

Beatriz Dal Pont Duarte

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ECTOMESEENQUIMAL DAS CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Duarte, Beatriz Dal Pont

Avaliação do potencial ectomesenquimal das células da
polpa dentária / Beatriz Dal Pont Duarte ; orientador,
Andréa Gonçalves Trentin ; co-orientador, Ricardo Castilho
Garcez. - Florianópolis, SC, 2013.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

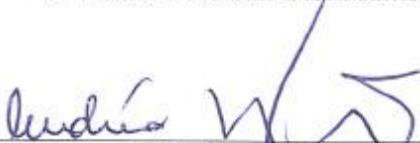
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células
tronco. 3. Polpa dentária. I. Trentin, Andréa Gonçalves.
II. Garcez, Ricardo Castilho. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

"Avaliação do potencial ectomesenquimal das células da polpa dentária" por

Beatriz Dal Pont Duarte

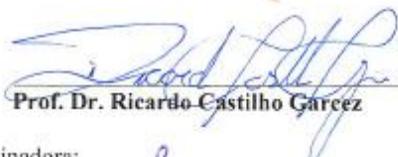
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pela Orientadora, Coorientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientadora:



Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Coorientador:

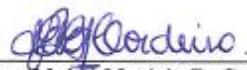


Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Comissão Examinadora:



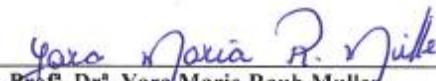
Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
PTL/CCS/UFSC



Prof. Dra. Mariela R. Cordeiro
MOR/CCB/UFSC



Prof. Dra. Yara Maria Rauh Muller
BEG/CCB/UFSC



Prof. Dr. Yara Maria Rauh Muller
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento
Florianópolis, 21 de maio de 2013.

*Dedico este trabalho ao meu
marido Jakson, meu eterno
amor, companheiro e amigo.*

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Andréa Gonçalves Trentin, por ter me acolhido e me orientado nesses seis anos de laboratório. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Ricardo Castilho Garcez, minha eterna gratidão pela paciência, pelos conselhos, discussões que contribuíram tanto para o meu desenvolvimento acadêmico. Tenho certeza que um dia descobriremos o porquê da zebra ser listrada!

Aos demais professores do Lacert, Dr. Giordano Wosgrau Calloni e Dr. Márcio Alvarez Silva, pelo incentivo, confiança e apoio à minha formação científica.

Aos professores da pós-graduação, que contribuíram para meu crescimento acadêmico e em especial as coordenadoras da pós nesse período, Prof^ª. Dr^ª. Iliada Rainha De Souza e Prof^ª. Dr^ª. Yara Maria Rauh Muller.

Ao professor Dr. Filipe Modolo Siqueira que prontamente me ajudou e me ensinou técnicas fundamentais para a realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à professora Dr^ª. Michelle Tillmann Biz, peça fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada por tudo! Pelo apoio técnico e muitas vezes emocional, por estar sempre disposta a me ajudar quando necessitei! Serei eternamente grata!

Aos tantos amigos que eu encontrei nesses seis anos de Lacert, Fernanda, Camila, Meline, Addeli, Diana, Diego, Mari, Raul, Bruna, Bianca, Suelem, Bi-K, Zucco, New, Denise, Cecilia, Michele, Priscila, Bibiane e Patrícia. Vocês foram fundamentais em todo esse período. Obrigada por todos os momentos de apoio durante muitas fases de preocupação, por todos os risos, conversas, cafezinhos e jantinhas. Sentirei saudades!

Ao Aloisio, por me acalmar em tantos momentos em que eu não via solução para os problemas. Obrigada por suas palavras sempre sábias e carinhosas.

A Silvia que sempre me aconselhou e me ajudou pessoal e cientificamente. Desejo-te tudo que há de bom e mais sincero. Sentirei saudades das nossas conversas!

A Talita por todas as dúvidas tiradas, por toda paciência em me ajudar sempre que eu precisava, pelos almoços, cafezinhos, fofocas e risadas! Você sempre terá um parágrafo só seu!

