incorporadas em OCT, um meio de embebição usado em tecido congelado para garantir a Temperatura Ideal de Corte. Seções com seis microns de espessura foram coradas com H & E e Tricromo de Masson para microscopia de luz. Análise da expressão de GFP em enxertos de LP EGFP-IDPSC foi realizada por microscopia confocal.

[0354] Histologicamente, o melhor aspecto foi observado no grupo que recebeu LP EGFP- IDPSC via distribuição tópica. Neste grupo, tecido bem organizado, fornecida a formação da epiderme, derme e hipoderme, foi observado. Não foram detectados sinais de rejeição imunológica do enxerto.

[0355] Colágeno, sob a forma de fibrilas alongadas, pode ser encontrado normalmente na pele. A coloração por Tricromo de Masson demonstrou a presença de colágeno na pele, que foi remodelada pela distribuição tópica de EGFP-IDPSC para o local lesionado. Em contraste, o grupo de controle não mostrou a remodelação da pele (**Figura 40**).

[0356] Microscopia confocal mostrou enxertia robusta de LP EGFP-IDPSC em torno de pequenos vasos, brotos de folículos pilosos e glândulas

sebáceas (**Figura 41**). Imagens capturadas com microscopia confocal de células da pele tratadas só com PBS são mostradas na **Figura 42** para comparação.

### **Exemplo 12. Diferenciação da Retina In Vitro de LP IDPSC**

[0357] Já que a retina neural é composta por células ectodérmicas e da mesma origem que DP e IDPSC derivadas de DP, ambas estas células, da retina e IDPSC, podem preservar uma "memória" embrionária comum que pode permitir que a IDPSC desse origem não somente aos neurônios do sistema nervoso central (SNC), com também às células-tronco da retina e células tipo neurônios da retina.

[0358] Estudos de potencial neurogênico de LP IDPSC demonstraram que essas células apresentam um tipo mais controlado da necessidade de diferenciação e responderam adequadamente quando indução neurogênica foi induzida com ácido retinoico. Quando IDPSC LP induzidas foram postas em placas in vitro, diferenciação adicional foi observada e a maioria das células expressaram  $\beta$ -Tubulina III, um marcador para os neurônios imaturos. Além disso, muitas células postas em placas expressaram marcadores para neurônios maduros ou células gliais.

[0359] Em vertebrados, a retina é considerada parte do sistema nervoso central (SNC). No entanto, a retina é uma classe especial de células neuronais, e é uma estrutura em camadas com várias camadas de neurônios interconectados por sinapses. A retina produz células fotorreceptoras, que são os neurônios que são diretamente sensíveis à luz. Podem ser identificados três tipos de neurônios da retina: células bastonetes, cones e ganglionares. Os bastonetes fornecem visão em preto e branco, cones apoiam a visão diurna e a percepção da cor, e a célula ganglionar fotorreceptora é importante para respostas reflexivas à luz do dia.

[0360] Células neurais e retiniais diferem em seus espectros de marcadores específicos e enquanto as células retiniais podem expressar marcadores de célula neuronal precoce, as células neuronais são limitadas

pela expressão de apenas marcadores neuronais (por exemplo, nestina e beta-tubulina III) (**Figura 43**). EP IDPSC foram capazes apenas de se diferenciar em células neurais, enquanto LP IDPSC mostrou a diferenciação neuronal e retinal (**Figuras 45-47**).

#### Protocolo de Diferenciação de LP IDPSC para Células Retinais In Vitro

[0361] LP IDPSC foram mantidas e expandidas in vitro conforme descrito em Lizier et al., 2012. Neuroesferas foram obtidas de LP IDPSC, que foram cultivadas no frasco de cultura de 25cm<sup>2</sup> até atingirem um semiconfluência de 70%. Em seguida, as células foram tripsinizadas e divididas em duas louças de petri de 35 mm, pré-tratadas com 1% de agarose (Sigma), que formou uma camada fina na parte inferior da placa. Meio de cultura neurobasal suplementado com 3% de B27 (ambos da Gibco) foi usado. As louças foram incubadas a 37°C durante 3 dias em atmosfera úmida em uma incubadora de 5% de CO<sub>2</sub>. Uma vez formadas, as neuroesferas foram transferidas para outras louças e foram banhadas em lamínulas para adesão em meio de cultura basal de IDPSC, que foi alterado no dia seguinte para NB+B27. Neuroesferas aderidas foram mantidas em meio cultura NB+B27+ 0,5 µM de ácido retinoico por cinco dias até as células começaram a se desenvolver das neuroesferas. Em seguida, foi realizada uma digestão enzimática utilizando 0,25% de tripsina e as células foram semeadas em uma nova louça de petri de 35 mm, mantendo o mesmo meio de cultura por mais de 10 dias, mas sem adição de 5 µM de ácido retinoico, e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. A cultura de células foi mantida por mais cinco dias e então fixada em 4% de formaldeído. Um protocolo resumido é mostrado na **Figura 44A-44F** e um cronograma de diferenciação é apresentado na **Figura 44G**.

[0362] No dia 15 da diferenciação, a diferença na diferenciação em células da retina entre EP e LP foi observada e é mostrada nas **Figuras 45 e 46**. EP IDPSC mostrou robusta diferenciação neuronal, expressando

marcadores principais tais como beta-tubulina III e GFAP (**Figura 47**).

[0363] A expressão de CD73 (ecto-5'-nucleotidase) em LP IDPSC foi avaliada por imunofluorescência, que recentemente foi relatada como sendo também o precursor das células da retina. A expressão de vimentina, um marcador de MSC, também foi avaliada. Ambos os marcadores foram positivos em LP IDPSC (**Figura 48**).

[0364] Em vista da origem embrionária proposta da crista neural de IDPSC, a expressão de marcadores específicos de células da retina como Pax-6, Chx-10, Crx, Nrl, Calbindina e Rodopsina foi também determinada por imunofluorescência (**Figura 49**) e citometria de fluxo (**Figura 50**). Estes marcadores não foram expressos em LP IDPSC indiferenciada.

[0365] As neuroesferas aderidas formadas por LP IDPSC lançam posteriormente células em grandes quantidades, entre as quais algumas tinham células com morfologia semelhante a neurônios. Após cerca de cinco dias de cultura, observamos que neuroesferas aderentes apresentaram áreas altamente concentradas de células em torno das esferas. Passamos as células e, a fim de enriquecer a louça com células tipo retiniais, cultivamos essas células em NB+ B27 e RA por mais dez dias. As células exibiram morfologia semelhante para diferentes tipos de células neuronais (**Figura 51**).

[0366] Quando variamos a quantidade de LP IDPSC e o tempo de dissociação enzimática, observamos que, dependendo desta variação, o resultado pode ser bastante diferente. Observamos que, em curtos tempos de digestão enzimática, ocorreu a formação de neuroesferas secundárias, que mostrou morfologia muito semelhante àquela, derivadas de células neuronais do SNC em si ou de células-tronco (**Figura 52**).

[0367] Para avaliar as células diferenciadas, realizamos um ensaio de imunofluorescência, primeiro verificando a expressão de CD73, também conhecida como ecto-5'-nucleotidase, que catalisa a conversão da adenosina extracelular 5'-monofosfato em adenosina. É uma superfície de

célula de marcador de precursores de cones e bastonetes (KOSO et al., 2009). **A Figura 53** demonstra a expressão de CD73 em neuroesferas e em células diferenciadas.

[0368] Em seguida, analisamos PAX-6, que é um fator de transcrição, e sua localização é principalmente em áreas nucleares e perinucleares da célula. Em células precursoras, a expressão citoplasmática também pode ser vista devido à alta relação entre o núcleo e o citoplasma, que é característica para este estágio de diferenciação. A expressão deste marcador não ocorreu em todas as células. Existem muitas células que foram negativas para este marcador (50%) dependendo do estágio de maturação a que tinham chegado (**Figura 54**).

[0369] Assim como Pax-6, Chx-10 também é um fator de transcrição envolvido na diferenciação do precursor do desenvolvimento inicial da retina. Observamos que o número de células positivas Chx-10 foi superior a Pax-6 e atingiu cerca de 80% de células positivas Chx-10 (**Figura 55**). CHx-10 ativa o fator de transcrição Crx. O gene Crx codifica um fator de transcrição que coordena a expressão de fotorreceptores e é considerado um marcador de precursores de fotorreceptores, e é expressa no núcleo e região perinuclear (**Figura 56**).

[0370] O gene Crx ativa outro fator de transcrição, Nrl (**Figura 57**), que se expressa nos neurônios da retina e promove a expressão de rodopsina através da sua ligação do promotor do gene de rodopsina. Ele é expresso por todo os sistemas nervosos centrais e periféricos durante o desenvolvimento, mas na idade adulta é restrito para o neocórtex e neurônios da retina. O próximo marcador expressado nas células da retina é Calbindina, que é também conhecida como proteína dependente de vitamina D de ligação de cálcio e é expressa em tecidos neurais e células da retina horizontais. Recoverina é uma proteína de fotorreceptores do ligante de cálcio e está envolvida com a regulação da atividade de quinase de rodopsina, uma enzima necessária para a adaptação luminosa.

Encontramos algumas células que expressam esta proteína. Ambas a calbindina e a recoverina são localizadas no citoplasma da célula (**Figuras 58-59**).

[0371] Finalmente, a rodopsina, que é um pigmento visual de fotorreceptores, é responsável pela absorção de fótons, mais especificamente, para adaptar a luz/escuro. Sua localização é no citoplasma celular, que também pode ser visto no núcleo. A quantidade de células que expressam esta proteína também foi muito menor no precursor da retina (**Figura 60**).

[0372] Assim, podemos concluir que chegamos a um avanço na diferenciação *in vitro* de LP IDPSC no precursor da retina e células maduras.

[0373] Protocolos de imunofluorescência e citometria de fluxo são os mesmos usados em outros exemplos e em Kerkis et al., 2006 e Lizier et al., 2012. A lista de anticorpos usados é apresentada abaixo nas Tabelas 1-3.

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados para geração de imagens de células de IDPSC diferenciadas.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante
CD73	Camundongo	1:100	*
Vimentina	Camundongo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Pax-6	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Chx-10	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Crx	Coelho	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Nrl	Coelho	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Calbindina	Coelho	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Recoverina	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Rodopsina	Coelho	1:100	Santa Cruz Biotechnology

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados para geração de imagens de células de IDPSC diferenciadas.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante
Nestina	<i>Cabra</i>	<b>1:100</b>	Santa Cruz Biotechnology
Beta-III-Tubulina	<i>Camundongo</i>	<b>1:100</b>	Chemicon
GFAP	<i>Cabra</i>	<b>1:100</b>	Santa Cruz Biotechnology

**Tabela 3** Anticorpos utilizados para geração de imagens de células de IDPSC diferenciadas.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante
FITC anti-cabra	<i>Coelho</i>	<b>1:200</b>	Santa Cruz Biotechnology
FITC anti-camundongo	<i>Cabra</i>	<b>1:200</b>	Santa Cruz Biotechnology
FITC anti-coelho	<i>Cabra</i>	<b>1:200</b>	Santa Cruz Biotechnology

### **Exemplo 13. Produção de Precusores de Células Pancreáticas de LP IDPSC**

[0374] Anteriormente, foi demonstrado que células  $\beta$  pancreáticas, que são de origem endodermal, compartilham características comuns com os neurônios que são de origem ectodérmica, de crista neural (Yang et al., 1999, Teitelman and Lee, 1987; Baekkeskov et al., 1990; De Vroede et al., 1990). Estes dados sugerem que os tecidos dentários podem ser uma possível fonte de células-tronco para a geração de células produtoras de insulina. Nesse sentido, foi relatado que DPSC de dentes decíduos, que foram obtidas usando a digestão enzimática, podem ser diferenciadas em  $\beta$ -células tipo pancreáticas (Govindasamy et al., 2011). Assim, este documento levantou várias questões. Ilhotas de Langerhans são as regiões do pâncreas que contêm suas células endócrinas (isto é, produtoras de hormônio), que constituem cerca de 1% a 2% da massa do pâncreas. Estas ilhas são compostas por 5 diferentes tipos de células, que produzem hormônios.

[0375] A maioria dos protocolos de diferenciação empregados

atualmente, que usaram as células ES, dependem da ativação sequencial ou inibição das vias de sinalização embrionárias, através do tratamento com seus respectivos ligantes. Abordagens alternativas foram empreendidas para identificar pequenos compostos químicos biologicamente ativos que funcionalmente podem simular moléculas de sinalização celulares.

[0376] Demonstramos que LP IDPSC expressam um conjunto de diferentes marcadores neurais como NGF, BDNF, NT-3, NT-4, bem como o receptor de baixa afinidade, p75NTR (CD271). Consequentemente, tecido neural do pâncreas normal também expressa algumas das neurotrofinas (Schneider et al 2001). Alternativamente, o NGF é capaz de induzir a diferenciação tipo neurônio de linhagem de célula beta pancreática secretora de insulina (Polak et al., 1993). Uma vez que células beta pancreáticas surgem a partir da endoderme embrionária, a indução da diferenciação de células beta pancreáticas secretoras de insulina por NGF indica que células endócrinas e neurônios compartilham uma via de desenvolvimento. LP IDPSC mostraram diferenciação robusta em células neurais e retiniais, que apoiam fortemente a capacidade potencial de população de LP IDPSC em células pancreáticas.

[0377] Na **Tabela 4**, testes padrões da expressão de várias neurotrofinas e marcadores neurais iniciais em LP IDPSC indiferenciadas e em diferentes células pancreáticas são apresentados. A sobreposição entre os padrões de expressão destes marcadores em células pancreáticas e LP IDPSC é evidente. Isso indica que a LP IDPSC é uma potencial fonte ilimitada de células-tronco, o que mostra o comprometimento com células endócrinas produtoras de insulina, bem como para células exócrinas (duto/dúctulos) e os neurônios pancreáticos.

[0378] Alguns autores não aceitaram a instrução sobre semelhanças entre neurônios e células  $\beta$  pancreáticas devido a suas origens anatômicas distintas (Hebrok, 2012). Em contradição com esta suposição, a contribuição

de LP IDPSC para três camadas germinativas, incluindo tecido endodermal, durante o desenvolvimento fetal foi demonstrada e apresentada no Exemplo 15 a seguir (Transplante Intrauterino de LP IDPSC). LP IDPSC podem produzir células (endócrinas) produtoras de insulina ou fornecer bases celulares para células exócrinas ou ambos. Elas ou sobrenadante destas células ricas em neurotrofinas podem ser usados em combinação com células ES, proporcionando um fator diverso útil para a diferenciação de células pancreáticas, criando um nicho de célula apropriado. Uma vantagem adicional de LP IDPSC sobre células ES é que elas são MSC e também podem atuar através de vários mecanismos parácrinos.

[0379] Em conjunto, estes fatos indicam que LP IDPSC formam a base de um tratamento terapêutico para alguns tipos de diabetes induzindo a diferenciação proliferativa das células das ilhotas.

**Tabela 4.** Expressão de marcadores comuns observados em LP IDPSC e células pancreáticas.

Neurotrofinas	Exócrina	Endócrina	Neurônios pancreáticos	LP IDPSC
p75NTR	----	----	+++	+++
Anti-NGF	++		+	+++
Anti-BDNF	----	----	----	+++
Anti-NT-3	----	----	----	+++
Anti-NT-4	+++ duto/dútilos	+ Células secretoras de insulina	----	+++
Outros marcadores				
Nestina	+++	+++	+++	+++
Beta-tubulina III	----	+++ precursores de células alfa e beta	----	+++
Pax 6 (também marcador de precursores da retina)	----	+++ precursores de células alfa e beta	----	+++
GFAP	n/a	+++ Células secretoras de insulina	n/a	+++

--- negativa; + semana; + + moderada; +++ forte; n/a - não analisada

#### **Exemplo 14. Transplante de IDPSC Tronco Intrauterino (IUSCT)**

[0380] Mostramos aqui que uma vez IDPSC são transplantadas em um feto no útero, elas são distribuídas em todo o feto enquanto permanecem viáveis em formas indiferenciadas e diferenciadas e se desenvolvem em vários tipos celulares devido à sua orientação original de linhagem múltipla que foi caracterizada com vários marcadores moleculares específicos a tecido e diferenciação potencial robusta nos outros exemplos.

[0381] Também surpreendentemente, IDPSCs e suas progênes diferenciadas não foram rejeitadas por hospedeiros imunocompetentes e não se transformaram em diferenciação inadequada, mas foram diferenciadas em conformidade com a forma coordenada por nicho de hospedeiro relevante. Portanto, concluímos que a orientação de linhagem múltipla das IDPSC é comprovada pela distribuição *in vivo* e enxertia de IDPSC em vários tecidos e órgãos.

[0382] Os resultados divulgados suportam o uso de IDPSCs para terapia celular pela administração através de uma rota intrauterina a um feto em uma quantidade eficaz para o tratamento.

[0383] Surpreendentemente, as IDPSC marcadas por GFP transfectadas distribuídas nos tecidos fetais e placentários. Em uma modalidade, a presente divulgação refere-se a um método de obtenção de IDPSCs geneticamente modificadas, compreendendo a transdução de IDPSCs com material genético exógeno e o uso destas IDPSCs modificadas como um sistema de distribuição para proteínas terapêuticas codificadas pelo gene exógeno para tratamento de doenças genéticas herdadas e/ou adquiridas.

[0384] Foi demonstrado que as células progenitoras adultas multipotentes (MAPC), progenitoras que foram isoladas de medula óssea, mas posteriormente estabelecidas em outros tecidos, incluindo o cérebro, músculo e sangue do cordão umbilical, mas não polpa dentária, tratam

doenças lisossomais no útero (ver Patente US N° 7.927.587). Surpreendentes características diferentes entre MAPC e LP IDPSCs incluem:

- IDPSCs nunca expressam Rex1.
- MAPC também são negativas para CD44
- MAPC não expressam nestina e LP IDPSCs são caracterizadas por muitos outros fatores.
- Pluralidade de MAPC requer o uso de métodos de seleção de célula para obter a população de alta pureza, como em IDPSC, mas esta etapa não é necessária com IDPSC.
- Esta é uma diferença principal, que IDPSC têm orientação de linhagem múltipla suficiente, sem a necessidade de métodos de purificação.
- Além disso, com MAPC, foram usadas apenas células pré-diferenciadas e o grau comparativo da enxertia de MAPC foi reduzido.
- IDPSCs mostrou um nível elevado de enxertia sem qualquer seleção, o que significa que elas são "células-tronco". Por exemplo, é divulgado neste documento o uso de IDPSC indiferenciadas, que têm uma capacidade de habitar em nichos de células-tronco, por exemplo, no tecido muscular – células satélites – que não é o tecido de sua origem (DP). Em outras palavras, eles são células-tronco VERDADEIRAS!

[0385] Nomeadamente, detectamos durante distribuição de experimentos no útero e enxertia de LP IDPSC diferenciadas e indiferenciadas. Quando elas se diferenciam, fazem isto adequadamente, por exemplo, no tecido cardíaco elas expressam marcadores adequados, mas não CK18, que é um marcador de epitélio. Elas mostraram a diferenciação em linfócitos humanos expressando CD45. É divulgada neste documento a enxertia robusta multi-órgão e diferenciação de tecidos em combinação. Em comparação, MAPC demonstram um potencial mais limitado para diferenciar:

- Transferência IUT de MAPCs não resultou na diferenciação de

um tipo de célula epitelial.

- Semelhante à enxertia de pulmão, MAPCs estavam presentes no intestino; no entanto, coloração para citoqueratina também foi negativa, indicando que MAPCs não se diferenciam em epitélio intestinal.

- MAPCs também foram encontradas no músculo esquelético e cardíaco, bem como no baço e na pele, mas não mostraram qualquer diferenciação.

- no cérebro, MAPCs se diferenciam em astrócitos e oligodendrócitos, mas não neurônios e não expressam fatores neurotróficos. Em contraste, com células de Purkinje IDPSC e vasos no cérebro foram observados.

[0386] Em suma, divulga-se neste documento um método robusto de administração de IDPSCs orientadas por linhagem múltipla, ou progênie diferenciada das mesmas, no portador farmacêutico como um tratamento biológico simples ou combinado (isto é, eles podem ser misturados com outros agentes terapêuticos ou regenerativos) para promover a diferenciação de um tipo de célula preferido. Isso pode ser vantajoso quando enxerto ou distribuição de gene é desejada de acordo com a progressão do desenvolvimento dos sistemas de órgãos do feto.

[0387] Células de diferentes origens foram usadas para transplante de útero em um número de modelos. No transplante de útero de  $1 \times 10^8$ /kg células CD34+ derivadas da medula óssea canina paterna em um modelo canino atingiu-se um baixo nível baixo de microquimerismo (1%) em vários tecidos (Blakemore et al., 2004). O transplante de células-tronco enriquecidas com CD34+ derivadas do cordão umbilical humano na cavidade peritoneal de fetos ovinos de 45 a 60 dias de idade alcançou 18% de enxerto em 1 a 3 meses após o nascimento (Young et al., 2003). Células mononucleares do fígado fetais humanas ou células CD34+ derivadas da medula óssea fetal transplantadas em camundongos NOD/SCID (diabéticos não obesos/imunodeficiência combinada severa) no dia 13 ou 14 de

gestação resultaram em enxerto hemopoiético humano de linhagem múltipla em 12% dos destinatários em 8 semanas de idade, respectivamente (Turner et al., 1998). O transplante de células-tronco mesenquimais fetais humanas em camundongos fetais com distrofia muscular de Duchenne nos dias 14 a 16 resultou em enxerto generalizado a longo prazo (19 semanas) em múltiplos órgãos (Chan et al., 2007). Células-tronco embrionárias transplantadas em fetos murino atingiram baixo nível de quimerismo (0,4%) (Moustafa et al., 2004). Células de âmnio e córion, derivadas da placenta humana da placenta de termo também foram enxertadas com sucesso em ratos e suínos neonatais após o transplante mostrando o baixo nível de quimerismo (Bailo et al., 2004, Chen et al., 2009).

[0388] Liechty e coautores (2000) realizaram IUT de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana em ovelhas no início da gestação. Este estudo demonstrou enxerto xenogênico de MSC em vários tecidos, que persistiram durante 13 meses após o transplante. As células transplantadas foram submetidas à diferenciação em condrócitos, adipócitos, miócitos e cardiomiócitos, medula óssea e células estromais do timo no sítio do enxerto. Este estudo demonstrou que as MSC foram capazes de manter a sua capacidade de potencial múltiplo e ainda suas características imunológicas únicas sem rejeição imunológica (Almeida-Porada, et al. 1996, b, 2002; LIECHTY et al. 2000). Subsequentemente, MacKenzie & Flake (2001 a, b 2002) confirmou esses resultados. No entanto, em ambos os estudos observou-se um baixo nível de quimerismo.

[0389] Outro grupo realizou o transplante alogênico de MSC no útero da ovelha no dia 14 de gestação, que também resultou em um baixo nível de quimerismo, mas mostrou o enxerto em múltiplos órgãos (SCHOEBERLEIN et al., 2005).

[0390] Quando as MSC da medula óssea humana foram transplantadas em um útero de camundongo no dia 14 de gestação, elas

mostraram enxerto em todos os tecidos derivados de três camadas germinativas, que foi mantido após quatro meses. É importante mencionar que células CD45+ (um marcador de linfócitos humanos) foram detectadas no sangue periférico de camundongos (Chou et al. (2006)). Este trabalho sugere que a população de MSC pode conter células precursoras que são capazes, em um ambiente apropriado, de diferenciar em células do sangue.

[0391] Para investigar a utilidade de MSC da medula óssea para o desenvolvimento cardíaco em mamíferos, estas células de origem fetal e adulta foram injetadas intraperitonealmente em fetos de ovelhas. Nenhuma diferença foi observada entre os enxertos de MSC isoladas da medula óssea adulta ou fígado e cérebro fetais. A maioria das células humanas enxertadas nas fibras de Purkinje. Aproximadamente 43,2% de fibras de Purkinje eram de origem humana, em contraste, apenas 0,01% dos cardiomiócitos eram das MSC (Airey et al. 2004).

[0392] As CTM fetais humanas isoladas do sangue periférico no primeiro trimestre de gravidez, foram aplicadas no útero de camundongos homozigotos com osteogênese imperfeita (HI), que resulta em múltiplas fraturas e é atualmente tratada apenas sintomaticamente. As células doadoras foram encontradas em ossos de animais, e expressam genes da linhagem osteoblástica produzindo osso de proteína estrutural extracelular - osteopontina. Após o tratamento uma redução acentuada de fraturas e anormalidades esqueléticas foi observada (GUILLLOT et al., 2008).

[0393] MSCs derivadas de âmnio e placenta humanos também foram usadas no modelo animal de IUT, embora a migração e localização em vários órgãos fossem evidenciadas, o enxerto permaneceu em baixo nível (Han et al., 2008, Chen et al. 2,009). MSC derivadas do tecido adiposo mostraram baixo enxerto similar (Martínez-González, 2012).

[0394] O transplante autólogo de MSC derivadas do fluido amniótico foi realizado em ovelhas usando células-tronco GFP positivas, que foram detectadas nos tecidos fetais, incluindo coração, fígado, membrana da

placenta, cordão umbilical, glândula adrenal e músculo (Shaw et al. 2010).

[0395] As MSC alogênicas derivadas do fígado de coelho fetal foram administradas por duas vias de administração: intra-hepática e intra-amniótica. O enxerto foi estudado após 10 e 16 dias e o baixo enxerto destas células foi observado que, no entanto, persistiu por 16 semanas (Moreno et al., 2011).

[0396] Para verificar a capacidade de células ES humanas de se diferenciar em neurônios funcionais in vivo, estas células foram transplantadas no dia 14 de gestação em fetos de camundongos no ventrículo lateral do cérebro. Este estudo demonstrou que as células de ES foram capazes de se integrar no cérebro do camundongo e produzir astrócitos localizados predominantemente no parênquima e neurônios funcionais, que estavam migrando no subventricular ao longo do fluxo facial e também no bulbo olfatório, embora estes enxertos no cérebro fossem baixos > 0,1% (Muotri et al. (2005)).

[0397] A vantagem de células-tronco de polpa dentária veio da origem embrionária do tecido da polpa. Tecidos craniofaciais se originam da crista neural, que é uma estrutura embrionária transitória. De acordo com os conhecimentos atuais, as células-tronco da crista neural (NCSC) têm uma alta capacidade de renovação automática de alta e diferenciação potencial similar a células de ES.

[0398] NCSC pós-migratórias originam a maioria das células e tecidos que geram o sistema nervoso periférico, bem como vários tipos de células não neurais tais como as células do músculo liso do sistema cardiovascular, células epiteliais da pele, ossos craniofaciais, cartilagem e tecido conjuntivo, epitélio corneano e polpa dentária e outros (LE DOUARIN, DUPIN, 2003; DOUARIN LE et al., 2004, 2008).

[0399] O transplante de células-tronco intrauterino (IUSCT) é um método para o tratamento de doenças genéticas, congênitas, hematológicas, e imunológicas. Na pesquisa básica este fornece um

modelo para estudar a dinâmica da migração, o enxerto e o estado funcional dos diferentes tipos de células-tronco. As células podem ser transplantadas em diferentes momentos do período gestacional, que pode ser dividido em trimestres que não são funcionalmente equivalentes. A escolha das células e do trimestre onde as células-tronco serão aplicadas pode influenciar o comportamento das células e os resultados do transplante. Células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea ou hematopoiéticas adultas e fetais foram usadas principalmente para IUSCT. Foram obtidas anteriormente células-tronco da polpa dentária imaturas humanas (IDPSCs), que mostraram propriedades pluripotentes potenciais e imunocompatíveis.

[0400] O objetivo deste estudo era avaliar a capacidade de migração, proliferação, habitação e diferenciação de IDPSCs após IUSCT durante o terceiro período fetal em cães. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal da Universidade de São Paulo e foram realizados sob anestesia apropriada.  $1 \times 10^6$  de IDPSCs humanas GFP positivas não diferenciadas foram transplantadas após laparotomia e injeção intraperitoneal sob controle de ultrassom intraoperatório em 5 fetos em 45 dias de gestação. Os cinco fetos, que não receberam IDPSCs, foram usados como um controle. As análises de ultrassom foram realizadas diariamente antes da coleta dos fetos. Após 7 dias realizou-se histerectomia ovariana, os fetos foram coletados; órgãos e tecidos foram isolados e fixados em paraformaldeído a 4% ou criopreservados.

[0401] A biodistribuição de IDPSCs de LP de EGFP dentro dos órgãos e tecidos foi analisada em criossecções ( $5 \mu\text{m}$ ) sob Microscopia Confocal. A habitação de IDPSCs de LP de EGFP foi observada em órgãos derivados de três linhagens germinativas, endoderme, ectoderme e mesoderme. No estômago e no intestino IDPSCs de LP de EGFP foram encontradas no espaço intraglandular, bem como na muscularis mucosae. No fígado, elas

apareceram no parênquima hepático; no coração no miocárdio e no cérebro em vasos sanguíneos, no cerebelo dentro das células de Purkinje. Usando o ensaio de citometria de fluxo enxerto de IDPSCs de LP de EGFP foi quantificado. Entre os diferentes órgãos uma habitação expressiva foi observada no miocárdio do coração (~50%), no baço e no fígado. As IDPSCs de LP de EGFP também foram encontradas na placenta canina, especialmente em vasos sanguíneos. Estes dados foram confirmados usando anticorpos de núcleo anti-humano (HuNu), anti-GFP e anti-IDPSCs. IDPSCs de LP de EGFP humanas mostraram alta capacidade de migração e proliferação potencial após IUSCT em fetos de cão. IDPSCs de LP de EGFP não diferenciadas demonstraram habitação em nichos de células-tronco hematopoiéticos fetais (placenta), epiteliais (glândulas gástricas) e perivasculares. Estes dados sugerem que IDPSCs de LP de EGFP é uma nova fonte promissora para o tratamento genético, congênito, hematológico, e imunológico para essas doenças através de IUSCT.

*Grupo experimental - animais*

[0402] Usou-se o modelo canino (*Canis lupus familiaris*), SRD (viralata), fêmea, de 3 a 4 anos de idade, grávida de aproximadamente 43 dias de gestação.

*Ultrassom abdominal para estimar a idade fetal*

[0403] Os exames sonográficos foram realizados nos dias 3, 2 e 1 antes do procedimento cirúrgico, com uma marca de aparelho GE®, modelo Logic 100 MP, equipado com transdutores: 7.5 MHz lineares, convexos 5.0 MHz e outros endocavitários. As imagens foram documentadas digitalmente.

[0404] O transdutor de matriz linear de 7,5 MHz foi usado em todos os testes para a avaliação clínica dos órgãos e útero, enquanto o transdutor de 5 MHz foi útil para avaliar o corpo do feto em seu comprimento e dimensões, especialmente quando ultrapassados os limites da placenta zonária, tal como CR (comprimento do corpo - Comprimento craniocaudal)

foi medido a partir da distância entre o crânio mais rostral até a base da cauda (diâmetro transverso DTC do feto) foi obtido a partir do dorso de distância e feto ventral-lateral-lateral. A medição da PE (espessura da placenta) foi obtida ao definir a estrutura em relação às membranas.

[0405] A fim de determinar a idade fetal, certificando-se que os fetos tinham idade inferior a 43 dias, obtida através da avaliação de ecogenicidades de pulmão e fígado. Também foi medida a frequência cardíaca (HR) certificando-se da viabilidade fetal antes e após o transplante de células.

*Mapeamento e localização de cintas placentárias do útero*

[0406] Esquema 1 exemplifica as trompas uterinas do modelo experimental: Grupo de tratamento dos fetos 1, 3, 4 e 5 da trompa uterina direita (Cud) - recebeu transplantes de IDPSC direcionadas por GFP. O grupo de controle de fetos esteve em 2 e 7 da trompa uterina esquerda (Cue); estas foram coletadas para o controle experimental (**Figura 61**).

*Procedimentos para transplante intrauterino em modelo canino fetal*

[0407] Os procedimentos cirúrgicos empregados nesta pesquisa foram divididos em três períodos diferentes:

1º período início 3 dias antes do Procedimento Cirúrgico I

- 1 - Avaliação clínica da mulher grávida
- 2 – Ultrassom abdominal (US) para determinar a idade e viabilidade fetal
- 3 - Coleta de sangue para CBC
- 4 - *Fast-food* 12 horas antes da cirurgia e 4 horas de retenção de fluido.

5 - Técnica anestésica em ambos os procedimentos cirúrgicos:

[0408] Pré-anestesia com acepromazina (Univet, São Paulo, SP), na dose de 0,1 mg/kg associada com Meperidina (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira) 5 mg/kg IM (intramuscular), 15 minutos depois que procedeu a indução da anestesia com cetamina em uma dose da dose

de 7,5 mg/kg associada com diazepam 5 mg/kg, em seguida, usada a anestesia peridural com morfina em uma dose de 1,0 mg/3kg associada com Lidocaína 2% sem constritor do vaso (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira) via lombossacra com agulha hipodérmica 40x8. Durante a cirurgia foi usado o Fentanil (analgésico) (Hipolabor, Sabará) em uma dose de 4,4 mg/kg IV (via intravenosa) e Ampicilina sódica (antibiótico) 20 mg/kg IV.

1 - Procedimento Cirúrgico I - Laparomia Exploratória

2 - Mapeamento para contar os fetos uterinos e identificação da trompa uterina direita paraplacentária dos fetos (CUD)

3 - Guiado pela sonda endocavitária US para identificar a cavidade peritoneal do feto

4 - Transplante de  $1 \times 10^6$  células IDPSC intrauterinas ressuspensas em 1,0 ml de soro fisiológico estéril via intraperitoneal nos fetos 1, 3, 4 e 5 Cud.

5 - Cuidados Diários: Terapia ATB (terapia com antibiótico) com Enrofloxacina a 10% em uma dose de 5,0 mg/kg SC (por via subcutânea) BID (a cada 12 horas) e Anti-flamatório Meloxicam a 0,2% em uma dose de 0, 2mg/kg no dia 1 e 0,1 mg/kg nos dias 2 e 3 após SC SID (a cada 24 horas) e área de curativo com Iodo líquido e polvidine Dakim.

6 - O animal foi mantido em um canil com comida e água ad libitum e colar elizabetano como animal de restrição mecânica.

Segundo período conduzido 7 dias após o transplante de IDPSC direcionadas por GFP do útero

1 - ultrassom abdominal para determinar a viabilidade fetal (frequência cardíaca - HR, peristaltismo fetal movimento fetal)

2 - Coleta de sangue da mãe para CBC

3 - Fast-food 12 horas antes da cirurgia e 4 horas de retenção de fluido.

Procedimento cirúrgico II - ovariosalpingohisterectomia no prazo de 3

dias subsequentes prosseguiu:

1 – Ultrassom abdominal na avaliação clínica de 1, 2 e 3 dias pós-cirurgia

2 - Cuidados diários pós-operatórios semelhantes aos anteriores (ATB, Cicatrização e sítio Anti-flamatório)

3 - Animal mantido em canis durante 3 dias com comida e água ad libitum e colar Elizabetano.

4 - Elevado retorno do animal ao seu dono.

Terceiro período imediatamente após a remoção do útero realizada:

[0409] Autópsia fetal - coleta de órgãos e tecidos dos fetos 1, 3, 4 e 5 (grupo de tratamento - CUD) para posterior análise de Xeno-transplante, bem como o grupo de controle dos fetos 2 e 7 - CUE + feto 2 CUD.

[0410] Imediatamente após a autópsia dos fetos foram coletados os seguintes órgãos: Língua, esôfago, timo, pulmão, coração, diafragma, aorta abdominal, Estômago, Intestino Delgado (Jujuno), Baço, Rim direito, gônada (ovário ou testículo), Cérebro, Cerebelo, Placenta e coletados da seguinte forma:

AMOSTRA 1 - 1/3 do paraformoldeído do órgão foi anteriormente incluído nos 10% e imerso em parafina.

Amostra 2 - 1/3 do paraformoldeído também pode ser definido em 10%, mas será incluído em OCT ("composto de corte ideal" Tissue-Tek ®)

AMOSTRA 3 - 1/3 do órgão foi mantido congelado nos criotubos no congelador a -80°C.

#### Análise de Citometria de Fluxo

[0411] As células foram colhidas por tripsinização e tripsina foi inativada com soro bovino fetal, as células foram colocadas em tubos de 15 ml. Em seguida, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para formar o agregado de células. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 5 ml de soro fisiológico a 0,9% para lavar o centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos e o sobrenadante descartado

novamente e o Fluxo de tampão de FACS adicionado, a suspensão foi transferida para citometria de tubos, e adicionados todos os anticorpos específicos anti-humanos, tais como Anti-HuNu anti-IDPSC, CD 45, CK18, CD 146, OCT 3/4,  $\beta$  1 integrina, Cardiotina, MyoD1 e Miogenina, humana, incubados durante 15 minutos a 4°C. As análises de expressão foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Calibur para 10.000 eventos e analisadas pelo programa de aquisições Mdi Win 2.8. A expressão do marcador foi determinada pela comparação com um controle de isotipo marcado com fluorocromo FITC não específicos.

[0412] A avaliação da expressão de marcadores Anti-IDPSC Anti-HuNu nucleares e citoplasmáticos e células Oct3/4 foi permeabilizada com anteriormente 10 $\mu$ l de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos antes da adição de anticorpos primários específicos.

#### Análise de Ciclo Celular

[0413] Após o isolamento de células de vários órgãos, eles foram cuidadosamente ressuspensos em 1ml de 70% de etanol RNase, transferidos para tubos de microcentrifugação e armazenados a uma temperatura de -20°C. As amostras fixas foram centrifugadas e armazenadas anteriormente a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1ml de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução PI, preparada a partir de 5ml de PBS, ao qual foram adicionados 5 $\mu$ l de triton 100 (0,01% v/v), 50mL de RNase A (2mg/ml) e 20 $\mu$ l de iodeto de propídio (5mg/ml). Em seguida, houve a aquisição de citômetro de fluxo de dados FACS Calibur em 10.000 eventos, e o programa de análise foi usado Mdi Win 2.8.

[0414] Após a aquisição de populações de células, as células positivas para proteína EGFP contida na porta ou quadrante foram selecionadas e determinadas as fases do ciclo celular usando o canal de FL-2 para a quantificação de PI (iodeto de propídio) incorporado em GFP +

células.

#### Interpretação dos resultados

[0415] Iodeto de propídio (PI) é um fluorocromo estequiométrico que intercala as fitas duplas de DNA. A fluorescência foi capturada em FL-2, e é proporcional ao teor de DNA na célula. Células diploides que não estão replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) têm teores celulares de  $2n$ , emitindo sinais de menor intensidade do que as células localizadas na fase S, durante a qual há um aumento do teor de DNA. Células da fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade do que aquelas situadas em G2/M até concluir a replicação do teor de DNA para  $4n$ , que permanece assim durante a fase G2 para mitose, em que cada célula-mãe dá origem a duas células-filhas.

[0416] Células localizadas no hipodiploide de pico (Sub-G1) possuem teor de DNA de menos de  $2n$ , e podem representar ocorrência aumentada de restos celulares e DNA fragmentado, característicos dos eventos de morte celular.

[0417] Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos em pulsos pelo aparato, permitindo a construção de gráficos de distribuição das células no ciclo celular. Considerando que existe uma relação proporcional entre o aumento no teor de DNA e área do pulso gerado.

#### Imuno-histoquímica

[0418] Para a análise imuno-histoquímica foram usadas seções de parafina montadas em slides. Para este procedimento, o material foi anteriormente incluído no paraformaldeído a 4%, incorporado em parafina e cortado para  $5,4 \mu\text{m}$  (Microtome, LEICA).

[0419] O rastreamento de EGFP LP IDSPC injetada via IP, foi realizado usando anticorpos: anti-IDPSC: marcador da polpa dentária humana, e núcleo anti-humano – HuNu.

[0420] Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas são submetidas a um processo de estarem imersas em xileno a  $50^\circ\text{C}$  por

30 minutos e em seguida imersas em xileno à temperatura ambiente por 20 minutos. Para minimizar a fluorescência natural do tecido, foi necessário imergir slides em Metanol + Acetona "durante a noite". Após este processo, o material foi hidratado em uma série de álcoois decrescentes (100%, 95% e 75%) por 2 minutos e incubado durante 10 minutos em uma solução de hidróxido de amônio para a remoção de formalina residual.

[0421] Durante a fixação o processo de mascaramento de antígeno no tecido pode ocorrer, tornando mais difícil de detectar. Para aumentar a exposição do antígeno foi usado calor de umidade de recuperação de antígeno em que o material foi imerso em tampão de citrato e colocado em banho-maria por 35 minutos.

[0422] Na próxima etapa, a peroxidase endógena de lâminas foi bloqueada com uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio (1:1). Após esta etapa, os tecidos foram incubados com anticorpos primários em uma câmara úmida "durante a noite" a 4°C. Após este estágio, o material foi revelado com o Dako Envision Kit e desidratado em uma série crescente de álcoois (50%, 75%, 95% e 100%). O cromogênio usado foi DAB (Dako ®), os slides foram contramanchados com Hematolixina de Mayer vedados com Permunt e visualizados por microscopia de luz.

#### QUANTIFICAÇÃO DE EGFP LP IDPSC E MEDIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO APÓS TRANSPLANTE INTRAUTERINO

[0423] Depois foram fornecidas várias evidências sobre enxerto de EGFP LP IDPSC em vários tecidos derivados de três camadas germinativas avaliou-se sua possível proliferação e diferenciação em tecidos destinatários.

#### ANÁLISE DE TECIDOS DERIVADOS DA ENDODERME - PULMÃO

[0424] O tecido pulmonar mostrou alta taxa de enxerto de EGFP LP IDPSC conforme medido pela coloração imunopositiva vermelha (Figura X, A, B). A escolha do anticorpo secundário de rodamina foi para evitar a

interferência do sinal fluorescente emitido por EGFP LP IDPSC verde. A taxa de enxerto foi 52,8%, conforme observado pela expressão de anti-IDPSC e 50,2% de anticorpos anti-HuNu (**Figuras 62A-62B**). Em seguida, a proliferação foi analisada para EGFP LP IDPSC (**Figuras 62C-62D**) por citometria de fluxo e revelou que 53,17% de EGFP LP IDPSC tiveram seu DNA fragmentado, 29,88% estavam na fase GO/G1 (células quiescentes e em preparação para a síntese de DNA), 8,53% foram encontrados no estágio S da síntese de DNA e 8,65% na fase de G2 da divisão celular.

#### ANÁLISE DOS TECIDOS DERIVADOS DA MESODERME - TECIDO MUSCULAR ESTRIADO ESQUELÉTICO - BÍCEPS FEMORAL

[0425] A quantificação de EGFP LP IDPSC em mesoderme foi realizada usando o tecido muscular esquelético (bíceps femoral) (**Figuras 63A-63D**) e o tecido renal e (**Figuras 64A-64D**). A taxa de enxerto conforme medida pela expressão de anti-IDPSC e anti-HuNu foi 34,29% e 36,86%, respectivamente. A análise de ciclo celular de EGFP LP IDPSC enxertada no bíceps femoral revelou que 22,28% tinham DNA fragmentado, 8,82% estavam na fase GO/G1 (células quiescentes e na preparação para a síntese de DNA), e 2,64% estavam no estágio S de síntese de DNA e 31,70% na fase G2 da divisão celular (**Figuras 63C-63D**).

#### TECIDO RENAL

[0426] No tecido renal, a taxa de enxerto de EGFP LP IDPSC foi 42,3% (anti-IDPSC) e 31,3% (anti-HuNu) (**Figuras 64A-64B**). A análise de ciclo celular de EGFP LP IDPSC no bíceps femoral revelou que 50,07% tinham DNA fragmentado, 15,92% estavam nas fases GO/G1, 8,97% estavam na fase S e 25,25% na fase G2 (**Figuras 64C-64D**).

#### ANÁLISE DOS TECIDOS DERIVADOS DO ECTODERMA - CÉREBRO E CEREBELO

[0427] Em amostras de tecido do cérebro para observar a taxa de enxerto de EGFP LP IDPSC 13,1% (anti-IDPSC) e 13,4% (anti-HuNu) (**Figuras 65A-65B**). A análise de ciclo celular de EGFP LP IDPSC no

cérebro revelou que 8,52% das células tinham DNA fragmentado, 3,24% estavam nas fases G0/G1, 29,1% estavam na fase S e 66,59% na fase G2 (**Figuras 65C-65D**).

#### ANÁLISE DE TECIDOS EXTRAEMBRIÓNICOS - PLACENTA MATERNA E HEMATOMA DA PLACENTA

[0428] Detectou-se o enxerto de EGFP LP IDPSC na PLACENTA MATERNA e HEMATOMA DA PLACENTA. Pode-se quantificar o enxerto de EGFP LP IDPSC apenas na cinta placentária e descobriu-se que este enxerto foi de 64,8% (anti-IDPSC) e 65,6% (anti-HuNu) (**Figuras 66A-66B**). Em seguida, analisou-se a viabilidade e a proliferação de EGFP LP IDPSC e no hematoma da placenta da cinta placentária separadamente, que eram diferentes em estruturas fetais. Os dados sugerem que o ambiente e a função do tecido placentário podem ter o efeito na viabilidade e proliferação de EGFP LP IDPSC. A análise do ciclo celular na cinta central placentária revelou que 21,96% de EGFP LP IDPSC tinham DNA fragmentado, 10,83% estavam nas fases G0/G1, 3,59% estavam na fase S e 38,64% na fase G2 (**Figuras 66C-66D**). Em hematomas marginais ou bolsos laterais com relação à cinta placentária central demonstraram uma taxa mais elevada de DNA fragmentado 31,82% e fases inferiores G0/G1, S e G2 foram de 7,40%, 1,63% e 13,13%, respectivamente.

#### TECIDO CARDÍACO

##### *Expressão de marcadores Oct3/4 e MSC no tecido muscular*

[0429] Sabe-se que EGFP LP IDPSC expressam Oct3/4 enquanto elas não são diferenciadas (Kerkis et al. (2006)). Analisou-se a expressão deste marcador no miocárdio fetal canino, devido ao presente estudo de EGFP LP IDPSC mostrar um alto enxerto neste tecido. A análise de imunofluorescência demonstrou a expressão desta proteína em EGFP LP IDPSC e demonstrou a sua localização dentro do núcleo (**Figuras 67A1-67A3**). O tamanho dessas células é inferior a 5 µm, o que sugere que elas apresentam as características e localização do miócito, também chamadas

de células satélites. A citometria de fluxo permite quantificar a taxa de EGFP LP IDPSC, que expressam o anticorpo anti-Oct3/4 e que era igual a 21,3% (**Figuras 68A-68B**). Ao mesmo tempo, a taxa de expressão de marcadores MSC: CD146 (pericitos) e  $\beta$ 1-integrina no mesmo tecido estavam muito baixos e eram de 0,1% e 0,5% respectivamente.

[0430] Além disso, analisou-se a expressão destes marcadores no músculo esquelético do bíceps femoral. Observou-se uma alta taxa de expressão de proteína Oct3/4, CD146,  $\beta$ 1-integrina que era igual a 45,4%, 0,4% e 36,7%, respectivamente (**Figuras 68C-68D**).

#### TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO - BÍCEPS FEMORAL

[0431] Avaliou-se se EFGP LP IDPSC foram submetidas ao processo de diferenciação no tecido muscular do miocárdio. As proteínas miogenina e cardiotina expressas nestas células com as respectivas taxas de 29,7% e 49,1% (**Figura 69**), enquanto a expressão de CK 18, que é um marcador de células epiteliais, era inferior a 4,7% no tecido muscular, como esperado. A proteína CD45, que é um marcador de diferentes tipos de células hematopoiéticas, foi expressa em EFGP LP IDPSC no tecido cardíaco transplantado. Para validar este resultado, comparou-se a expressão deste marcador nos músculos do coração e aorta onde se espera que seja diferente. Como esperado a taxa de expressão de CD45 no músculo cardíaco foi de 9,6% versus 19,5% na aorta (**Figura 69**). O estudo da expressão de marcadores de células musculares diferenciadas no estriato do músculo do bíceps femoral revelou a presença de MyoD1 e miogenina em 33,87% em 7,5% dos analisados nas células, respectivamente (**Figura 69**). CK 18 foi positivo em 7,7% das células, enquanto CD45 em 12% das células analisadas.

#### TECIDO CARDÍACO

[0432] A expressão de marcadores de IDPSC diferenciada em tecido cardíaco mostrou expressão positiva de proteínas cardíacas miogenina e cardiotina e negativa para CK-18. Observou-se a expressão positiva de

CD45+, cuja quantidade varia no miocárdio e no arco aórtico (**Figura 70**).

#### TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO - BÍCEPS FEMORAL

[0433] A EGFP LP IDPSC mostrou imunocoloração positiva para Oct  $\frac{3}{4}$ , que apresenta a localização nuclear e perinuclear (**Figura 72**). A taxa de EGFP LP IDPSC de Oct  $\frac{3}{4}$  também foi avaliada por citometria de fluxo e foi de 12,6%. A expressão de marcadores de MSCs, tais como CD146 (pericitos) e  $\beta$ 1-integrina foi de 2,5% e 18,3%, respectivamente (**Figura 73**).

[0434] No tecido placentário observou-se também a expressão da proteína de CD45 em CK18 em 9,4% e 2,3% das células, respectivamente. A expressão de miogenina foi registrada em 16,6% das células que é possivelmente correspondente ao enxerto de EGFP LP IDPSC no tecido do músculo liso que reveste os vasos placentários.

#### **Exemplo 15. Isolamento e cultura *in vitro* de IDPSCs**

[0435] A polpa dentária humana (DP) foi extraída de dez dentes decíduos de 10 sujeitos saudáveis (intervalo de 6 a 9 anos), através da remoção da parte apical do dente, usando um bisturi, como descrito anteriormente por Kerkis et al. (Kerkis et al. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 184: 105-116).

[0436] Em seguida, DP foi suavemente lavada em solução tamponada com fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), ligeiramente dissecada e colocada em placas de cultura de tecidos de plástico de 35mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

[0437] Explantes de tecido de DP foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/Ham' F12 (DMEM/F12, Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (FBS, Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, e 2 mM de aminoácidos não essenciais (todos de Invitrogen) em uma atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a

5% a 37°C.

[0438] Após um período de 3 ou 4 dias, as células semelhantes a fibroblastos foram geradas a partir de explantes aderentes. Para gerar um grande número de IDPSCs, explantes foram transferidos para outra placa de Petri sob as mesmas condições de cultura, e esse procedimento foi repetido várias vezes como mostrado na **Figura 74**. Este processo de geração de IDPSCs é distinto em que células-tronco de dentes Decíduos Exfoliados Humanos (SHED) são cultivadas (vide **Figura 75**). Após o isolamento, SHED são imediatamente submetidos à digestão enzimática, que impede a geração de determinadas populações de células-tronco como aquelas expressando os biomarcadores p53 e p75.

[0439] As células semelhantes ao fibroblasto crescendo em monocamada foram adicionalmente lavadas duas vezes com PBS e submetidas a 0,5 g/L de tripsina e 0,53 mmol/L de ácido tetra-acético de etilenodiamina (EDTA) (Invitrogen) por 3 a 5 minutos a 37°C.

[0440] A passagem 1 foi contada após a primeira digestão enzimática. A atividade de tripsina foi inativada pela adição de meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS). Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células foram colocadas no frasco de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> (Corning). O subcultivo foi realizado a cada 3 a 4 dias, e o meio de cultura foi mudado diariamente.

[0441] Após isolamento e expansão, as células-tronco de decíduos foram criopreservadas (CRYOP), como mostrado na **Figura 75**. Para criopreservação, 90% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, Mo., EUA) foram usados como meio de congelação. As células congeladas foram mantidas em frascos vedados a -196°C.

#### **Exemplo 16. Cultura *in vitro* a longo prazo de polpa dentária (DP)**

[0442] A polpa dentária recentemente extraída (DP) é um tecido, que contém grandes troncos nervosos e os vasos sanguíneos na região central da polpa coronária e radicular (**Figura 76A**). O primeiro crescimento de

células semelhantes a fibroblastos apareceu entre três a quatro dias após a colocação em placa da DP (**Figura 76B**). A cultura a longo prazo foi realizada por transferência mecânica da DP para uma nova placa de cultura sem usar tratamento enzimático. Após cada transferência, DP produziu um grande número de células superando aproximadamente a cada três ou quatro dias, permitindo assim uma produção constante de células-tronco (SCs) em passagem zero (P0) (vide Figuras **74** e **75**). Foram realizadas várias transferências mecânicas de DP a cada 3 a 5 dias durante pelo menos seis meses. Foram obtidos isolamentos com sucesso com todas as amostras (n = 10) dos dentes decíduos.

#### **Exemplo 17. Morfologia de IDPSCs (fenótipo), seguindo a cultura a longo prazo da DP**

[0443] Para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), EP e LP de IDPSCs foram fixados em 2,5% de glutaraldeído (Sigma) por 48 h, pós-fixados em 1% de solução de tetróxido de ósmio tamponada com fosfato (pH 7,4) (Sigma) por 2 h a 4°C e incorporados em resina de Spurr (Sigma). As seções ultrafinas foram obtidas usando um ultramicrótomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems, Alemanha). As seções foram manchadas duas vezes com acetato de uranila (Sigma) e citrato de chumbo (Sigma) (2% e 0,5%, respectivamente) e analisadas usando TEM (Morgagni 268D, FEI Company, Países baixos; Mega).

[0444] Durante a cultura a longo prazo de DP, a morfologia de ambas, a população precoce (EP) (isto é, IDPSCs isoladas de crescimentos de células durante as transferências mecânicas iniciais da DP por 2 semanas ou menos após a extração) e a população tardia (LP) (isto é, IDPSCs isoladas de crescimentos de células durante as transferências mecânicas posteriores da DP por mais do que 2 semanas após a extração) de IDPSCs foram preservadas (vide **Figura 76C**). TEM revelou dois tipos de morfologia de IDPSCs:

1. Células semelhantes a ES com baixa razão de citoplasma-

para-núcleo, baixa densidade de citoplasma e pobres de organelas (**Figura 76D**); e

2. Células IDPSCs semelhantes a MSC, tendo um número elevado de pseudopodos esticados para fora servindo na exploração do substrato com mais citoplasma e organelas em comparação com IDPSCs semelhantes a ES (**Figura 76E**).

[0445] **Figura 76F** documenta que IDPSCs mostraram uma população relativamente uniforme em relação à morfologia para estes dois tipos de células.

#### **Exemplo 18. Análises de cariótipo**

[0446] A cariotipagem de EP e LP subconfluentes de IDPSCs cultivadas em meio de DMEM/F12 (Invitrogen) foi realizada na passagem 3. Antes da colheita, Demecolcina (Sigma) em uma concentração final de 0,1 mg/ml foi adicionada por 1 hora. As células foram colhidas, lavadas em PBS e ressuspensas em 0,5 ml do meio e misturadas com 0,075 M de KCl (Sigma) para um volume de 10 ml. Após a incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a 400 g por cinco minutos e o pélete fixado em 5 ml três vezes (3:1) de metanol frio/ácido acético (Sigma). Três gotas de suspensão de células foram fixadas por slide. Para a contagem de cromossomos, os slides foram manchados em Giemsa por 15 minutos e; > 200 células foram analisadas por linhagem celular e relatadas em um microscópio Zeiss II (Zeiss, Jena, Alemanha), de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana.

[0447] O cariótipo de LP IDPSC foi confirmado aqui ser inalterado, sugerindo que durante a cultura, anormalidades cromossômicas estruturais numéricas e brutas não ocorreram conforme mostrado pela técnica de banda de rotina G (**Figura 76G**).

**Exemplo 19. Migração de células-tronco na polpa dentária: localização de células positivas de BrdU na DP durante o cultivo in**

**vitro**

[0448] Para examinar células positivas de BrdU na DP durante o cultivo in vitro, polpas dentárias foram suavemente lavadas em PBS e fatiadas. Cada fatia foi colocada em uma placa de cultura diferente. Em seguida, 5-bromo-29-desoxiuridina (BrdU, Sigma) foi adicionado diretamente no meio de cultura basal. A primeira fatia da polpa foi fixada e processada após 6 h de tratamento com BrdU. Na segunda placa de cultura com uma fatia da polpa, BrdU foi adicionado após 42 h e na terceira, após 66 h.

[0449] Após 6 h de tratamento com BrdU, todas as fatias foram fixadas em solução de formalina a 10% por 48 h. Os espécimes foram incorporados em blocos de parafina e seções de 10 mm foram obtidas. Todos os espécimes acima foram tratados por métodos de imunohistoquímica como segue. As seções de parafina de 10 mm foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. A atividade de peroxidase endógena foi medida incubando as seções durante 30 minutos em uma solução a 0,1% de peróxido de hidrogênio (Sigma). Para recuperação do antígeno, seções foram incubadas com tripsina durante 10 minutos a 37C. Para inibir a ligação do antígeno não específica, as seções foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de bezerro fetal, Invitrogen) por 10 min. As seções foram, em seguida, incubadas durante 12 a 16 h com o anticorpo primário em uma câmara úmida a 4C.

[0450] Os anticorpos primários foram os mesmos usados na imunofenotipagem de IDPSCs e adicionalmente STRO-1 anti-humano (Santa Cruz) e camundongo anti-BrdU IGg (Chemicon). A diluição ideal do anticorpo primário foi considerada ser 1:10. Os slides foram novamente lavados com PBS e então incubados com anticorpo secundário biotilado (DAKO, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1: 200 durante 30 min. As amostras foram lavadas com PBST (PBS com 0,1% de Tween 20) e incubadas com StrepABComplex/HRP (DAKO) na diluição de 1: 100 para

30 min. Depois de mais uma lavagem com PBST, a cor foi revelada pelo cromogênio 3 (3 diaminobenzidina DAB Kit, Zymed Laboratories, Inc.) por 5 min, seguido de lavagem com PBST, contracoloração nuclear com hematoxilina de Harris por

[0451] 45 s, desidratada e montada em Permount. A observação das seções foi realizada usando um fluoromicroscópio Carl Zeiss Axioplan (Zeiss). Seções de controle negativo foram tratadas de forma idêntica, exceto o anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

[0452] A fim de compreender o processo contínuo de geração de IDPSCs, a DP foi tratada com BrdU logo após a extração e chapeamento in vitro (**Figuras 77A-77C**). Após 6 h, apenas algumas células positivas do anticorpo anti-BrdU foram encontradas na parte central da DP (**Figura 77A**). Após 48 h, as células positivas de BrdU foram observadas na periferia da DP (**Figura 77B**), enquanto após 72 h, as células positivas de BrdU aumentaram em número e também foram encontradas na periferia da DP na parte apical, perto de IDPSCs, superando a zona (**Figura 77C**).

#### **Exemplo 20. Tecido da DP após tratamento enzimático**

[0453] Pelo menos dois métodos podem ser usados para isolamento de células tronco de tecidos específicos: tratamento enzimático e cultura de explante. Para o isolamento de células-tronco, os tecidos macios são cortados em pedaços pequenos e tratados com enzima após a desagregação do tecido.

[0454] Foram comparadas as características morfológicas da DP com e sem tratamento enzimático (colagenase/dispase) (**Figuras 77D-77E**). A DP, sem qualquer tratamento, manteve a sua integridade, especialmente na região onde as células positivas de BrdU foram observadas (**Figura 77D**). No entanto, após a digestão enzimática esta região foi destruída (**Figura 77E**). Portanto, escolheu-se o método de explante de DP para isolamento de células-tronco (SC) da DP. A análise morfológica comparativa demonstrou que tratamento enzimático de isolamento de SC prévio não é

recomendado para DP, pois provavelmente destrói o "nicho" de SCs.

**Exemplo 21. Imunofenótipo in vivo de células-tronco da polpa dentária**

[0455] A imunofenotipagem de IDPSC foi baseada na imunofluorescência e análises de citometria de fluxo realizadas usando anticorpos específicos anti-humanos: vimentina, nestin, fibronectina, e Oct3/4 (todos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); e CD105/SH-2 e CD73/SH-3 (ambos de Case Western Reserve University, OH, EUA). Os anticorpos secundários conjugados com FITC (Chemicon, Temecula, CA, EUA) foram usados e o respectivo isotipo combinou controles. A imunofluorescência foi analisada usando os anticorpos acima mencionados após a fixação das células em 4% de paraformaldeído (Sigma) em PBS e permeabilização em 0,1% de Triton X-100 (Sigma) em PBS. As IDPSCs foram incubadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma), diluídas em PBS durante 30 minutos, e adicionalmente incubadas por 1h à temperatura ambiente com imunoglobulina anti-camundongo ou anti-coelho de cabra conjugada com FITC (Chemicon) a uma diluição final de 1:500 em PBS (Invitrogen).

[0456] Os slides do microscópio foram montados no meio de montagem de Vectashield com 49,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e a imunofluorescência foi detectada usando um fluoromicroscópio Carl Zeiss Axioplan (LSM 410, Zeiss, Jena, Alemanha) ou Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Kanagawa, Japão). As imagens digitais foram adquiridas com uma câmera CCD (Applied Imaging model ER 339) e o sistema de documentação usado foi Cytovision v. 2.8 (Applied Imaging Corp - Santa Clara, CA, EUA).

[0457] A citometria de fluxo foi realizada usando EP e LP de IDPSC na passagem 3. As células foram desanexadas usando um tratamento de 10 min a 37C com 0,02% de EDTA de PBS, peletizado (10 min em 400 g) e lavadas em 0,1% de BSA em PBS a 0,1 M a 4C. Em seguida, as células em

uma concentração de  $10^5$  células/ml foram manchadas com uma concentração de saturação dos anticorpos acima mencionados (10 ml). Após 45 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, as células foram lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em 0,25 ml de PBS frio. A análise de citometria de fluxo foi realizada em um classificador de célula ativada de fluorescência (FACS; Becton, Dickinson, San Jose, CA) usando o programa CELL Quest (Becton, Dickinson). As análises de citometria de fluxo e/ou imunofluorescência foram repetidas com todas as amostras ( $n = 10$ ), e experimentos representativos são apresentados nas figuras. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em triplicado.

[0458] Usando estes ensaios de imuno-histoquímica o nicho de células de nestin, vimentina (marcadores de MSCs) e Oct3/4 (marcador de células de ES) dentro da DP (**Figuras 78A-78Q**) foram identificados. Células positivas de nestin foram encontradas em todas as zonas da DP: na zona rica em célula (camada mais interna da polpa que contém fibroblastos e células mesenquimais não diferenciadas) (**Figuras 78A-78C**); na zona livre de célula, a expressão de nestin foi observada em capilares e redes nervosas (**Figuras 78D-78F**); bem como na camada odontoblástica (camada mais externa que contém odontoblastos e está situada junto à pré-dentina e dentina madura) (**Figuras 78G-78H**). Células positivas de nestin na zona rica em célula mostraram semelhantes a fibroblastos, bem como morfologias de célula semelhante a ES (**Figuras 78B-78C**). Na zona livre de célula, a proteína nestin foi considerada ser expressa em filamentos intermediários nas células do plexo de nervos (**Figuras 78D**). Além disso, células positivas de nestin foram incorporadas na parede de pequenos capilares (**Figura 78E**) e em regiões adjacentes destes capilares (**Figura 78F**).

[0459] Na camada odontoblástica, grandes células colunares e semelhantes à célula de ES de várias rodadas também eram positivas de nestin (**Figuras 78G-78H**). STRO-1 é um marcador específico para as

células-tronco/pericitos da DP. STRO-1 anticorpo, portanto, foi usado como controle. A expressão de STRO-1 foi principalmente observada em capilares pequenos e vasos sanguíneos de tamanho médio (**Figura 78J**), bem como no plexo dos nervos na zona livre de células (**Figura 78K**). Verificou-se a localização de células que expressam vimentina na DP. Como esperado, células positivas de vimentina foram localizadas em capilares e na camada da polpa mais interna, localizações onde as células positivas de nestin foram também encontradas (**Figuras 78L-78M**).

[0460] Além disso, examinou-se a expressão de Oct3/4 na DP. Inicialmente, apenas uma pequena porcentagem (~0,75%) das células era positiva para Oct3/4. Esta porcentagem aumentou com o tempo do cultivo in vitro da DP. Uma forte expressão de Oct3/4 foi observada em núcleos de células localizadas em capilares da DP e na camada da polpa mais interna (**Figuras 78N-78Q**).

#### **Exemplo 22. Imunofenotipagem de EP e LP de IDPSCs**

[0461] A população inicial (EP) e a população final (LP) de células-tronco foram caracterizadas usando vários marcadores incluindo SH2/CD105, SH3/CD73 (marcadores de MSCs) e Oct3/4 (marcador de células de ES). Além disso, a expressão de marcadores de MSCs tais como vimentina, nestin, fibronectina foi avaliada em EP e LP. A **Figura 79** representativa (**A1-E1, A2-E2**) mostra que todos os marcadores de MSC foram expressos em ambas as populações (EP e LP) e diminuíram ligeiramente em SCs de LP, após seis meses de múltiplos ciclos de transferência de DP (**Figuras 79A2-79E2**), com exceção de Oct3/4.

[0462] A porcentagem de IDPSCs, que mostrou imunocoloração positiva para estes marcadores, foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados foram: 99,10% para EP e 96,60% para LP para SH2/CD105; 99,60% para EP e 98,40% para LP para SH3/CD73; 97,76% para EP e 94,56% para LP para nestin; 99,45% para EP e 95,60% para LP para vimentina; 97,10% para EP e 96,30% para LP para fibronectina (**Figuras**

**79A1-79E1 e 79A2-6E2).**

[0463] Curiosamente, nesta população de IDPSC específica uma porcentagem muito baixa de células positivas de Oct3/4 de 0,75% foi observada na EP. Esta porcentagem aumentou para 10,03% nas células de LP (**Figuras 79F1 e 79F2**).

[0464] Os dados de citometria de fluxo foram confirmados por imunocoloração de células usando anticorpos contra os mesmos marcadores de célula de MSC e ES. A expressão foi observada em ambas EP e LP de IDPSCs. Na **Figura 79**, a expressão de marcadores de MSC na LP é apresentada (**Figuras 79A3-79E3**). Como esperado, a expressão da proteína Oct3/4 foi observada no núcleo celular (**Figura 79F3**). Exceto para o caso de Oct-3/4, a expressão de todos estes marcadores na LP foi similar à da EP (dados não mostrados). As IDPSCs de LP isoladas de quatro doadores não relacionados demonstraram proporções variáveis de células positivas de Oct-3/4 de 5% a 47% (**Figuras 80A-D**).

**Exemplo 23. Taxa de Crescimento de LP e EP de Influência de Meios de Cultura**

[0465] Para avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento celular, recentemente isolados e o mesmo congelamento-descongelamento de IDPSC foram igualmente divididos em três grupos (DMEM/F12), DMEM de baixa-glicose (1000 mg/ml; DMEM-LG), e Meio Essencial Mínimo (MEM) Meio alfa (MEM-alfa). Todos os meios (Invitrogen) foram complementados com 15% de FBS (Hyclone), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, e 2 mM de aminoácidos não essenciais (todos de Invitrogen). As células foram semeadas em uma densidade de  $10^5/\text{cm}^2$  e contadas por pelo menos quinze dias consecutivos para avaliar a taxa de crescimento e o efeito da criopreservação. A capacidade do explante de tecido da DP para produzir IDPSC após rodadas consecutivas de criopreservação e descongelamento também foi verificada. Todos os experimentos foram realizados pelo menos

em triplicado.

[0466] As curvas de crescimento foram construídas usando dados de linhagens celulares, número de passagem (P2 a P15), criopreservação, e meio de crescimento. Os dados de número de células foram analisados usando análise de duas formas de variância ("criopreservação" e "meio de crescimento") complementadas por testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey. O nível de significância foi fixado em 5% (SPSS 19.0, Chicago, IL, EUA).

[0467] A capacidade proliferativa de EP e LP de IDPSCs antes e depois da criopreservação também foi estudada usando três diferentes meios de cultura: DMEM/F12, DMEM-LG, e MEM-alfa. A partir de P2, as células não-criopreservadas foram colhidas após a dissociação enzimática e contadas diariamente durante 15 passagens consecutivas. As IDPSCs cultivadas em DMEM/F12 e meio MEM-alfa apresentaram uma taxa proliferativa constante durante as passagens iniciais, que alcançou seu pico de crescimento na passagem  $5 \pm 2$  (**Figura 82A, Tabela 5**). Com base nas curvas de crescimento apresentadas na **Figura 81**, as análises estatísticas foram realizadas considerando o número de células da passagem 3 a 7 (**Tabela 5**). Usando os mesmos parâmetros, a taxa proliferativa de EP e LP cultivadas em DMEM/F12 e meio MEM-alfa foi avaliada após o descongelamento e mostrou potencial proliferativo semelhante, quando comparado com aqueles antes da criopreservação (**Figura 81B, Tabela 5**). EP e LP não-criopreservadas de IDPSCs cultivadas em DMEM-LG apresentaram diferenciação espontânea em linhagem osteogênica (dados não mostrados) e demonstraram a rápida diminuição do potencial proliferativo (**Figura 81A, Tabela 5**). Curiosamente, EP e LP de IDPSCs, cultivadas em DMEM-LG após o descongelamento, mantiveram seu estado proliferativo (**Figura 81B, Tabela 6**). DMEM/F12 e meio MEM-alfa não induziram qualquer diferenciação espontânea em EP e LP não-criopreservadas e criopreservadas de IDPSCs.

**Tabela 5.** Número de IDPSCs cultivadas em três meios de crescimento diferente e em diferentes passagens antes e após a criopreservação.

Linhagem de	Meio de Crescimento	Número de Passagens													
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Antes da criopreservação	MEM-alfa	100	165.5	364	431.5	476.5	394	378.5	321	266.5	189	176.5	147.5	119.5	90.5
	DMEM-LG	100	139.5	109.5	100	78	38.5	a	a	a	a	a	a	a	a
	DMEM/F12	100	125	262.5	302	333	305.5	273.5	218	193	161.5	149.5	124.5	110.5	89
Depois da criopreservação	MEM-alfa	100	153	329	433.5	345	325.25	245	191.5	175.5	172.5	166.5	112.5	64.6	60.5
	DMEM-LG	100	115.5	265	314	266	268.50	209	186.5	165.5	162	154.5	50	64.5	35.75
	DMEM/F12	100	99	251.5	296.5	250.5	232.5	191	180.5	166.5	142	128	117.5	59.5	57

<sup>a</sup>DMEM-LG não suportou crescimento da célula.  
doi:10.1371/journal.pone.0039885.t001

**Tabela 6.** Número de células ( $\times 10^3$ ) de IDPSCs (intervalo de passagem P3–P7) cultivadas em diferentes meios de crescimento antes e após a criopreservação de células.

Criopreservação	Meio de Crescimento		
	MEM-alfa	DMEM-LG	DMEM/F12
Antes	317.15 ± 101.81 <sup>a</sup>	245.80 ± 75.70 <sup>a</sup>	226.00 ± 74.82 <sup>a</sup>
Depois	366.30 ± 119.88 <sup>a</sup>	93.10 ± 37.68 <sup>b</sup>	265.60 ± 82.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Valores são a média ± desvio padrão, n=5. Meios seguidos pela mesma letra são estatisticamente diferentes (Tuckey,  $p > 0,05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0039885.t002

#### **Exemplo 24. Expressão de Gene de EP e LP de Influência de Meios de Cultura**

[0468] EP e LP de IDPSCs foram cultivadas durante sete passagens em três meios distintos (DMEM/F12, MEM-alfa, e DMEM-LG). Para avaliar o efeito destes diferentes meios de cultura na expressão gênica, o RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen): IDPSCs foram lavadas em PBS e a extração do RNA foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. cDNAs foram sintetizados a partir de 1  $\mu$ g do RNA total reverso transcrito com a Transcriptase Reversa RevertAid M-MuLV e oligo (dT)

(Fermentas Life Science, Amherst, NY, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. As concentrações finais dos reagentes foram: 20 µl de reações de PCR foram preparados com 2 µl de cDNA, 0,2 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 µM de dNTPs, 1,5 mM de cloreto de magnésio e Taq DNA polimerase do tampão (Fermentas Life Science). As sequências iniciadoras (frente e verso), e os comprimentos dos produtos amplificados são resumidos: Nestin FW 5'-CTCTGACCTGTCAGAAGAAT-3' (SEQ ID NO:1), e RV 5'-GACGCTGACACTTACAGAAT-3' (SEQ ID NO:2) (302 bp/54°C); Vimentina FW 5'-AAGCAGGAGTCCACTGAGTACC-3' (SEQ ID NO:3), e RV 5'-GAAGGTGACGAGCCATTTCC-3' (SEQ ID NO:4) (205 bp/55°C); Fibronectina FW 5'-GGATCACTTACGGAGAAACAG-3', (SEQ ID NO:5) e RV 5'-GATTGCATGCATTGTGTCCT-3' (SEQ ID NO:6) (386 bp/56°C); OCT3/4 FW 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO:7); e RV 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 8) (120 bp/61°C); SH2/CD105 FW 5'- TCTGGACCACTGGAGAATAC-3' (SEQ ID NO:9), e RV 5'-GAGGCATGAAGTGAGACAAT-3' (SEQ ID NO:10) (171 bp/56°C); SH3/CD73 FW 5'-ACACGGCATTAGCTGTTATT-3' (SEQ ID NO:11), e RV 5'-AGTATTTGTTCTTTGGGCA-3' (SEQ ID NO:12) (391 bp/56°C). Para diferenciação condrogênica e miogênica, as seguintes sequências iniciadoras foram usadas: COMP FW 5'-CCGACAGCAACGTGGTCTT-3' (SEQ ID NO:13), e RV 5'-CAGGTTGGCCCAGATGATG-3' (SEQ ID NO:14) (91 bp/53°C); ACTB FW 5'-TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3' (SEQ ID NO:15), e RV 5' GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC-3' (SEQ ID NO:16) (395 bp/59°C); MYOD1 FW 5'-GCCGCCTGAGCAAAGTAAATGAGG-3' (SEQ ID NO:17), e RV 5'-TAGTCCATCATGCCGTCGGAGC-3' (SEQ ID NO:18) (280 bp/53°C). GADPH gene FW 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO:19), e RV 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO:20) (463 bp/61°C) foi usado como controle. IDPSC não diferenciadas foram examinadas como

controle negativo para iniciadores específicos de diferenciação. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de recozimento por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Os produtos amplificados foram ressolvidos por eletroforese em um gel de agarose a 1,5% (Sigma) e visualizados usando coloração de brometo de etídio (Sigma).

[0469] O padrão de expressão do gene da célula de ES pluripotente e marcadores de MSC foram analisados por RT-PCR em EP e LP após o descongelamento. Em geral, tanto a EP quanto a LP mostraram padrão de expressão de vimentina semelhante, SH2/CD105 e SH3/CD73 (**Figura 81C**). Padrões de expressão semelhantes foram observados para fibronectina, nestin e Oct3/4, quando IDPSCs foram cultivadas em DMEM/F12 e DMEM-LG. No entanto, foram distintos quando cultivadas em MEM-alfa, em que três destes genes (fibronectina, nestin e Oct3/4) não mostraram qualquer expressão (**Figura 81C**).

#### **Exemplo 25. Padrão de expressão de marcadores de MSCs em células-tronco da polpa dentária imatura**

[0470] Para análise citométrica de fluxo, os seguintes anticorpos contra moléculas de superfície celular e seus respectivos controles de isotipos foram utilizados: anticorpo monoclonal anti-humano CD45, CD13 (Sigma), CD43 e CD34 (BD-PharMingen, San Diego, Calif., EUA) e CD105 (Serotec, Oxford, Reino Unido). SH-2, SH-3, e SH-4 foram de Case Western Reserve University, (Cleveland, Ohio, EUA), HLA-ABC anti-humano de camundongo e HLA-DR (Chemicon), CD90, CD146 (BD Pharmigen™), CD29 (Serotec), CD117/c-kit, CD44/Hcam (Santa Cruz, Calif., EUA). Cerca de 10<sup>6</sup> células foram incubadas com anticorpo primário por 30 min no gelo, lavadas em PBS + 2% FBS e 1M de azida sódica (tampão) seguido pela adição de anticorpo conjugado com ficoeritrina ou FITC secundário. Para a coloração dos antígenos intracelulares, as células foram fixadas e o seguinte protocolo de permeabilização. O pélete foi

ressuspenso em 1 ml de solução de Tween-20 (0,2% em PBS) à temperatura ambiente, e a mistura foi incubada por 15 min em banho-maria a 37°C. A análise citométrica de fluxo foi realizada em um classificador de célula ativada por fluorescência (FACS; Becton, Dickinson, San Jose, Calif. EUA) usando o programa CELL Quest (Becton, Dickinson).

[0471] A citometria de fluxo revelou que as células desenvolvidas a partir da DP foram uniformemente positivas para os antígenos específicos de MSCs de humanos, tais como SH-2 (CD105), SH-3 e SH-4 (CD73) e marcador de CD13 de precursores hematopoiéticos (**Figuras 82A, 82B, e 82H**) enquanto fibroblastos primários humanos foram negativos para todos estes marcadores (dados não mostrados). Estas células isoladas da DP também foram negativas para CD34, CD43 e CD45 descartando a contaminação com células hematopoiéticas e endoteliais (**Figuras 82E-82G**).

[0472] Além disso, a expressão de antígenos de histocompatibilidade (MHC) de HLA-ABC e HLA-DR foi examinada por FACS. HLA (antígenos de leucócitos humanos) foram originalmente definidos como antígenos de superfície celular que mediam doença de enxerto versus hospedeiro, que resultou na rejeição de transplantes de tecidos de doadores incompatíveis com HLA. Semelhante às MSCs da medula óssea, a expressão de ambas estas proteínas não foi observada em IDPSC (**Figuras 83A-83B**). Também analisamos um conjunto de marcadores comumente usado para a caracterização de MSC:

i) CD44 é uma glicoproteína de transmembrana de 80-250 kDa tipo I (N-terminal extracelular) e o receptor de ácido hialurônico desempenha um papel importante na migração do MSCs e parece ser crítica para o recrutamento de MSCs para sítios da ferida para a proposição de regeneração do tecido (Zhu et al., 2006);

ii) Fator de Células Tronco/c-kit (Kit de tirosina-proteína quinase) ou CD117;

iii) CD90 ou Thy-1 pode ser usado como um marcador para uma variedade de células-tronco e para os processos axonais de neurônios maduros;

iv) CD29 - expressão do antígeno de superfície revelou imunofenótipos mesenquimais e semelhantes de crista neural (Pruszek et al., 2009);

v) nestin é um marcador para células-tronco neurais multipotentes e também é expresso em células-tronco do broto de folículo piloso; e

vi) vimentina é um marcador de células-tronco neurais, que também é expresso em células imaturas, antes de ser substituído posteriormente por redes mais especializadas (Langa et al., 2000).

[0473] Todos estes marcadores eram uniformemente positivos em IDPSC (**Figuras 83C-83H**).

#### **Exemplo 26. Expressão de marcadores de células-tronco neuroepiteliais em IDPSC de LP**

[0474] A citometria de fluxo foi realizada para BDNF, NGF, NT-3 e NT-4 em IDPSC de LP. O mesmo protocolo descrito acima foi seguido, e os anticorpos primários usados foram: BDNF anti-humano de coelho (Preprotech, 1:100), NGF anti-humano de coelho (Preprotech, 1:100), NT-3 anti-camundongo de cabra (Preprotech, 1:100), NT-4 anti-camundongo de cabra (Preprotech, 1:100). A expressão da proteína p75 foi monitorada pela análise de FACS usando o anticorpo monoclonal de camundongo Ab3125 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) ou controle do isotipo. Após a incubação primária, os slides foram lavados e incubados com os anticorpos apropriados anti-coelho de cabra Alexa 488 (Sigma, 1:600), ou anti-cabra de coelho Alexa 488 (Sigma, 1: 600) por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de três lavagens, e a tampa escorregou com Fluoromount (Sigma).

[0475] Para análise de RT-PCR o RNA total foi extraído de culturas de células-tronco da polpa dentária com Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. cDNA foi sintetizado utilizando o Sistema de

Transcrição Reversa ImProm-II™ (Promega) com Oligo(dT)15, e uma reação de controle sem a transcriptase reversa também foi realizada. PCR consistiu em 35 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, com os seguintes pares de iniciadores: BDNF-F (5'-AGA GGC TTGACA TCA TTG GCT G-3') (SEQ ID NO:21), BDNF-R (5'-CAA AGG CAC TTG ACT ACT GAG CAT C-3') (SEQ ID NO:22); GDNF-F (5'-CAC CAG ATA AAC AAA TGG CAGTGC-3') (SEQ ID NO:23), GDNF-R (5'-CGA CAG GTC ATC ATC AAA GGC G-3') (SEQ ID NO:24); NGF-β-F (5'-ATA CAG GCG GAA CCA CAC TCA G-3') (SEQ ID NO:25), NGF-β-R (5'-GTC CAC AGTAAT GTT GCG GGT C-3') (SEQ ID NO:26); NT-3-F (5'-TGG GGG AGA CTT TGA ATG AC-3') (SEQ ID NO:27), NT-3-R (5'-CTG GCA AAC TCC TTT GAT CC-3') (SEQ ID NO:28); NT-4/5-F (5'-AGG AGGCAC TGG GTA TCT GA- 3') (SEQ ID NO:29), NT-4/5-R (5'-ATC CCT GAG GTC TCT CAG CA-3') (SEQ ID NO:30). As reações sem nenhuma transcriptase reversa e sem modelo foram realizadas como controles negativos para ausência de amplificação de DNA genômico e ausência de contaminação, respectivamente. Os amplicons tinham 147 bp (fator neurotrófico derivado do cérebro, humano-BDNF), 335 bp (fator neurotrófico derivado de célula glial, humano-GDNF), 174 bp (fator de crescimento do nervo, polipeptídeo beta, humano-NGF-β), 201 bp (neurotrofina 3, humano-NT-3), 198 bp (neurotrofina 4/5, humano-NT-4/5).

[0476] A expressão de mRNA de p75 foi analisada por RT-PCR usando iniciadores específicos (iniciador avançado: 5'-tcgtggagagtctgtgcagt-3' (SEQ ID NO: 31), iniciador reverso: 5'-tggacaggaagtgtggtcag-3' (SEQ ID NO: 32)). O RNA total foi extraído com o RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA), transcrito reverso e amplificado para 20 ciclos em um Controlador Térmico Programável PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA) usando o sistema de amplificação Superscript (Life Technologies, Inc.). Os produtos de PCR foram fracionados em dimensão por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio

a 2% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). GAPD foi coamplificado como um gene de limpeza para normalizar os níveis de expressão p75.

[0477] Sem desejar vinculação a qualquer teoria, as células-tronco da polpa dentária adulta podem se originar de células-tronco da crista neural (NCSC) e essas células-tronco da polpa dentária com características de NCSC podem persistir até a idade adulta, capazes de gerar uma ampla variedade de células, dependendo do seu ambiente. Os inventores demonstraram, pela primeira vez, que IDPSC da LP naturalmente constitutivamente expressam altos níveis de fatores neurotróficos, tais como BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), GDNF (fator neurotrófico derivado da linhagem da célula glial), NGF- $\beta$  (fator de crescimento do nervo), NT-3 (neurotrofin-3), NT-4/5 (neurotrofin-4/5) que são conhecidos por promover o crescimento do axônio sensorial e motor (**Figuras 84A-84E e 84G**) bem como p75 (um receptor de neurotrofina e marcador de NCSC) (**Figuras 84F e 84H**). A análise de classificação de célula ativada por fluorescência (FACS) (**Figuras 84A-F**) demonstrou uma proporção de BDNF (100%), GDNF (99%), NGF- $\beta$  (99%), NT-3 (70%), NT-4/5 (80%) e p75 (90%) nas populações de IDPSC da LP.

#### **Exemplo 27. Expressão de células-tronco do estroma e marcadores epiteliais da córnea em IDPSCs de LP**

[0478] As IDPSCs de LP também mostraram expressar um subconjunto de marcadores, que são importantes para o destino da célula epitelial e especialmente para o epitélio de superfície do olho. Usando a análise imuno-histoquímica, a presença de várias células-tronco do estroma e proteínas epiteliais foi avaliada em IDPSCs de LP não-diferenciadas. Os seguintes anticorpos foram usados: os anticorpos monoclonais anti-humanos de camundongo: anti-integrina beta1 (integrina  $\beta$ 1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), conexina 43 (Chemicon), ABCG2 (Chemicon) e vimentina (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA) e anticorpos monoclonais citoplásmicos/nucleares: anti-citoqueratina de camundongo

3/12 (K3/ 12) (RDI, Flandres, NJ, USA), reage com anti-p63 anti-humano de ser humano e coelho, e de camundongo (Chemicon). As células foram crescidas em lamínulas de vidro para confluência de 70%, lavadas em PBS (Gibco) e fixadas durante a noite com 4% de paraformaldeído (Sigma). As Lamínulas foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 20 mm de Tris-HCl pH 7,4 (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), 0,15 M de NaCl (Dinâmica Reagent, São Paulo, SP, Brasil) e 0,05% de Tween-20 (Sigma). A permeabilização foi realizada usando 0,1% de Triton X-100 por 15 min (Santa Cruz Biotechnology). As células foram lavadas três vezes e incubadas por 30 min em 5% de albumina de soro bovino (Sigma) em PBS pH 7,4 (Gibco). Anticorpos primários foram adicionados por 1h em cada slide em diferentes diluições (conexina 43, ABCG2, vimentina, integrina  $\beta$ 1 e K3/12 (1: 100), p63 (1: 200) e anti-hIDPSC (1: 1000), que foram incubados à temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS (três vezes), as células foram incubadas no escuro por 1h com isotiocianato de fluoresceína conjugado com o anticorpo anti-camundongo secundário (FITC), em uma diluição de 1:500. Os slides do microscópio foram montados em solução antidesgaste (meio de montagem Vectashield, Vector Laboratories, Hercules, CA, EUA) com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e analisados usando um microscópio confocal. As reações de controle foram incubadas com PBS em vez do anticorpo primário, seguido de lavagem e incubação com o respectivo anticorpo secundário.

[0479] Os iniciadores usados para a análise de expressão de marcadores de células-tronco do estroma em IDPSCs de LP foram os seguintes com o iniciador sense de gene, iniciador anti-sense e temperatura de recozimento especificada: ABCG2 (379 bp) AGTTCCATGGCACTGGCCATA TCAGGTAGGCAATTGTGAGG (SEQ ID NO: 33). 55°C; Conexina 43 (154 bp) CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC (SEQ ID NO:34)

ACCAAGGACACCACCAGCAT (SEQ ID NO:35) 55°C; K3 (145 bp)

GGCAGAGATCGAGGGTGTC (SEQ ID NO:36)  
 GTCATCCTTCGCCTGCTGTAG (SEQ ID NO:37) 58°C; K12  
 (150bp)ACATGAAGAAGAACCACGAGGATG  
 TCTGCTCAGCGATGGTTTCA (SEQ ID NO:38) 58°C;  $\beta$ -actina (208 bp)  
 GGCCACGGCTGCTTC (SEQ ID NO:39); GTTGGCGTACAGGTCTTTGC  
 (SEQ ID NO:40) 55°C. Amostras de estroma humano e epitélio da córnea foram doadas pelos pacientes do Departamento de Oftalmologia, da Universidade Federal de São Paulo, após consentimento informado e foram usadas como controles no presente trabalho. O mRNA total destes estromas humanos, epitélio da córnea e IDPSCs de LP foram extraídos usando o reagente TRIZOL (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. O mRNA total era transcrito reverso em cDNA usando o SperScript First-Strand Synthesis System e iniciador Oligo dT20 (ambos de Invitrogen). Cerca de 2 $\mu$ l de mRNA foram usados por reação. As concentrações finais dos reagentes foram 1 $\times$ tampão de PCR, 0,2 mM de mistura de dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (acima); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 2 unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), com um volume final de 50 $\mu$ l. PCR foi realizada usando um MiniCycler (MJ Research, San Francisco, CA, EUA). PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, à temperatura de recozimento por 1 min e a 72°C, durante 1 min. Os produtos de PCR foram fracionados em dimensão por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio a 2% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O gene de  $\beta$ -actina humano foi usado como controle.

[0480] Anticorpos específicos humanos, tais como p63, integrina  $\beta$ -1 (CD29), vimentina, conexina 43 e ABCG2 apresentaram imunocoloração positiva com IDPSCs de LP enquanto o anticorpo anti-K3/12 mostrou apenas fraca imunocoloração positiva em algumas células (**Figuras 85A-85G**). A expressão de alguns genes analisados anteriormente usando proteínas imunofluorescentes também foi avaliada por RT-PCR. As IDPSCs

de LP não diferenciadas demonstraram a expressão de ABCG2, conexina 43 e K12, enquanto a expressão de K3 não foi encontrada (**Figura 85I**). Como esperado, ABCG2, conexina 43 e K12 foram expressos em tecido de estroma humano usado como controle, enquanto os mRNAs de K3 eram indetectáveis (**Figura 85I**, Pista 3). Em amostras de controle da córnea humana conexina 43, K12 e mRNAs de K3, estavam presentes (**Figura 85I**, Pista 2). Previsivelmente, a expressão de ABCG2 não foi detectada na córnea de controle humana (**Figura 85I**, Pista 2).

### **Exemplo 28. Expressão de marcadores de células-tronco embrionárias em IDPSC de LP**

[0481] Anticorpos primários Oct3/4 e Nanog (Chemicon, Temecula, CA., EUA) foram diluídos em 1:40. Após FITC adequada, os anticorpos secundários foram adicionados por 40 min na diluição de 1:100 à temperatura ambiente. Os slides do microscópio foram montados no meio de montagem de Vectashield (Invitrogen) com ou sem 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). A visualização foi obtida usando imagens digitais que foram adquiridas com uma câmera CCD refrigerada (PCO, VC44) e processadas com software ISIS (MetaSystem, Belmont, MA, EUA). O RNA total foi purificado com o reagente Trizol (Invitrogen) e tratado com Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, EUA) para eliminar a contaminação de DNA genômico. As células de ES humanas foram usadas como um controle. Um micrograma de RNA total foi usado para a reação de transcrição reversa com iniciador de ReverTra Ace- $\alpha$  e dT<sub>20</sub>, de acordo com as instruções do fabricante. PCR foi executado com ExTaq. As Sequências de Iniciador de RT-PCR são: (5' para 3') Oct3/4 (End-S) GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG, (SEQ ID NO:41); (End-AS) CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC (SEQ ID NO:42); SOX2 (End-S) GGG AAA TGG GAG GGGTGC AAA AGA GG (SEQ ID NO:43), (End-AS) TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG (SEQ ID NO:44); Nanog (S) CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C

(SEQ ID NO:45), (AS) CGG AAGATT CCC AGT CGG GTT CAC C (SEQ ID NO:46); GAPDH (S) GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC (SEQ ID NO:47), (AS) TGG TGA AGA CGC CAG TGG A (SEQ ID NO:48).

Colágeno tipo I

Iniciadores: 5'-AATGAAGGGACACAGAGGTTTC-3' (SEQ ID NO: 49)

e

5'-CCAGTAGCACCATCATTTCAC-3' (SEQ ID NO: 50)

Tamanho do produto: 198 bp

Temperatura de recozimento: 61°C

[0482] PCR quantitativa foi usada para determinar a expressão percentual em relação a células-tronco epiteliais humanas (hESC).

[0483] IDPSC de LP mostrou a expressão de Oct3/4, Nanog, SOX2, e p53 com Oct3/4 e Nanog tendo uma localização nuclear (**Figuras 86A-86C1**). A PCR quantitativa indicou que Oct3/4 tinha o mais alto nível relativo de expressão entre Oct3/4, Nanog, e SOX2. A expressão relativa de Oct3/4 em IDPSCs de LP variou entre doadores não relacionados (**Figuras 80A-80D**). Além disso, a proporção de células positivas de p53 em IDPSC de LP derivada de dois doadores não relacionados também foi quantificada (**Figura 89A-89B**). As células positivas de p53 também foram positivas para CD44, um marcador de MSC descrito acima (Figura 10C) e foram encontrados em IDPSC de LP em quantidades semelhantes (**Figura 89C-89D**).

**Exemplo 29. Análise de Biomarcadores em IDPSCs de LP por RT-PCR**

[0484] O RNA total das amostras de células de IDPSCs de LP isoladas de dentes decíduos (DL-1 e DL-4) e de um terceiro molar (DL-2) foi preparado com o kit RNeasy Mini (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese do DNA complementar foi realizada em ~800 ng do RNA total usando o Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (Qiagen) e os produtos de cDNA resultantes foram ampliados usando

os iniciadores de gene específico mostrados abaixo.

Colágeno tipo I

Iniciadores: 5'-AATGAAGGGACACAGAGGTTTC-3' e

5'-CCAGTAGCACCATCATTTCAC-3'

Tamanho do produto: 198 bp

Temperatura de recozimento: 61C

Fibronectina IIIA

Iniciadores: 5'-GGTCAGTCCTACAAGATTGGTG-3' (SEQ ID NO: 51)

e

5'-CTTCTCCCAGGCAAGTACAATC-3' (SEQ ID NO: 52)

Tamanho do produto: 223 bp

Temperatura de recozimento: 61C

Tenascina-C

Iniciadores: 5'-AGAAGAGGTGTCCTGCTGACTG-3' (SEQ ID NO: 53)

e

5'-TCATGTCACTGCAGTCATAGCC-3' (SEQ ID NO: 54)

Tamanho do produto: 285 bp

Temperatura de recozimento: 61C

Vimentina

Iniciadores: 5'-AATCCAAGTTTGCTGACCTCTC-3' (SEQ ID NO: 55)

e

5'-TGTAGGTGGCAATCTCAATGTC-3' (SEQ ID NO: 56)

Tamanho do produto: 327 bp

Temperatura de recozimento: 61C

[0485] Os iniciadores foram projetados usando software Primer3 v. 0.4.0. Os produtos foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, e visualizados com um transiluminador Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, New Haven, CT) usando o Software Kodak 1 D v.3.6.5K2 (Kodak). A densitometria comparativa das bandas foi obtida com o software Adobe Photoshop CS2.

[0486] As **Figuras 87A** e **87B** mostram as imagens dos géis de agarose e os gráficos das densidades ópticas correspondentes das bandas para os quatro genes analisados. Todas as IDPSCs de LP estudadas expressaram os genes de vimentina, tenascina-C, colágeno tipo I, e fibronectina. As três populações de IDPSCs de LP exibiram expressão semelhante de genes de vimentina, tenascina e fibronectina. A análise da densitometria mostrou que o RNA total para o colágeno tipo I nas células de DL-2 foi significativamente menor do que o observado nas outras hIDPSCs ( $p < 0,05$ ).

[0487] As células foram incubadas com anticorpos primários para detectar vimentina, colágeno tipo I, fibronectina e tenascin-C. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de albumina de soro bovino a 5% em PBSA. As concentrações de anticorpos óptimas foram determinadas antes dos experimentos usando células de DL-1, DL-2, e DL-4. Vimentina foi detectada por um anticorpo monoclonal de camundongo de Neomarkers (LabVision Corporation, Fremont, CA) diluído 1:250. O colágeno tipo I foi detectado por um anticorpo monoclonal de camundongo de Chemicon (Chemicon, Victoria, Austrália) diluído 1:25. A fibronectina foi detectada por um anticorpo monoclonal de camundongo de Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA) diluído 1:50. A tenascina-C foi detectada por um anticorpo monoclonal de camundongo de Neomarkers diluído 1:100. O anticorpo secundário foi a anti-imunoglobulina G do camundongo conjugada com fluoresceína diluída em PBSA (1:500) à temperatura ambiente. Todas as incubações foram realizadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e a omissão dos anticorpos primários serviu como controles negativos. As observações e gravação fotográfica foram realizadas em um microscópio de fluorescência (LSM 410 Zeiss; Oberkochen, Baden-Wurttemberg, Alemanha). Para cada reação, pelo menos 100 células foram observadas.

[0488] As reações positivas para todos os anticorpos testados foram observadas independentes das IDPSCs de LP analisadas. As populações

de IDPSC de LP expressaram vimentina, uma proteína do citoesqueleto das células mesenquimais. A vimentina apareceu como feixes em onda de filamento ramificado para fora do corpo central para alcançar os domínios periféricos da célula (**Figura 88A**). O colágeno tipo I apareceu como pontos espalhados por todo o citoplasma com uma maior concentração em torno da área perinuclear (**Figura 88B**). A fibronectina (**Figura 88C**), bem como a tenascina (**Figura 88D**) apareceram como pequenos pontos homogeneamente distribuídos por todo o citoplasma. O colágeno tipo I apareceu menos evidente na terceira linhagem molar DL-2 do que em outras hIDPSCs, considerando que o DL-4 isolado de dentes decíduos mostrou reação menos proeminente para os anticorpos de fibronectina e tenascina. **A Tabela 7** resume a análise da expressão dos quatro biomarcadores nas células de DL-1, DL-2, e DL-4.

**Tabela 7.** Coloração de imunofluorescência de biomarcadores em hIDPSCs

Anticorpos primários	DL-1	DL-2	DL-4
Vimentina	+++	+++	+++
Colágeno Tipo I	++	+	++
Fibronectina	++	++	+
Tenascina	++	++	+

+++ : expressão forte; ++ : expressão moderada; + : expressão fraca

### **Exemplo 30. População de IDPSC não diferenciada Enriquecida com Células Expressando SOX2**

[0489] IDPSC são células-tronco da crista neural isoladas de um organismo jovem. Desse modo, verificou-se que a expressão de SOX2 nestas células em múltiplas passagens *in vitro* e posterior transferência de DP mecânica, considerando um ambiente de baixo teor de oxigênio. As IDPSCs de EP não diferenciadas obtidas após 15 ciclos de transferência de DP demonstram expressão robusta se a proteína SOX2 na passagem 2 (**Figura 90a, A-A1**), durante a cultura *in vitro*, diminuir gradualmente a expressão de SOX2. Na passagem 5, a expressão de SOX2, pode ser observada apenas em algumas IDPSC de EP (**Figura 90a, B-B1**).

[0490] Descobriu-se surpreendentemente que essa localização

intracelular de fatores de transcrição (TF) é um marcador do estado funcional de TFs. Desse modo, na passagem 2 a localização intracelular de SOX2 era nuclear, enquanto na passagem 5 pode ser observada predominantemente no espaço perinuclear. Isto sugere tráfico de SOX2 para o citoplasma (**Figura 90a**, A1, B1). As IDPSCs de LP não diferenciadas obtidas após 45 ciclos de transferência de DP demonstram expressão robusta se a proteína SOX2 na passagem 2 (**Figura 90b**, A) e na passagem 5, (**Figura 90b**, B). A ligeira diminuição da imunocoloração para SOX2 foi detectada e a localização intracelular de SOX2 era nuclear nas passagens 2 e 5 (**Figura 90b**, A, B). Estes resultados confirmam a vantagem funcional da expressão da proteína de SOX2 em IDPSC de LP sobre IDPSC de EP seguindo as condições de cultura de baixo oxigênio.

### **Exemplo 31. Células Progenitoras Neurais - Neuroblastos Derivados de IDPSC**

[0491] IDPSC são células-tronco da crista neuronal migratórias que são capazes de agregar em neuroesferas. Sabe-se que, no desenvolvimento, SOX2 é recuperado apenas por essas células destinadas a se tornarem neurônios. Células-tronco da crista neural que permanecem livres de SOX2 se diferenciam em outros tipos de células, mas nunca se tornam neurônios.

[0492] De acordo com alguns aspectos, verificou-se o quanto a transferência mecânica a longo prazo de DP afetará a capacidade de IDPSC para expressar SOX2 e diferenciar-se de neurônios. A diferenciação neural de IDPSC foi induzida seguindo o protocolo descrito neste documento. Primeiramente, verificou-se que a expressão da proteína SOX1 correlaciona-se com progenitores mitoticamente ativos que não estão ainda empenhados em um estágio final e também aquela classe de  $\beta$ -tubulina III é um elemento de microtúbulo expresso exclusivamente nos primeiros neurônios. Este marcador em combinação com marcação de BrdU foi usado como evidência de uma correlação entre um número de ciclos de

transferência de DP e enriquecimento da população de IDPSC com as células fortemente empenhadas em diferenciação neural.

[0493] **Figura 91a**, A-A4 demonstra expressão de SOX1 no núcleo, enquanto  $\beta$ -tubulina mostra localização citoplasmática nos precursores neurais derivados de LP de IDPSC, que são organizados em neuroesferas. Mais especificamente, a **Figura 91a** ilustra a expressão de proteínas de Sox1 e  $\beta$ -tubulina na população final (LP) de neurônios derivados de hIDPSC. O seguinte também é mostrado na **Figura 91a**: A. um núcleo (seta branca) de neurônios colorido com DAPI; A1. Imunocoloração positiva para SOX1 observada no núcleo (seta branca) de neurônios; A2. Imunocoloração positiva para a  $\beta$ -tubulina; A3. Imagens mescladas A-A2; e A4. Grande ampliação de baixo-relevo (*inset*) em A3 demonstra a superposição de DAPI e Sox1 no núcleo dos neurônios (seta branca). **As figuras 91b-e** demonstram enriquecimento de LP de hIDPSC com progenitores neurais e neurônios após 15, 30 e 45 ciclos de transferência mecânica de polpa dentária e indução de diferenciação neural. Na **Figura 91b-A**, uma percentagem de células negativas de SOX1, núcleo corado apenas com DAPI (azul) são mostradas; células positivas de SOX1 são apresentadas em verde. Na **Figura 91d-B**, uma porcentagem de células negativas de  $\beta$ -tubulina, núcleo colorido apenas com DAPI (azul). As células positivas de  $\beta$ -tubulina são apresentadas em vermelho.