Aos meus sogros Valcir e Marisa, e ao meu cunhado Ronaldo por terem me acolhido tantas vezes.

Aos meus pais, Américo e Salete. Vocês são o motivo de eu estar aqui. Agradeço todo esforço, amor e dedicação que vocês tiveram comigo. Amo muito vocês!

As minhas amigas mais sinceras, minhas irmãs, Rosiani e Giseli. Obrigada por todos os telefonemas chorosos que vocês aguentaram. Amo vocês demais!

Ao meu marido Jakson Manfredini Vassoler por todo amor, compreensão e apoio. Te amo muito e agradeço todos os dias por você estar ao meu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e também às agências financiadoras FAPESC, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), INTT e PRONEX/CNPq.

Resumo

A formação dentária ocorre através de interações sequenciais entre o epitélio oral e o mesênquima facial. O epitélio oral dá origem aos ameloblastos, enquanto a formação da polpa dentária é derivada das células mesenquimais. A maior parte do tecido mesenquimal na região cefálica é formado pelas células da crista neural (CN). A CN compreende uma população de células altamente multipotentes. Células tronco com característica da CN vem sendo encontradas em vários tecidos adultos como na polpa dentária humana de dentes permanentes. As células tronco encontradas na polpa dentária apresentam potencial de utilização para fins terapêuticos em diversas áreas médicas. Neste trabalho, avaliamos o potencial de diferenciação celular da polpa dentária, *in vivo* e *in vitro*, durante o desenvolvimento embrionário e em adultos. Para esse fim, lâminas histológicas de dentes de ratos foram analisadas, através de imunohistoquímica, em 3 fases do desenvolvimento: idade fetal de 17 dias (F17), 4 dias após o nascimento (D4) e em idade adulta. As análises ocorreram por imunohistoquímica para os marcadores de pluripotencialidade (Oct4 e Nanog) e de CN (Sox10, HNK1 e p75). Além disso, células da polpa dentária humana obtida de terceiros molares de indivíduos adultos foram analisadas por RT-PCR para os mesmos marcadores de pluripotencialidade e para os marcadores de CN Sox10, p75, Nestina e Snail. Estas células foram ainda cultivadas em meio de cultura padrão (α MEM acrescido de SFB a 10%) e meio indutivo neural (MCTN) e analisadas por imunocitoquímica para os marcadores de pluripotencialidade descritos acima, marcadores neurais (Nestina e β Tubulina III) e marcador mesodermal (α SMA) e ainda para a capacidade de originar Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Os resultados demonstram que as células da PD de ratos expressam os marcadores de pluripotencialidade Oct4 e Nanog, assim como o marcador de CN Sox10, em F17, D4 e no adulto. Marcação para p75 e HNK1 foram observados em D4 e no adulto respectivamente. Os resultados demonstraram ainda que as células da PD adulta de humanos apresentam expressão gênica dos marcadores de pluripotencialidade analisados e de CN Sox10, Snail e Nestina. Após cultivo, as células de apresentam expressão proteica de OCT4, dos marcadores neurais (ectodermis) β TubulinaIII e Nestina, e de músculo liso (mesodermal) α SMA. Além disso, as células de PD apresentam capacidade clonogênica, originando colônias com potencial ectomesenquimal (com células positivas para α SMA, β TubulinaIII e Nestina). O cultivo em meio indutivo neural promoveu alterações

morfológicas, e diminuição na proporção de células positivas para α SMA. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a PD contém população de células multipotentes, clonogênicas com potencial ectomesenquimal, aparentando estarem presentes desde o início do desenvolvimento até a fase adulta. Ao mesmo tempo, essas células apresentam potencial de diferenciação neural. Desse modo, nossos dados demonstram que as células da PD apresentam um real potencial terapêutico.

Palavras Chave: Células tronco, polpa dentária, crista neural.