[0494] O potencial proliferativo de neuroblastos iniciais obtidos após a diferenciação de IDPSC para os neurônios também foi confirmado. **A Figura 92a** demonstra um núcleo de neuroblastos de IDPSC positivamente imunocoloridos com anticorpo anti-BrdU e corpos neuronais que reagem positivamente com a classe de  $\beta$ -tubulina III. **Figura 92b-c** mostra claramente o enriquecimento da população de IDPSC diferenciada com neuroblastos um pouco diferenciados após números de ciclo crescentes de transferência mecânica de DP.

[0495] Surpreendentemente, a população de IDPSC de amplificação

transitória de neuroblastos ligeiramente diferenciados foi obtida. Isto foi confirmado pela expressão concomitante de BrdU, Sox1 e  $\beta$ -tubulina, que nunca foi demonstrada antes nem para células-tronco adultas nem para embrionárias.

[0496] Ainda mais surpreendente foi a constatação de que as células progenitoras neuronais derivadas de IDPSC nas passagens avançadas (5-10) que já carecem de expressão de SOX2 (**Figura 90a, B, B1**) começam a reexpressar SOX2 durante a formação de neuroesfera (**Figura 93a**). A eficiência dessa diferenciação das células em células neurais, no entanto, é inferior à de IDPSC nas passagens 1-3. A reexpressão de SOX2 foi mais eficiente em IDPSC obtida a partir de DPs, que foi submetida a ciclos de transferência mecânica de número elevado ( $\geq 30$ ) (**Figura 93b, c**).

[0497] Estes resultados fornecem fortes evidências sobre a identidade entre IDPSC e células-tronco da crista neural que podem ser isoladas em estágios embriônicos iniciais e finais. Além disso, a eficiência do comprometimento neural aumentou após as transferências mecânicas de DP apoiando nossa observação anterior sobre a importância da atmosfera de baixo teor de oxigênio para isolamento de IDPSC e manutenção de sua autorrenovação e diferenciação potencial (Lizier et al., 2012). Portanto, IDPSC de LP tem uma vantagem sobre IDPSC de EP em relação ao comprometimento neuronal, que é uma conclusão importante para o futuro do uso de células-tronco em doenças neurodegenerativas.

### **Exemplo 31. Simplicidade e Vantagens dos Novos Métodos.**

[0498] **Figura 94a** é um resumo gráfico de Cimadamore et al., 2011, que sugeriu o método de isolamento de células de SOX2 de células de ES humanas. Este protocolo é iniciado a partir do isolamento de células de SOX2<sup>+</sup> e indução da sua capacidade migratória para induzir a transição mesenquimal epitelial. Neste momento, as células em contraste com IDPSC carecem de expressão de SOX2, que é reexpressa durante esta diferenciação de células nos neurônios. Este protocolo, que apresenta

grande interesse acadêmico para estudar o mecanismo de regulação da expressão de SOX2 durante a diferenciação neuronal, é sofisticado. É menos provável que este protocolo seja usado para isolar as células neuronais para a terapia celular.

[0499] **Figura 94b** retrata uma modalidade não limitante dos aspectos desta divulgação que claramente demonstram a simplicidade do método sugerido bem como ressaltam a utilidade da composição de IDPSC para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

[0500] De acordo com alguns aspectos, biomarcadores exclusivos fazem *fingerprint* nos neuroblastos derivados de hIDPSCs e neurônios iniciais. A expressão de P75NTR (ou CD271), um membro do receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNFR) da superfamília de proteínas de transmembrana, é descrito em outra parte neste documento. Os ligantes para CD271 são neurotrofinas, que são o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), Fator de Crescimento Derivado do Cérebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT3), e Neurotrofina 4/5 (NT4/5). A expressão destes em IDPSCs não diferenciadas também foi demonstrada e descrita em outra parte neste documento. Estudos recentes forneceram evidências de que CD271 também serve como um receptor para as pró-formas destas neurotrofinas (*Rogers ML, Beare A, Zola H, Rush RA. CD 271 (P75 neurotrophin receptor) J Biol Regul Homeost Agents. 2008 Jan-Mar;22(1):1-6.*)

[0501] Surpreendentemente descobertas recentes também divulgadas neste documento é que o marcador de CD271 também é expresso em neuroblastos derivados de hIDPSCs que formam neuroesferas (agrupamentos tridimensionais do progenitor neural embrionário) e rosetas (estruturas neuroepiteliais reminiscentes dos tubos neurais iniciais - ilhas neurais em 3-D). Inesperadamente, as células dentro rosetas são também expressas em CD 146, que é considerado o marcador de pericitos originalmente derivados de capilares neurais. Por outro lado, o papel multifuncional desta molécula em biologia e patologia só foi recentemente

reconhecido. Mostrou-se que CD146 está ativamente envolvido no desenvolvimento, sinalização, transdução, migração celular, diferenciação de células-tronco mesenquimais, angiogênese e resposta imune. Ainda mais recentemente, o envolvimento de CD146 no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso foi demonstrado. CD146 interage com o fator de crescimento do axônio e envolvido na extensão do axônio in vitro. Além disso, camundongos de nocaute do sistema nervoso de CD146 exibiram pesos corporais mais baixos e menor ingestão de alimentos quando comparados com o tipo selvagem (Tu et al., 2013).

[0502] **Figura 95** ilustra coexpressão dos marcadores neurais em neuroblastos derivados de IDPSCs que formam neuroesferas e rosetas. Mais especificamente, a seguir mostra-se na **Figura 95**: A) expressão de RAR-alfa (verde) dentro de neuroblastos derivados de IDPSCs induzidos no sentido da diferenciação neural; B) e C) Expressão de CD271 (P75) em neuroesferas e neurônios diferenciados, respectivamente; D) expressão de beta-3-tubulina; E) anticorpo NeuN, localização nuclear em neuroesferas; F, G), e H) expressão do complexo Dineína – Lis1 - Ndel; I) e J) expressão de mielina P2 e O4, respectivamente; K) expressão de Sinaptofisina; L) expressão de CD146; e M) controle. Barra de escala = 10µm, núcleo colorido com DAPI (azul).

[0503] **Imunofenótipo de neuroblastos derivados de hIDPSCs SOX1, SOX2, beta-3-tubulina, e neurônios iniciais:** CD271+, Beta-3-tubulina+, NeuN+ Dineína+, Lis1+, NDEL+, mielina P2+, O4+, GFAP+, Sinaptofisina+ e CD146+. Surpreendentemente, descobriu-se que a cultura de IDPSC de LP de células pós-natais de origem da crista neural é caracterizada por propriedades únicas. Essas propriedades exclusivas são geralmente típicas para precursores neurais derivados do cérebro fetal ou de células de ES ou iPS induzidas para diferenciação neural in vitro.

### **Exemplo 32. Diferenciação e Maturação Posteriores de Neuroblastos Derivados de IDPSCs**

[0504] Neuroblastos derivados de IDPSCs, após maturação neural *in vitro*, começam a expressar marcadores chave neurais:

1. responsáveis pela migração de neurônios e sinalização, crescimento e manutenção e transporte axoplásmico, tais como, **dineína, Lis1, Ndel1;**
2. envolvidos na geração da bainha de mielina: **mielina P2, O4;**
3. envolvidos na diferenciação e especificação neural: **RAR-alfa**
4. envolvido na regulação da liberação do neurotransmissor:

#### **Sinapsina Ia/b**

[0505] **Dineína** é uma proteína motora direcionada pela extremidade-*minus* que, nas células, converte a energia química contida no ATP na energia mecânica do movimento. Através do transporte axoplásmico retrógrado, organelas carreadoras de dineína, vesículas, e possivelmente fragmentos do microtúbulo ao longo dos axônios dos neurônios em direção ao corpo celular.

[0506] **Lis 1, subunidade alfa IB acetil-hidrolase do fator de ativação de plaquetas**, é uma enzima que em seres humanos é codificada pelo gene PFAH1B1. Lis1 é o produto de proteína de um gene mutado na lisencefalia de defeito de migração neuronal humana, liga e regula a função motora de **dineína** na célula.

[0507] **NDEL-1**, proteína de distribuição nuclear 1 tipo nudE é uma proteína que em seres humanos desempenha um papel no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo a organização do citoesqueleto, migração de neurônio e sinalização celular, desenvolvimento natural e manutenção.

*Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. Neuron. 2000 Dec;28(3):681-96.*

*Sakakibara A, Ando R, Sapir T, Tanaka T. Microtubule dynamics in*

*neuronal morphogenesis. Open Biol. 2013 Jul 17;3(7):130061. doi: 10.1098/rsob.130061.*

[0508] Proteína **mielina P2** e proteína básica de mielina, juntas, constituem uma grande fração da proteína de mielina do sistema nervoso periférico. Estão intimamente envolvidas na geração da bainha de mielina. Elas também são implicadas em um número de doenças neurológicas, incluindo doenças autoimunes, de ambos os sistemas nervosos central e periférico.

[0509] **O4** Marcador Anti-Oligodendrócito Monoclonal O4 reconhece o marcador de oligodendrócito O4. Os oligodendrócitos são células de mielinação no sistema nervoso central (SNC) que formam a bainha de mielina dos axônios para apoiar a condução nervosa rápida.

[0510] **Receptor-alfa do ácido retinoico (RAR-alfa)** tem uma alta afinidade para todos os ácidos transretinoicos e pertence à mesma classe de fatores de transcrição nuclear como receptores de hormônio da tireoide, receptor de vitamina D3 e receptor de ecdisona.

[0511] **Sinapsina la/b** existe como duas isoformas alternativamente emendadas designadas Sinapsina la e Sinapsina lb, tem sido caracterizada como uma das principais fosfoproteínas em terminais nervosos e é considerado estar envolvida na regulação da liberação de neurotransmissor.

[0512] Tabela 8 apresenta o tipo, origem, diluição e local de aquisição para vários anticorpos primários.

**Tabela 8.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Tipo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Comprado de</b>
Dineína HC	Monoclonal	coelho	1:50	Santa Cruz
Lis1	Monoclonal	cabra	1:50	Santa Cruz
Mielina P2	Monoclonal	coelho	1:50	Santa Cruz
NDEL-1	Monoclonal	coelho	1:50	Santa Cruz
Anti-O4	Monoclonal	cabra	1:50	Millipore
RAR $\alpha$	Monoclonal	cabra	1:50	Santa Cruz
Sinapsina la/b	Monoclonal	cabra	1:50	Santa Cruz

**Exemplo 33. Análise cariotípica de IDPSCs de LP da Banda G**

[0513] A cariotipagem de LP subconfluente de IDPSCs cultivadas em

meio de DMEM/F12 (Invitrogen) foi realizada nas passagens 3 e 10. Antes da colheita, demecolcina (Sigma) em uma concentração final de 0,1 µg/ml foi adicionada por 1 hora. As células foram colhidas, lavadas em PBS e ressuspensas em 0,5 ml do meio e misturadas com 0,075 M de KCl (Sigma) para um volume de 10 ml. Após a incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a 400 g por cinco minutos e o pélete fixado em 5 ml três vezes (3:1) de ácido acético/metanol frio (Sigma). Três gotas de suspensão de células foram fixadas por slide. Para a contagem de cromossomos, os slides foram manchados em Giemsa por 15 minutos e; > 200 células foram analisadas por linhagem celular e relatadas em um microscópio Zeiss II (Zeiss, Jena, Alemanha), de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana.

[0514] O cariótipo de IDPSC foi analisado nas passagens inicial (P3) e final (P10). O cariótipo demonstra estabilidade e nenhuma alteração estrutural ou numérica foi observada. **Figura 96** ilustra cariótipos masculinos de IDPSC de LP cultivadas in vitro nas passagens inicial e final, figura representativa.

#### **Exemplo 34. Regeneração do nervo Mental de Ratos com o Uso de IDPSC**

[0515] A avaliação foi feita da regeneração do nervo mental que é um nervo aferente somático geral (sensorial). Este nervo fornece a sensação aos aspectos anteriores do queixo e lábio inferior, bem como a gengiva bucal dos dentes anteriores mandibulares e dos pré-molares. É uma ramificação do tronco posterior do nervo alveolar inferior, que em si é uma ramificação da divisão mandibular do nervo trigêmeo (CNV).

[0516] Trinta e seis ratos machos Wistar foram usados neste experimento e os ratos tinham seu nervo mental do lado direito ferido por compressão. O nervo do lado esquerdo de cada rato foi usado como controle positivo. Os nervos mentais do lado direito então foram distribuídos em dois grupos: grupo de controle com compressão e sem tratamento (n =

18) e grupo experimental que sofreu lesão por compressão e tratamento com IDPSCs (n = 18) ( $2 \times 10^6$  células). Os animais foram sacrificados em diferentes momentos do estudo: 1, 3, 7, 14, 21 e 42 dias após a lesão e eles tinham seus nervos mentais e gânglio trigeminal removido para análise com microscopia eletrônica de transmissão. As imagens de fibras neurais foram obtidas para a medição da circunferência externa de fibras mielínicas e espessura da camada mielínica. Os nervos após 14 dias de tratamento mostraram aspectos morfológicos semelhantes aos do nervo intacto. O uso de IDPSCs para a regeneração do nervo mental foi eficaz em uma única aplicação após duas semanas de tratamento.

### **Exemplo 35. Formação de teratoma.**

[0517] A formação de teratomas é uma ferramenta essencial na determinação da pluripotência de quaisquer células pluripotentes, tais como as células-tronco pluripotentes induzidas ou embrionárias (células de ES e iPS). Um protocolo consistente para a avaliação da capacidade de formação de teratoma das células foi estabelecido e então usado nos estudos. Alguns métodos publicados recentemente dos inventores são baseados em cotransplante subcutâneo de um número definido de IDPSCs não diferenciadas e Matrigel em camundongos imunodeficientes. O método mostrou ser altamente reprodutível e eficiente quando  $10^6$  células do camundongo e células pluripotentes humanas foram usadas. Em 100% dos casos observou-se a formação de teratoma em um grande número de animais e no seguimento longo (até 6 meses). Este método de análise de biossegurança de outras células-tronco mesenquimais/adultas (MSC), tais como derivadas da polpa dentária de dentes decíduos, cordão umbilical, tecido adiposo e outros.

[0518] Além disso, foram avaliados os seguintes critérios para a sensibilidade do ensaio de teratoma e quantitativamente:

A. Número de células definitivo e produção de suspensão de única célula; imunofenotipagem de célula de estudos em relação à

expressão de marcadores de células pluripotentes e cariótipo; cotransplante de células estudadas juntamente com Matrigel; transplante de células subcutâneo (s.c.) que permite o simples monitoramento do desenvolvimento de teratoma; as células foram transplantadas em camundongos NOD/SCID.

B. O desenvolvimento de tumores foi monitorado por 4 meses (aproximadamente 16 semanas). Para células pluripotentes critérios histológicos para os teratomas foi o desenvolvimento de tecidos derivados de todas as três camadas germinativas. Esta análise foi realizada por um patologista.

C. Para IDPSCs qualquer tipo ou quaisquer alterações na integridade do tecido normal no sítio da injeção de células foram levados em consideração.

#### SISTEMA(S) EXPERIMENTAL(AIS):

A. Três diferentes culturas de IDPSC LP nas passagens inicial (n = 10) e final (n = 10)

B. Fibroblasto primário humano (controle negativo)

[0519] As IDPSCs são compostas por população com um número variável de células-tronco expressando marcadores pluripotentes (1 a 25% das células) (Kerkis et al., 2006; Lizier et al., 2012). Estas células foram transplantadas em camundongos NOD/SCID (n = 20) e o desenvolvimento de tumores foi monitorado a partir de 4 meses (aproximadamente 16 semanas). Qualquer tipo de alterações na integridade do tecido normal no sítio da injeção de células foi levado em consideração.

[0520] Este protocolo foi adaptado para a população de IDPSC, especialmente no que diz respeito ao número de células usado, que foi calculado com base em que 20% de IDPSCs expressam marcadores pluripotentes. Em nossos testes anteriores com células de ES e iPS usamos  $10^6$  células, enquanto para testar teratogenicidade de células de controle e IDPSC  $5 \times 10^6$  células foram usadas.

[0521] Após 4 meses, mesmo se macroscopicamente, os tumores não fossem observados, os camundongos foram sacrificados e cortes congelados foram obtidos de diversos órgãos, tais como cérebro, pulmão, rins, baço, fígado e foram analisados pelo patologista.

[0522] Conclusão: embora a presença de DNA de IDPSC dentro de todos os órgãos estudados fosse encontrada, nenhuma formação de tumor ou quaisquer alterações morfológicas macroscópicas foram observadas.

### **Exemplo 36. Efeitos Parácrinos de hIDPSCS de LP: Propriedades Anti-inflamatórias, imunomoduladoras e Antimicrobianas de IDPSCs**

[0523] MSCs auxiliam via mecanismos Parácrinos e modulam o ambiente regenerativo através de mecanismos anti-inflamatórios e imunomoduladores. O efeito de inoculação i.p. de IDPSCs na produção de citocinas pelas células pulmonares de camundongos C57B1/6 i.t. infectados com cepas de Mtb e M. bovis diferidas em virulência foi observado. Dados do teste BIOPLEX são fornecidos na **Figura 97**. A inoculação de IDPSCs reduziu a produção de citocinas pelas células pulmonares infectadas. A forte redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, IL-17) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10) foi observada nos pulmões infectados com cepas altamente virulentas de Mtb. A redução da produção de IFN- $\gamma$  e KC foi menos pronunciada. A indução da produção de IL-4 foi observada somente em camundongos inoculados com IDPSCs.

[0524] **Fator de necrose tumoral** (TNF, cachexina, ou cachectina e anteriormente conhecido como fator de necrose tumoral alfa ou TNF $\alpha$ ) é uma adipocina envolvida em inflamações sistêmicas. O principal papel do TNF é na regulação das células imunes. TNF, sendo um pirogênio endógeno, é capaz de induzir febre, morte celular apoptótica, caquexia, inflamação e inibir a replicação viral e tumorigênese e responder à sepse através de células produtoras de IL1 & IL6. A desregulação de produção de TNF tem implicado em uma variedade de doenças humanas, incluindo o mal de Alzheimer.

[0525] **Interferon gama** (IFN $\gamma$ ) é uma citocina solúvel dimerizada que é o único membro do tipo classe II de interferon, é conhecido como interferon imune uma citocina que é crítica para imunidade inata e adaptativa contra infecções bacterianas, virais e intracelulares e para o controle do tumor. IFN $\gamma$  é um importante ativador de macrófagos. A expressão de IFN $\gamma$  aberrante está associada a um número de doenças autoinflamatórias e autoimunes. A importância do IFN $\gamma$  no sistema imunológico decorre em parte de sua capacidade de inibir a replicação viral diretamente e o mais importante de seus efeitos imunoestimulatórios e imunomoduladores.

[0526] A **Interleucina 17** é uma citocina que age como um potente mediador em reações tipo tardias, aumentando a produção de quimiocina em vários tecidos para recrutar os monócitos e neutrófilos para o sítio da inflamação, semelhante ao Interferon gama. A Interleucina 17 como uma família funciona como uma citocina pró-inflamatória que responde à invasão do sistema imunológico por patógenos extracelulares e induz a destruição da matriz celular do patógeno.

[0527] **Interleucina-1 beta (IL-1  $\beta$ )** também conhecida como catabolina, é uma proteína de citocina, um mediador importante da resposta inflamatória, e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação, e apoptose. O papel mais notável de IL-17 é seu envolvimento na indução e mediação de respostas pró-inflamatórias. IL-17 é comumente associada a respostas alérgicas.

[0528] **Interleucina-10 (IL-10)**, também conhecida como fator inibitório de síntese de citocina humana (CSIF), é uma citocina anti-inflamatória. IL-10 é uma citocina com efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação.

[0529] O ligante da quimocinas (motivo C-X-C) 2 (CXCL2), também chamado de proteína inflamatória de macrófago 2 (**MIP-2**), desempenha um papel importante na mediação de resposta inflamatória neutrofílica e é um

mediador no desenvolvimento de sepse. **KC** e proteína inflamatória de macrófago-2 (**MIP-2**) são quimiocinas de CXC que apresentam padrões temporais distintos de expressão na pele após a lesão cirúrgica. KC e Mip 2 são genes quimiotáticos de neutrófilo. Ambas as quimiocinas são conhecidas por serem expressas em um amplo espectro de configurações inflamatórias agudas e crônicas e são consideradas ser determinantes críticos da natureza e da magnitude da subsequente reação inflamatória.

**Exemplo 37. IDPSCs isoladas do terceiro dente Molar (Siso).**

[0530] **Figura 104** ilustra um terceiro dente siso molar extraído. CD 105 é um importante marcador nas MSCs. Foi usado para verificar a distribuição de MSCs e identificar seu nicho na polpa dentária. Demonstrou-se que MSCs expressando este marcador estão localizadas em múltiplos nichos perivascular, plexo vascular e plexo nervoso na rede de vasos ou nervos (**Figura 98**). Apesar do plexo vascular e plexo nervoso serem estruturas muito semelhantes, esta definição foi incluída para distinguir sendo redes menores (plexo vascular) como maiores (plexo nervoso). Conforme observado o CD105+, as células são localizadas no nicho perivascular (**Figura 98B, C, F**, seta preta), o plexo vascular (**Figura 98B, C, G**, seta laranja) e o plexo nervoso (**Figura 98H** asterisco).

[0531] Outro marcador de extrema importância para a identificação de MSC e seus nichos é CD73, que é composto de dois anticorpos: SH-3 e SH-4 que reconhecem epítomos diferentes em MSCs. Usou-se ambos os anticorpos e observou-se uma diferença perceptível entre eles. SH3 mostrou coloração positiva distribuída por todo o tecido da polpa e localização perivascular (**Figura 99A**). Observou-se células positivas SH3 nos vasos que estão localizados na camada de células endoteliais (**Figura 99B, C**), bem como algumas células SH3+ apresentam localização dos pericitos. Surpreendentemente, as células SH3+ foram encontradas no plexo neural nas células que exibem uma morfologia tipo neuronal, distinta (**Figura 99D**), quando comparado com as células CD105+ localizadas no

mesmo sítio anatômico (**Figura 98H**). Quanto à expressão do anticorpo SH4 mostrou uma marcação muito sutil (**Figura 99E, F**) quando comparado a SH3 (**Figura 99A-D**) e controle (**Figura 98A**).

[0532] Além disso, testou-se a expressão de N-caderina, que é uma molécula de adesão de células neurais e considerada uma molécula chave das células da crista neural durante a embriogênese. Na polpa dentária do terceiro dente molar, a expressão de N-caderina foi visualizada principalmente no nicho perivascular, mas em torno de vasos sanguíneos de diâmetro menor (**Figura 100A-C**). Além disso, a coloração não foi observada em torno de todos os vasos (**Figura 100A**). Além disso, a **Figura 100C** mostra a localização de N-caderina no sítio anatômico de pericitos.

[0533] ABCG2 está associado à proteína de membrana celular que transporta várias moléculas através das membranas celulares internas e externas. ABCG2 também é considerado um marcador de células-tronco e manifesta-se abundantemente na placenta. Observou-se células distribuídas pelo tecido conjuntivo da polpa que mostrou uma expressão intensa deste marcador (**Figura 100D, E**) observada de forma semelhante para SH-3 (**Figura 99**). Verificou-se também a expressão de Nanog, que é um fator de transcrição, cuja expressão foi observada na região perivascular e plexo vascular (**Figura 100F**), mas não mostrou nenhuma localização citoplasmática e nuclear.

[0534] A análise comparativa dos dois principais marcadores mostrou que células positivas de MSC e CD105+ + CD73/SH3 diferem tanto na localização dos nichos do tecido da polpa, quanto na morfologia. As células CD105+ quando encontradas no tecido da polpa, o plexo nervoso mostra a morfologia de células de fibroblastos - típicas para CTM (**Figura 101**). CD73/SH3 + células encontradas no tecido conjuntivo são redondas e são menores (**Figura 101B**) em comparação com CD105+. A marcação para ambos os anticorpos de CD105+ e +CD73/SH3 foi observada no nicho perivascular, mas aparentemente células CD105+ são encontradas no local

anatômico de pericitos, células CD73/SH3+ quando células endoteliais (**Figura 101C, D**). Por sua vez N-caderina de células positivas é preferencialmente localizada no sítio anatômico de pericitos (**Figura 101E**) e não no nicho de células endoteliais (**Figura 101C, D**). A principal diferença entre CD73/SH3+ e CD105+ foi observada no plexo nervoso, onde células CD73/SH3+ fac-símile da morfologia neuronal (**Figura 102A, B**).

[0535] Estes dados demonstram a possibilidade de isolamento de células-tronco com assinatura molecular semelhante a IDPSCs, bem como confirmar o comprometimento neural de células-tronco localizadas no plexo nervoso.

#### **Exemplo 38. Avaliação do Potencial Teratogênico de IDPSC**

[0536] A fim de avaliar o potencial teratogênico de IDPSC,  $1 \times 10^6$  células foram injetadas por via subcutânea na parte de trás de 15 camundongos imunossuprimidos. Após 40 dias havia macroscopicamente observado a formação de massas celulares e/ou teratomas (Figura 104).

#### **Exemplo 39. Processo de Liberação do Lote para Escala Industrial de hIDPSC por Método de LP**

[0537] **Figura 105** ilustra um fluxograma exemplar para um processo de liberação do lote para escala industrial de hIDPSC pelo método de LP para obter quantidades clinicamente relevantes para múltiplas dosagens de pacientes. De acordo com alguns aspectos, a polpa dentária derivada de dentes decíduos é chapeada em um frasco de cultura celular. As células da polpa dentária (DP) são passadas por um reagente de dissociação enzimática da passagem 1 (P1) para a passagem 3 (P3) em cada ciclo de colheita (H). Em cada colheita (h1-H35), a DP é transferida pelo método não enzimático.

[0538] Em P3, em cada ciclo de colheita, as células das polpas dentárias 1-10 são agrupadas e passam por um processo de congelamento em P4. Posteriormente, as células são descongeladas e 50% das células

são liberadas como um único lote em p%. Depois, as células estão congeladas e prontas para a administração terapêutica, preferencialmente para induzir neurodegeneração direta, tais como mas não limitado a, injeção intratecal (IT) ou da medula intraespinal (Produto 1-IT).

[0539] A fim de obter um elevado número de células por administração intravenosa (IV)/sistêmica ou tópica/local, outros 50% das células são descongelados em P4 e podem ser crescidos para passagem 15 e liberados como um único lote em P15. As células são então agrupadas e congeladas para a administração intravenosa (Produto 2-IV).

[0540] **Tabela 9** apresenta diversos métodos de análise executados em relação ao processo de liberação do lote acima descrito e mostrados na **Figura 105**.

**Tabela 9**

Método de Análise	Características	Especificações	Passagem
Análise de cariótipo	Anormalidades cromossômicas	Não-detectável	<b>P3, P15</b>
<b>PCR</b>	Teste de Micoplasma	Não-detectável	<b>P3, P5, P15</b>
Teste Morfológico	Morfologia	Fibroblasto normal : como morfologia sob inspeção de microscópio invertido	<b>P3, P15</b>
<b>XTT</b>	Taxa de Proliferação Celular	-----	<b>P3, P15</b>
<b>CFU</b>	Ensaio Clonogênico	Nº de colônias_____	<b>P3, P15</b>
Análise de FACS	Análise do Fenótipo	Positivo para CD73, CD105, CD44, SOX2 Negativo para CD45, HLA-ABC	<b>P3, P15</b>

[0541] Os testes de controle de qualidade selecionados foram realizados em P3 e P15. Uma análise de certificado foi realizada e é fornecida abaixo, na **Tabela 10**. A análise de certificado é um produto de hIDPSC de acordo com um aspecto desta divulgação para a administração intratecal. O número do lote para esta análise específica foi #001H1-30/P1-5/F.

**Tabela 10.**

<b>Método de análise</b>	<b>Características</b>	<b>Especificação</b>	<b>Resultado</b>
Teste morfológico	Morfologia	Fibroblasto normal como morfologia sob a inspeção do microscópio invertido	<i>confirma</i>
Viabilidade celular via exclusão por Azul de Tripano	Viabilidade	>95%	<i>confirma</i>
Teste de Micoplasma por PCR	Detecção de Micoplasma	Não detectável	<i>confirma</i>
CFU	Ensaio de unidades formadoras de células	> 5 colônias	<i>confirma</i>
LAL	Detecção de endotoxina	≤ 2 Eu/kg de peso corporal/dose	<i>confirma</i>
Atividade bacteriostática e Fungistática	Esterilidade	Não detectável	<i>confirma</i>
Técnica de coloração de Gram	Contaminação microbiana	Não detectável	<i>confirma</i>
MTT/ ou XTT	Taxa de proliferação celular	Pelo menos a duplicação do número de células em 24 horas	<i>confirma</i>
Análise de FACS	Análise do fenótipo	Positivo para CD73, CD105, CD44, SOX2 Negativo para CD45, HLA-ABC	<i>confirma</i>
Ensaio de liberação de citocinas e fatores de crescimento	Análise de fatores neuronais e citocinas	Positivos para NGF, BDNF, IL8	<i>confirma</i>
Análise de FACS	Marcadores neuronais	Positivos para SOX2, e/ou Nestin	<i>confirma</i>

[0542] Vários métodos relacionados também são contemplados como parte desta divulgação. Os métodos podem incluir, mas não estão limitados a:

[0543] **Isolamento da Polpa Dentária.** No que diz respeito à preparação dos dentes antes da amostragem, há métodos diferentes. Células-tronco isoladas da polpa dentária humana derivam de células mesenquimais produzidas pela crista neural. Para isolar as células-tronco da polpa dentária humana é necessário que os dentes estejam saudáveis e sem qualquer comunicação entre a cavidade oral e da polpa.

[0544] **Cultura de células.** Dependendo do tipo de sistema de cultura usado para a indução de diferenciação, a natureza da população resultante pode ser a priori determinada. O sistema de cultura comum para uso compreende uma matriz de cultura compreendendo uma matriz extracelular (ECM). Em conformidade com uma modalidade, a ECM é selecionada a partir de, sem se limitar às mesmas, fibronectina, laminina e gelatina. O sistema de cultura pode ser ainda mais suplementado por um agente antibacteriano. O agente antibacteriano pode ser selecionado a partir de, sem se limitar aos mesmos, penicilina e estreptomicina, preferencialmente gentamicina (a fim de reduzir o risco de transplante para população alérgica à penicilina em traços).

[0545] O sistema de cultura pode ser ainda mais suplementado por fatores de crescimento, também, como descrito por Stern et al. na Patente US Nº 8.481.308 usando o fator de crescimento de liberação sustentada para manter as células no estágio não diferenciado homogêneo.

[0546] Outro sistema de cultura alternativo que foi desenvolvido e amplamente usado é um sistema livre de soro que inclui o meio de nocaute (KO) suplementado com substituição de soro de nocaute (KOSR) e fatores de crescimento tal como FGF2. A substituição de soro de nocaute (KOSR) (Gibco) é um suplemento do meio de cultura livre de soro, quimicamente definido usado como um substituto para o soro de origem animal em

sistemas baseados em KO-DMEM cultura para a propagação de células-tronco que pode substituir a suplementação com soro bovino fetal (FBS). Outra cultura opcional que compreende meio Neurobasal™ é um meio basal especialmente formulado para o crescimento de células neuronais, e suplementado com substituição de soro FBS, ou B27, ou N2 e ácido retinoico (RA).

[0547] A linhagem celular não diferenciada ou diferenciada é preservada pelos métodos de preservação, tal como a criopreservação.

[0548] De acordo com alguns aspectos, as divulgações contempladas fornecem uma hIDPSC não diferenciada, em que a célula é imunorreativa com marcadores de células-tronco pluripotentes humanas incluindo Oct3/4, Nanog e SOX2, e em que a referida célula pode diferenciar sob condições diferenciadas às células neurais. Preferencialmente, as células expressam o fator de transcrição SOX1; SOX2 e tubulina, como demonstrado por RT-PCR. As referidas células mantêm um cariótipo diploide estável durante o cultivo prolongado *in vitro*. Os fatores de transcrição Sox e Oct3/4 são considerados ser centrais à hierarquia regulatória transcricional que especifica a identidade de célula de ES. hIDPSC anteriormente mostraram expressar Oct 4 (Inserir ref. 2006; e Liezer et al. 2012) aproximadamente em cerca de 20% de IDPSC ao longo da cultura celular até LP. Portanto, a coexistência de marcadores da família de OCT e da família SOX, indica alta certificação (*stemness*) e pluripotência de hIDPSC. No entanto, o enriquecimento com marcadores SOX e beta-tubulina indicam forte afinidade para destino neuronal.

[0549] Além disso, divulga-se neste documento uma preparação de hIDPSCs não diferenciadas usando o método de colheita de LP onde o enriquecimento com marcadores moleculares SOX1, SOX2, BrdU, beta-3-tubulina em LP indica a capacidade desta LP de proliferação *in vitro* e diferenciação (*in vivo* ou *ex vivo*) em células progenitoras neurais, células neuronais e/ou células gliais e células ganglionares. Preferencialmente, as

células hIDPSCs não diferenciadas têm o potencial de se diferenciar em células progenitoras neurais, células neuronais e/ou células gliais quando submetidas às condições diferenciadas ou microambiente *in vivo*.

[0550] **Métodos de Tratamento.** A natureza alogênica de aspectos desta divulgação substancialmente atenua as preocupações de imunotoxicidade, como hIDPSCs são normalmente de tipagem não-HLA. Um método compreendendo fornecer uma composição de hIDPSCs para transplante a um paciente é contemplado. Tais hIDPSCs são derivados de um sistema de cultura a LT compreendendo hIDPSCs não diferenciadas em conformidade com a divulgação, seguida por incubação das SCs não diferenciadas em um sistema de cultura que suporta a diferenciação direcionada de SCs em células somáticas selecionadas, preferencialmente mantendo forte comprometimento neuroectodérmico.

[0551] Em uma modalidade, a população selecionada de células somáticas consiste essencialmente em células precursoras neurais. Em conformidade com outra modalidade a população selecionada de células somáticas consiste essencialmente em células neuronais dopaminérgicas. Sistemas de cultura que suportam diferenciação direcionada de SCs em um tipo especificamente desejável de células somáticas, tais como células precursoras neurais ou células neuronais dopaminérgicas, são bem conhecidos na técnica.

[0552] É fornecida uma linhagem de células não diferenciadas capaz de diferenciação em células progenitoras neurais, células neuronais e células gliais e preferencialmente produzidas por um método da presente invenção. É fornecida uma linhagem de células progenitoras comprometidas diferenciadas que pode ser cultivada por períodos prolongados e dá origem a grandes quantidades de células progenitoras. É fornecida uma linhagem de células progenitoras comprometidas diferenciadas capaz de diferenciação em neurônios maduros e/ou células gliais. É fornecida uma célula progenitora neural comprometida capaz de

dar origem a células neuronais e células gliais maduras. É fornecida uma linhagem de células progenitoras comprometidas diferenciadas capaz de estabelecer um enxerto em um cérebro destinatário, a participar da histogênese do sistema nervoso e a constituir as linhagens neuronais, do astrócito e oligodendrócito *in vivo*.

[0553] Além disso, é fornecida uma hDPSC não diferenciada, neuroblastos de célula progenitora neural derivada de hDPSC, uma célula neuronal e uma célula glial que pode ser usada na composição farmacêutica para terapia celular e terapia gênica através do transplante de células de forma sistêmica, intratecal, intranasal ou local. A ação neuroprotetora terapêutica divulgada/antecipada pode ser ativada apesar de anti-inflamatório protetivo e/ou liberação de fatores de crescimento do nervo, e/ou expressão e/ou reparação de neurogênese, e/ou para melhorar os resultados funcionais, tais como resultados motores e/ou cognitivos.

[0554] Tais métodos neuroprotetores oferecem o tratamento de doenças CNS e/ou PNS diretamente reabastecendo, substituindo, e/ou suplementando células neurais disfuncionais ou danificadas (isto é, os neurônios/gliais/oligodendrócitos), e/ou aumentando o crescimento e/ou sobrevivência de células neurais existentes, e/ou retardando ou revertendo a perda de tais células em condições neurodegenerativas.

[0555] Além disso, são divulgadas neste documento composições compreendendo hDPSCs e métodos para a profilaxia e o tratamento de doenças, condições e lesões dos sistemas nervosos central (CNS) e periférico (PNS). Exemplos adicionais não limitantes de doenças e condições tratáveis pelo transplante de hDPSC divulgado são as doenças neurodegenerativas e doença neural, tais como doenças neurodegenerativas (por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, distúrbios de Parkinson, doença de Huntington (Huntington's Chorea), doença de Lou Gehrig, esclerose múltipla, doença de Pick, síndrome de demência do Parkinsonismo), gliose subcortical progressiva, paralisia

supranuclear progressiva, síndrome de degeneração tálmica, afasia hereditária, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Shy-Drager e doença de corpo de Lewy; condições vasculares (por exemplo, infartos, hemorragia, doenças cardíacas); misturado vascular e Alzheimer; meningite bacteriana; Doença de Creutzfeld-Jacob; e doença de Cushing.

[0556] Além disso, contempla-se neste documento o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, denominadas lesão cerebral aguda. Estes incluem, mas não estão limitados a: acidente vascular cerebral, traumatismo craniano, e asfixia. Derrame se refere a uma doença vascular cerebral e também pode ser referido como um acidente vascular cerebral e inclui derrame tromboembólico agudo. O derrame inclui isquemia focal e global. Outros incidentes são traumatismo craniano, trauma da medula espinhal, ou lesão de anóxia geral, hipóxia, hipoglicemia, hipotensão, bem como lesões similares vistas durante os procedimentos de embolia, hiperfusão, e hipóxia.

[0557] As células hIDPSCs são normalmente formuladas em uma forma injetável de dosagem unitária, tal como uma solução, suspensão, ou emulsão. Formas de dosagem/formulações farmacêuticas da suspensão aquosa de células/meio normalmente envolverão ajustar a força iônica da suspensão para isotonicidade de cerca de 0,1 a 0,2 e para pH fisiológico de cerca de pH 6,8 a 7,5. A referida formulação também normalmente conterá um lubrificante fluido.

[0558] Formulações farmacêuticas adequadas para injeção de células, e/ou meio condicionado normalmente são soluções e dispersões aquosas estéreis. Carreadores para formulações injetáveis podem ser um solvente ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, ou outro veículo adequado, e suas misturas adequadas.

[0559] A pessoa versada na técnica farmacêutica pode determinar a quantidade de células e carreador opcional e aditivos nas composições a

serem administradas nos métodos da invenção. Normalmente, quaisquer aditivos/excipientes ou compostos ativos para as células hIDPSCs estão presentes em uma quantidade de 0,001 a 50% em peso em solução salina tamponada com fosfato.

[0560] As referidas composições podem ser administradas em dosagens e por técnicas conhecidas por aqueles versados nas técnicas médicas e farmacêuticas. Doses para seres humanos/mamíferos podem ser determinadas sem experimentação indevida pelo médico versado na técnica, a partir desta divulgação, dos documentos citados neste documento, e do conhecimento na técnica.

[0561] Uma pessoa versada na técnica será capaz de determinar a situação apropriada em que os sujeitos são suscetíveis a ou em risco de, por exemplo, derrame, bem como sofrendo de derrame para administração de hIDPSC por via sistêmica, intratecal ou local, conforme descrito na presente invenção.

[0562] Os aspectos também se referem ao uso terapêutico da terapia combinada onde a administração de hIDPSC é combinada com agentes de compostos químicos ou bioativos e/ou farmacêuticos terapêuticos para distúrbios neurodegenerativos.

[0563] As composições e métodos contemplados podem ser usados para moderar, e/ou aliviar, e/ou melhorar a condição médica no paciente diagnosticado com uma doença neurodegenerativa, conforme descrito acima. Em modalidades adicionais, métodos de uso de neuroblastos de precursores neuronais de hIDPSC com fingerprint de biomarcadores exclusivos são contemplados, surpreendentemente expressando C271 e P57. Estas células crescidas em cultura são de grande interesse para a descoberta de medicamentos e drogas para neurodegeneração.

[0564] Além disso, divulga-se neste documento pela primeira vez uma característica Parácrina exclusiva de hIDPSCs, tais como (i) propriedades imunomodulatórias, (ii) propriedades anti-inflamatórias e, ainda, (iii)

propriedades antimicrobianas. Tais características abrem novos campos de utilização de IDPSCs. Por exemplo, o tratamento de múltiplas aplicações clínicas é contemplado: (i) como imunoproteção contra doenças imunossupressoras, por exemplo Enxerto vs Hospedeiro; AIDS; efeitos colaterais de quimioterapia de câncer; (ii) uso de hIDPSCs como terapia anti-inflamatória, por exemplo, contra a artrite, ou doença intestinal inflamatória-IBD; e/ou (iii) doenças infecciosas, tais como sepse e infecções nosocomiais resistentes, etc.

[0565] Além disso, são divulgados neste documento métodos de tratamento que podem ser usados como terapia única ou em adjunção ou em sinergia, com outras modalidades de tratamento, e/ou como uma terapia preventiva (por exemplo, em pacientes com alto risco de infecção hospitalar ou AIDS).

[0566] Tendo estabelecido neste documento as várias modalidades da presente divulgação, prevê-se que modificações adequadas podem ser introduzidas que permanecerão, no entanto, no escopo das divulgações contempladas. A invenção, portanto, só deve ser interpretada em conformidade com as seguintes reivindicações abaixo.

#### *Referências*

Noble M, Mayer-Pröschel M, Davies JE, Davies SJ, Pröschel C. Cell therapies for the central nervous system: how do we identify the best candidates? *Curr Opin Neurol*. 2011 Dec;24(6):570-6.

Kempermann G. The pessimist's and optimist's views of adult neurogenesis. *Cell*. 2011 Jun 24;145(7):1009-11.

Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol*. 2009 Sep;220(3):562-8.

Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R. A role for SOX1 in neural determination. *Development*. 1998 May;125(10):1967-78.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new

neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003 Jan;130(2):391-9.

Molero AE, Gokhan S, Gonzalez S, Feig JL, Alexandre LC, Mehler MF. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Dec 22;106(51):21900-5.

Kandasamy M, Couillard-Despres S, Raber KA, Stephan M, Lehner B, Winner B, Kohl Z, Rivera FJ, Nguyen HP, Riess O, Bogdahn U, Winkler J, von Hörsten S, Aigner L. Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Jul;69(7):717-28.

Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, Gnedeva K, Cattarossi G, Miller A, Pluchino S, Brill LM, Bronner-Fraser M, Terskikh AV. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell*. 2011 May 6;8(5):538-51.

Zappone, M. V. *et al.* Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* 127, 2367–2382 (2000).

Komitova M, Eriksson PS. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci. Lett*. 2004;369(1):24.

Gronthos et al., "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97:25 (2000), 13625-30.

Handa et al., "Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo", *Connective Tissue Research*, 43:2/3 (2002), 406-408.

Harada et al., "Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling", *Journal of Cell Biology*, 147:1 (1999), 105-20.

Krebsbach et al., "Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration", *Journal of Dental Education*, 66:6 (2002), 766-73.

Nakashima et al., Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11), *Gene Therapy*, 9:12 (2002), 814-18.

Shi et al., "Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis", *Bone* 29:6 (2001), 532-39.

Patente US N° 5.928.947.

Patente US N° 5.817.773.

WO 01/176507.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma população isolada de células-tronco de polpa dentária imaturas (IDPSCs) **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) extrair a polpa dentária (DP) de um dente isolado;

(b) colocar a DP em um recipiente estéril e lavar a DP com uma solução estéril com antibióticos;

(c) transferir mecanicamente a DP em outro recipiente com um meio de cultura, ou alterar o meio cultura no recipiente; e

(d) cultivar a DP até o desenvolvimento e aderência das IDPSCs ser observado para estabelecer uma cultura de explante sob condições hipóxicas, em que as condições hipóxicas compreendem cultivar as células em condições de cultura compreendendo ou equivalente a um máximo entre 0,5% e 15% de oxigênio (O<sub>2</sub>),

em que as etapas (c) e (d) são repetidas pelo menos 25 vezes para permitir o desenvolvimento e aderência das IDPSCs de múltiplos nichos dentro da DP;

(e) isolar as IDPSCs das culturas de explantes;

(f) cultivar as IDPSC isoladas; e

(g) passar uma célula aderente a partir da cultura isolada da etapa (f) para se obter uma população homogênea de IDPSCs, em que a célula aderente se auto renova, se diferencia em células de linhagem endodérmica, mesodérmica ou ectodérmica e expressa Sox-1, Sox-2 e beta-3-tubulina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a etapa (d) compreende cultivar a DP durante 2 dias, 3 dias, 4 dias ou 5 dias de cultura de explante antes de repetir a etapa (c).

3. Uso de uma população isolada de células-tronco de polpa dentária imaturas (IDPSCs) produzida pelo método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar uma doença neurodegenerativa, uma doença desmielinizante, uma lesão da medula espinhal ou para inibir a morte de células ganglionares da retina (RGC) ou degeneração do nervo óptico.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a doença desmielinizante é selecionada do grupo constituído por: esclerose múltipla; doenças desmielinizantes inflamatórias idiopáticas; deficiência de vitamina B12; mielinose de pontina central; Tabes Dorsalis; mielite transversa; doença de Devic; leucoencefalopatia multifocal progressiva; neurite óptica; leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica; neuropatia periférica Anti-MAG; Doença de Charcot-Marie-Tooth; e deficiência de cobre; e a doença neurodegenerativa é selecionada do grupo que consiste em: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doenças do príon, Creutzfeldt-Jakob, doença de Huntington, demência frontotemporal (doença de Pick) e esclerose lateral amiotrófica (ALS ou doença de Lou Gehrig) e uma doença autoimune que ataca a mielina.

5. Uso de uma população isolada de células-tronco de polpa dentária imaturas (IDPSCs) produzida pelo método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 **caracterizado** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar insuficiência renal, calvície, cabelos brancos, uma ferida na pele, uma característica cosmética da pele, espermatogênese reduzida, doença cardíaca ou câncer.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que

a ferida na pele é uma lesão por queimadura ou uma úlcera cutânea intratável resultante de diabetes, isquemia ou doenças do colágeno; a doença cardíaca é um infarto do miocárdio; e câncer é neuroblastoma ou retinoblastoma.

FIGURA 1

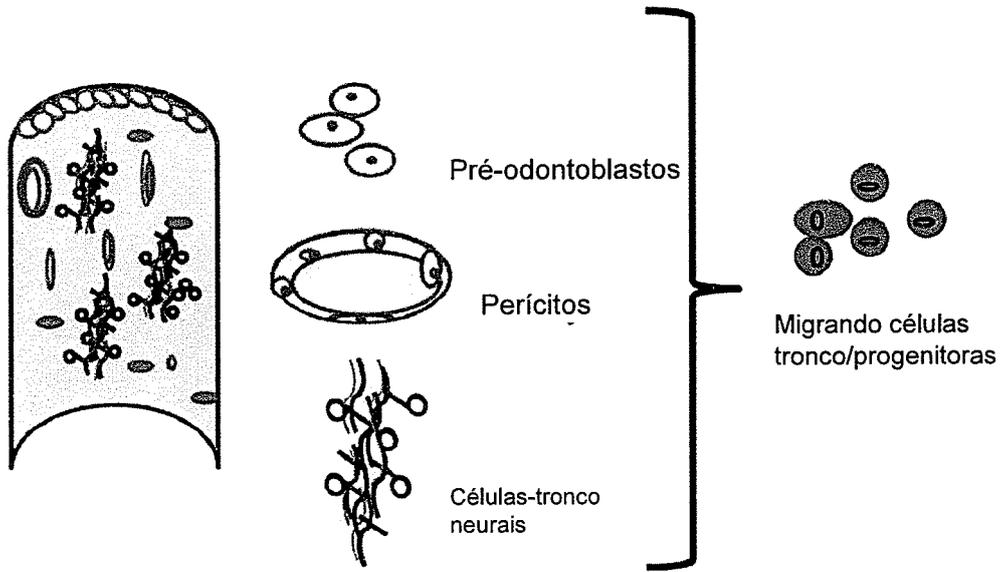


FIGURA 2

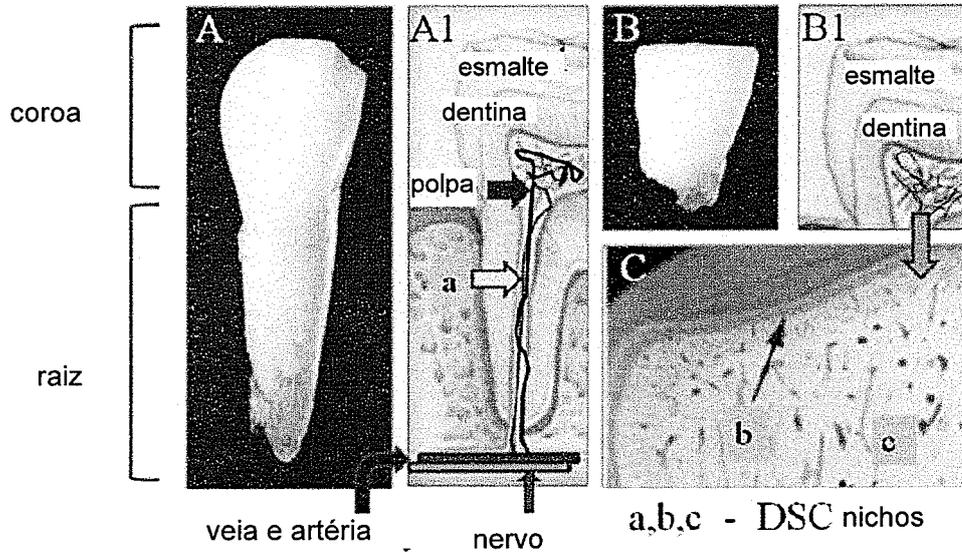


FIGURA 3

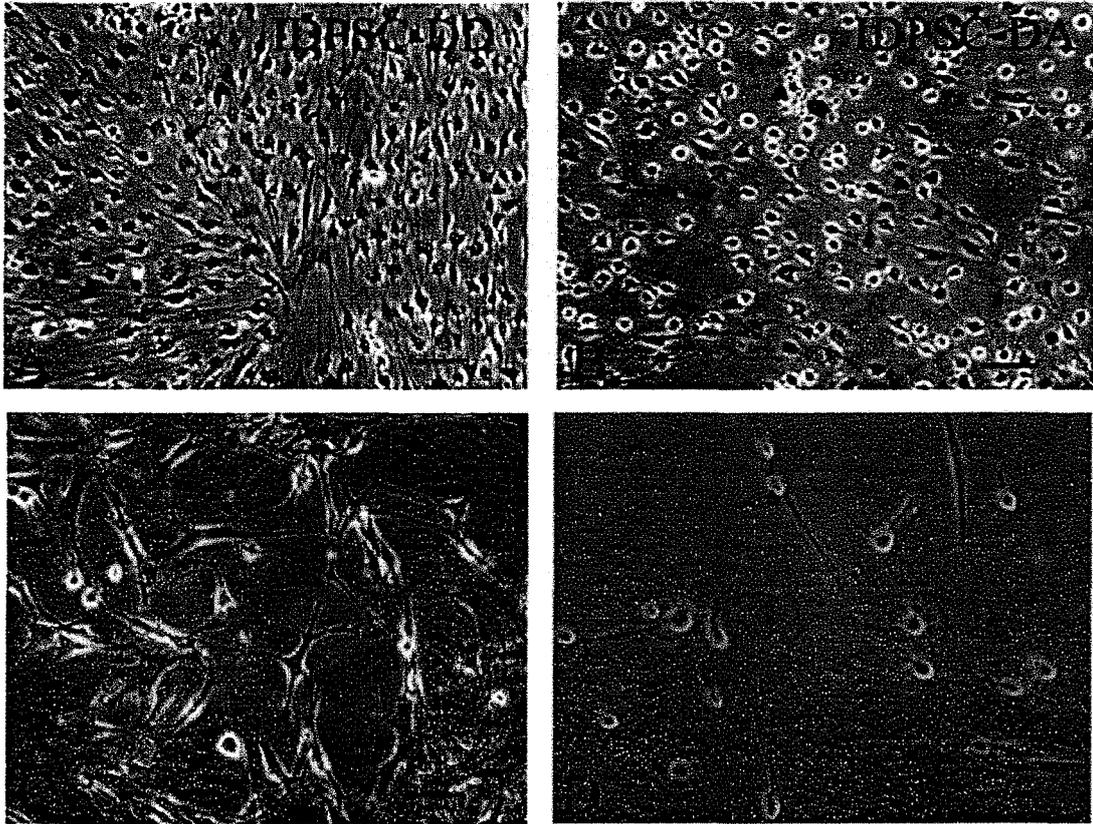


FIGURA 4

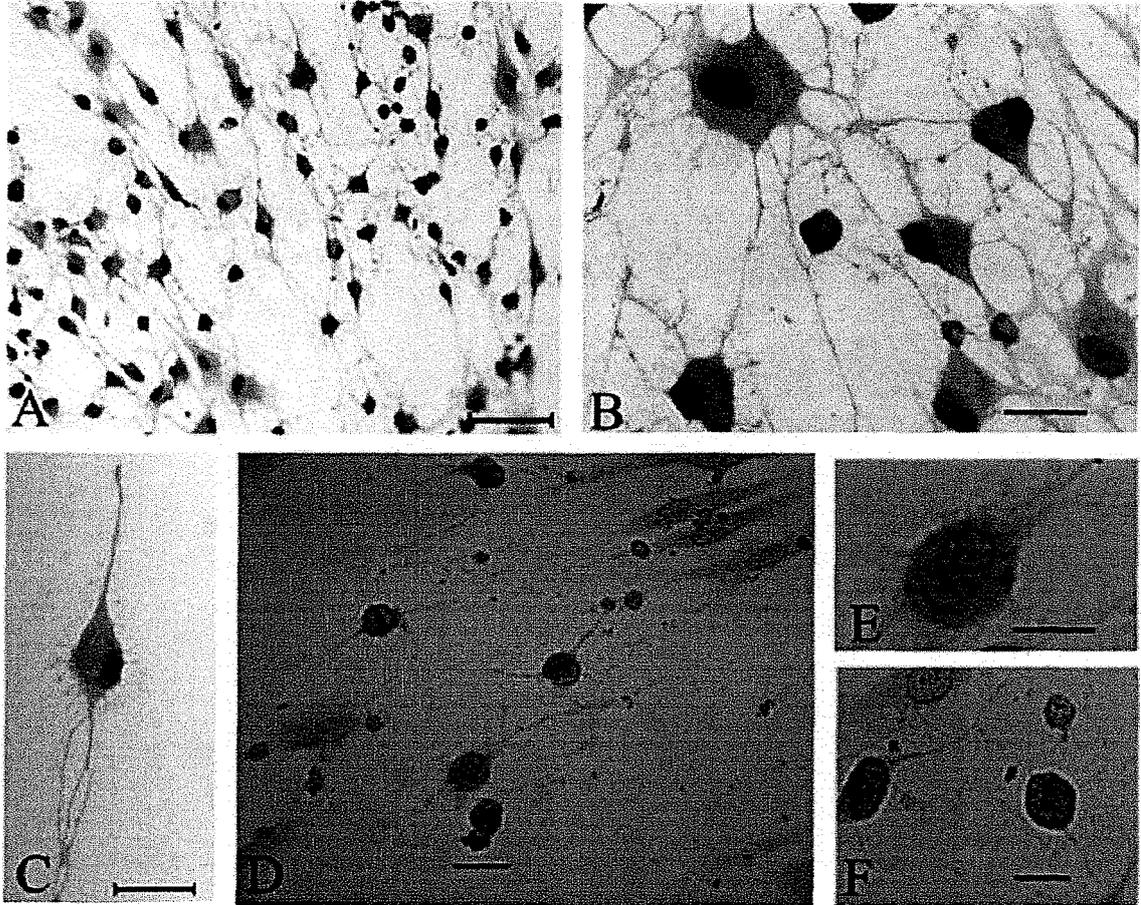


FIGURA 5

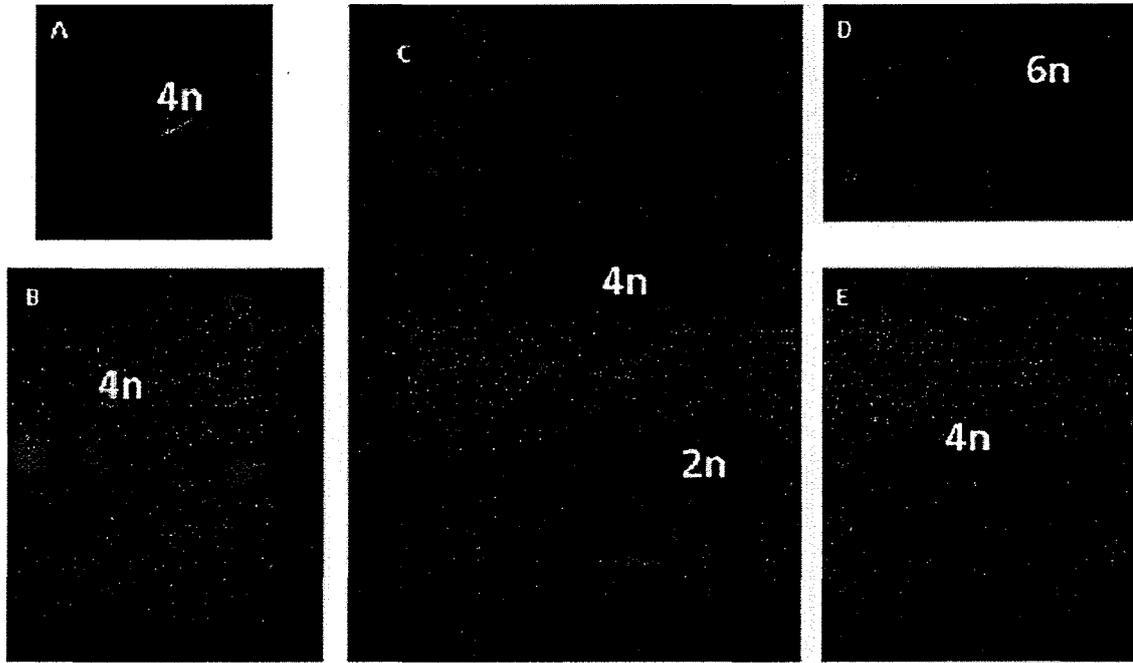


FIGURA 6

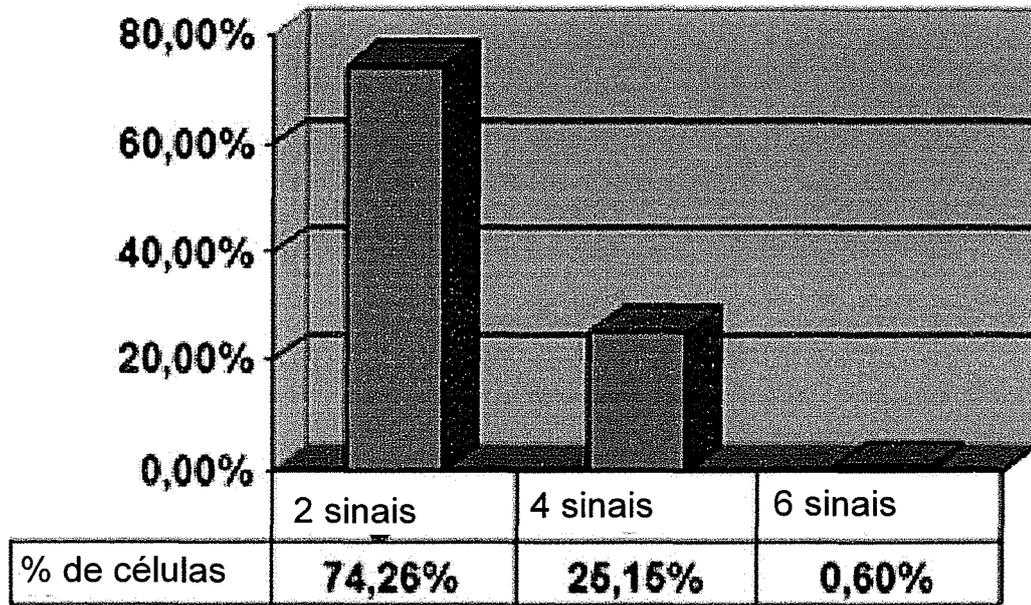


FIGURA 7

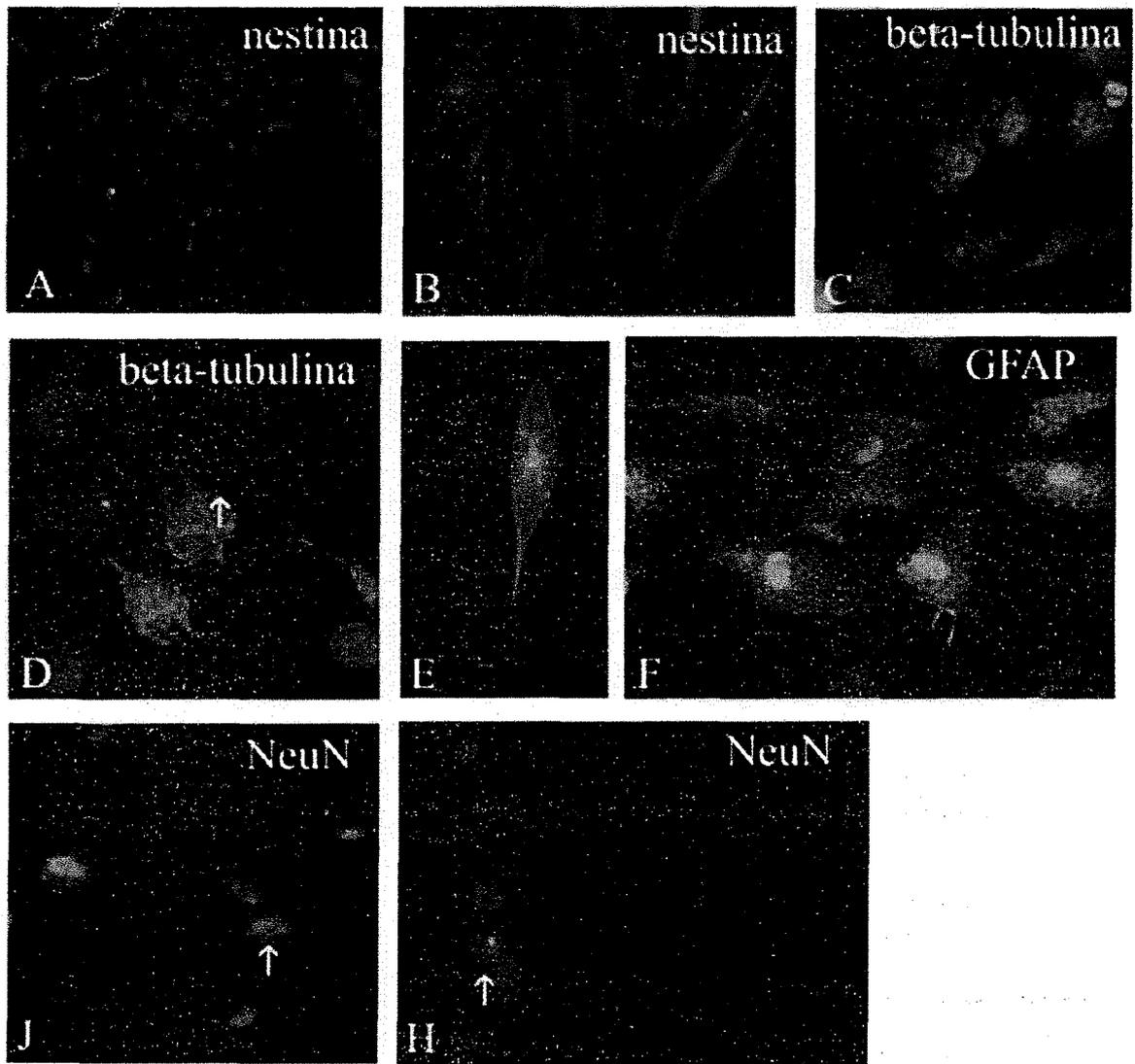


FIGURA 8

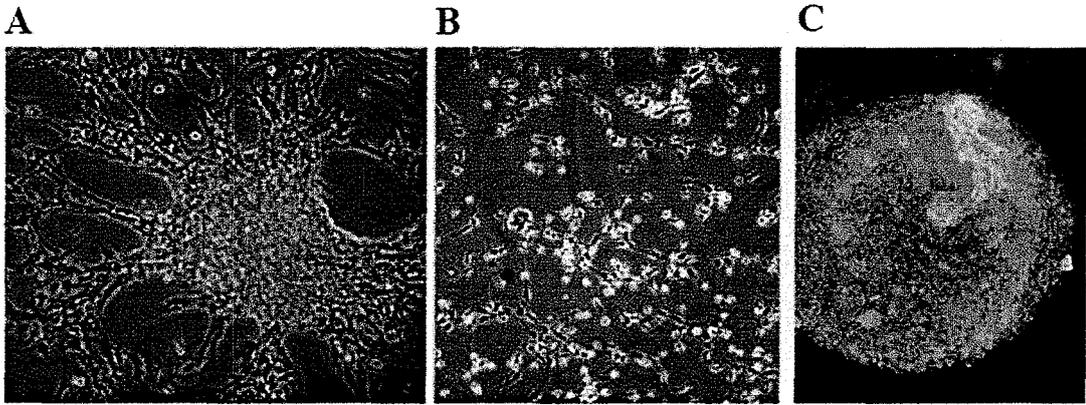


FIGURA 9

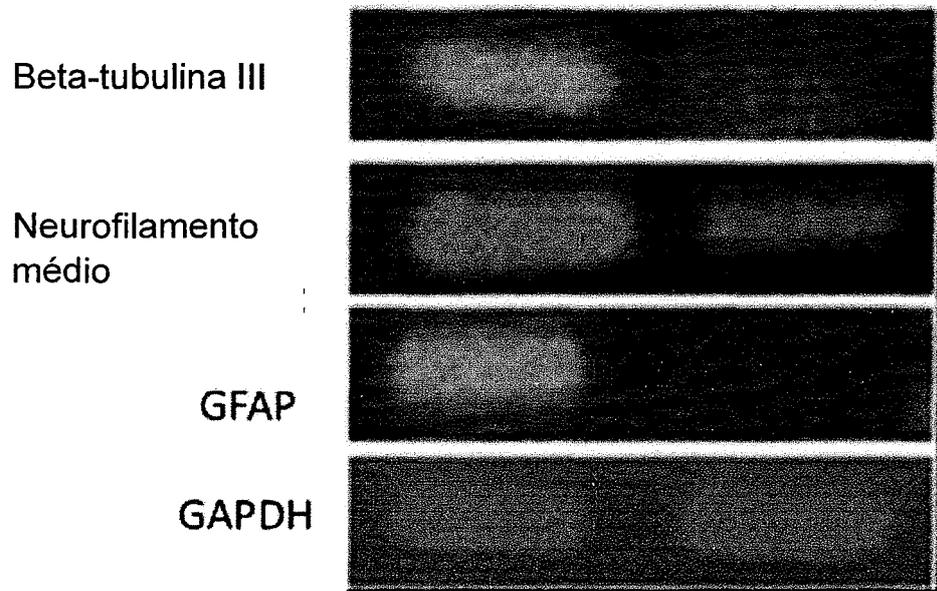


FIGURA 10

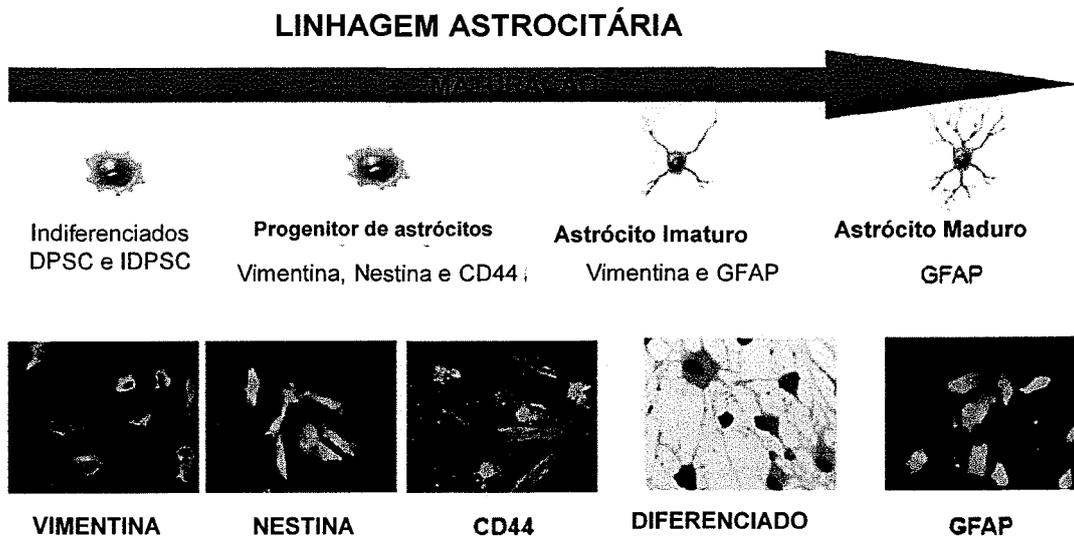


FIGURA 11

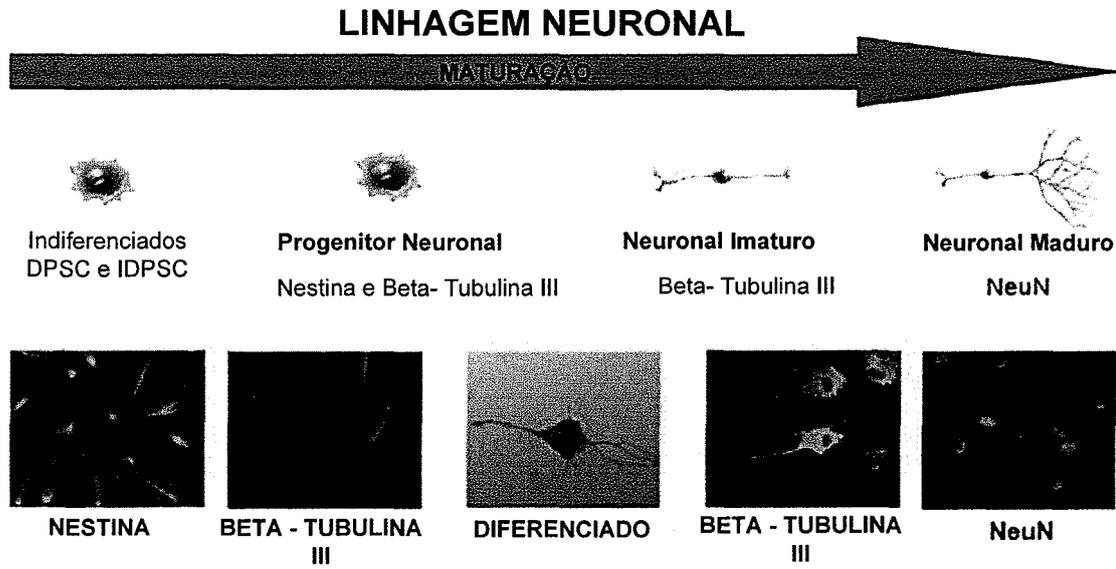


FIGURA 12

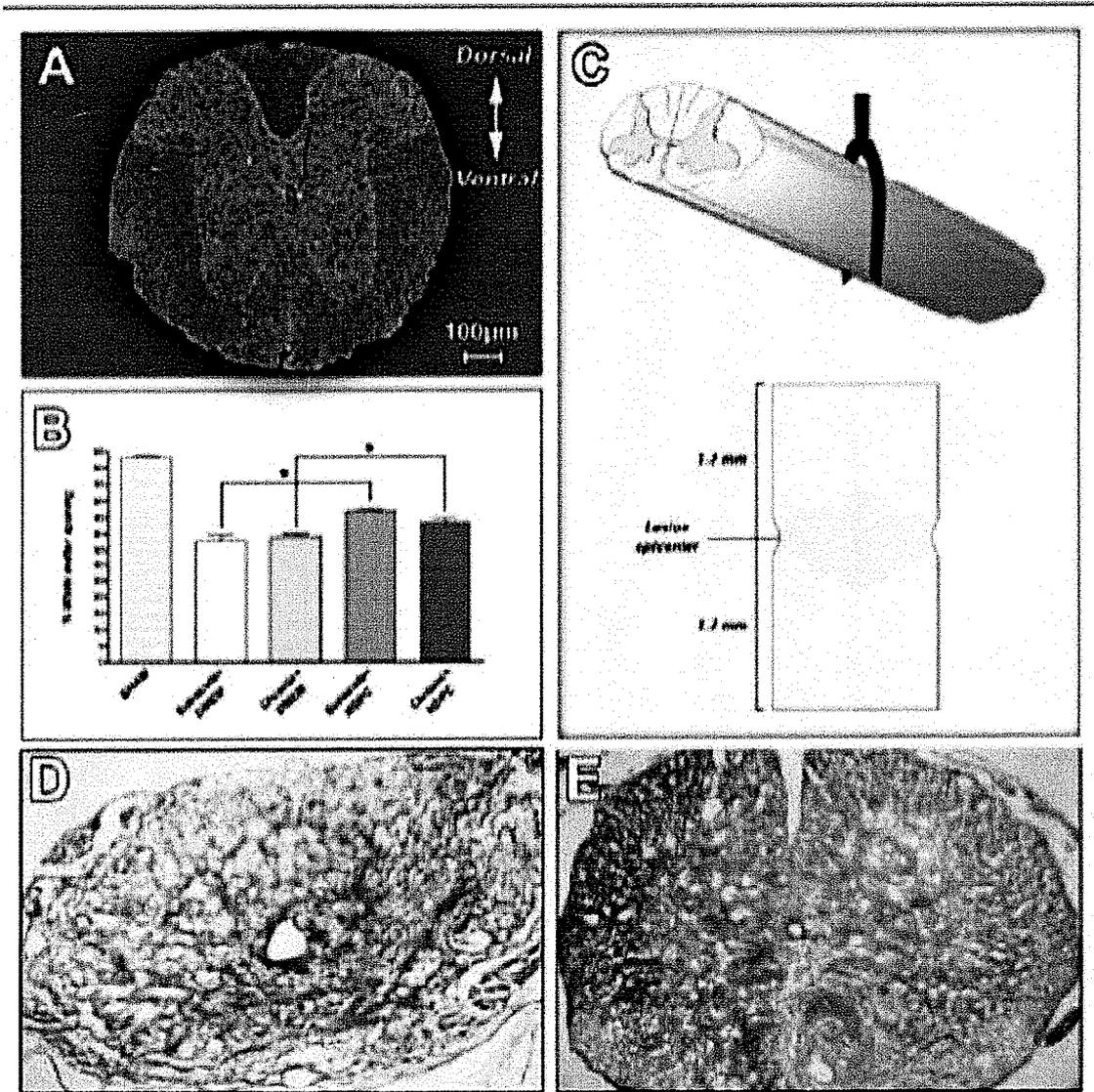


FIGURA 13

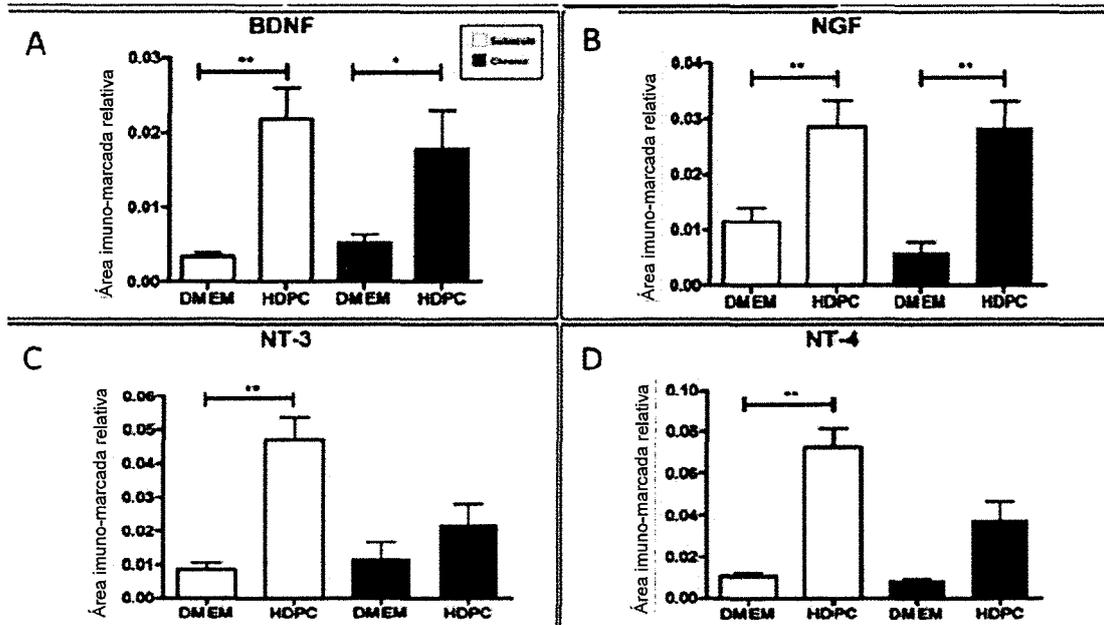


FIGURA 14

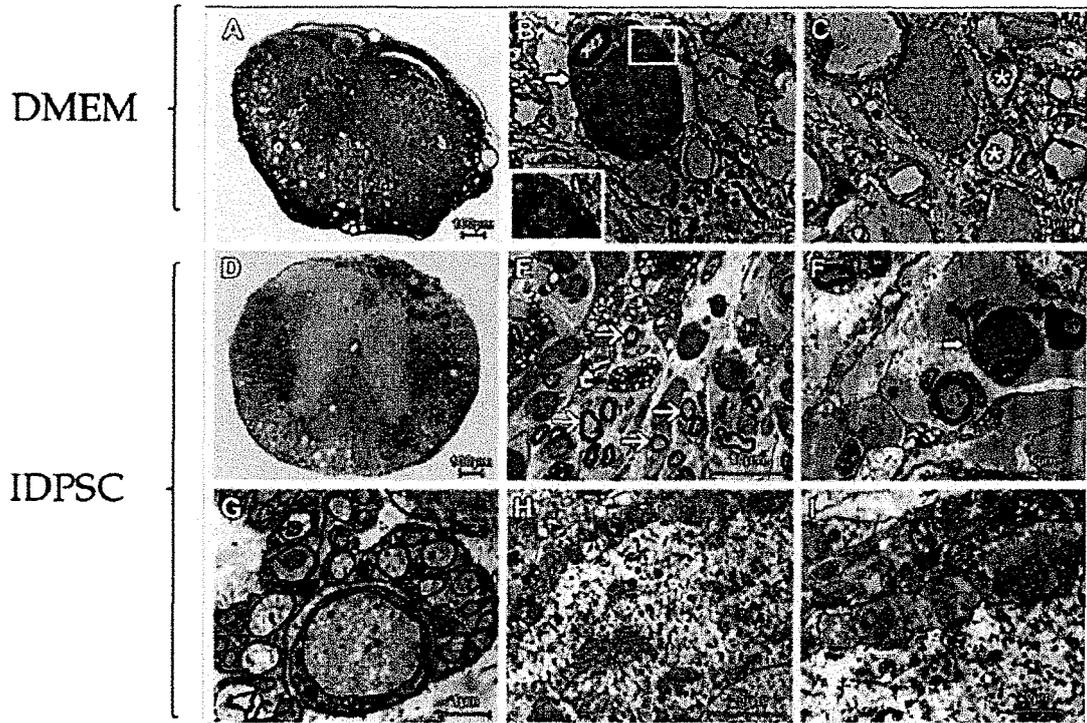


FIGURA 15

DMEM

IDPSC

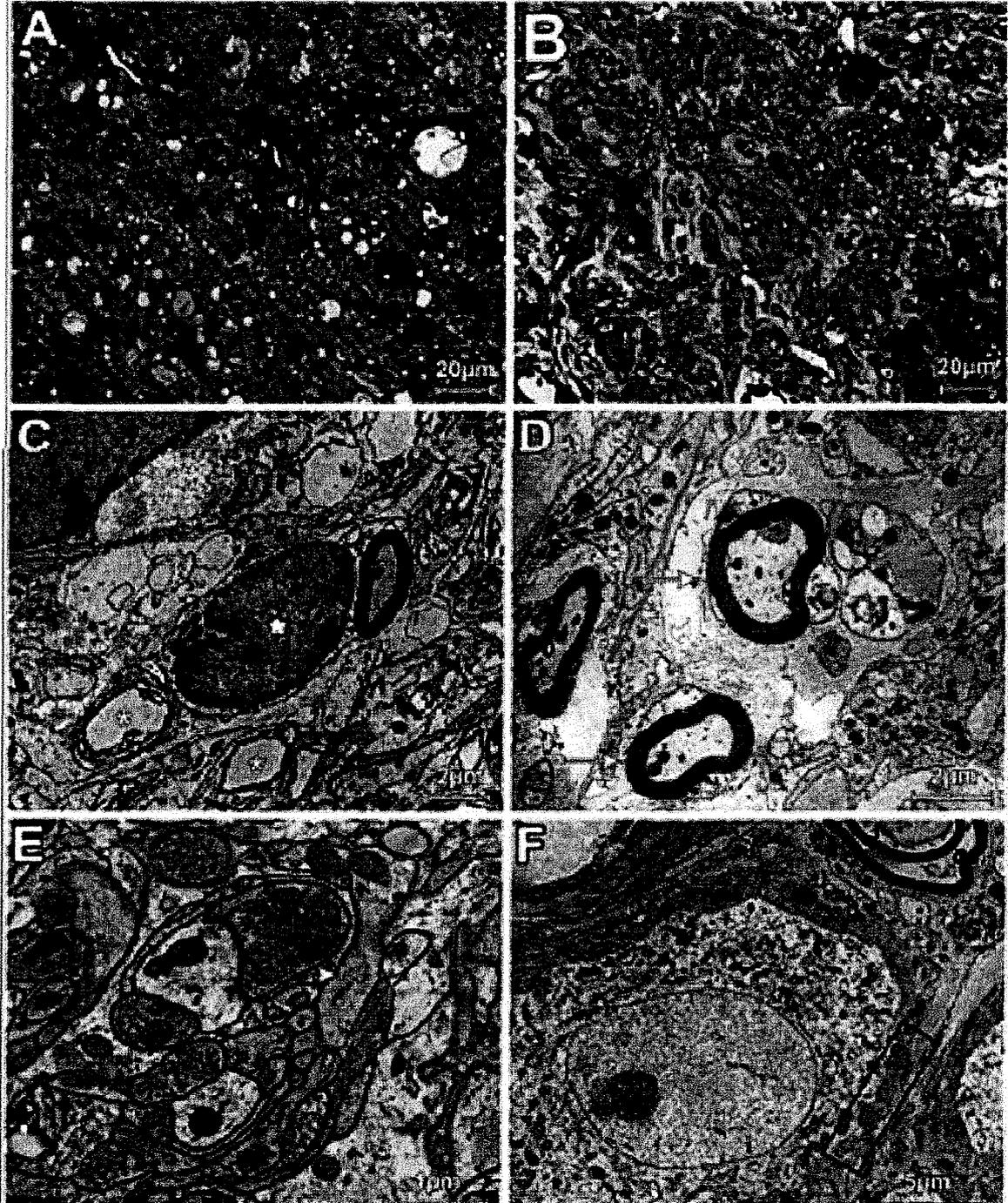


FIGURA 16

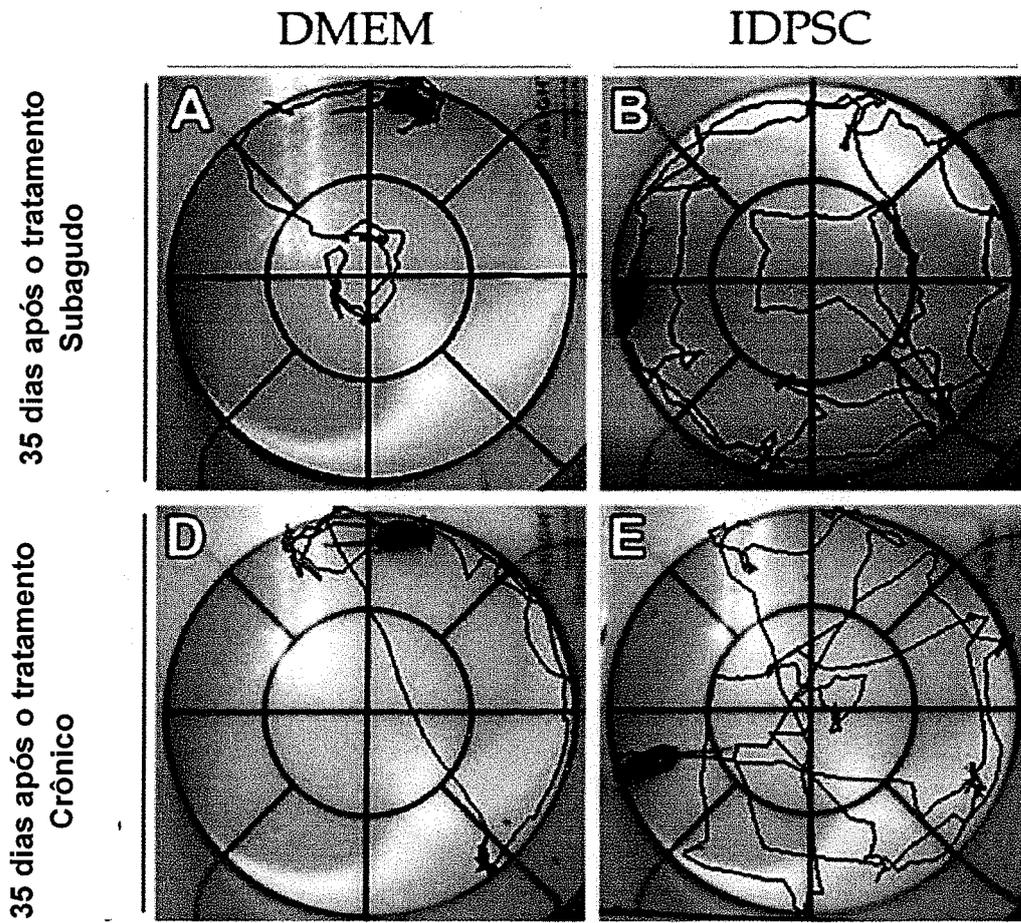


FIGURA 17



FIGURA 18



FIGURA 19

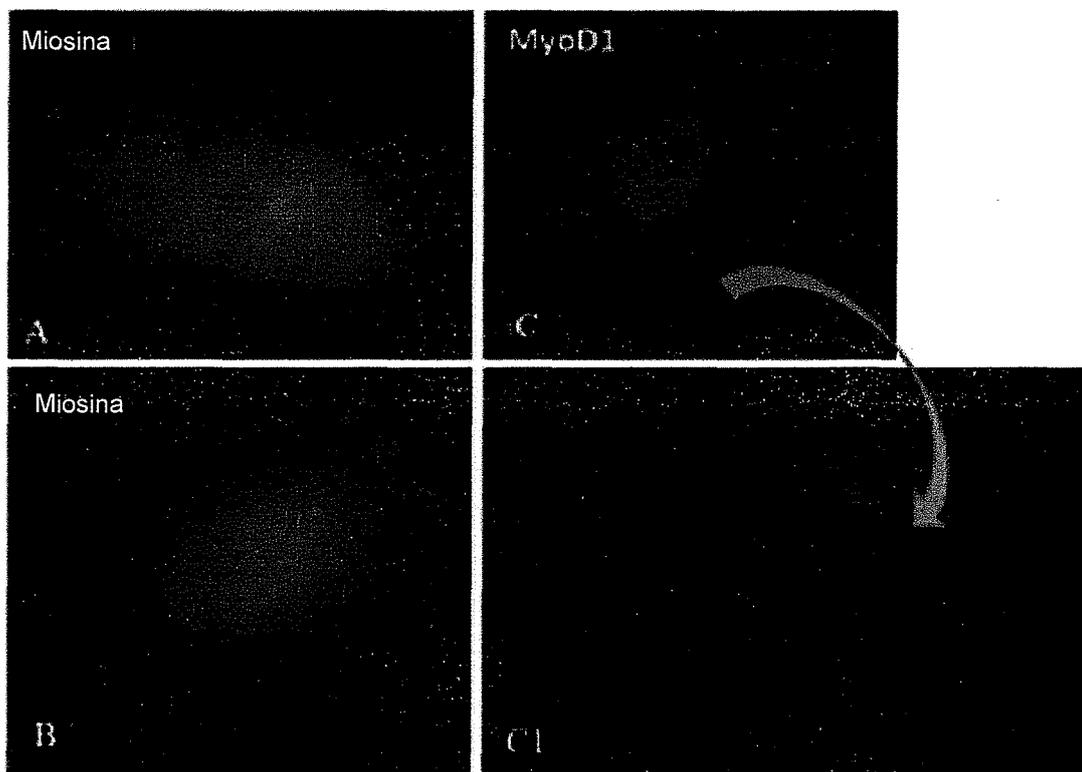


FIGURA 20

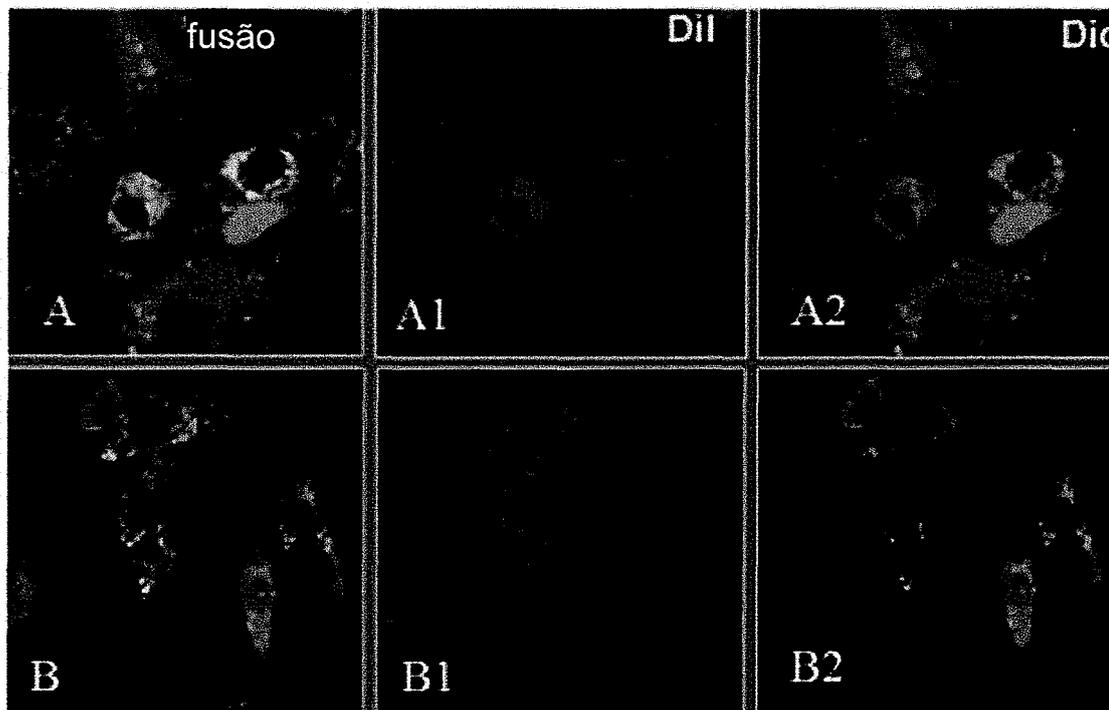


FIGURA 21

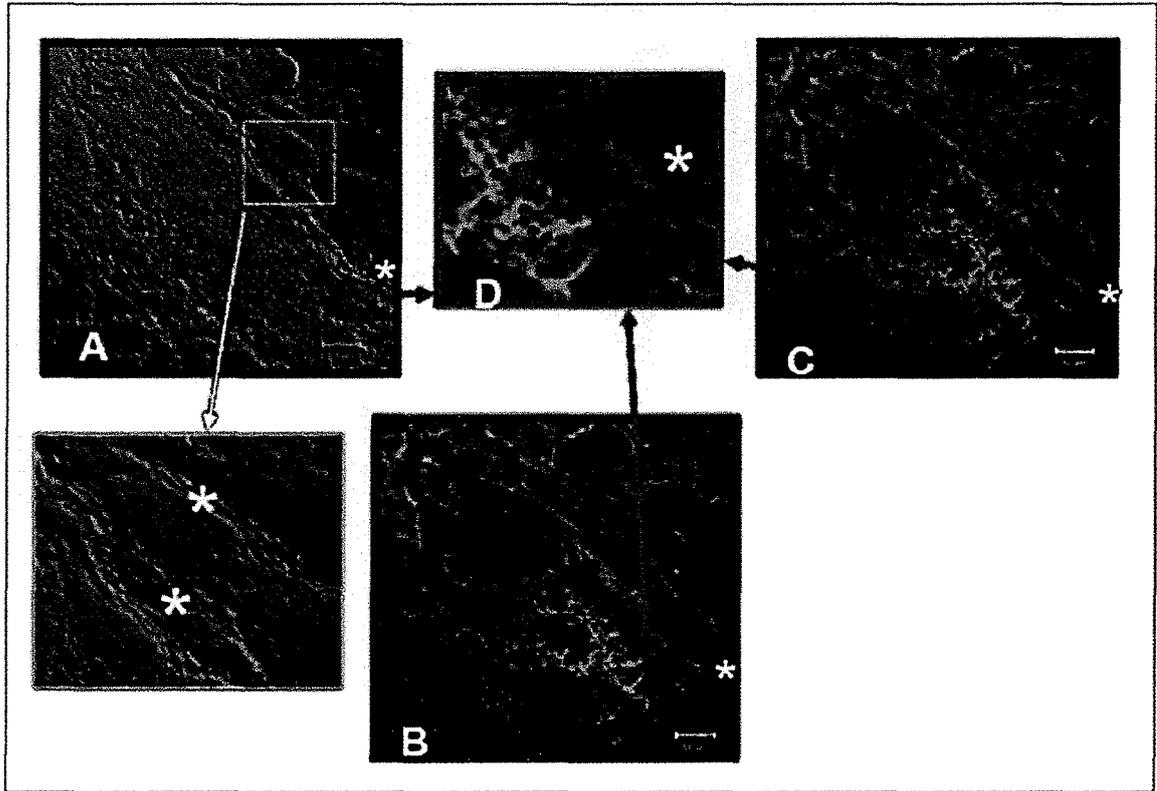


FIGURA 22

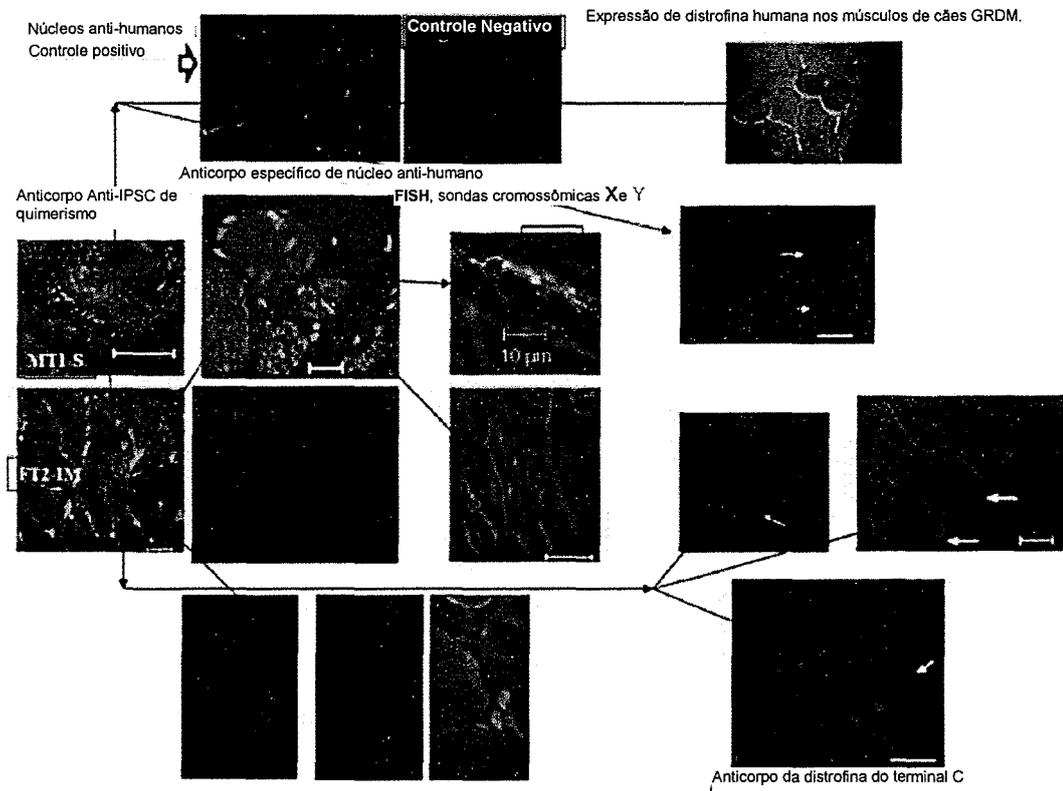
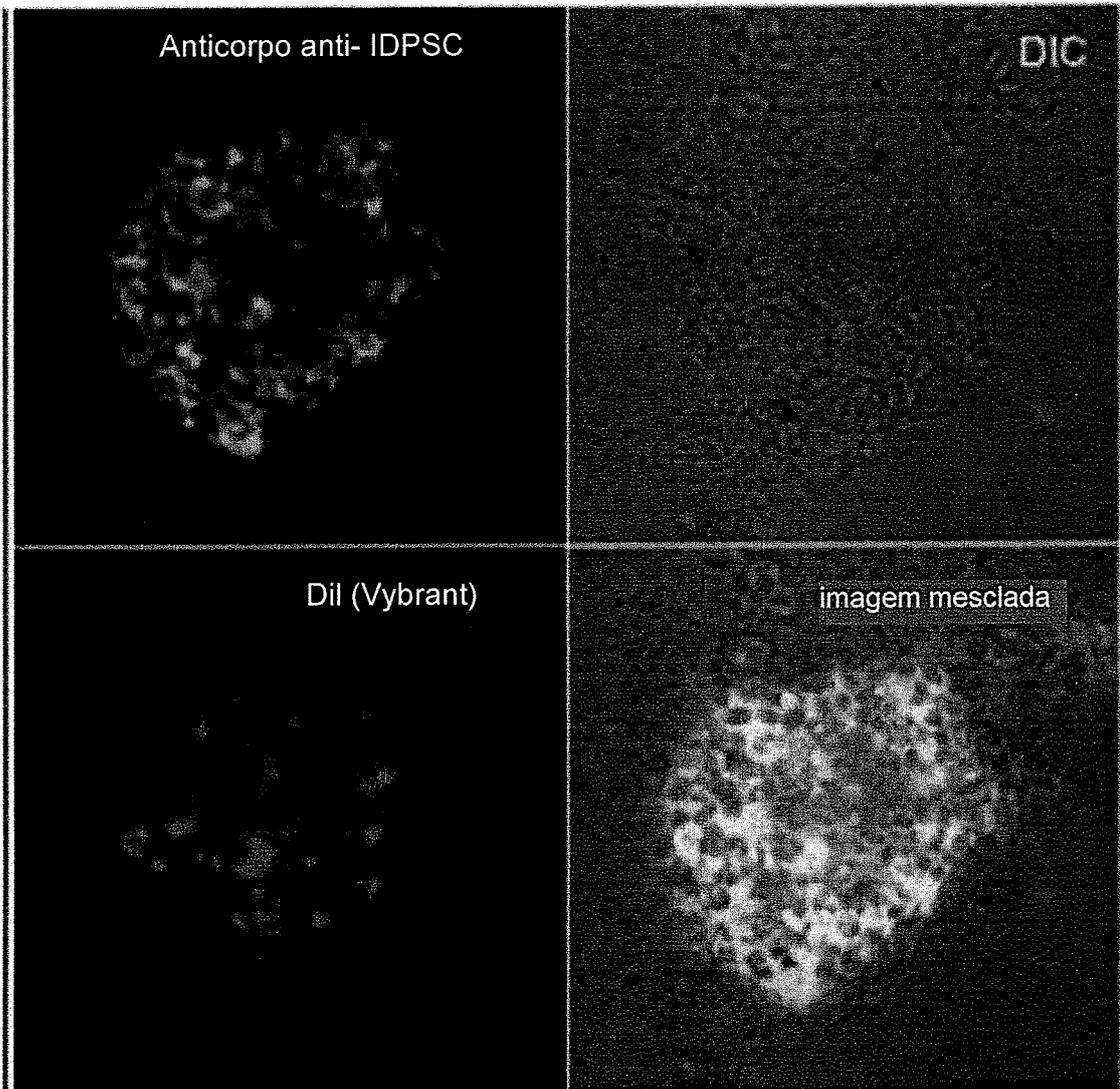


FIGURA 23



IDSPC de enxerto na medula óssea dos camundongos

FIGURA 24

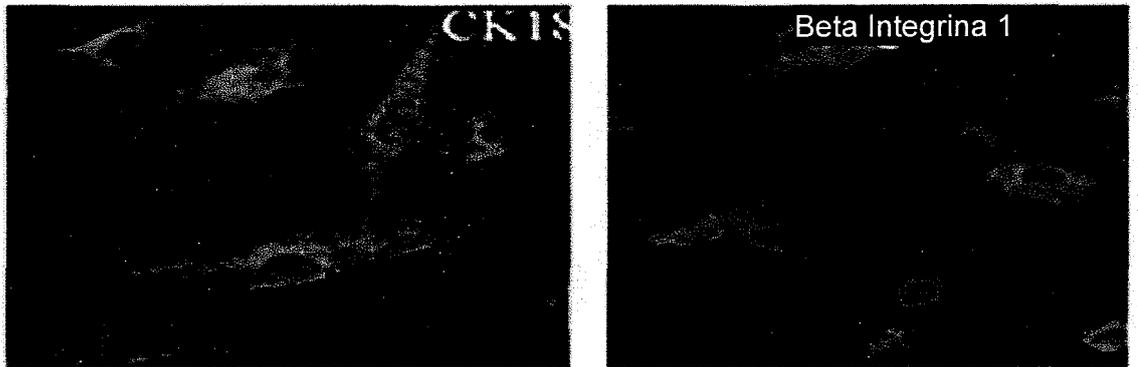


FIGURA 25

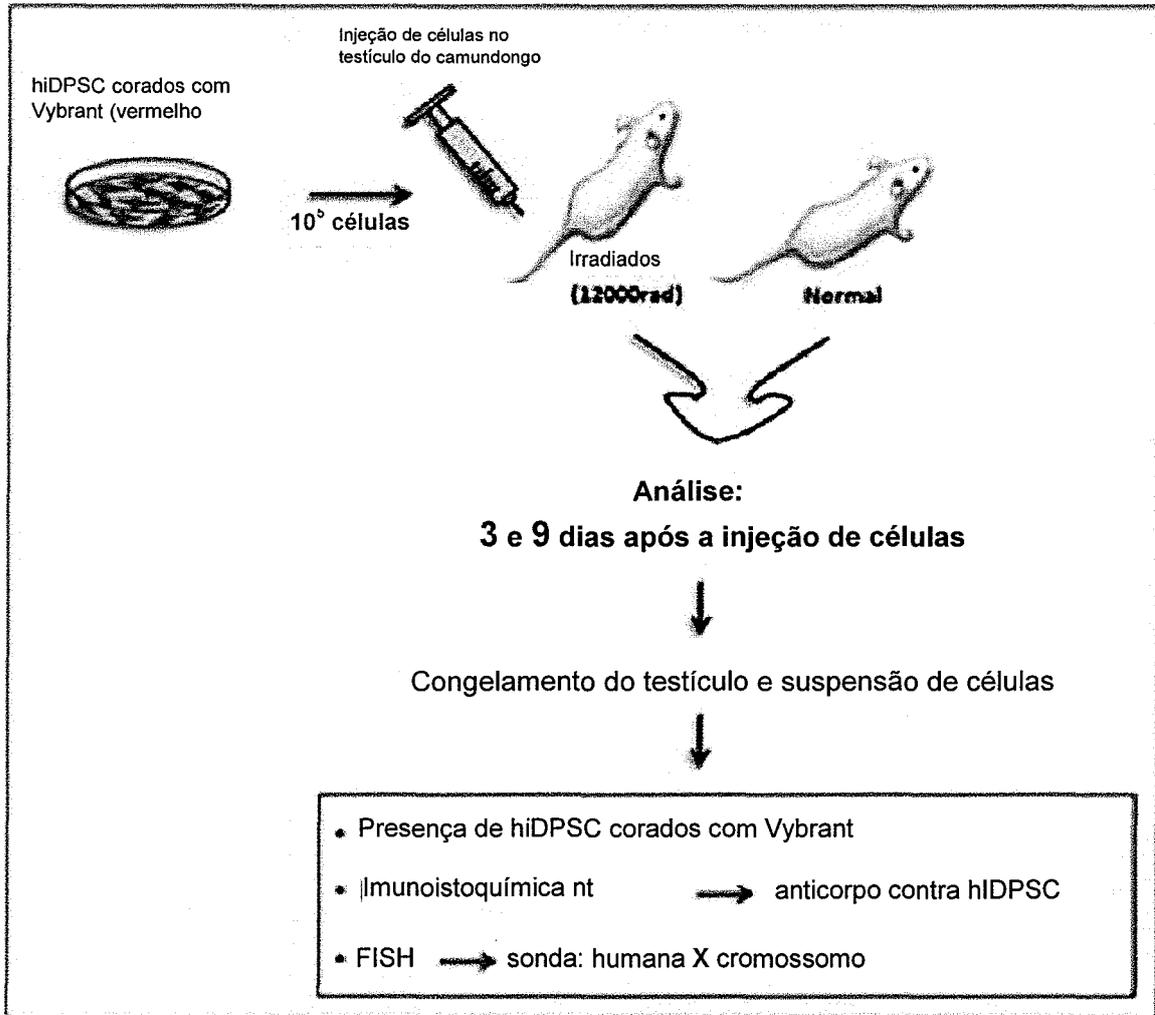


FIGURA 26

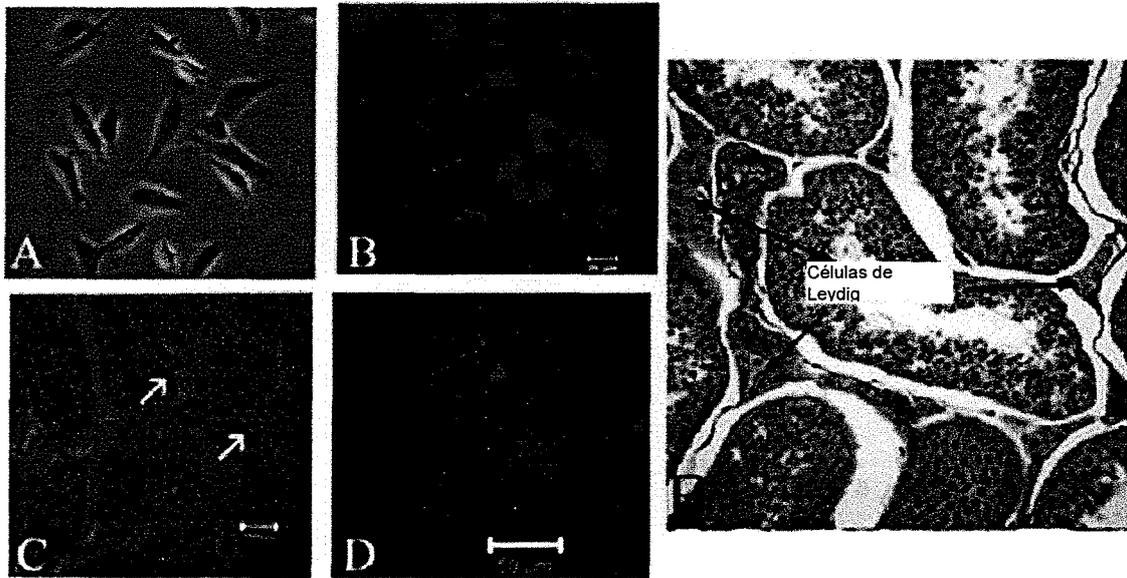


FIGURA 27

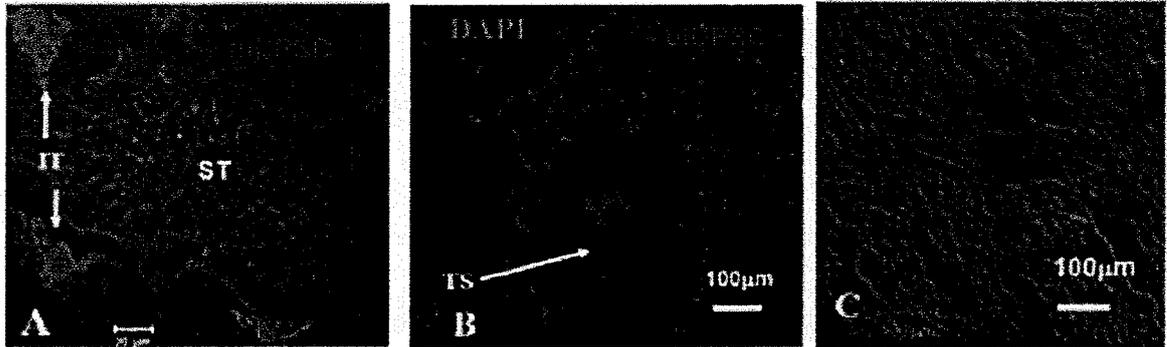


FIGURA 28

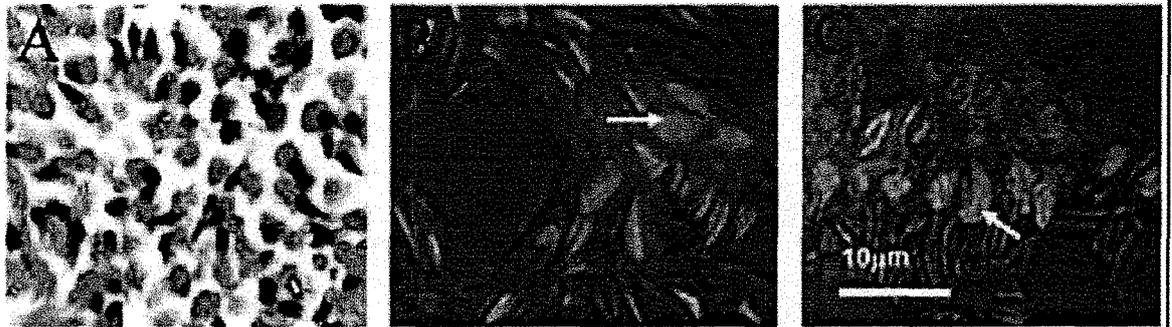


FIGURA 29

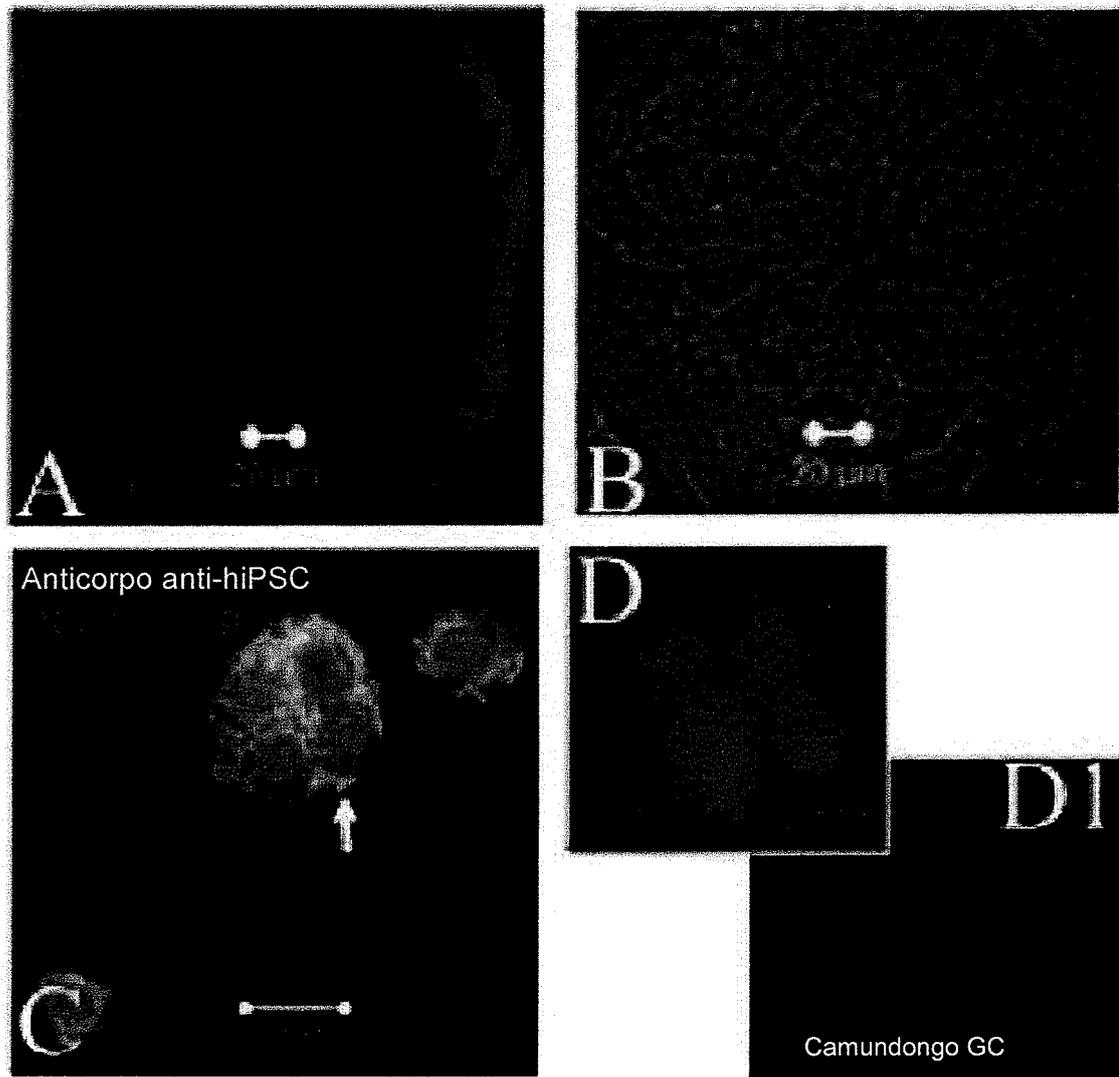


FIGURA 30

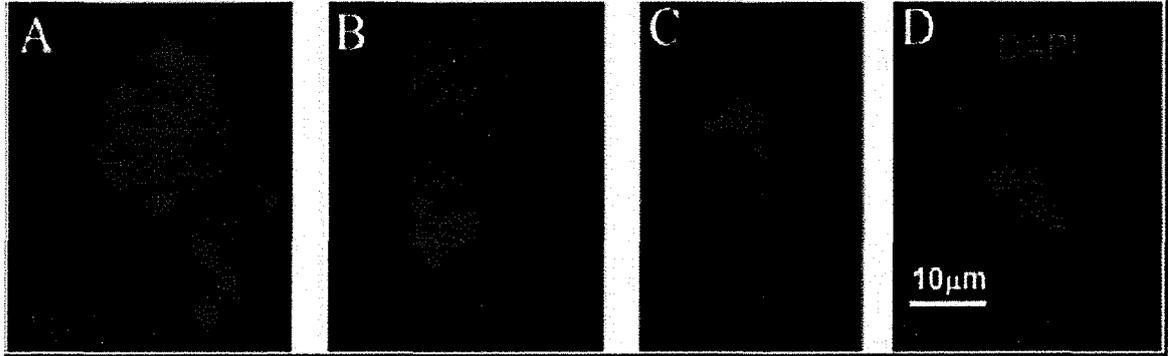


FIGURA 31

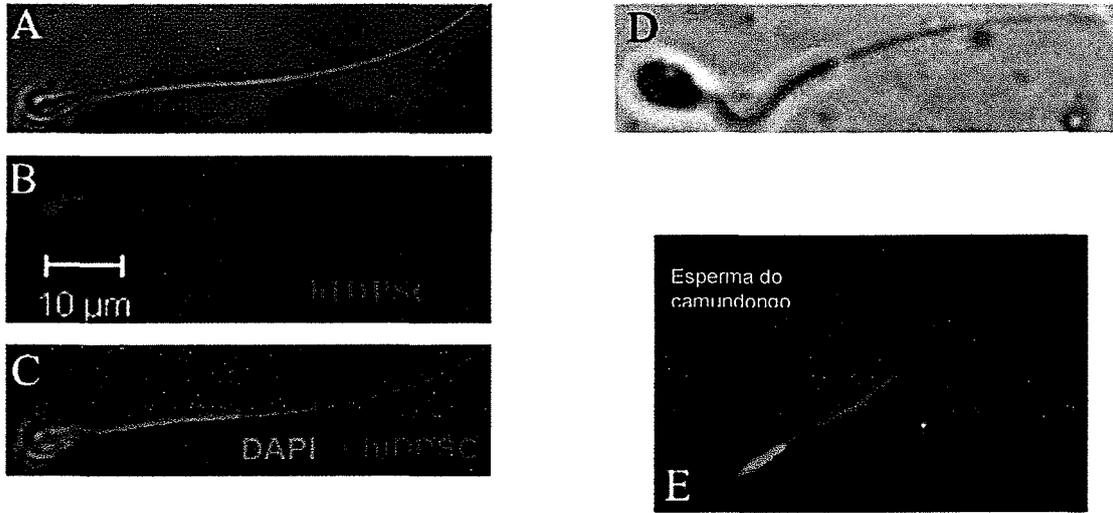


FIGURA 32

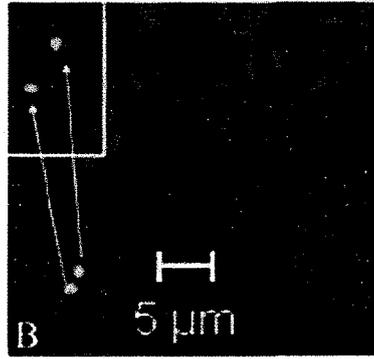
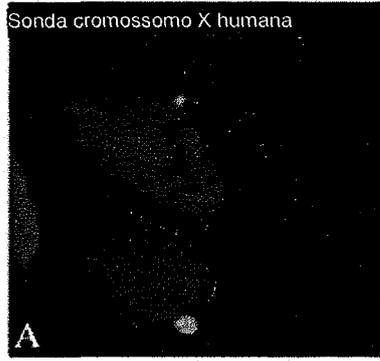


FIGURA 33

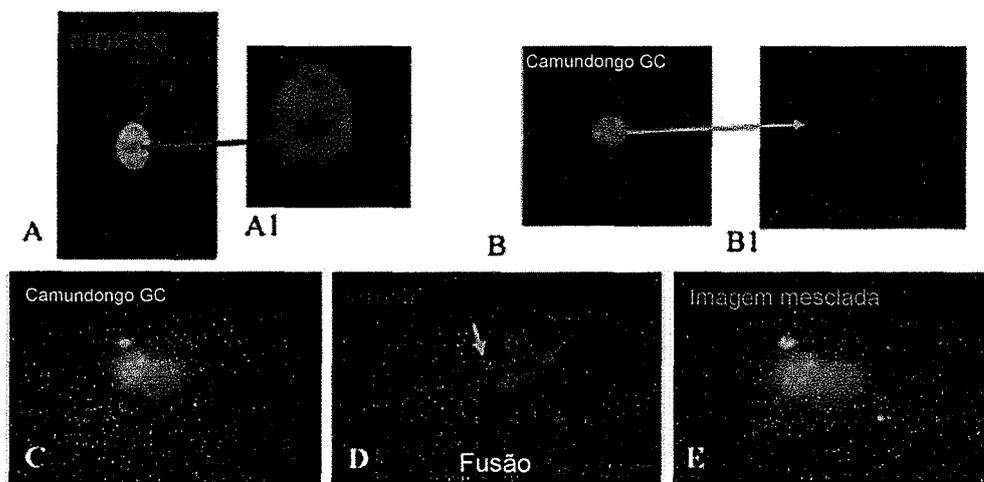


FIGURA 34

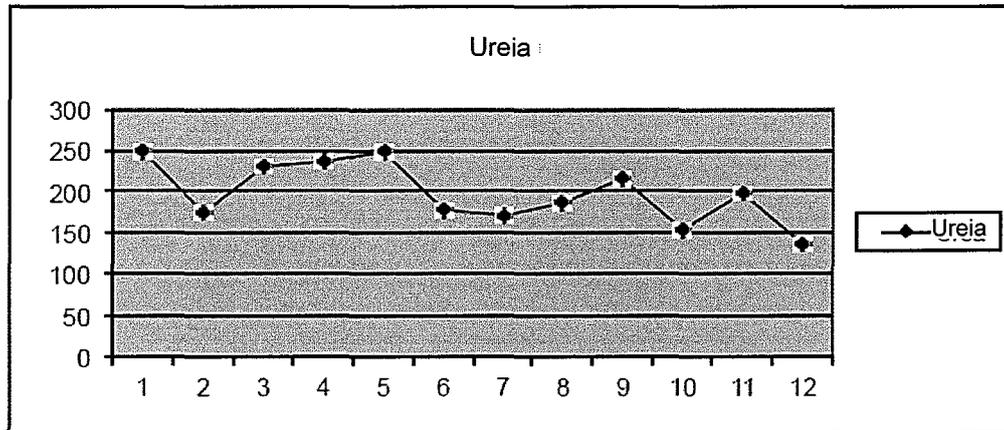


FIGURA 35

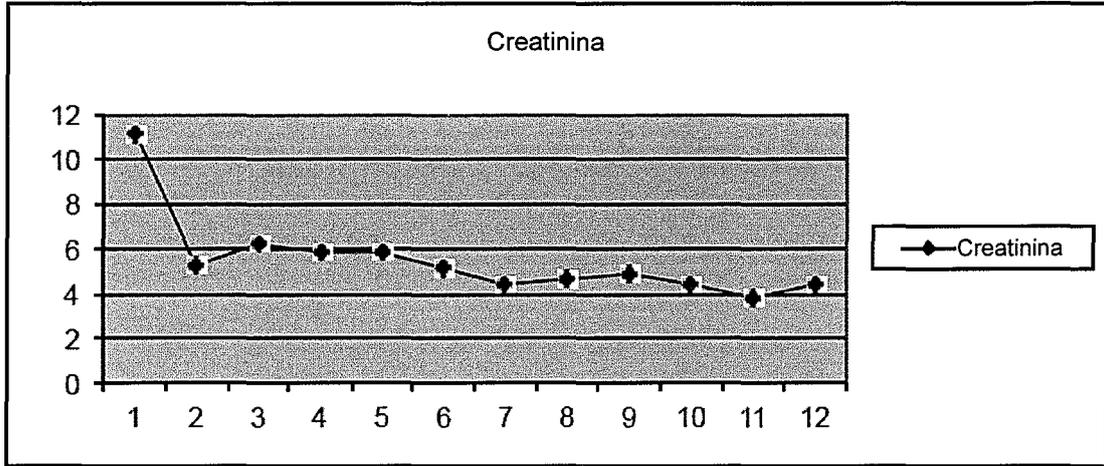


FIGURA 36

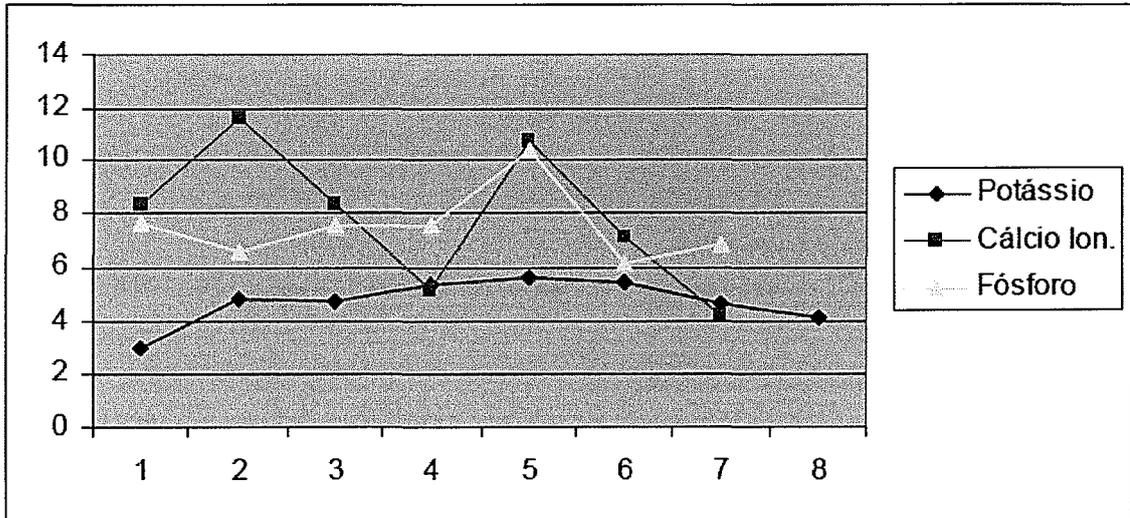


FIGURA 37

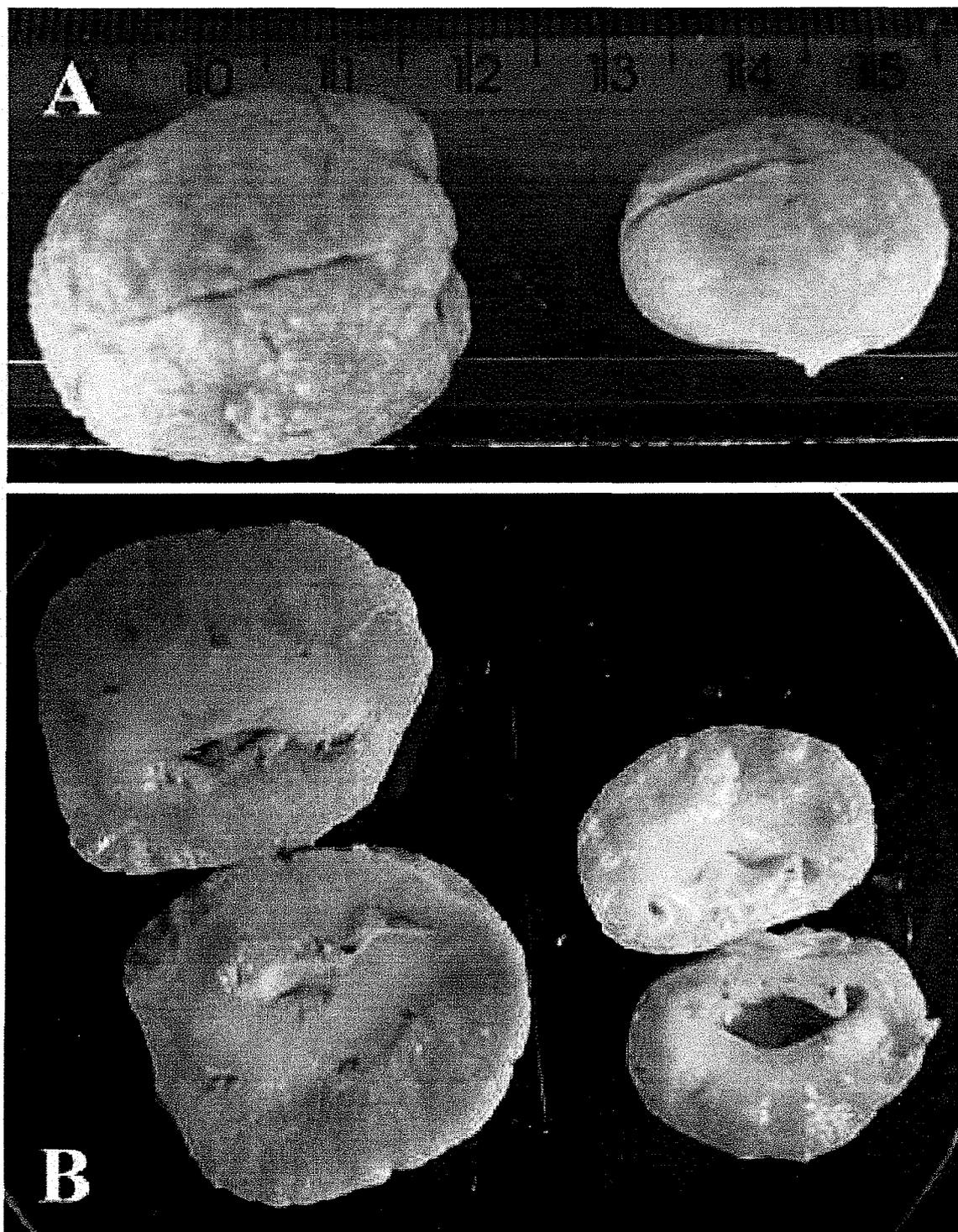


FIGURA 38

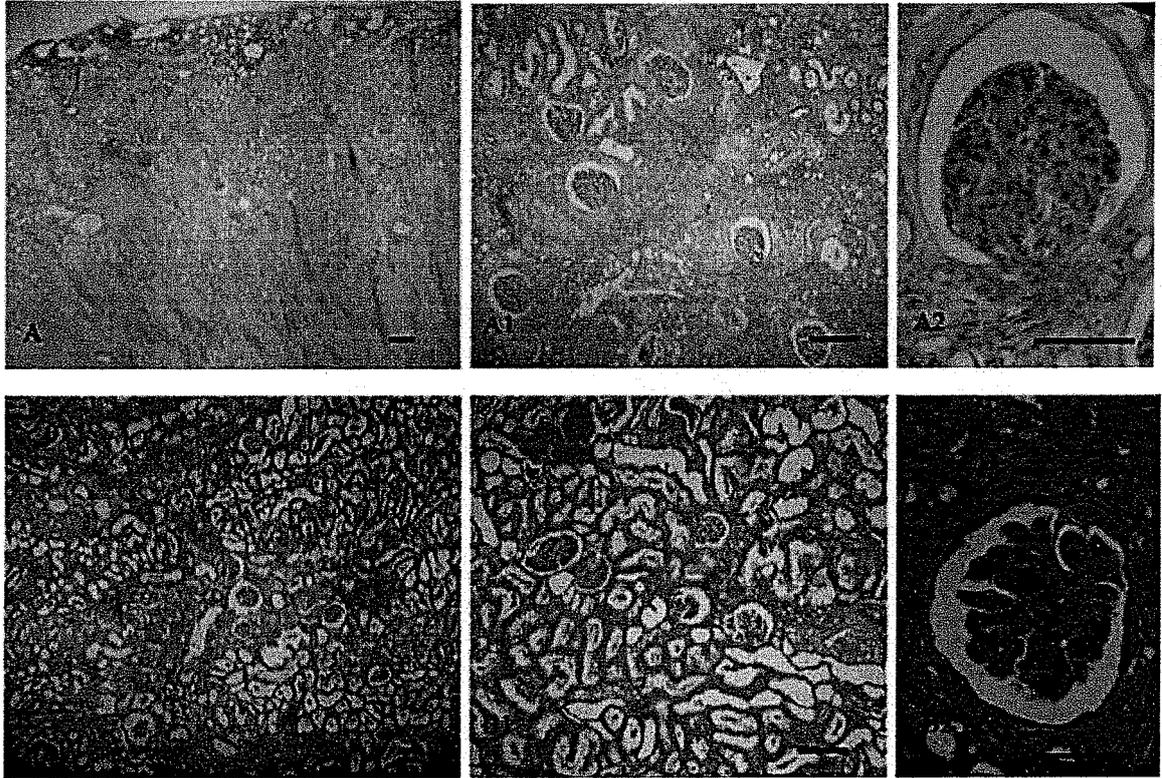


FIGURA 39

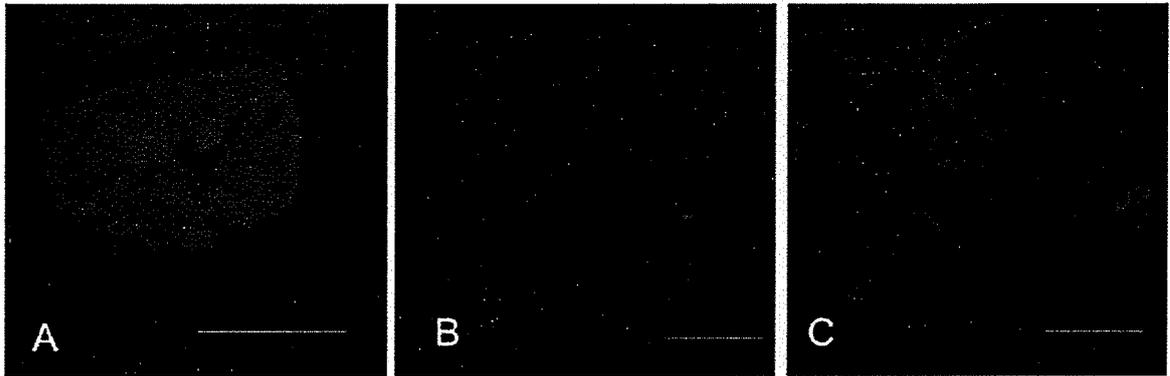


FIGURA 40

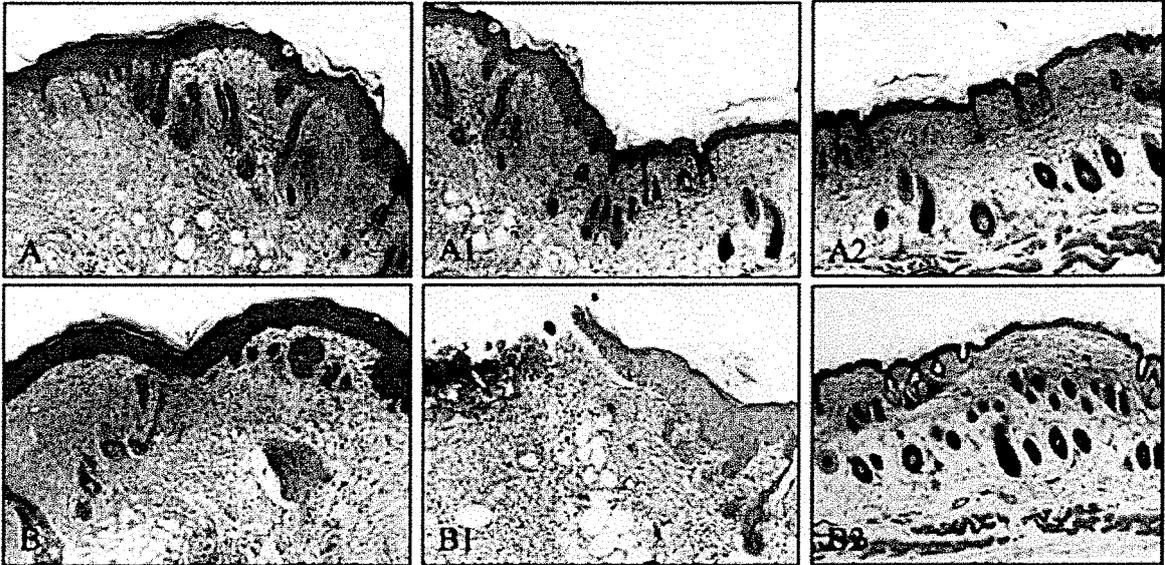


FIGURA 41

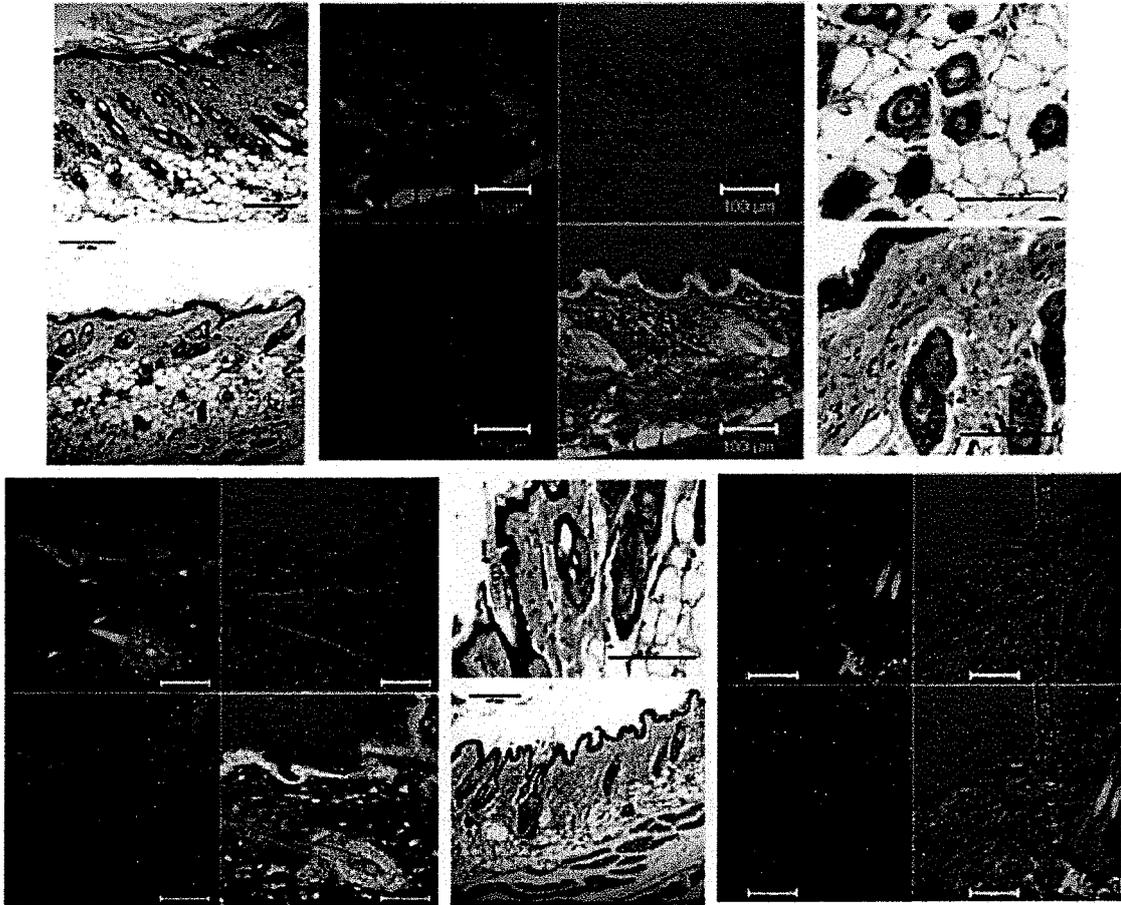


FIGURA 42

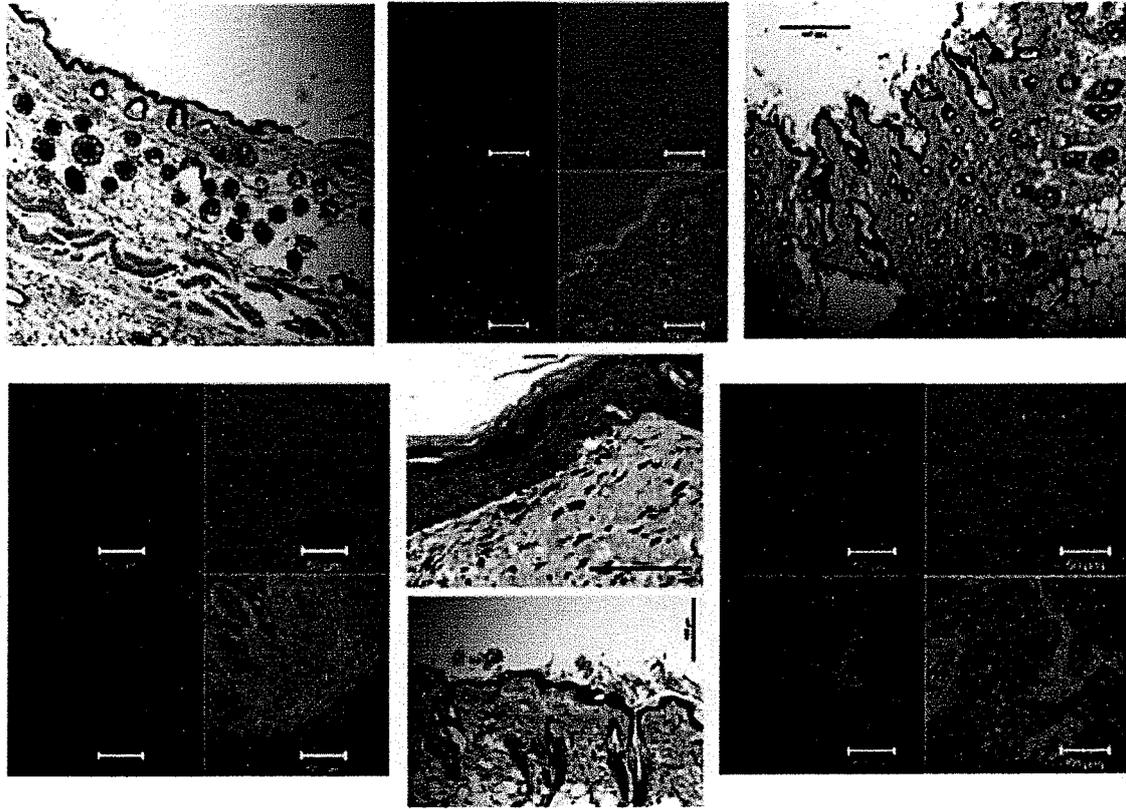


FIGURA 43

Progressão da  
diferenciação neuronal

EP IDPSC  
LP IDPSC

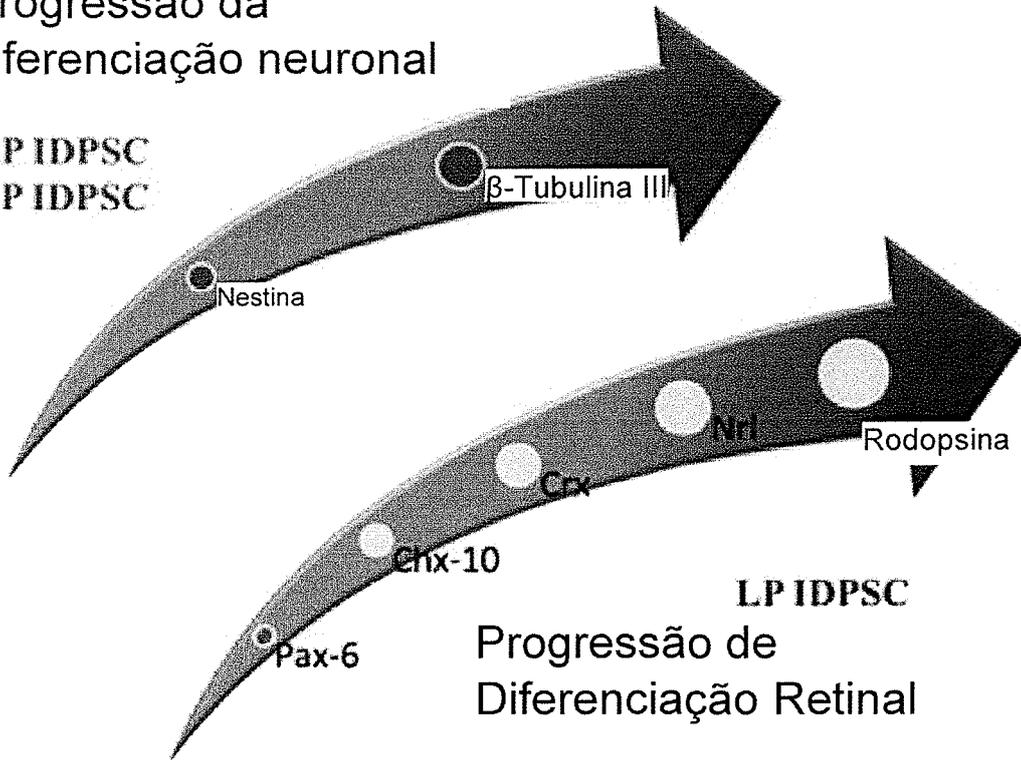


FIGURA 44

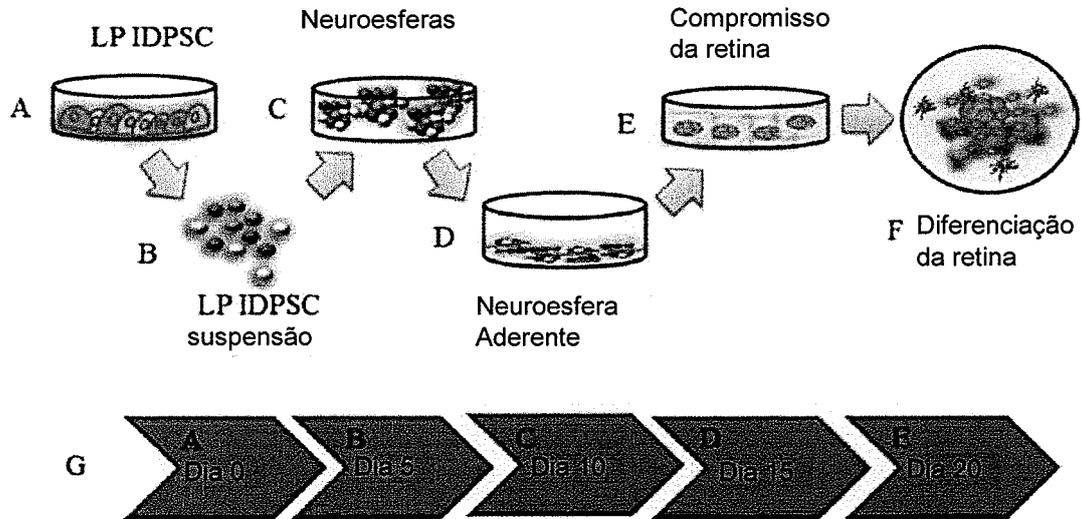


FIGURA 45

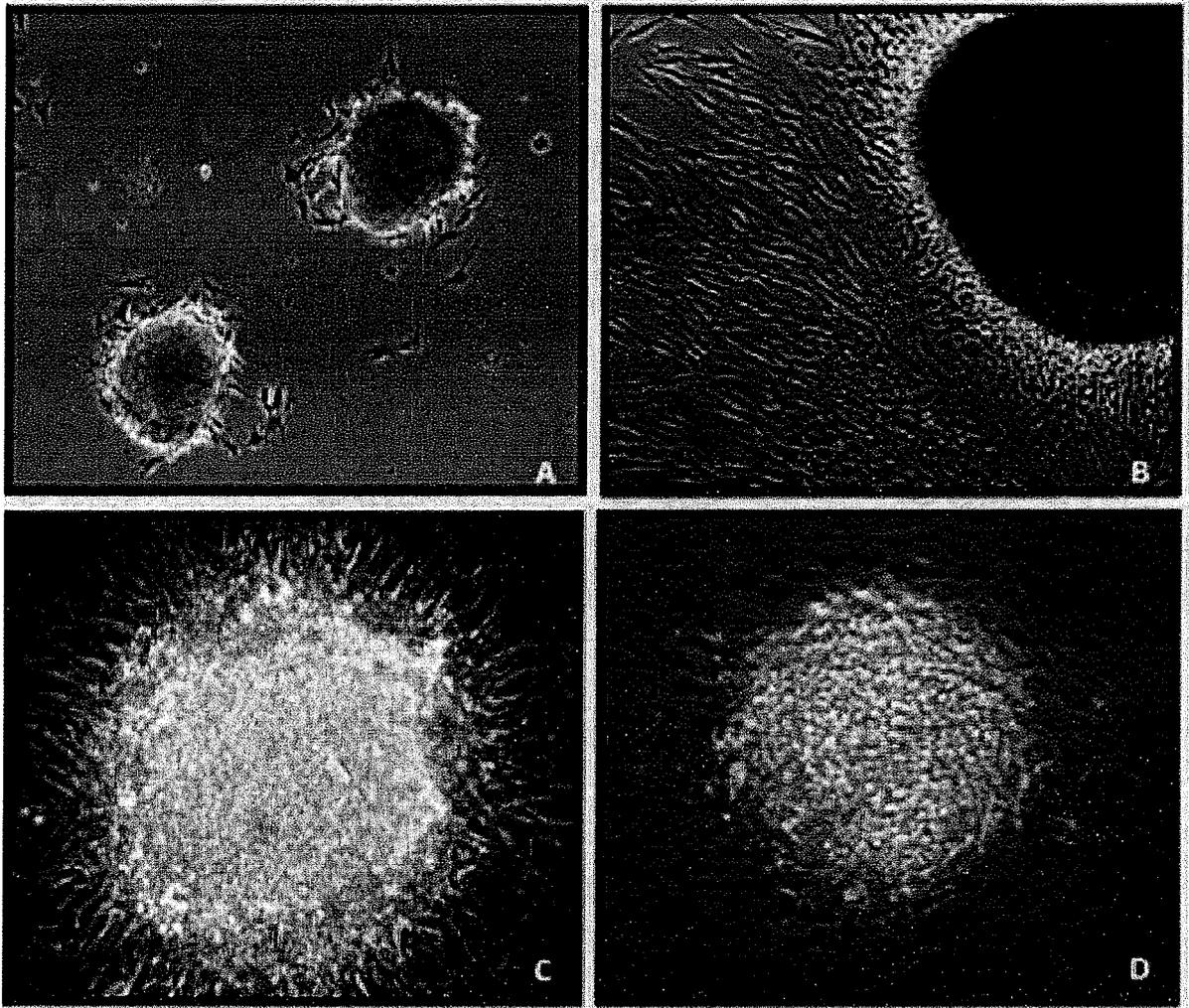


FIGURA 46

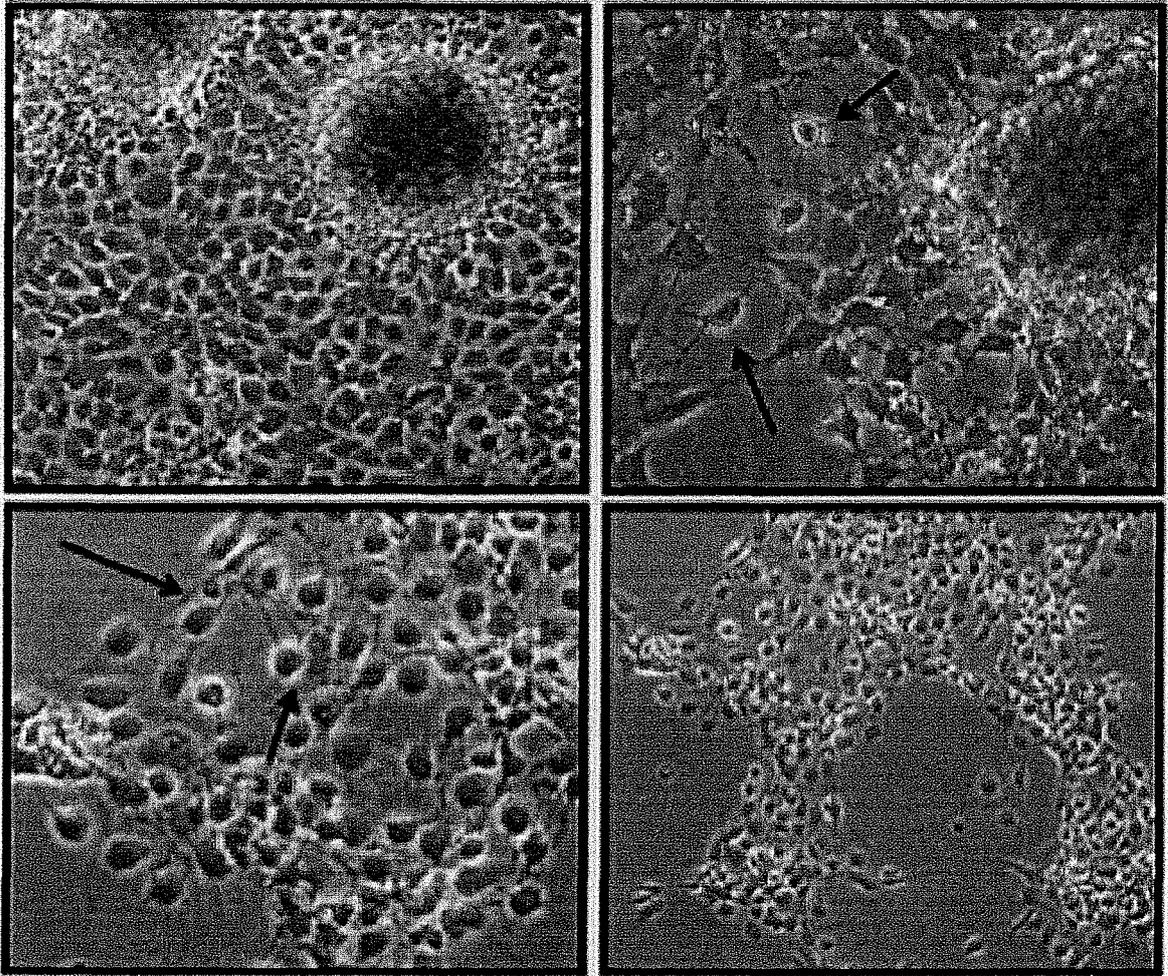


FIGURA 47

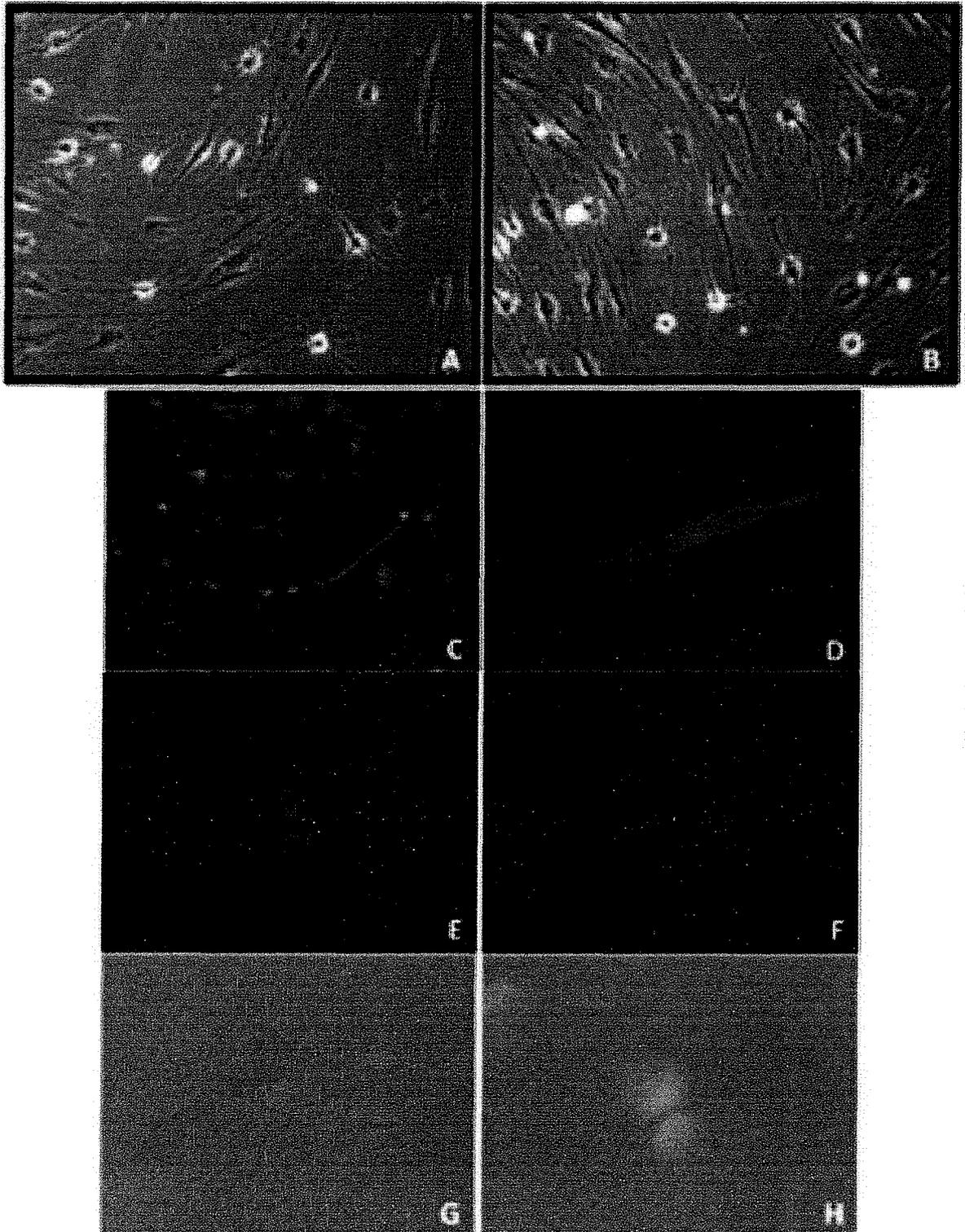


FIGURA 48

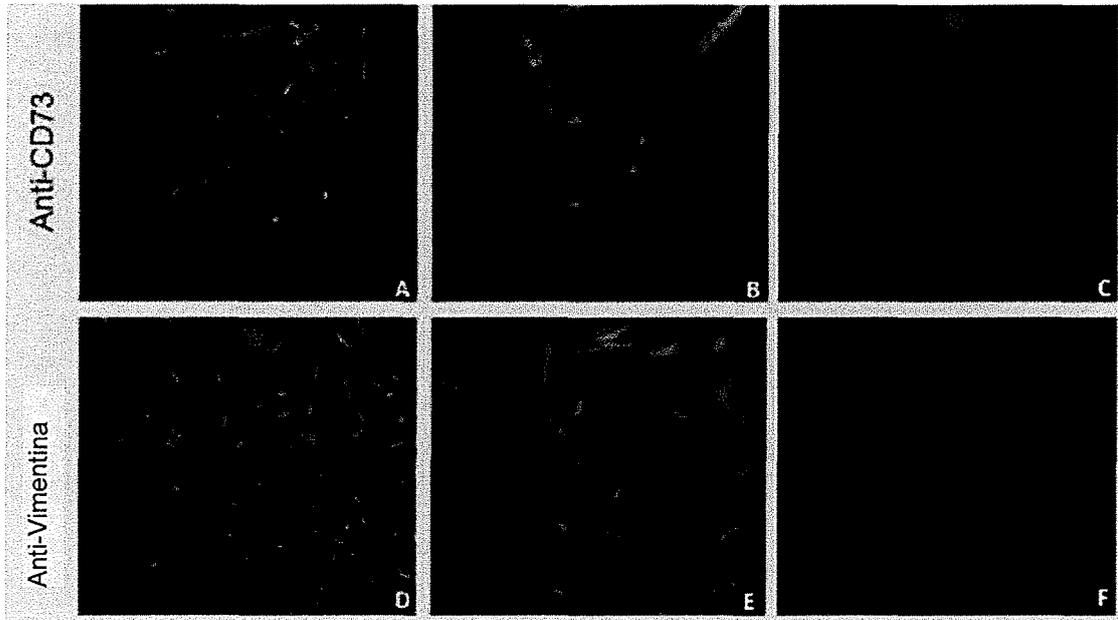


FIGURA 49

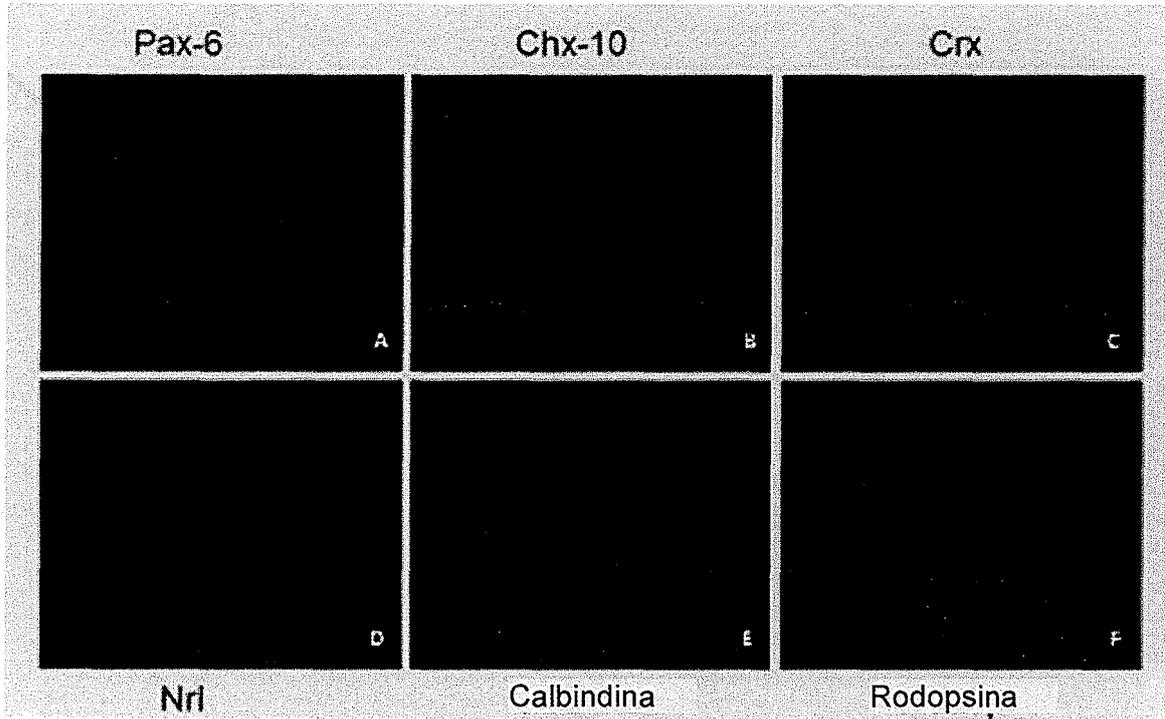


FIGURA 50

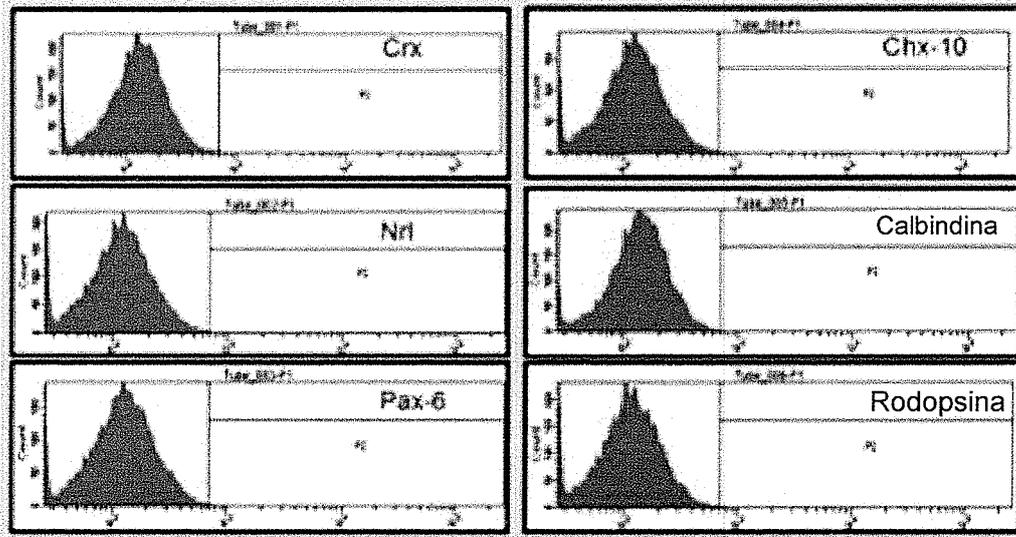


FIGURA 51

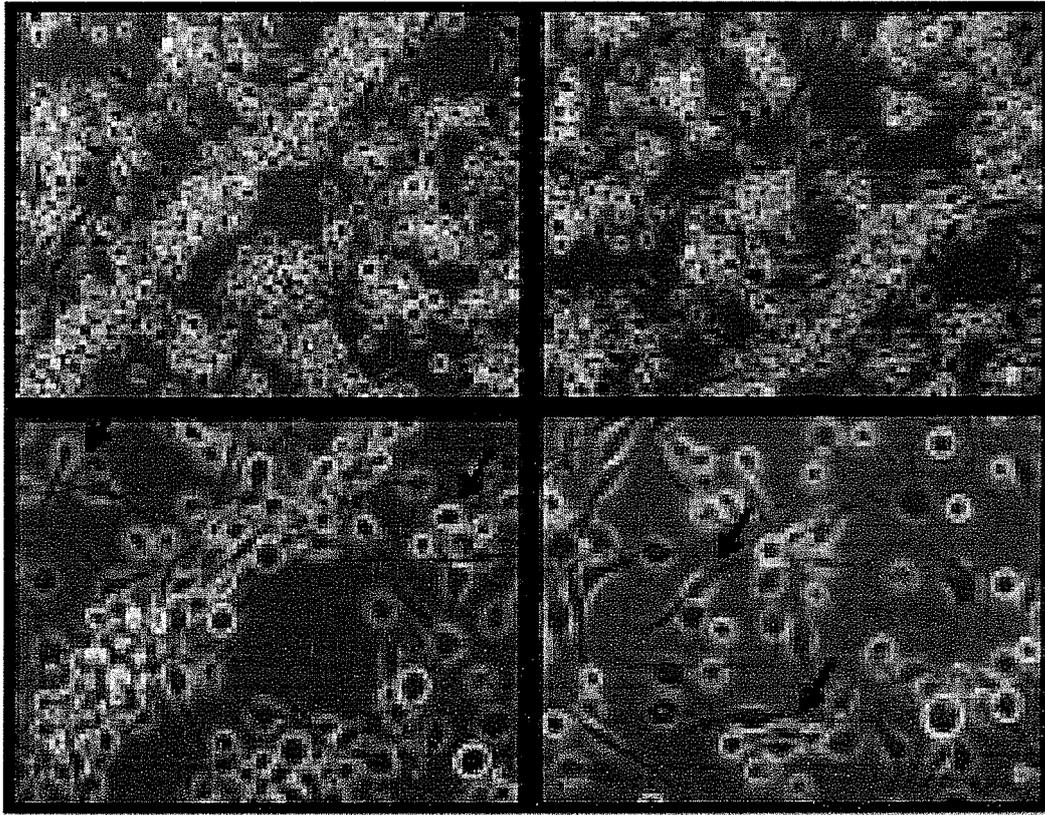


FIGURA 52

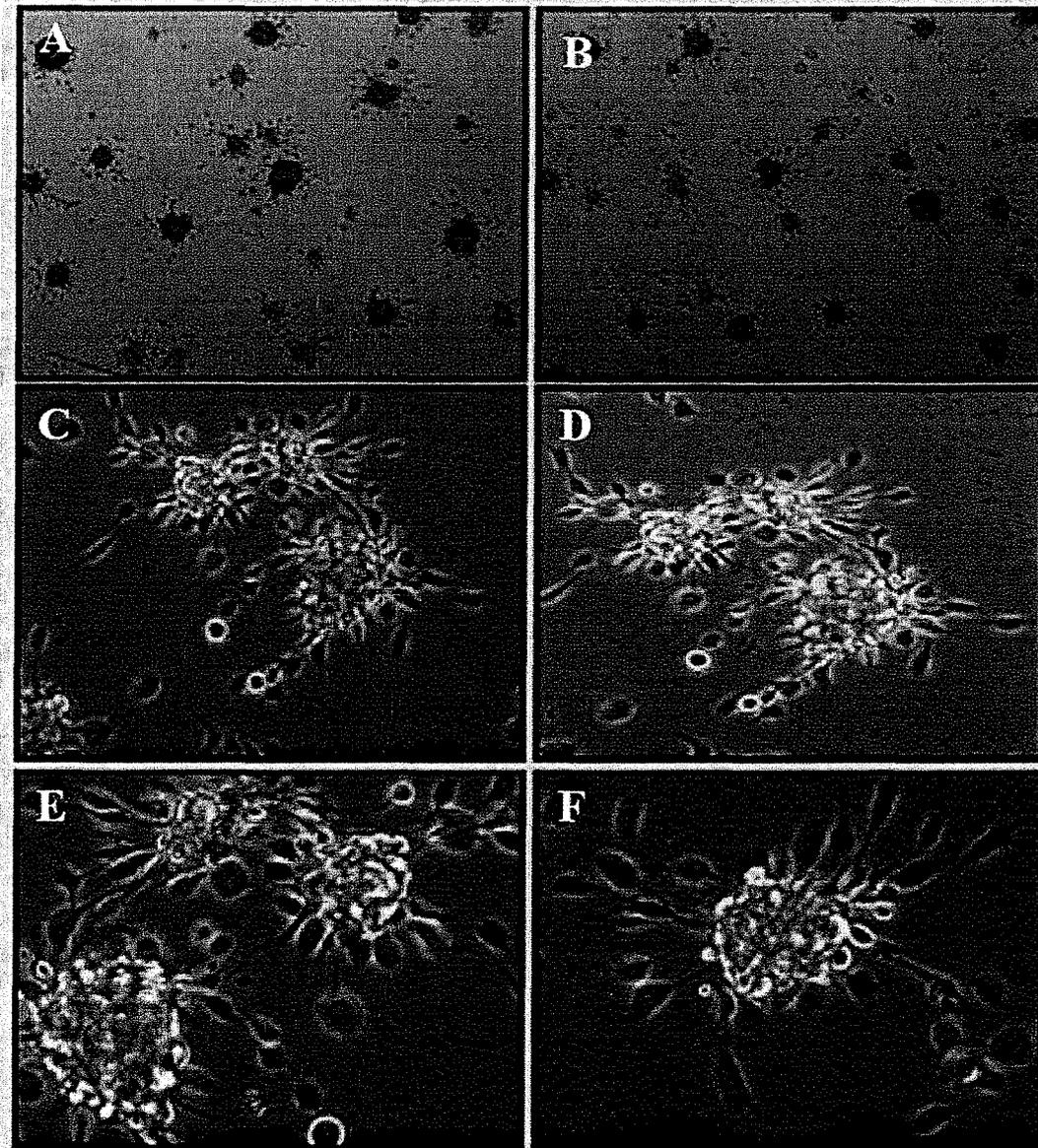


FIGURA 53

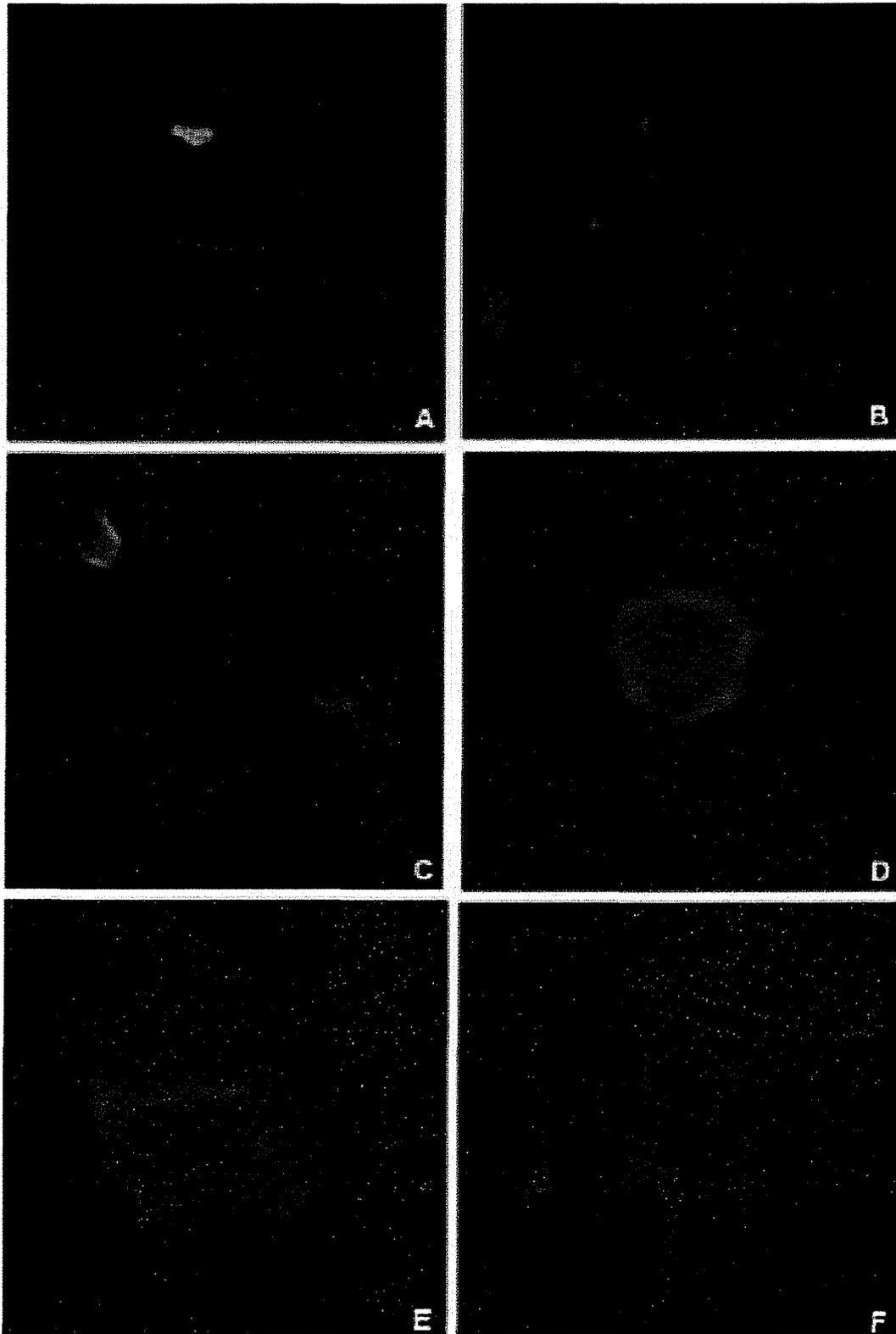


FIGURA 54

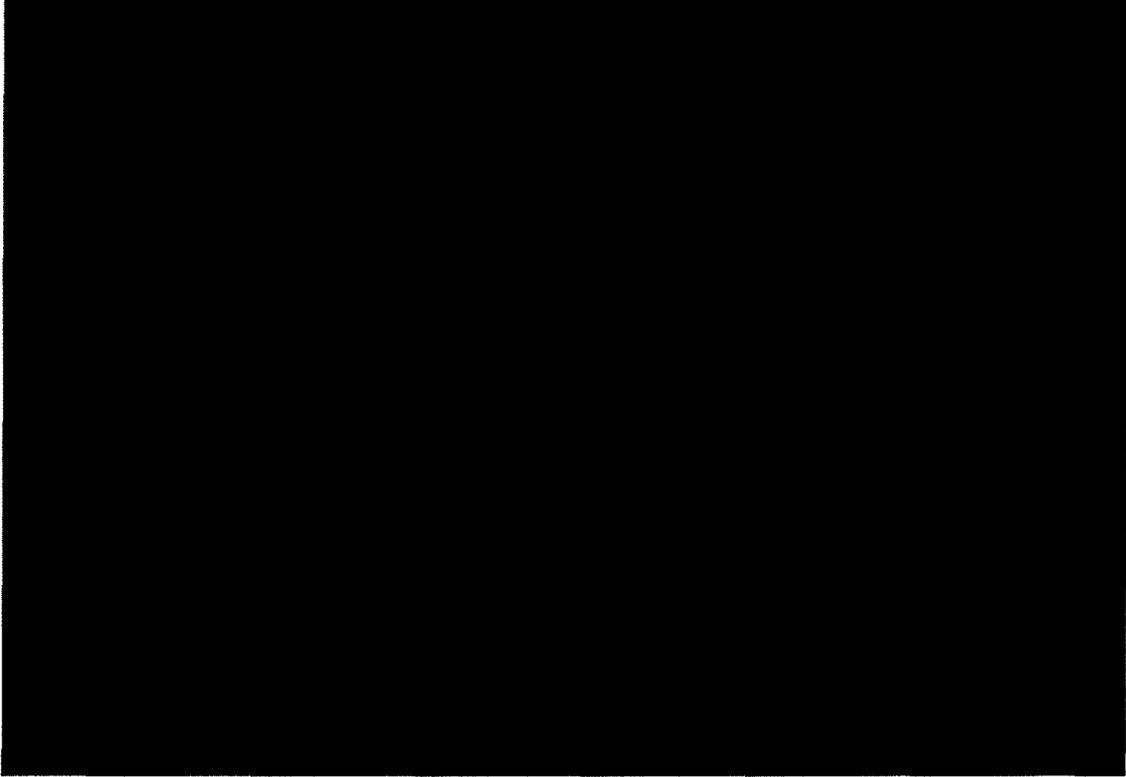


FIGURA 55

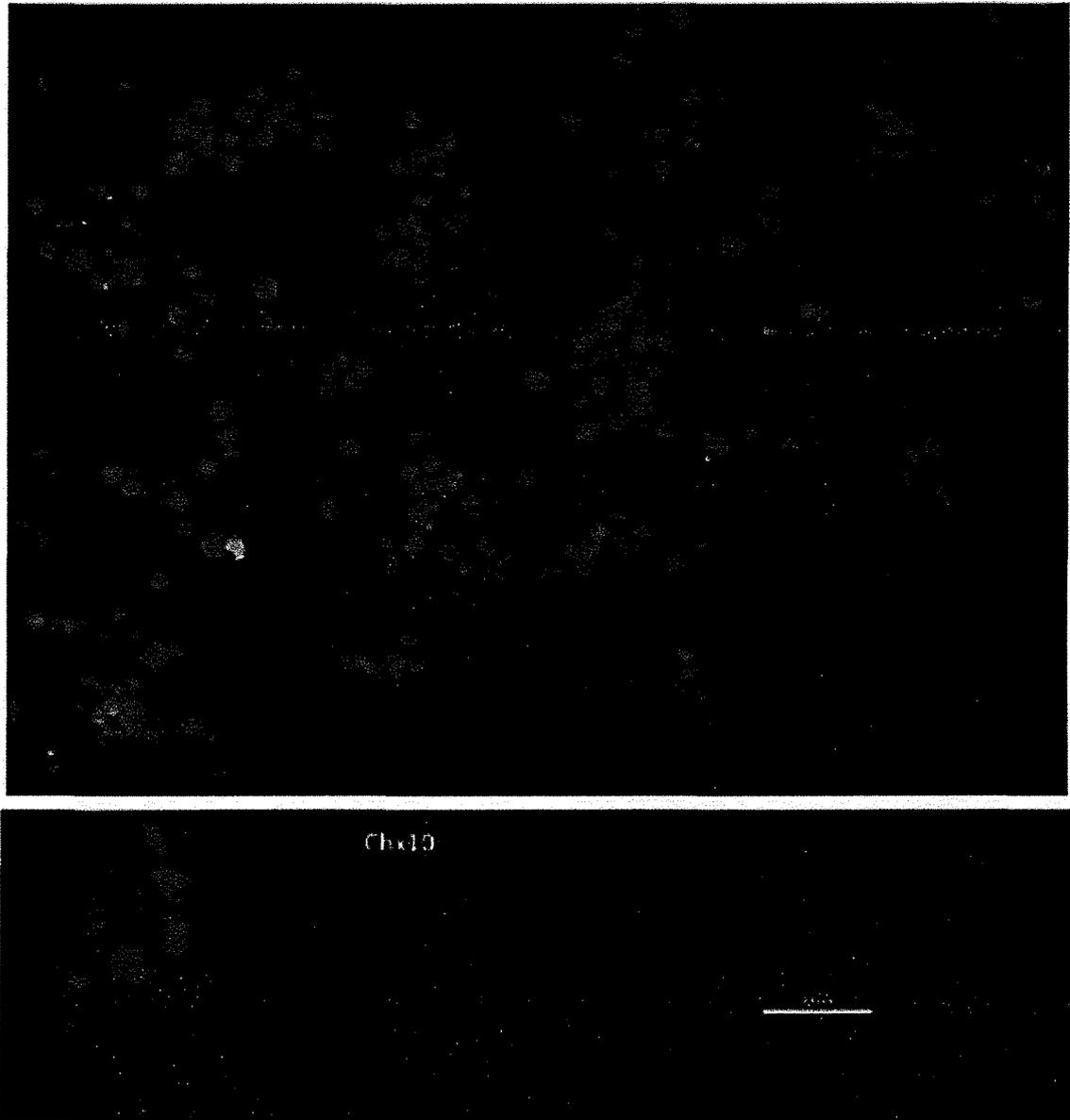


FIGURA 56

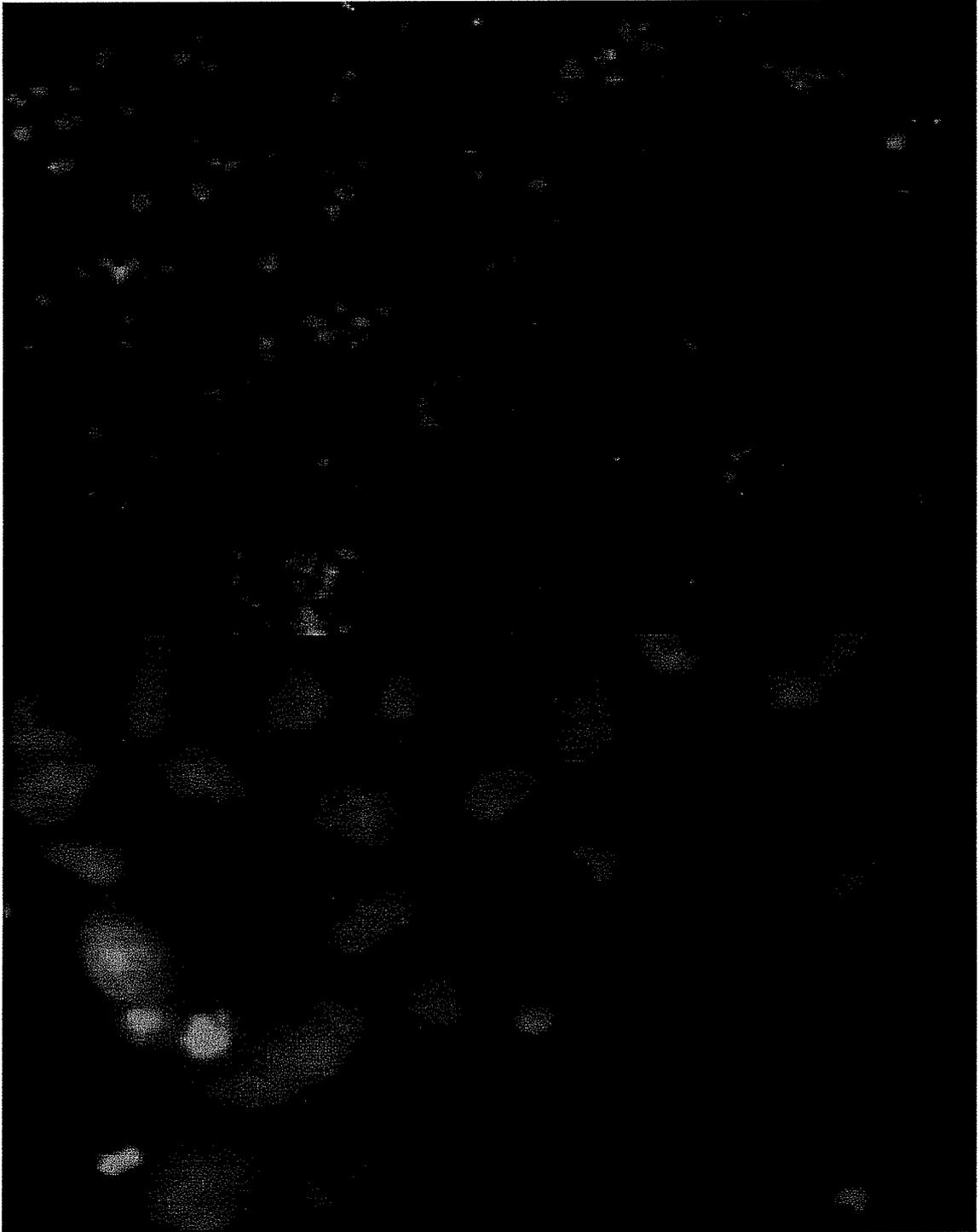


FIGURA 57

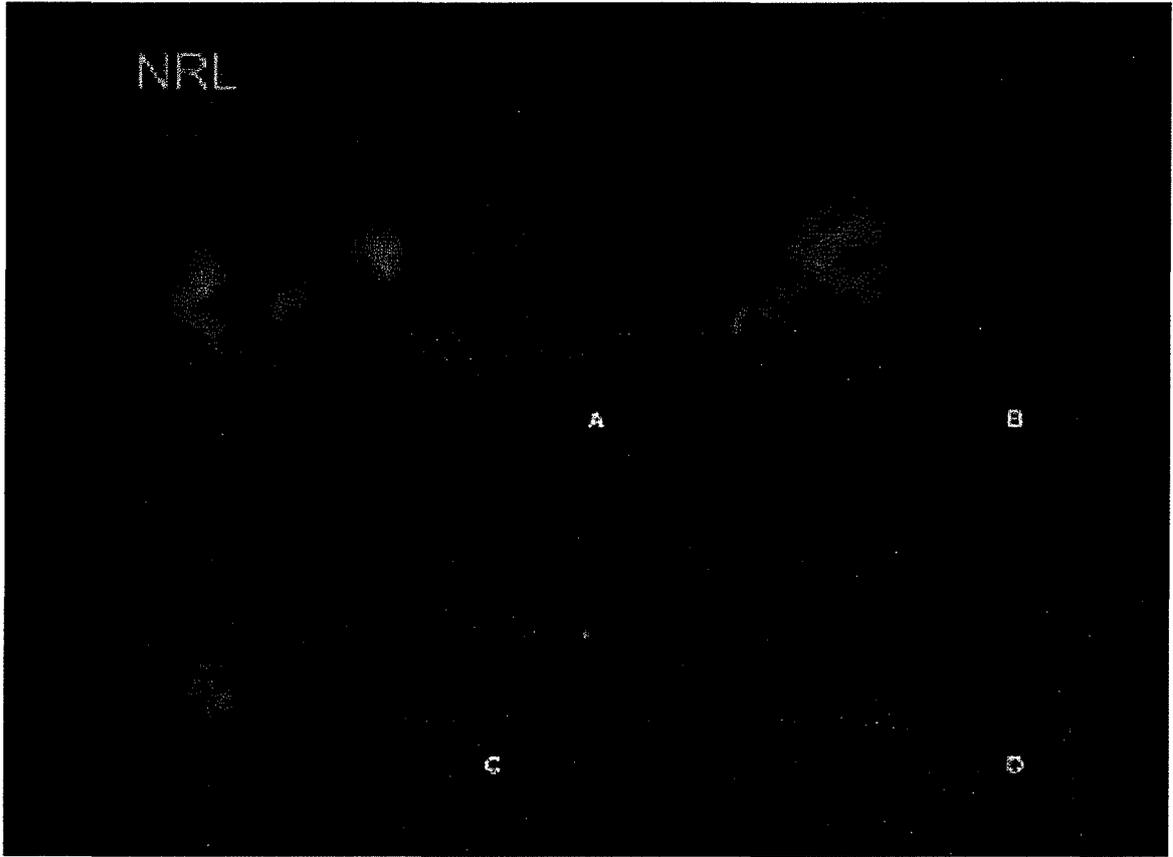


FIGURA 58



FIGURA 59



FIGURA 60



FIGURA 61

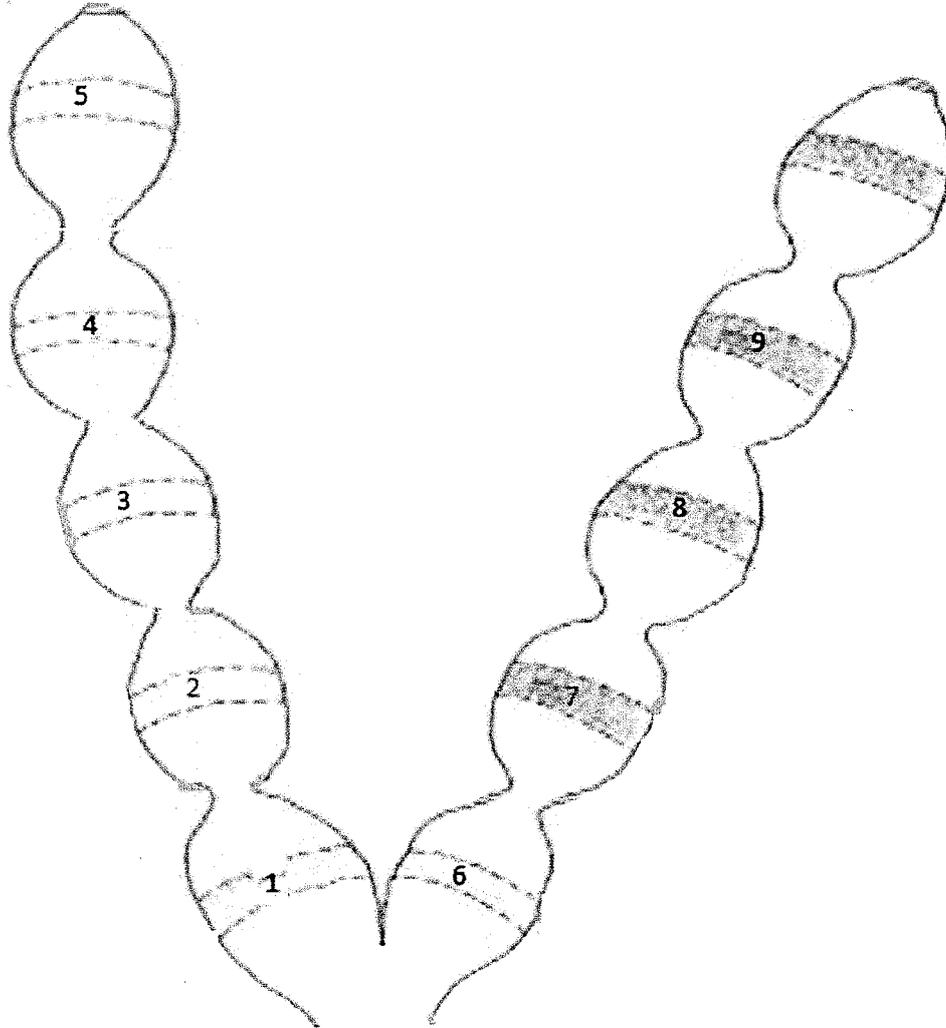
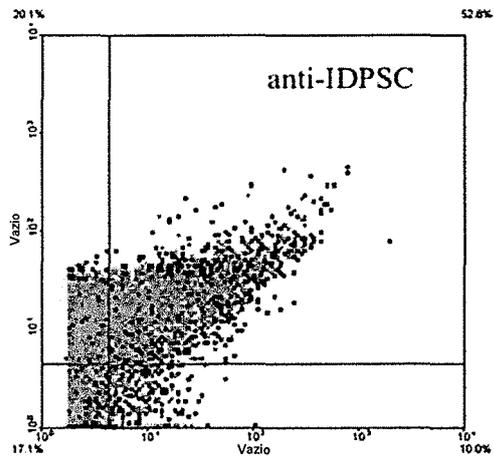


FIGURA 62

A)



B)

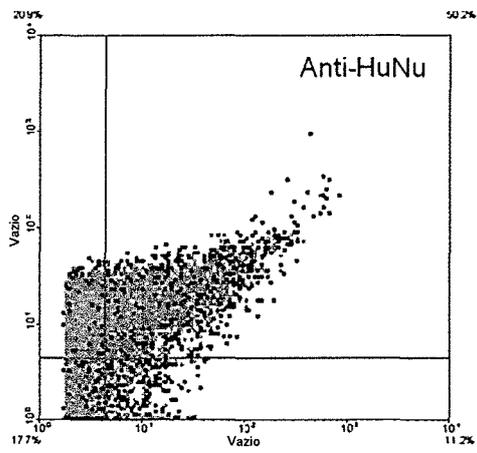
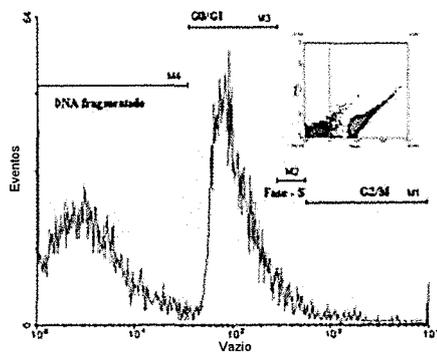


FIGURA 62 (continuação)

C)



D)

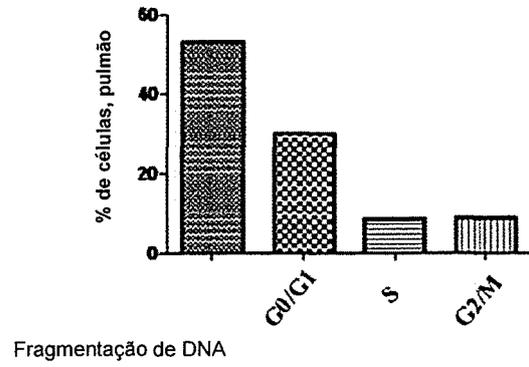


FIGURA 63

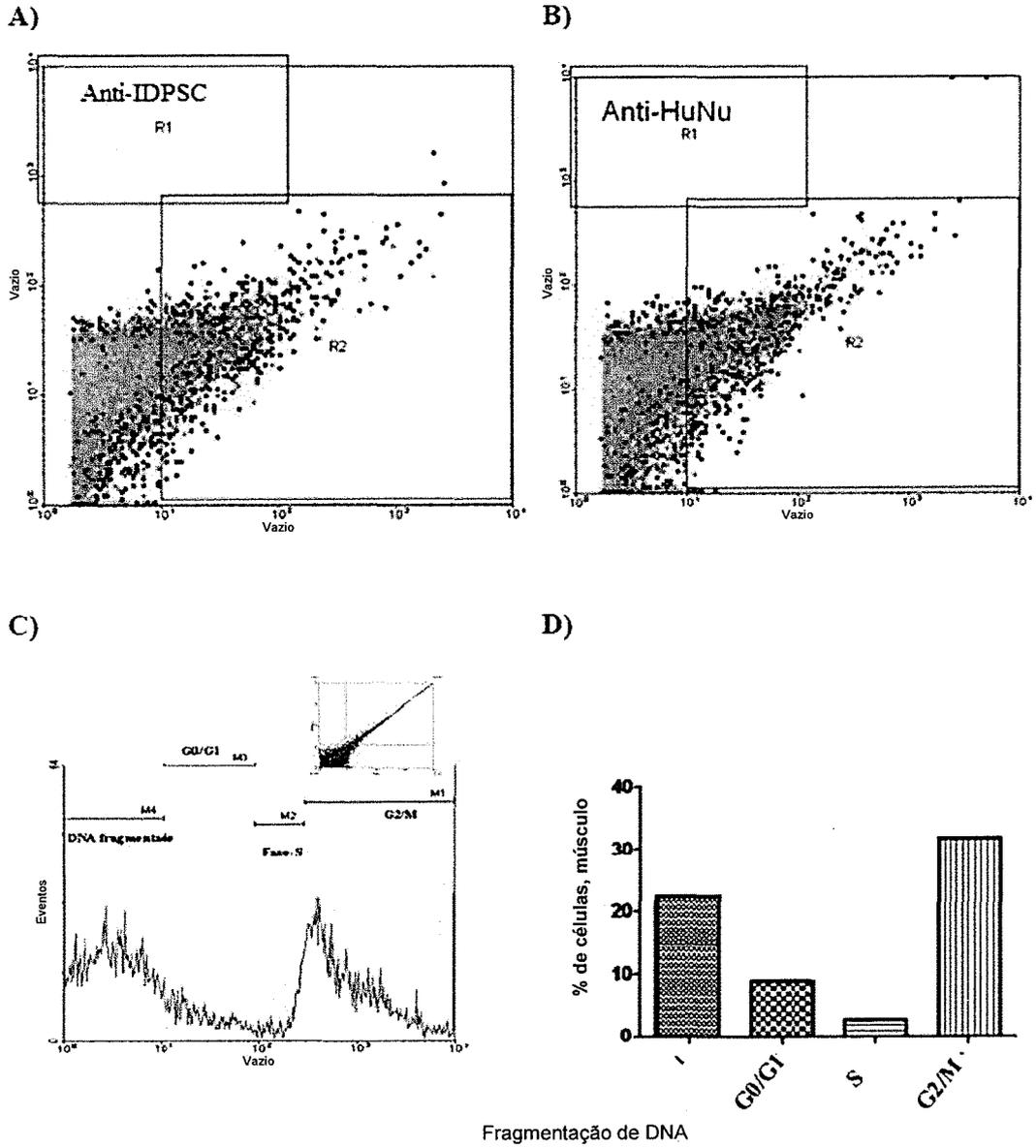


FIGURA 64

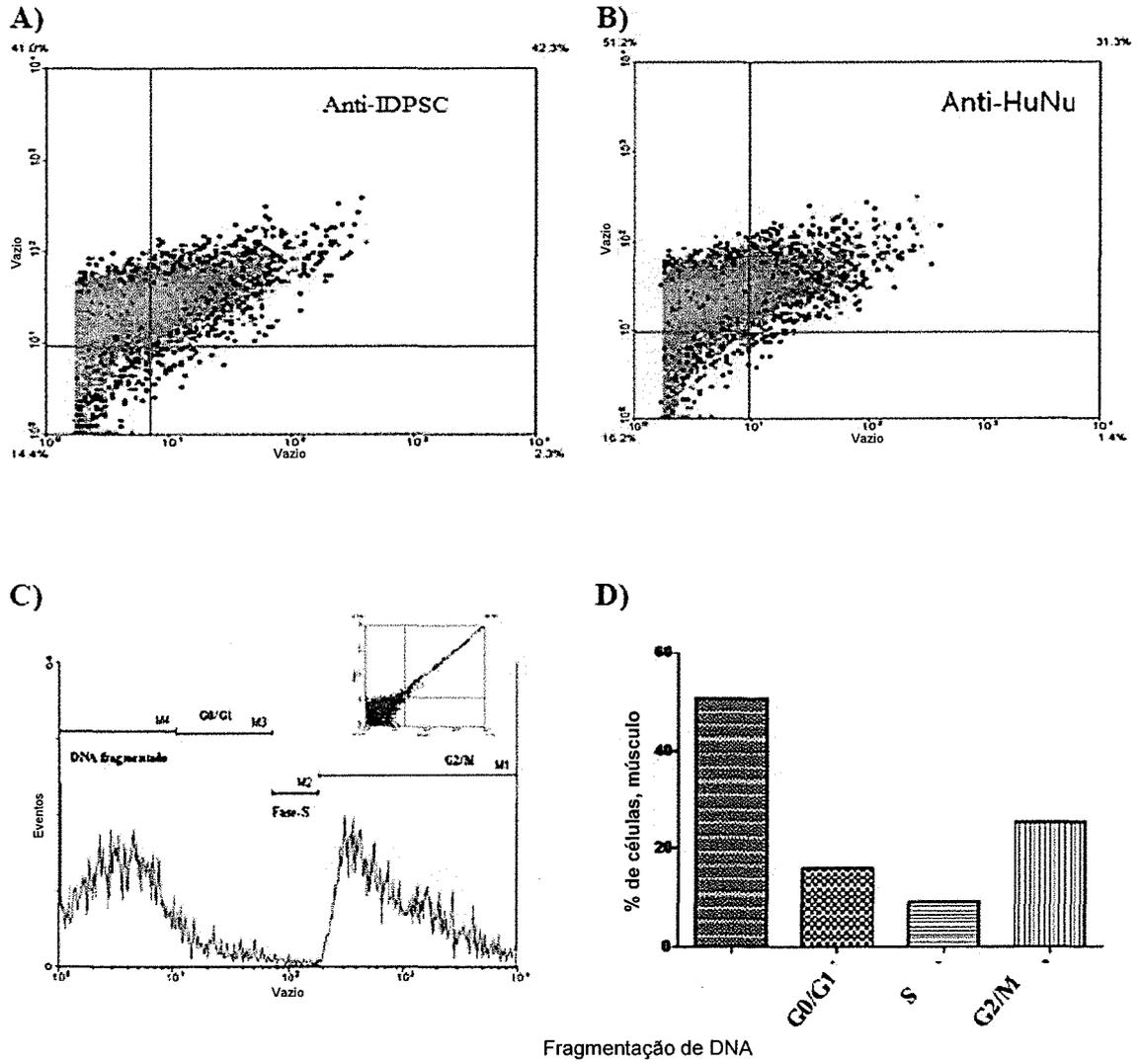


FIGURA 65

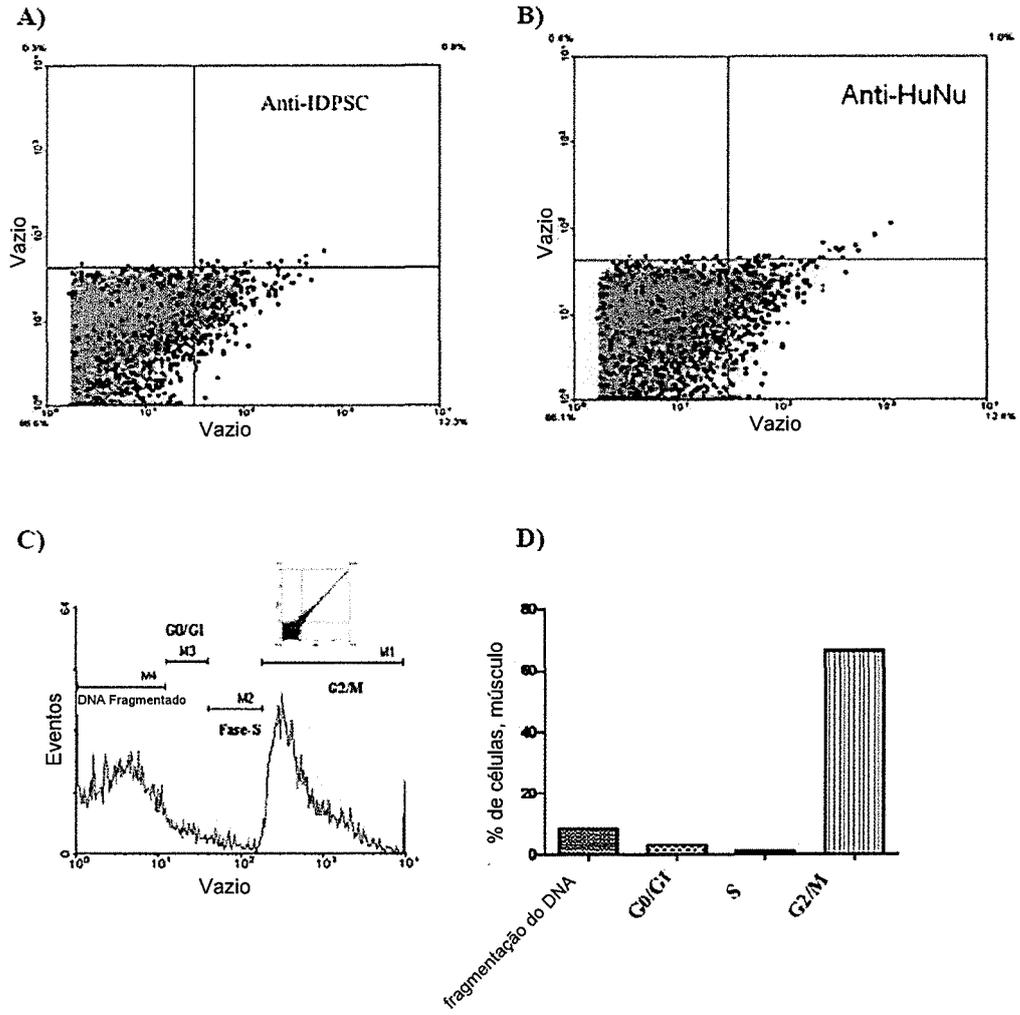


FIGURA 66

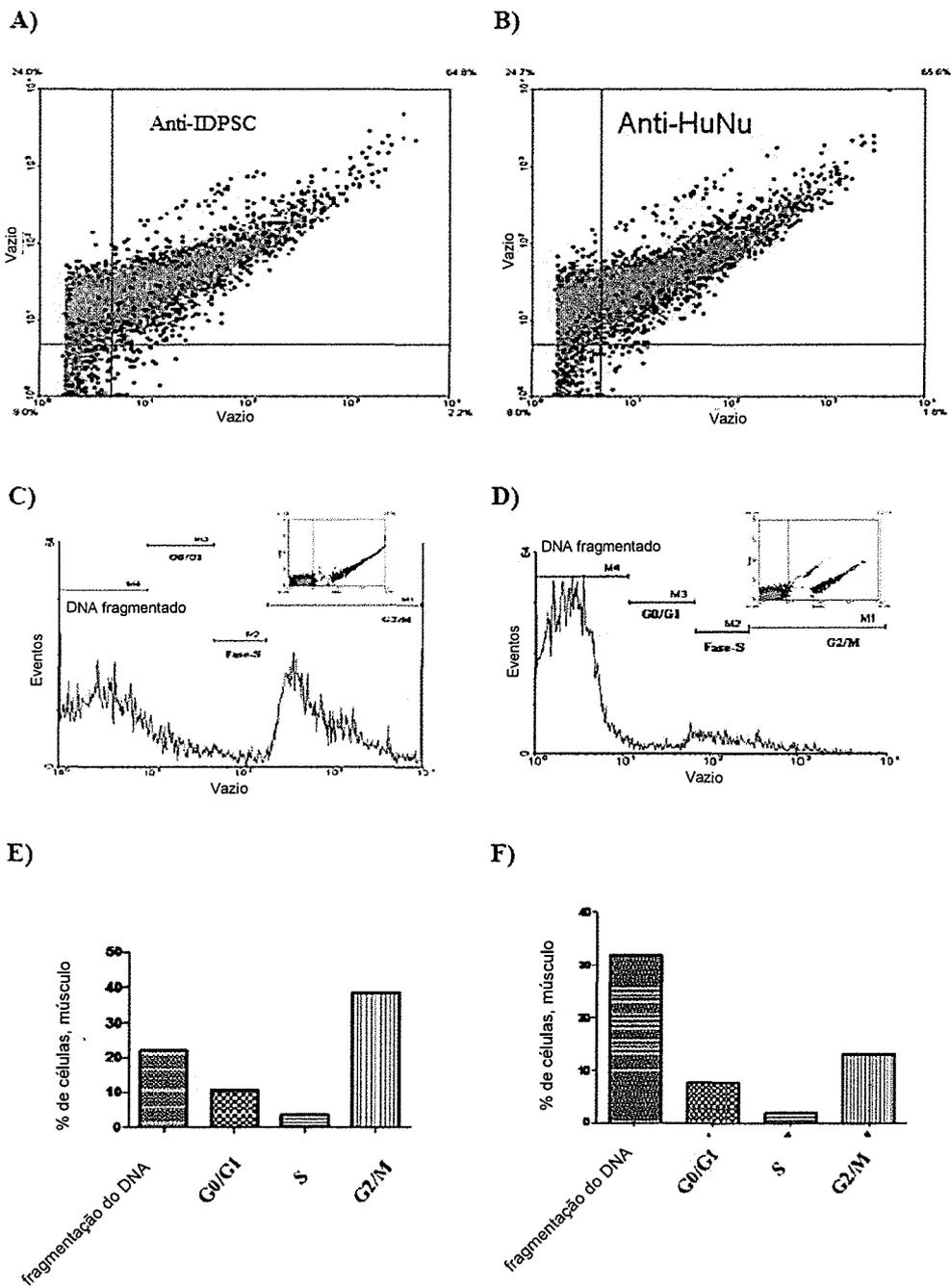


FIGURA 67

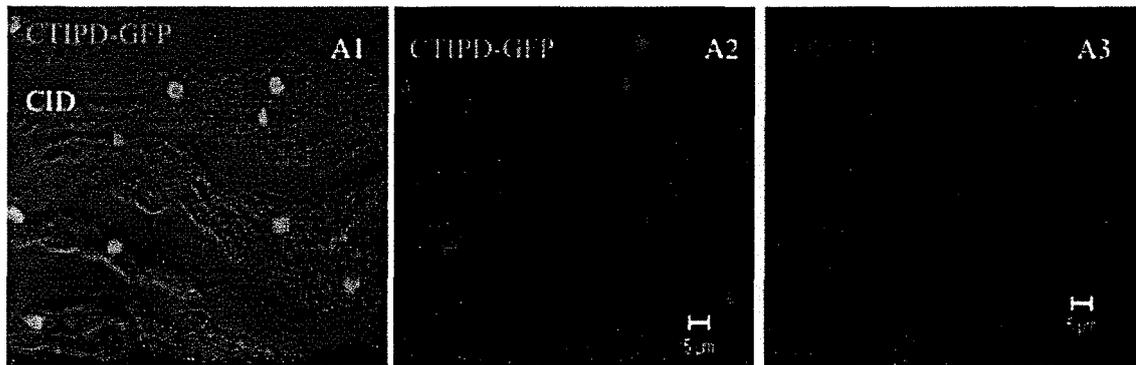
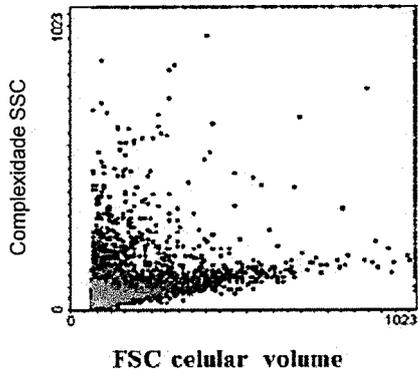
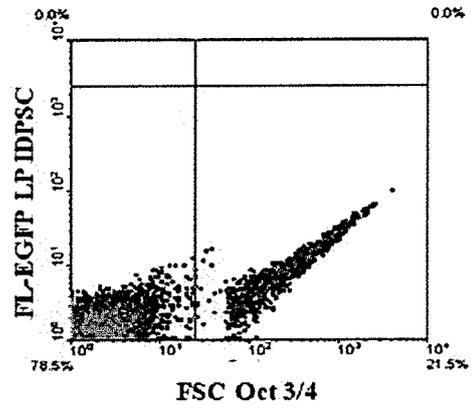


FIGURA 68

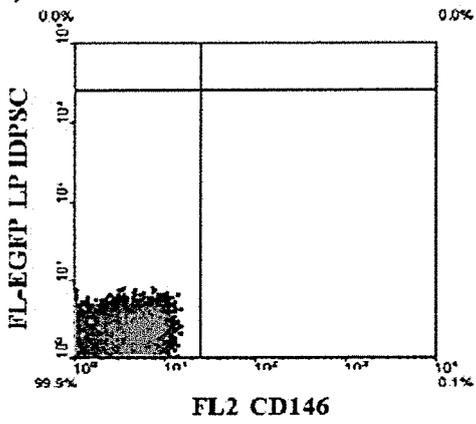
A)



B)



C)



D)

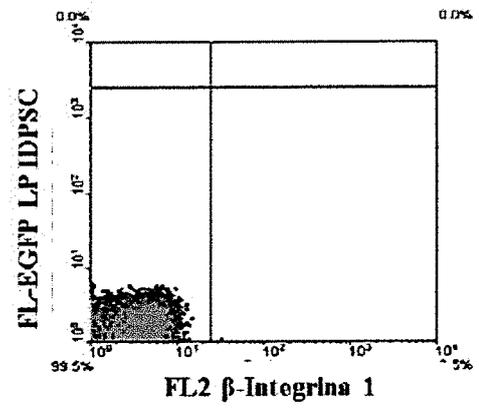


FIGURA 69

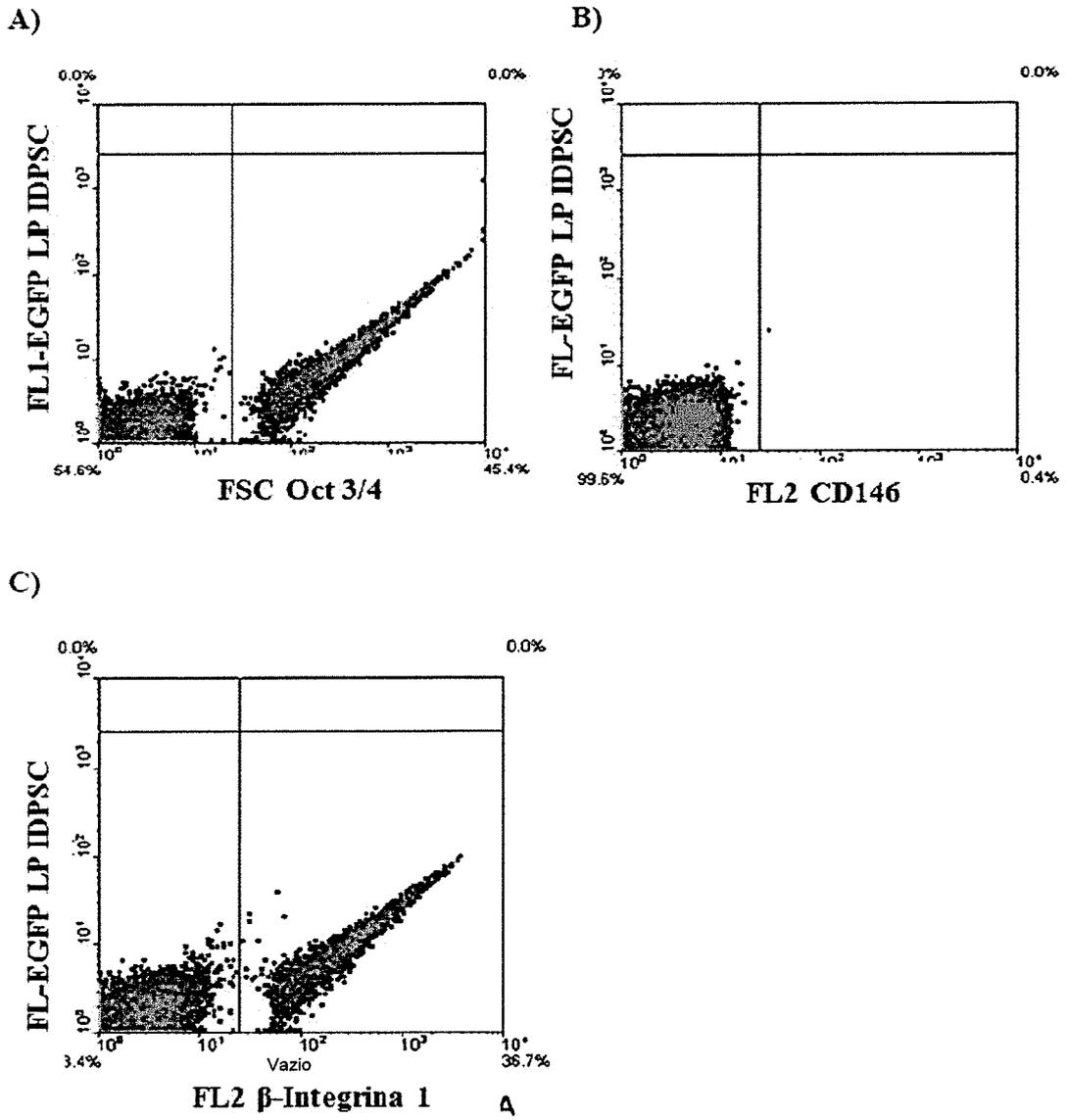


FIGURA 70

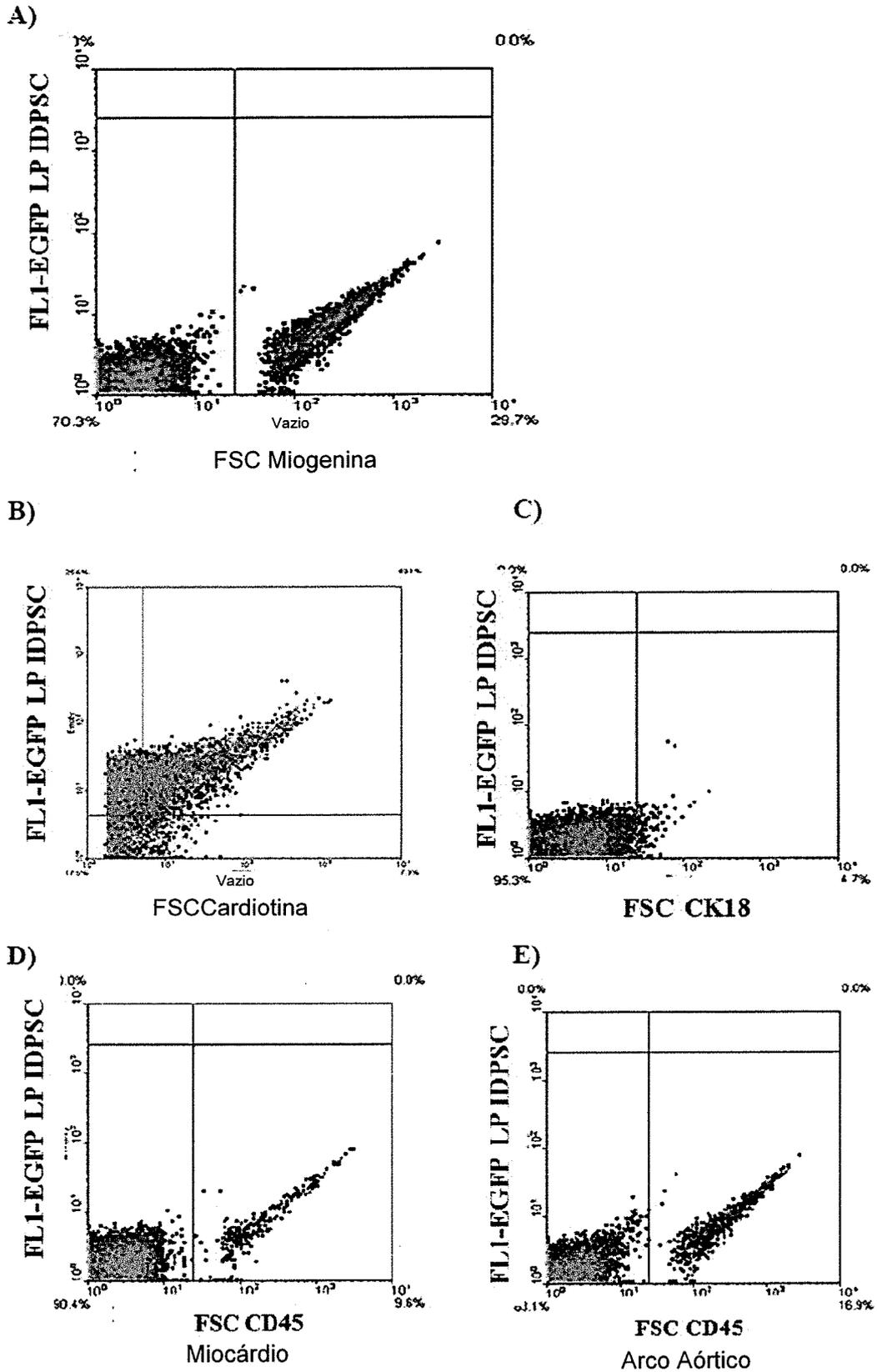
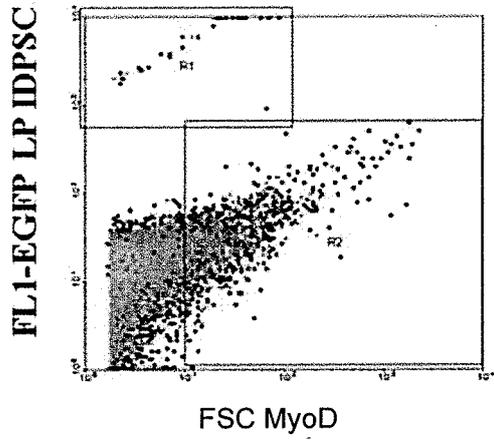
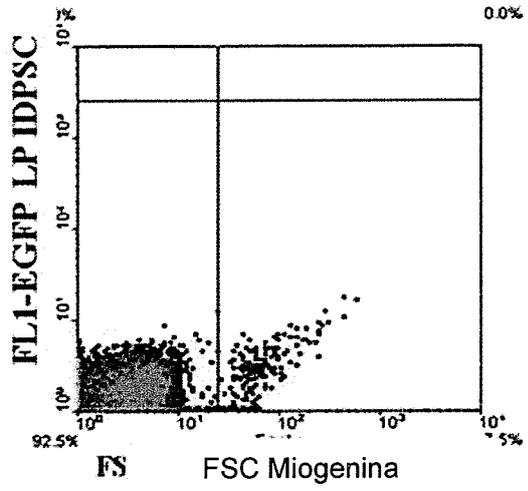


FIGURA 71

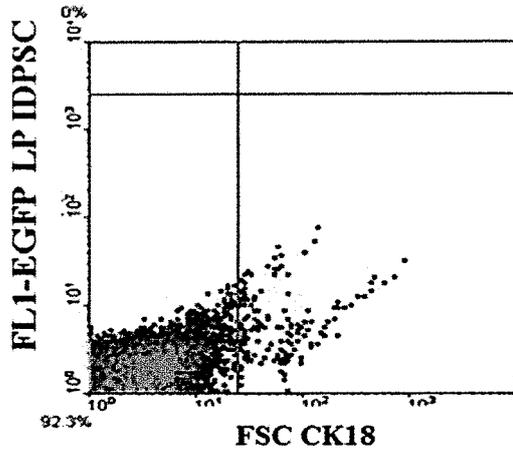
A)



B)



C)



D)

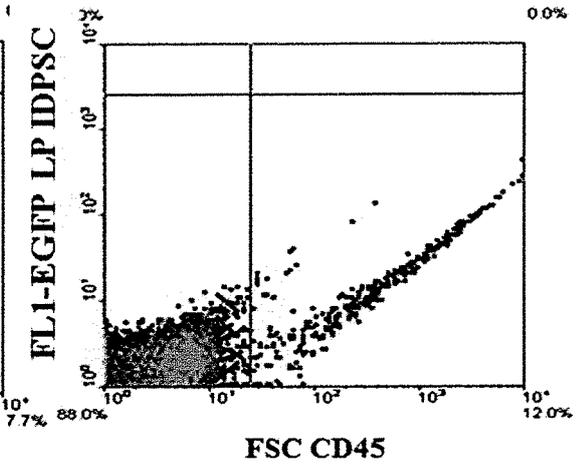


FIGURA 72

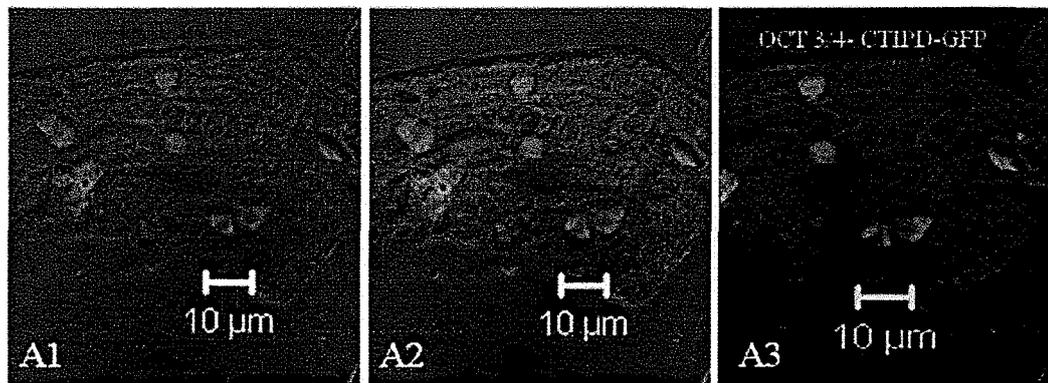
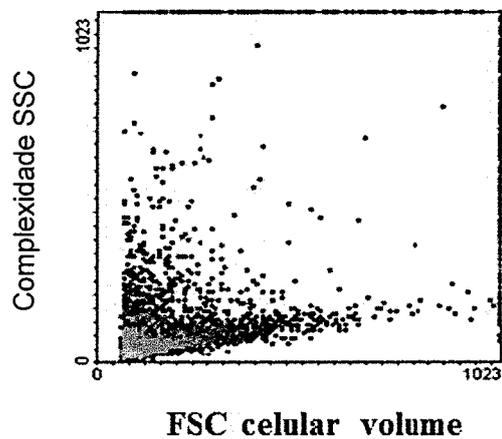
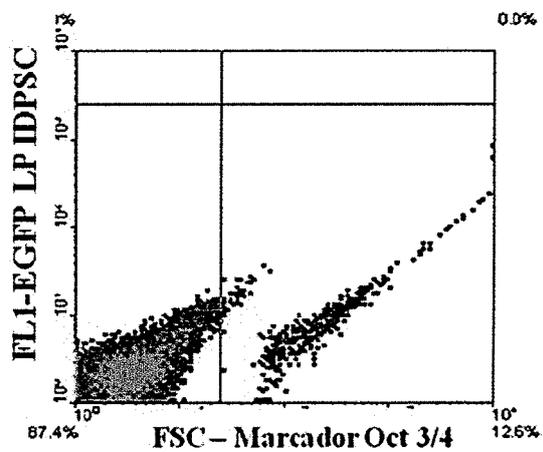


FIGURA 73

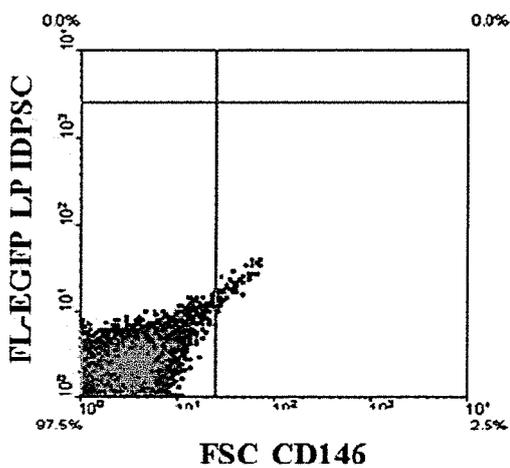
A)



B)



C)



D)

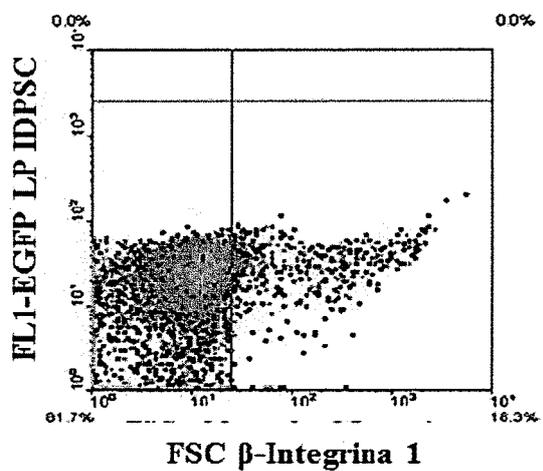


FIGURA 74

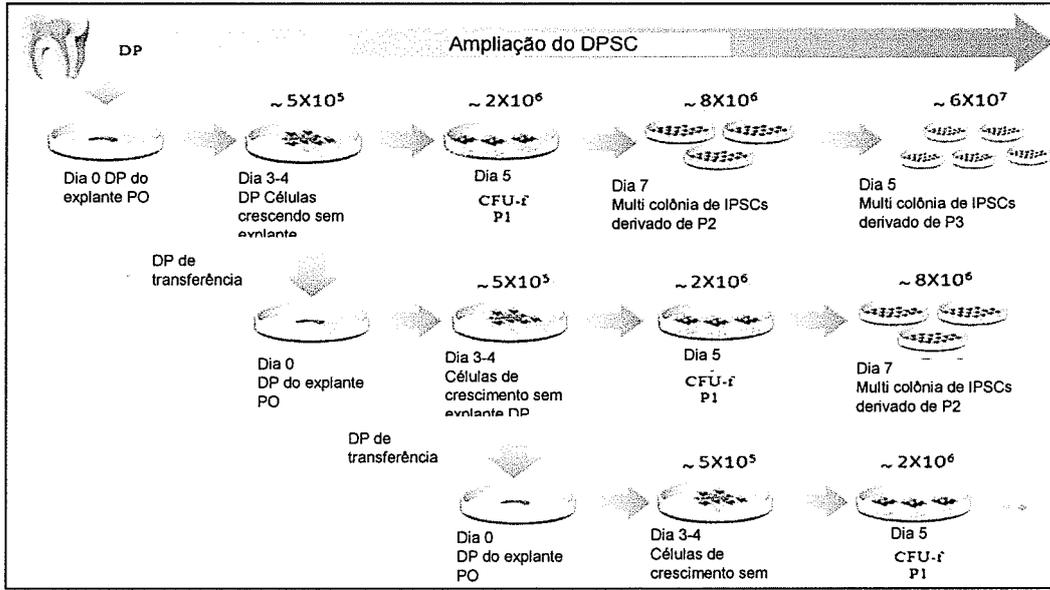


FIGURA 75

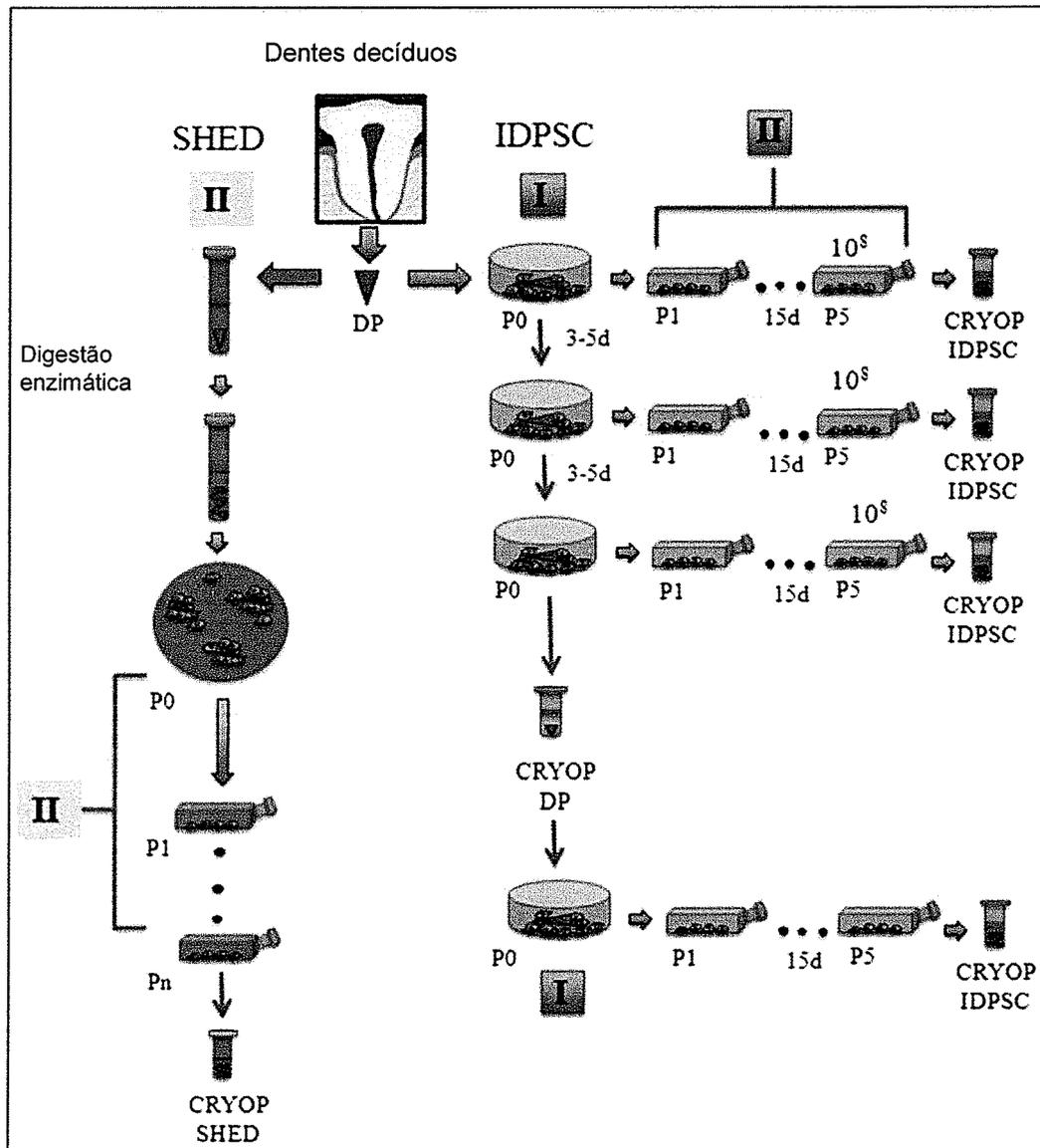


FIGURA 76

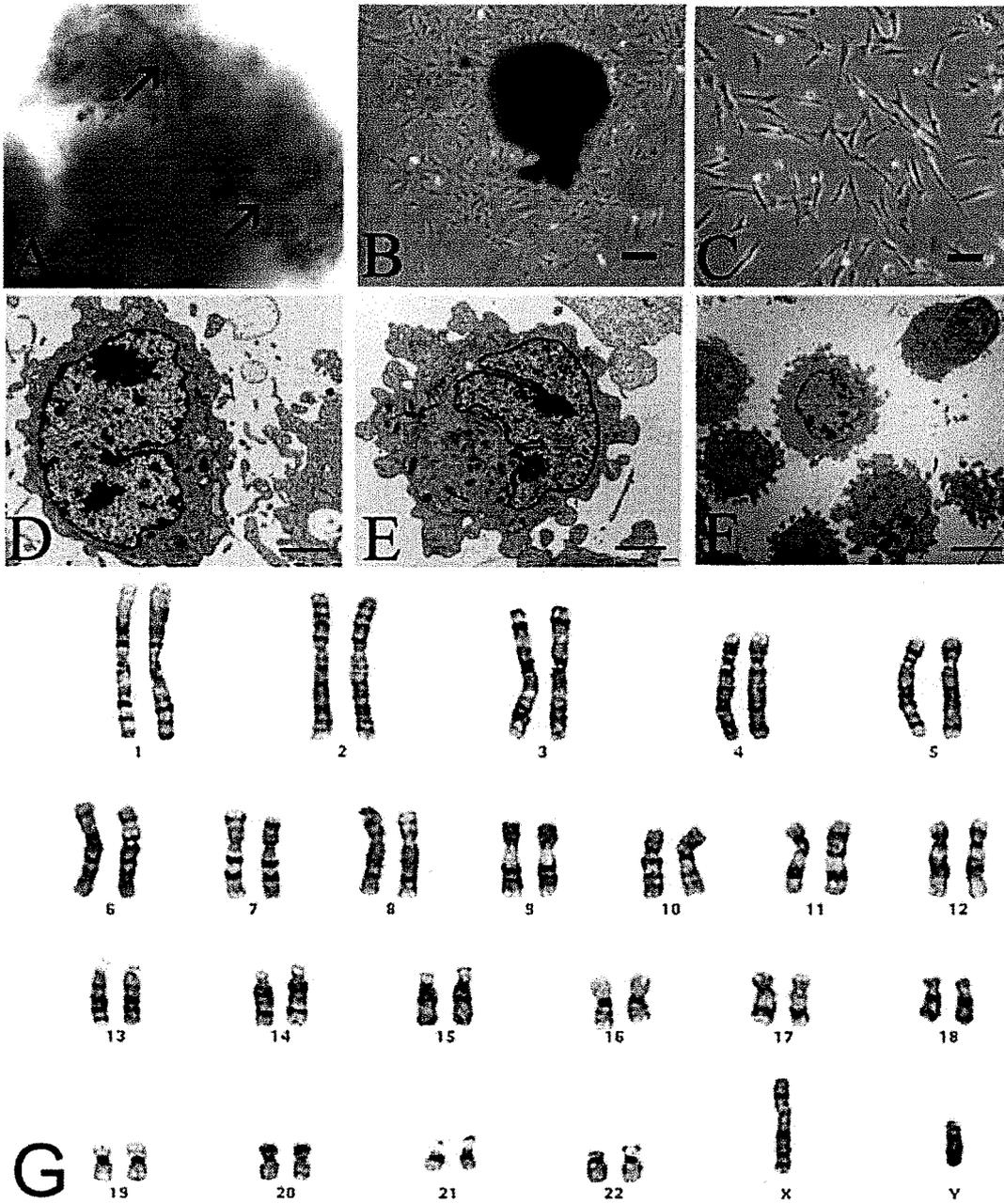


FIGURA 77

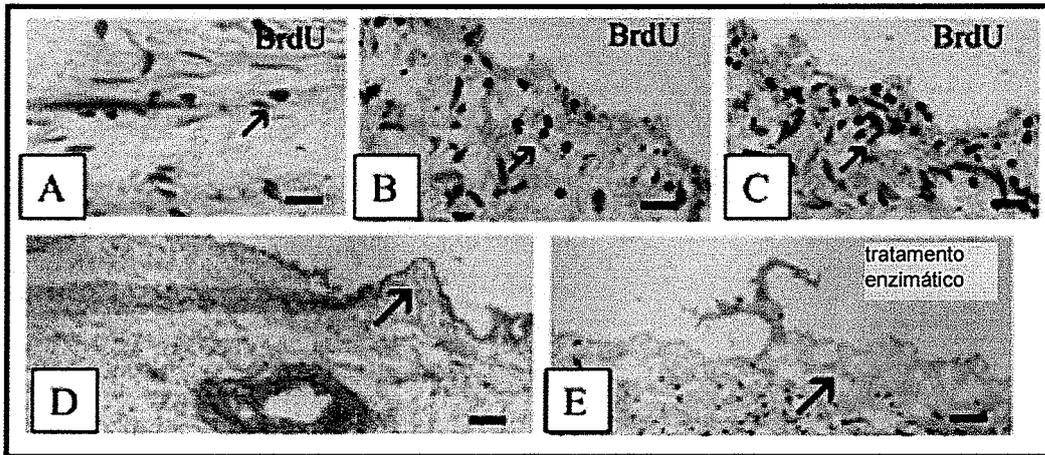


FIGURA 78

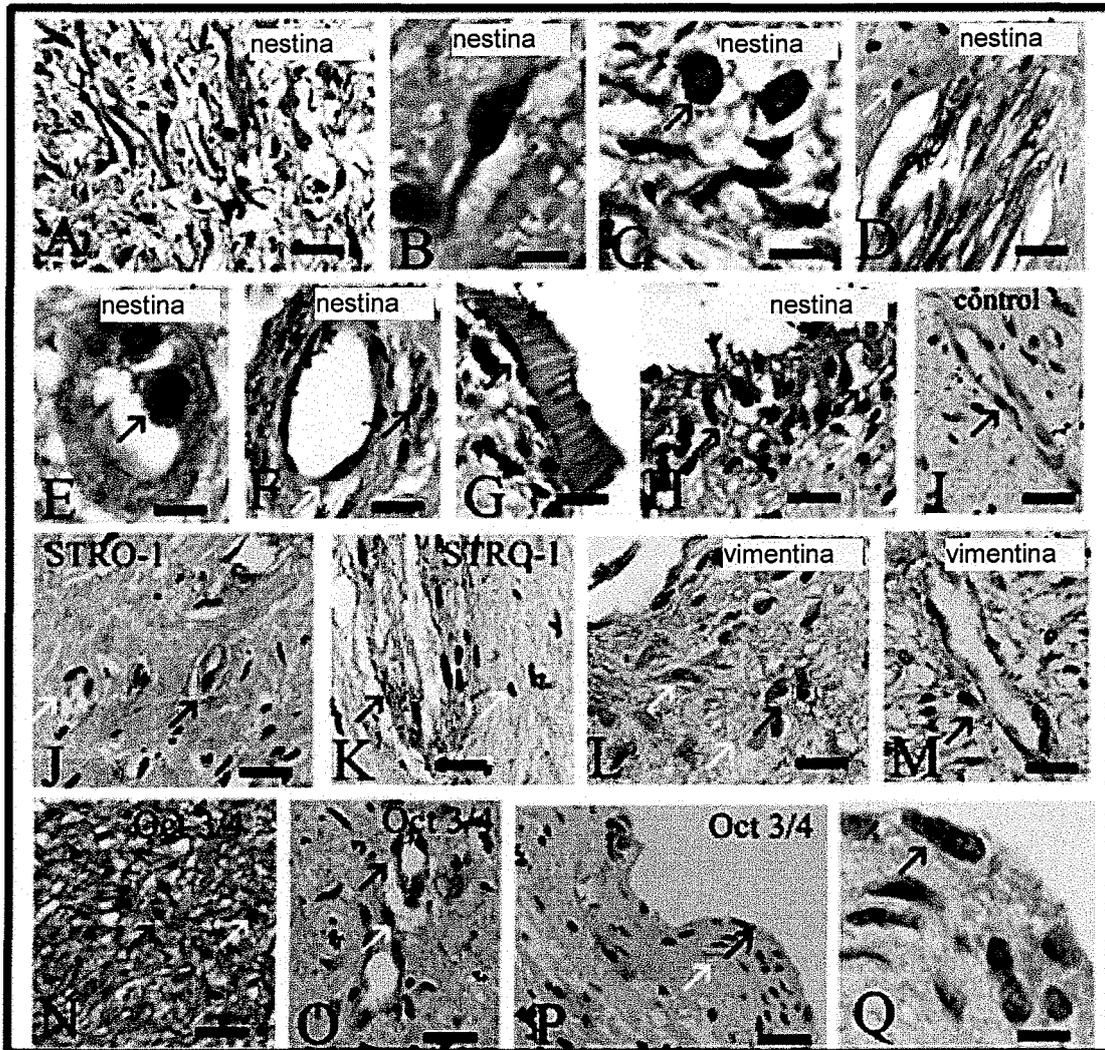


FIGURA 79

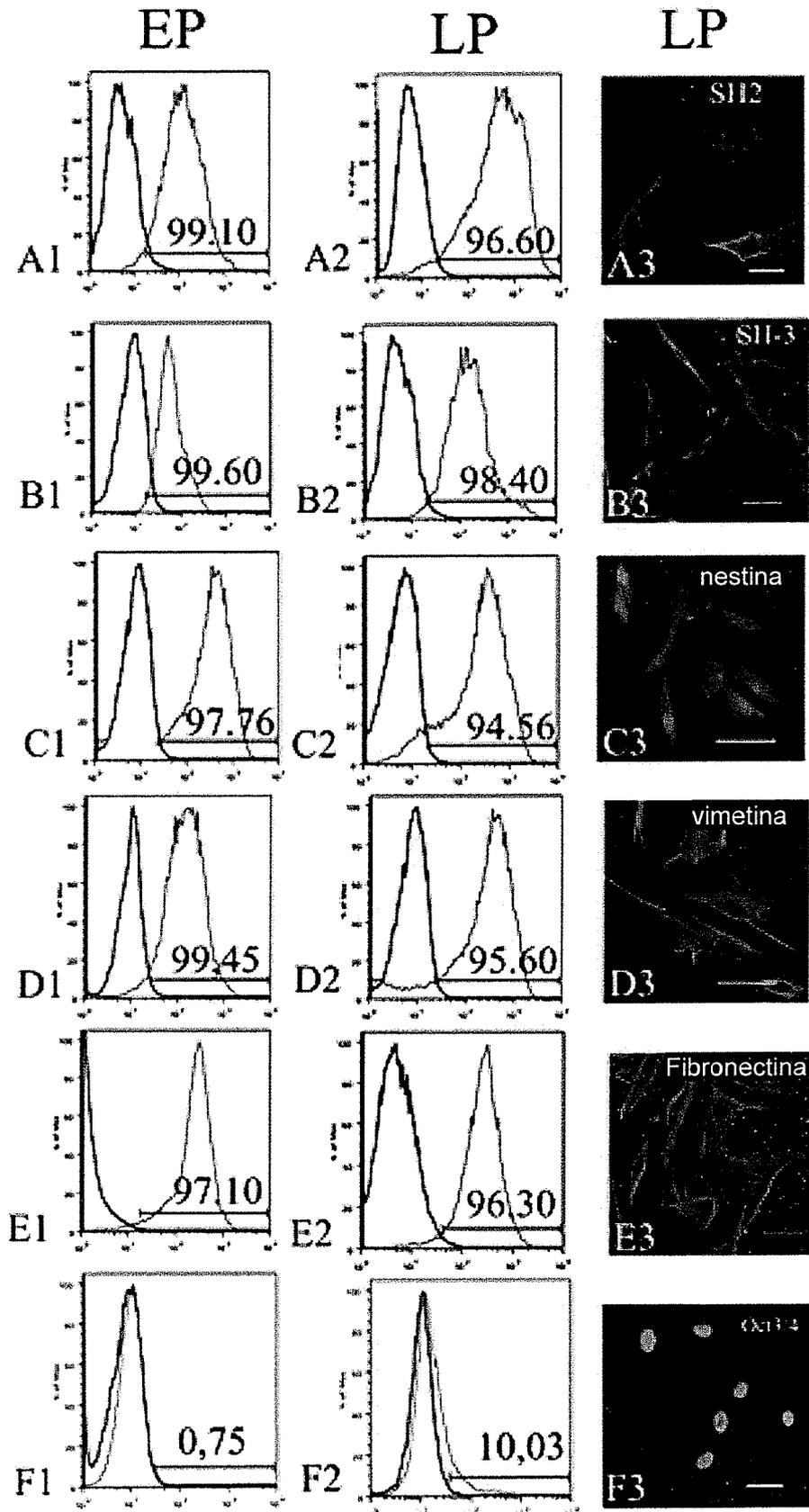


FIGURA 80

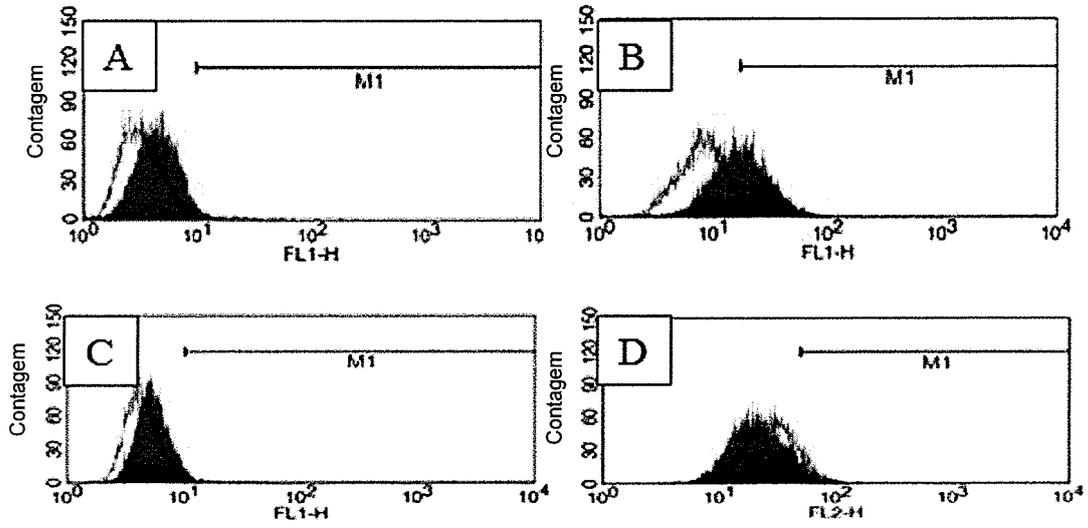


FIGURA 81

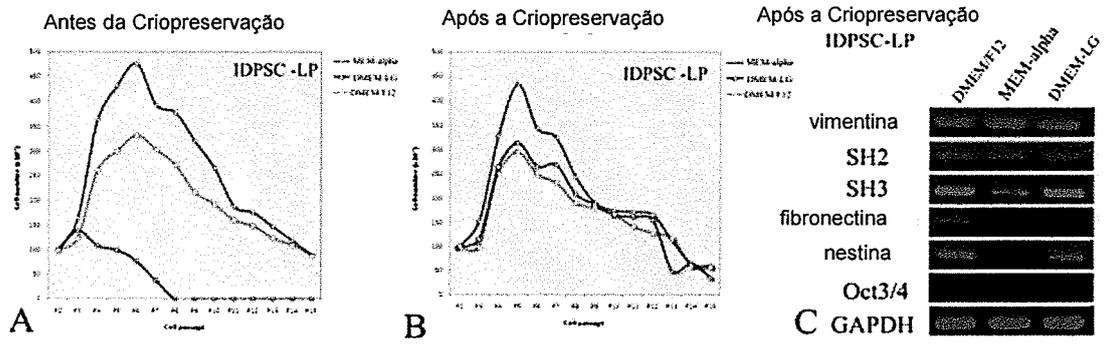


FIGURA 82

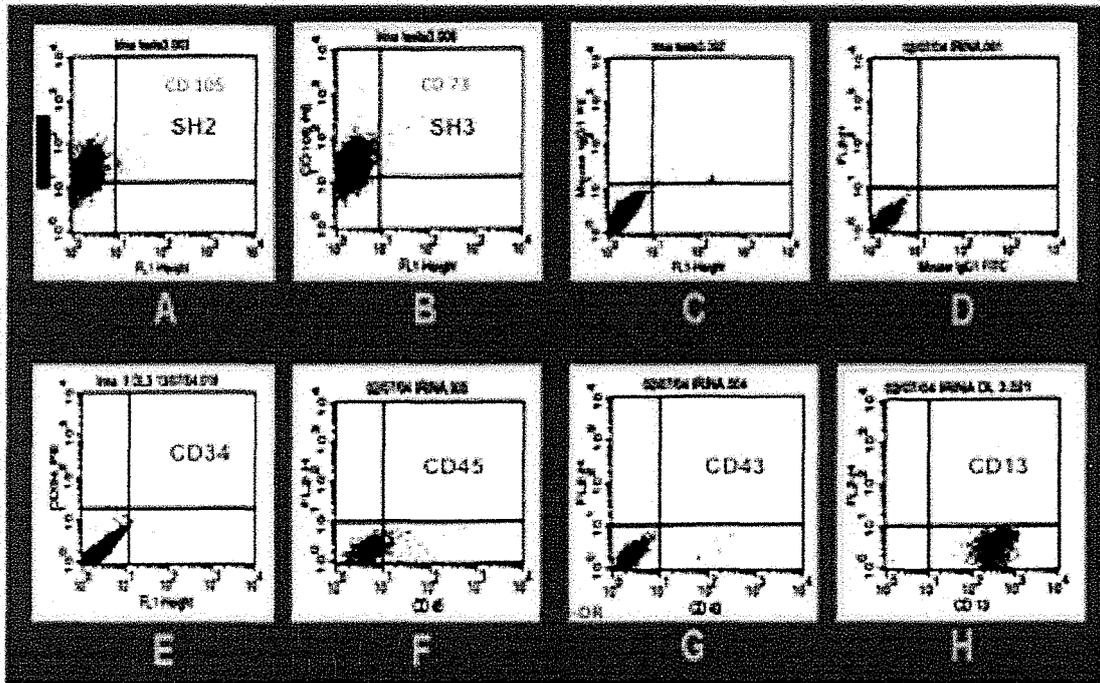


FIGURA 83

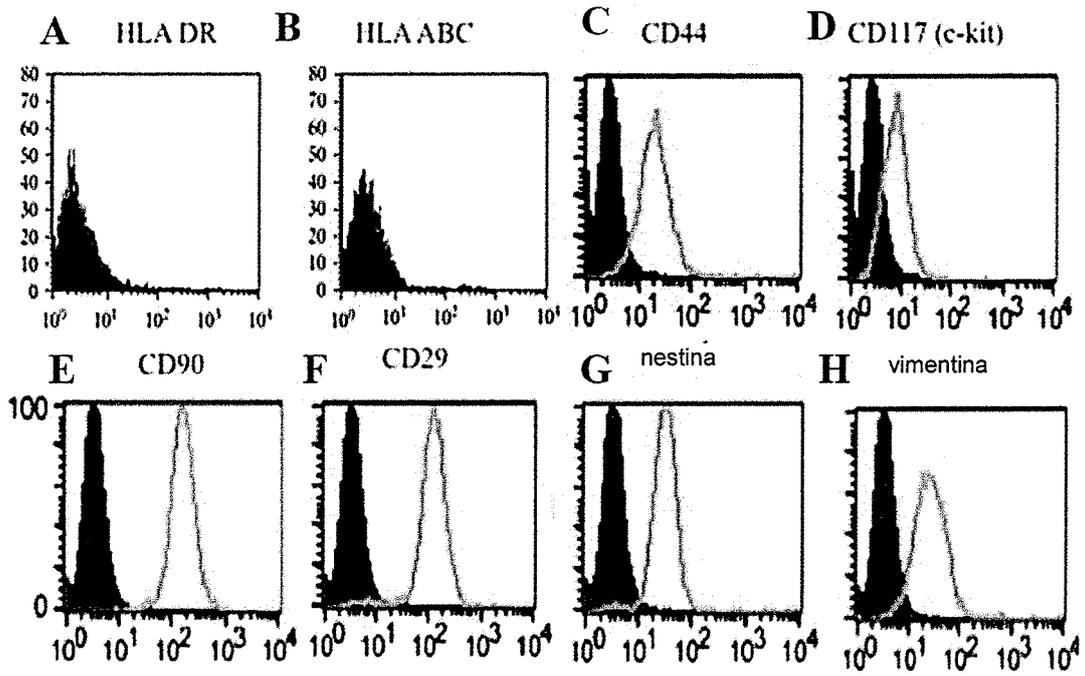


FIGURA 84

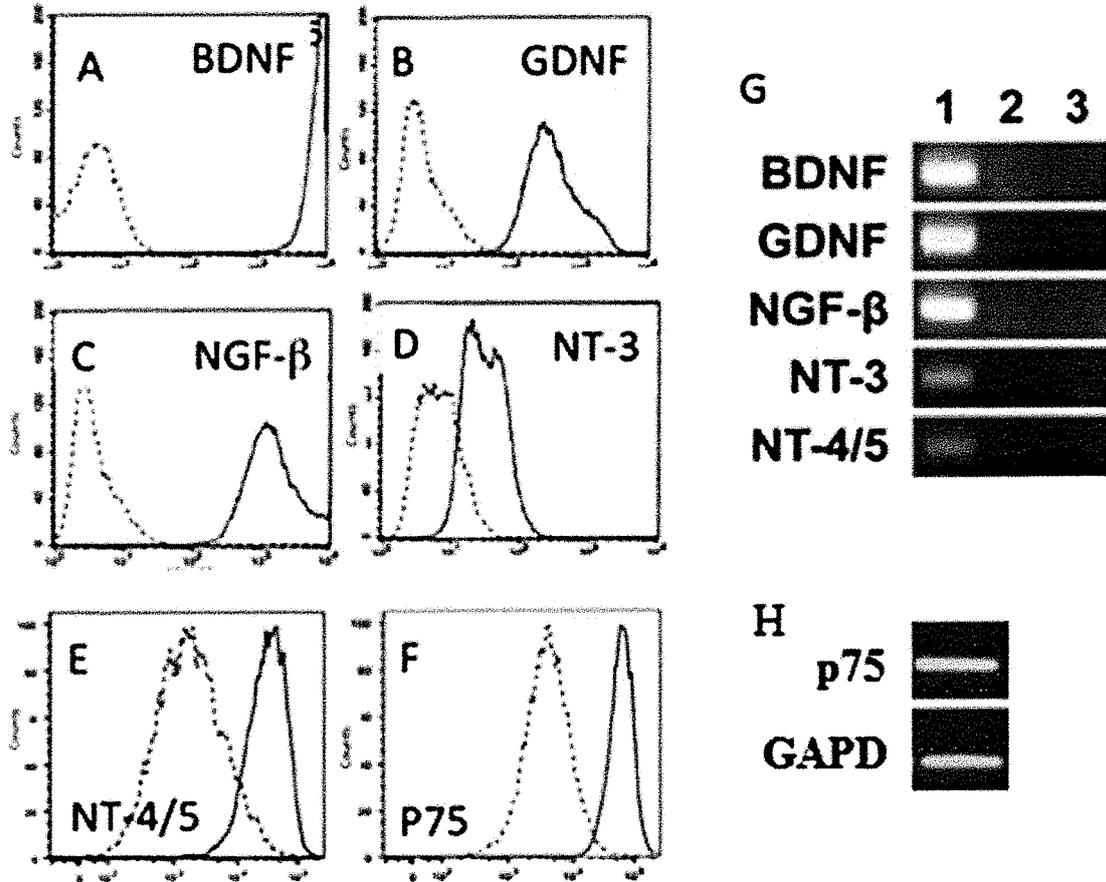


FIGURA 85

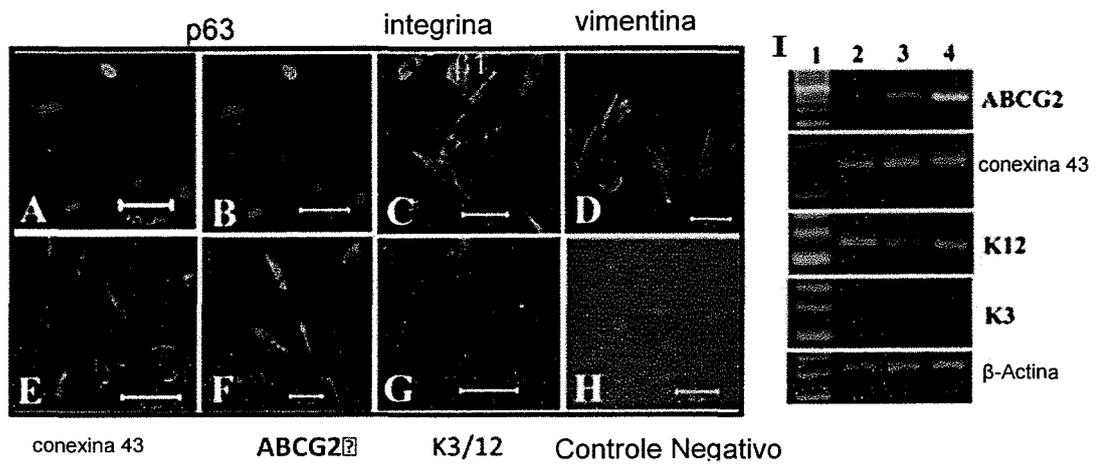


FIGURA 86

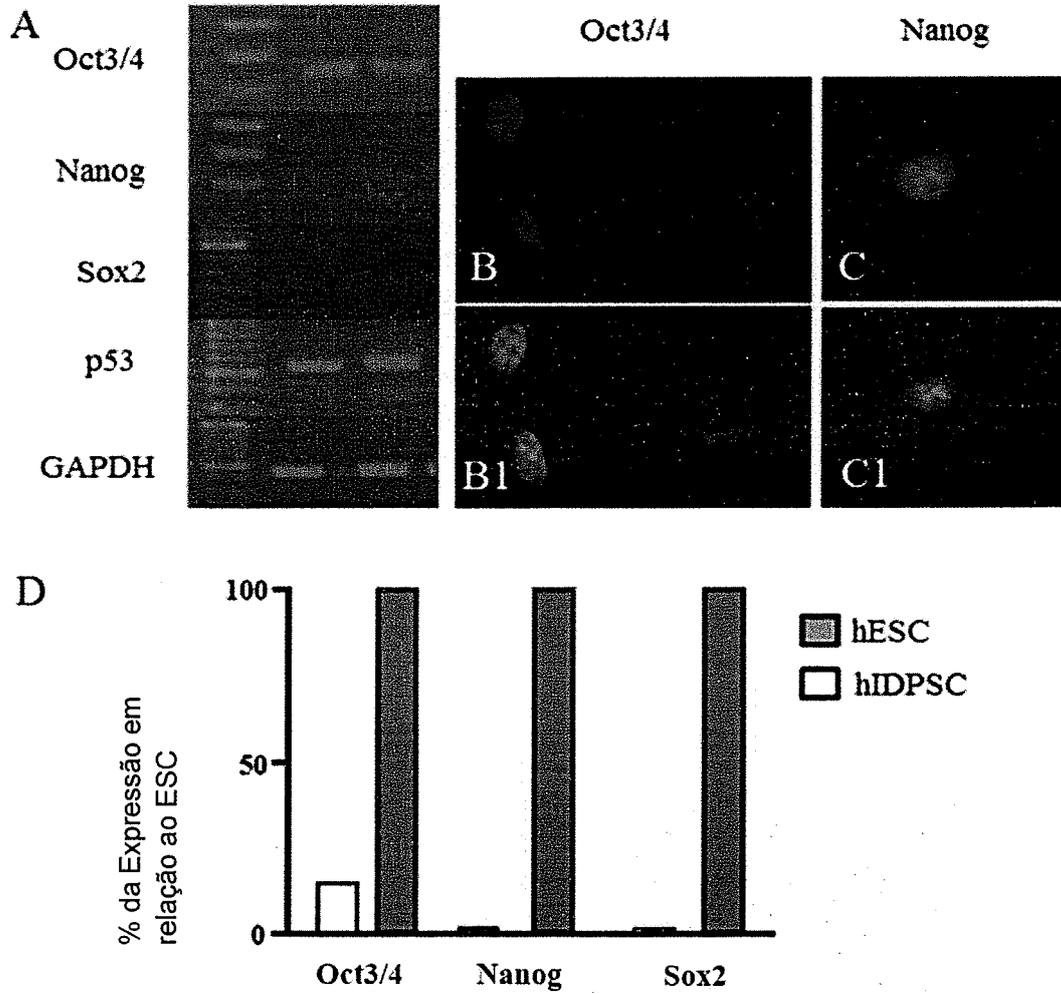


FIGURA 87A

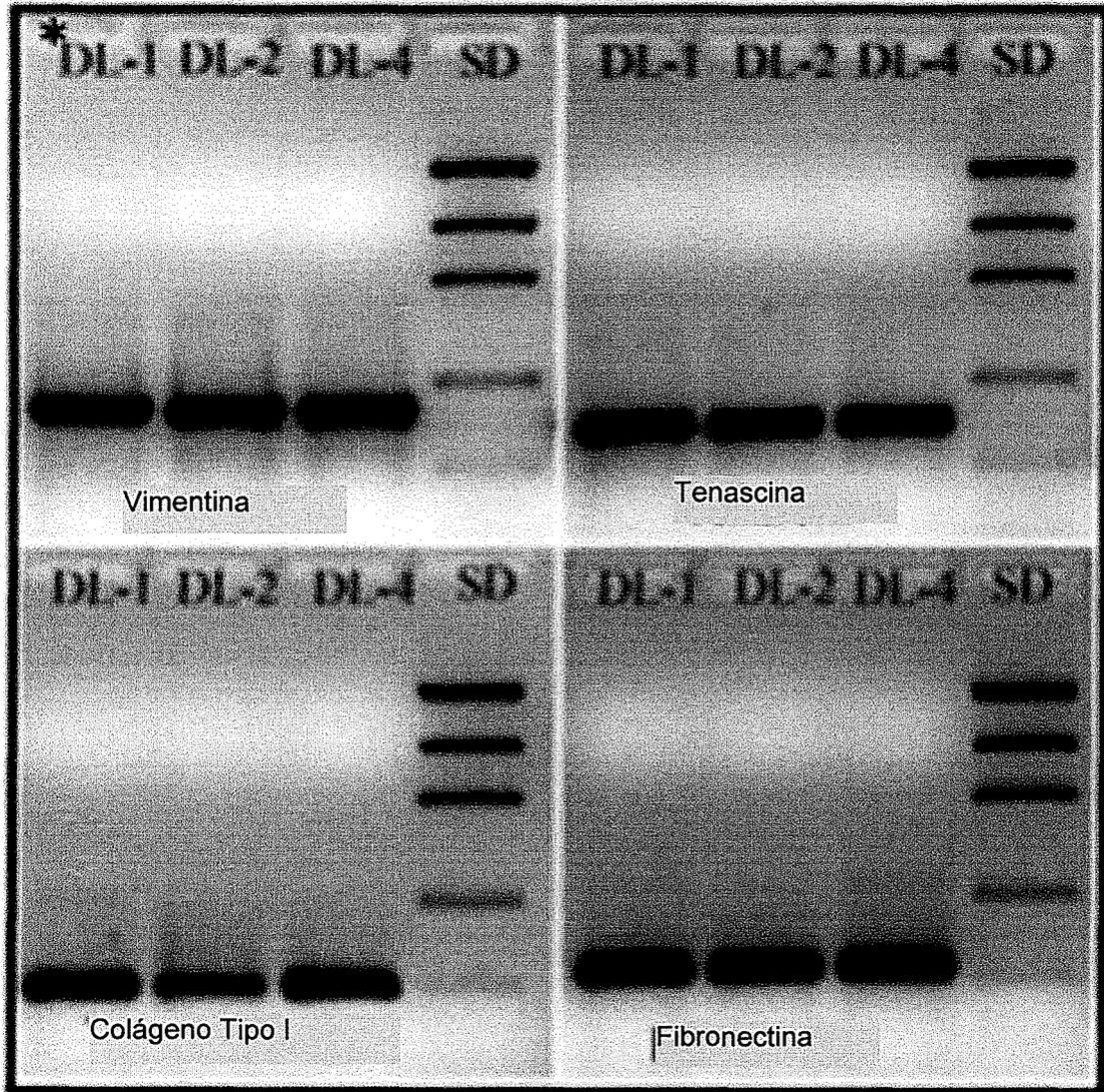


FIGURA 87B

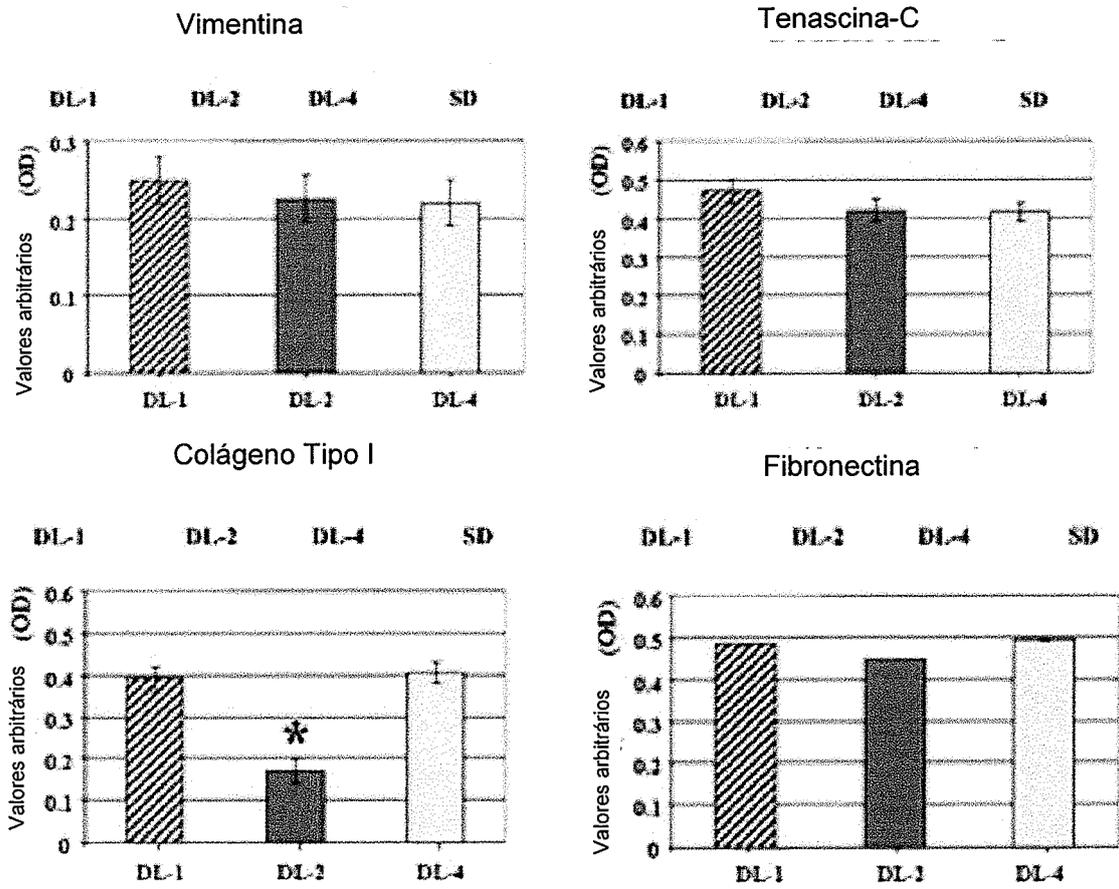


FIGURA 88

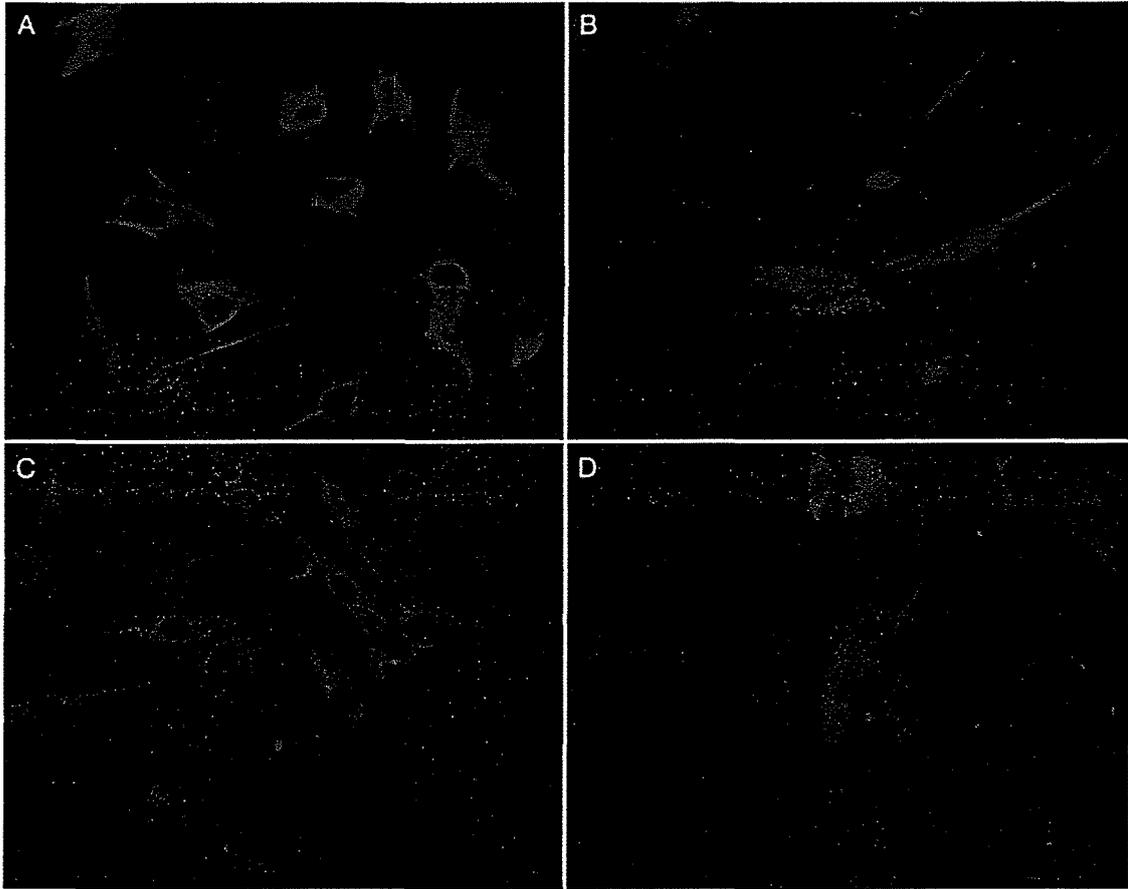


FIGURA 89

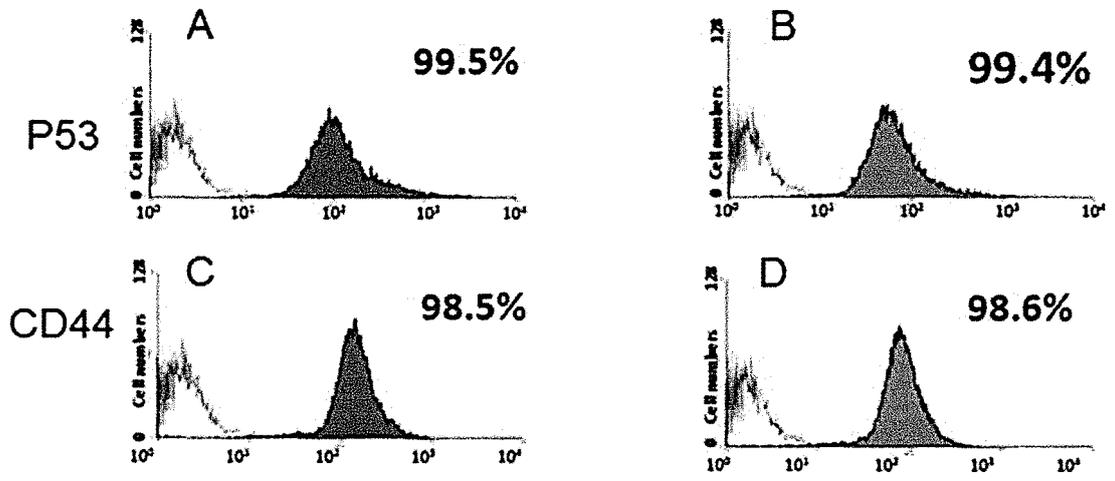


FIGURA 90

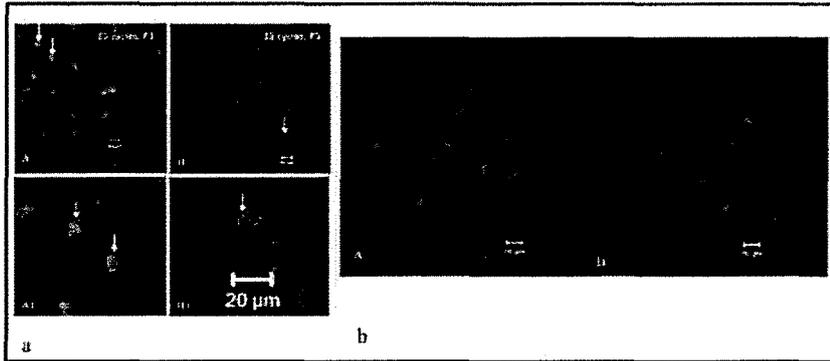


FIGURA 91

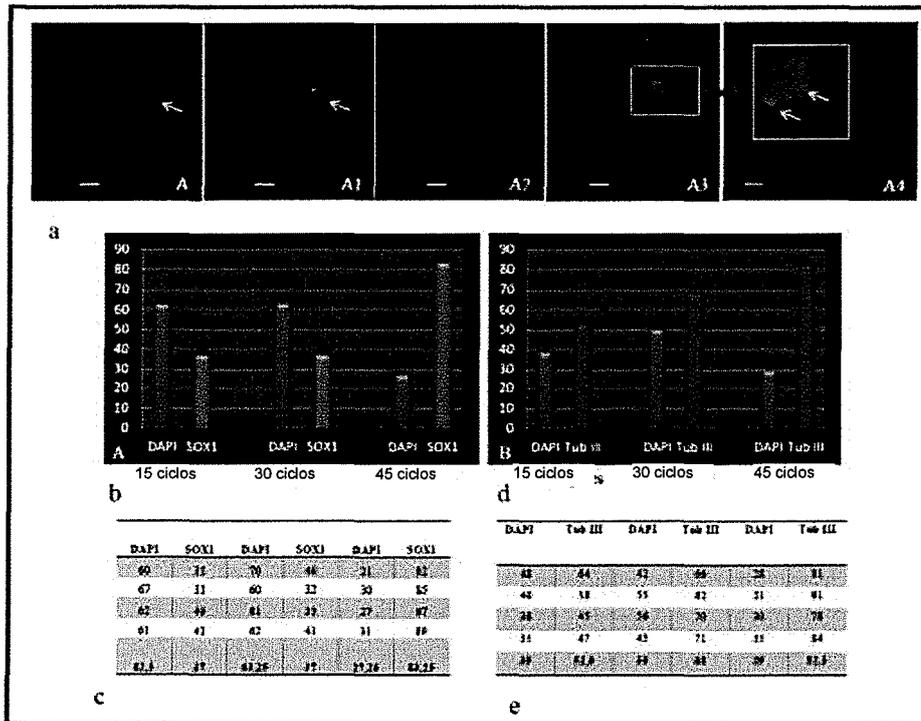


FIGURA 92

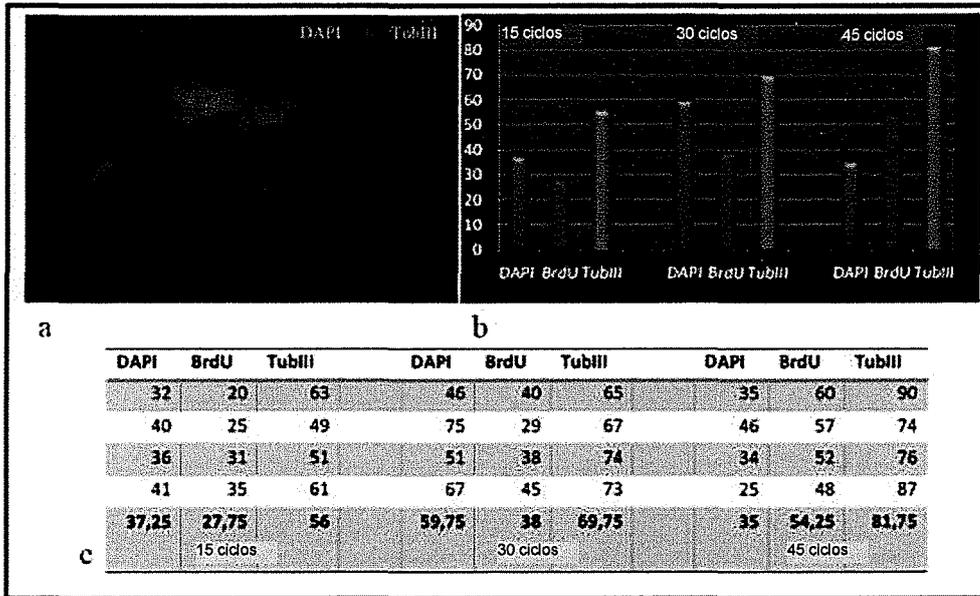


FIGURA 93

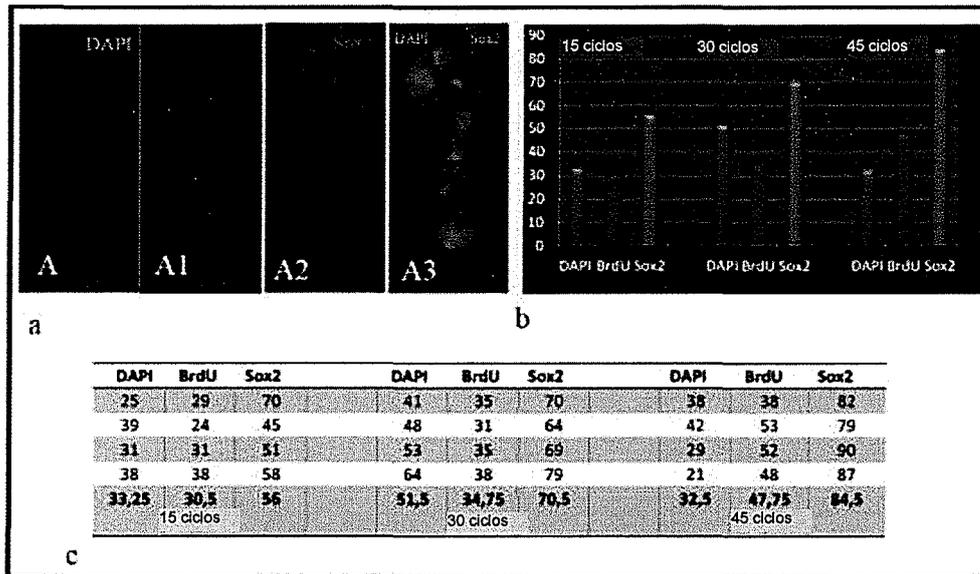


FIGURA 94

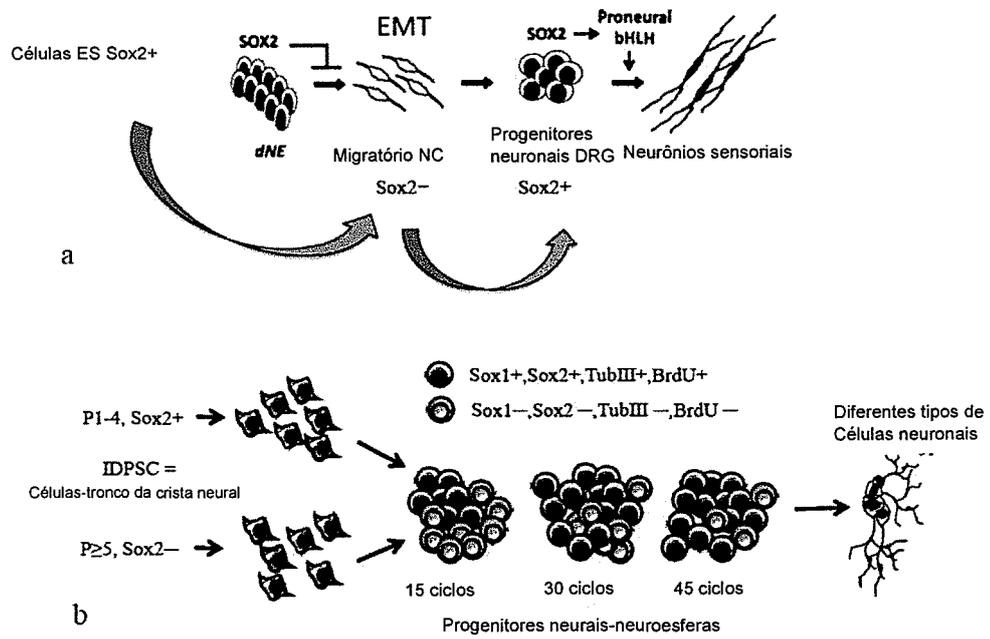


FIGURA 95

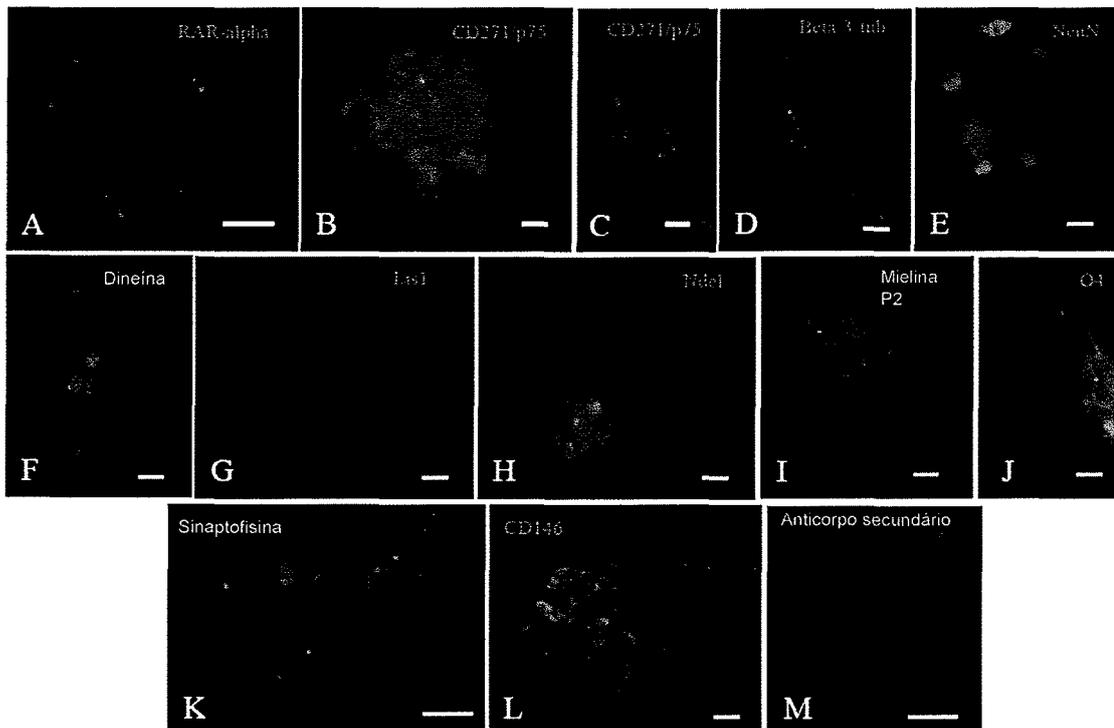


FIGURA 96

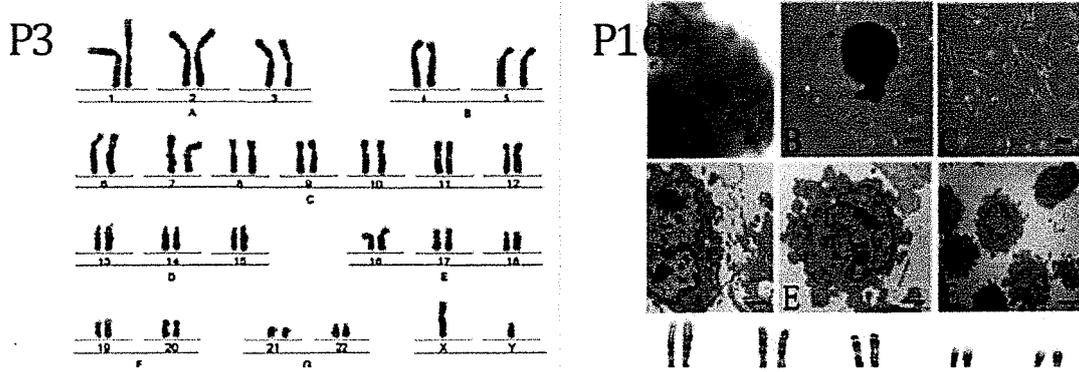


FIGURA 97

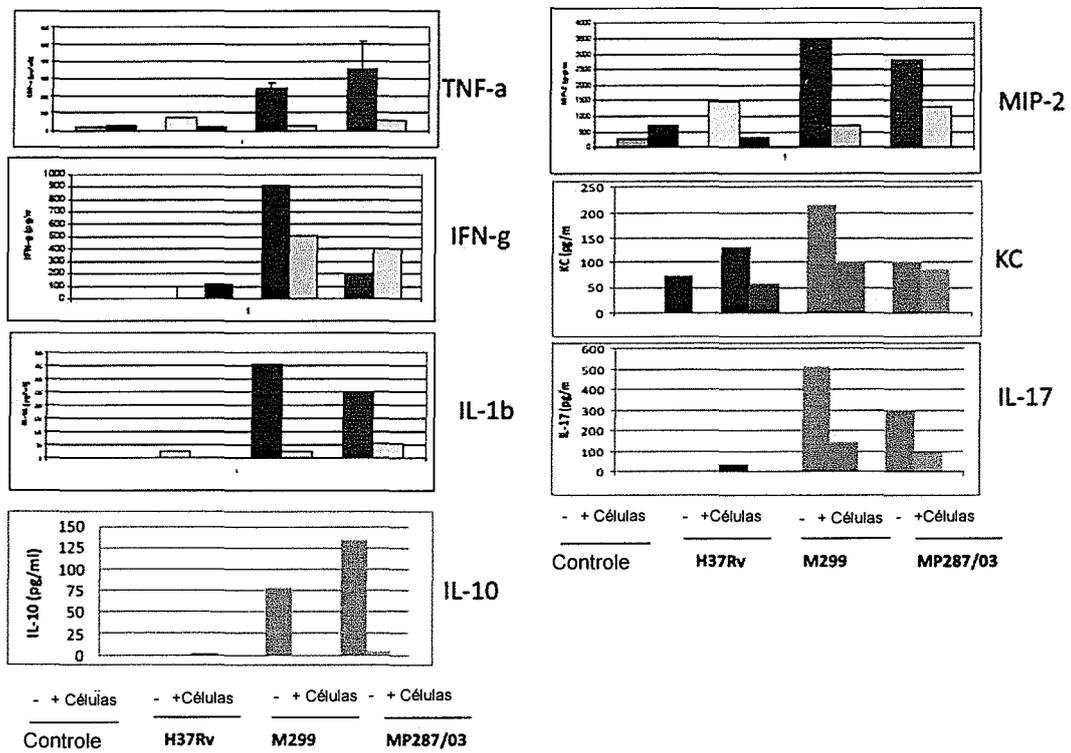


FIGURA 98  
CD105/HE

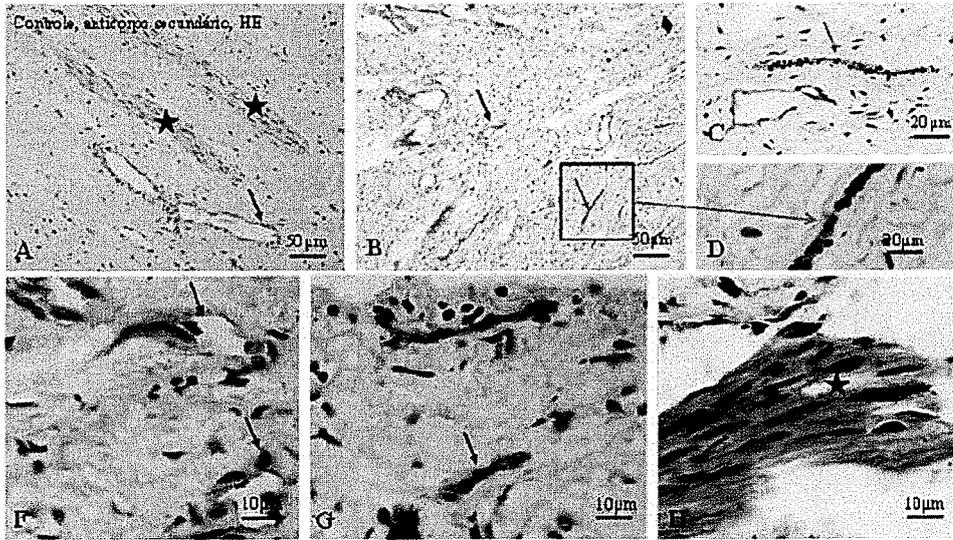


FIGURA 99

CD73/SH3

CD73/SH4

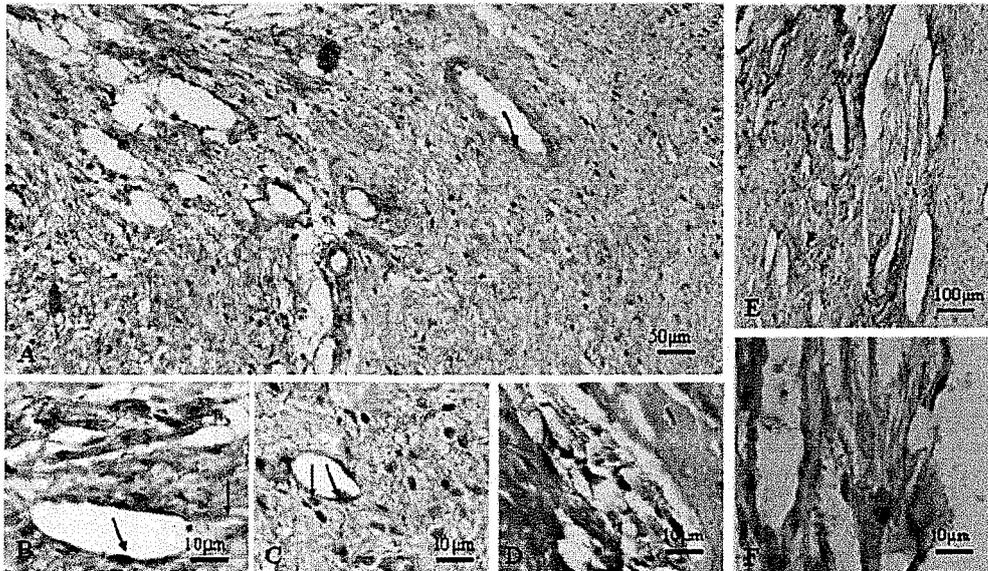


FIGURA 100

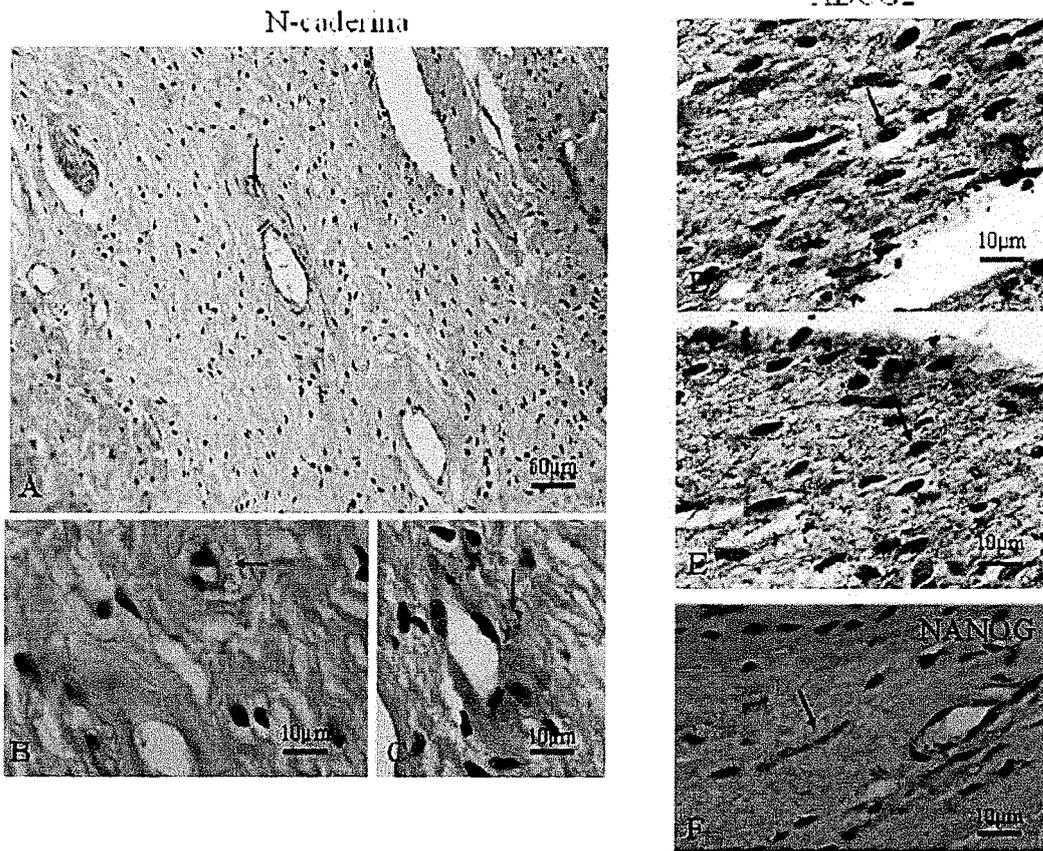


FIGURA 101

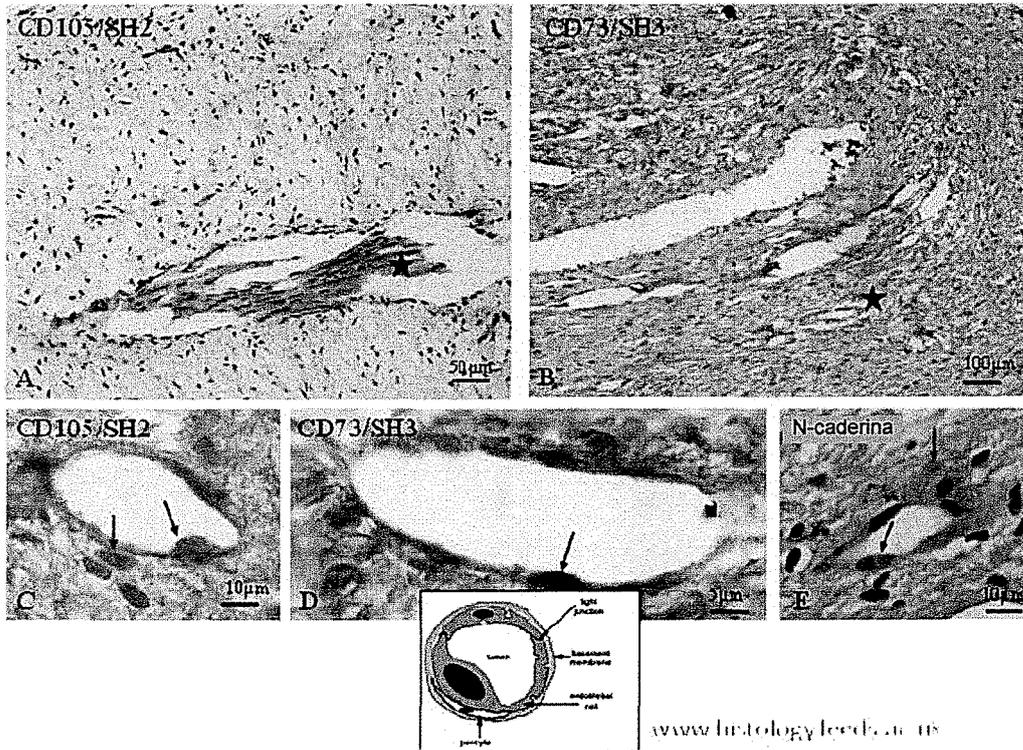
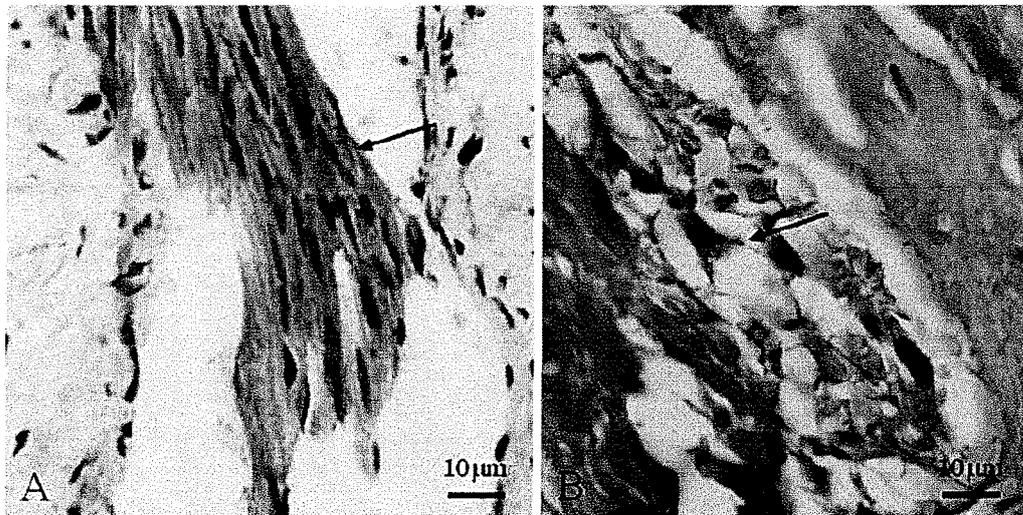


FIGURA 102



99/100

FIGURA 103

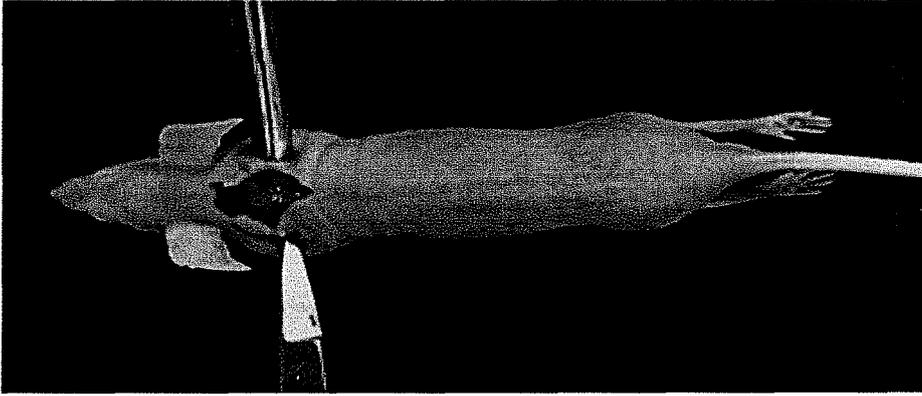


FIGURA 104

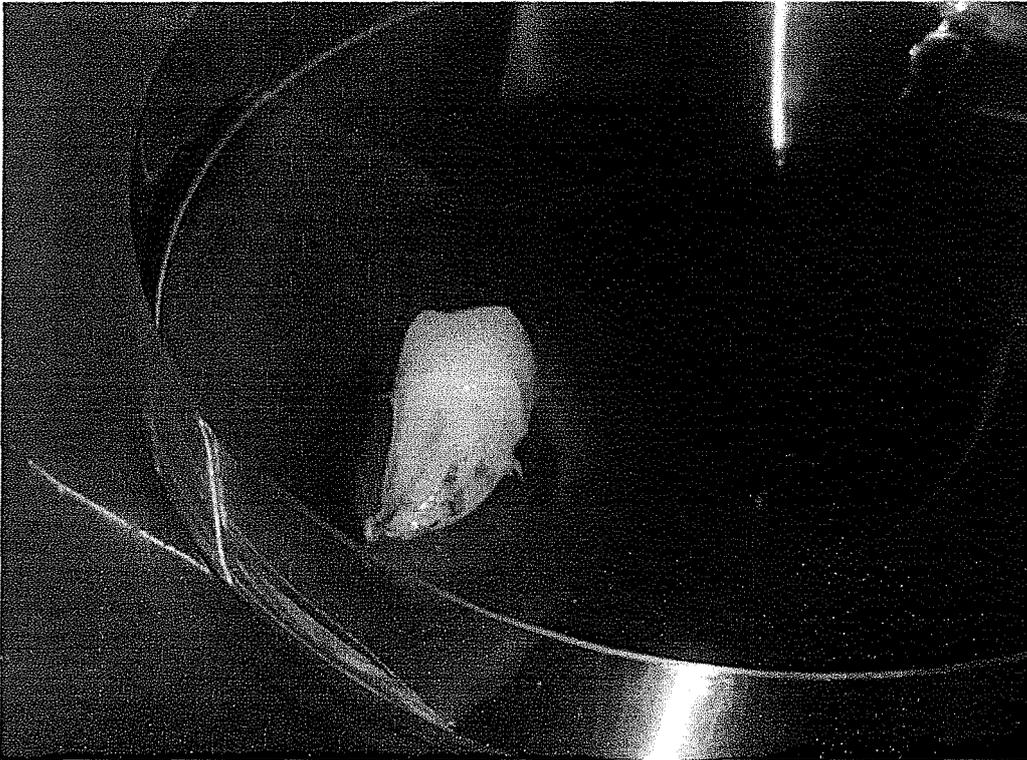
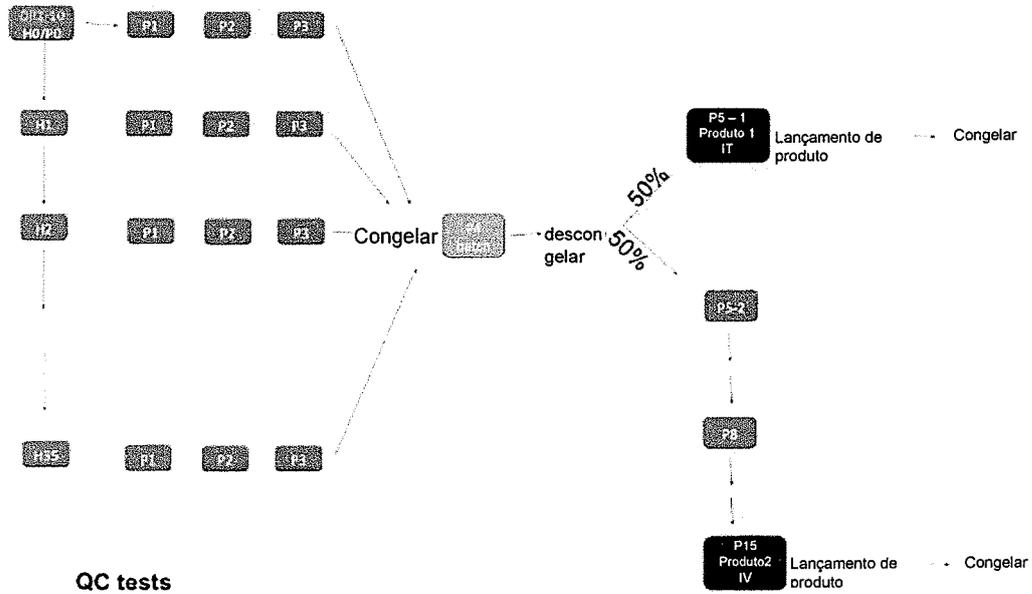


FIGURA 105



**QC tests**

- Análise do cariótipo      **P3, P15**
- Teste de Micoplasma      **P3 (PCR), P5, P15 (HyLab)**
- Morfologia                **P3, P15**
- Ensaio de proliferação MTT **P3, P15**
- CFU                         **P3, P15**
- FACS                        **P3, P15**