Abstract

Tooth morphogenesis occurs through sequential interactions between the oral epithelium and adjacent mesenchyme. The oral epithelium gives rise to ameloblasts while the dental pulp (DP) is derived from mesenchymal cells. It is accepted that mesenchymal cells are originated from neural crest (NC) cells. The NC corresponds to a population of multipotent cells that gives rise to a variety of cell types. Stem cells (SC) with NC characteristics have been found in adult tissues including human adult DP. It has been proposed that DP-derived SC could be used for therapeutic purposes in various medical fields. In the present study, we have analyzed, both *in vivo* and *in vitro*, the differentiation potential of DP-derived SC cells, during embryonic development and in adult tissue. Therefore, histological slides of rat's teeth were immunohistochemistry examined at day 17 of fetal age (F17), at day 4 after birth (D4) and in adulthood for markers of pluripotent cells (Oct4 and Nanog), of NC (SOX10, HNK1 and p75). Furthermore, human adult DP cells was obtained from third molars and analyzed by RT-PCR for markers of pluripotency (Oct4 and Nanog) and NC cell markers (SOX10, p75, nestin and Snail). In addition, human adult DP cells obtained from third molars were cultured at both low and high passages in standard medium (α MEM plus 10% FCS) and in neural inductive medium (NIM) and analyzed by immunocytochemistry and for the Colony Forming Unit (CFU) capacity. Immunohistochemical analysis revealed the expression of Oct4 and Nanog by PD cells in F17, D4 and adult. Similar results were obtained for the NC marker SOX10, whereas p75 and HNK1 (another NC cell marker) were found in at least one stage of PD development. RT-PCR analysis revealed that human PD also expresses the mRNA of Nanog, Oct4, SOX10, p75, Snail and nestin. Furthermore, adult human DP cells in culture also express OCT4 (cytoplasmic distribution) in addition to ectodermal (β TubulinaIII, nestin) and mesodermal (α SMA) markers. In addition, CFUs assay showed that DP cells have clonogenic capacity, which is a characteristic of pluripotent stem cells. Some colonies included cells positive for the three analyzed markers: α SMA, nestin and β TubulinaIII, demonstrating the ectomesenchymal potential of DP cells. Further, morphological alterations and decreased expression of α SMA were observed in cells maintain in NIM. Taken together, our results suggest that DP cells contain a population of multipotent cells with clonogenic capacity and ectomesenchymal potential. This characteristic could be found from the embryo to the adult. When these cells are maintained in NIM they

present a possible differentiation state of neural progenitors. Thus, our data demonstrate that DP cells have a real therapeutic potential.

Key words: Stem cells, dental pulp, neural crest.

Lista de Abreviaturas

- α MEM: α -modified minimum essential
 α SMA: α -actina de músculo liso (α -smooth muscle actin)
 β TubIII: β TubulinaIII
BMP: Proteína Morfogênica Óssea (*Bone morphogenetic protein*)
CN: Crista Neural
CTA: células tronco adultas
CTE: células tronco embrionárias
CTM: célula-tronco mesenquimal
CTPD: célula-tronco da polpa dentária
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol
D4: 4 dias após o nascimento
dNTP: Desóxi-ribonucleotídeos Trifosfatados
EGF: Fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth factor*)
F17: idade fetal de 17 dias
FGF: Fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblast growth factor*)
FITC: *Fluorescein isothiocyanate*
HNK1: *Human natural killer-1*
Ig: Imunoglobulina
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)
iPS: células tronco pluripotentes induzidas
MC: Meio Controle
MCTN: Meio para Células Tronco Neurais
Oct4: *Octamer-binding transcription factor 4*
PBS: Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PD: Polpa dentária
RT Transcriptase Reversa
SBF: soro bovino fetal
Sox2: *SRY (sex determining region Y)-box 2*
Sox10: *SRY (sex determining region Y)-box 10*
UFC: unidades formadoras de colônias

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo dos tecidos dentários.....	24
Figura 2. Esquema de um embrião demonstrando a migração das células da CN na região cefálica... ..	26
Figura 3. O desenvolvimento dentário nas suas diferentes fases.. ..	27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	38
Tabela 2. Anticorpos primários utilizados.....	40
Tabela 3. Anticorpos secundários utilizados.....	41

SUMÁRIO

1	Introdução	21
2	Revisão da Literatura	23
	2.1 Órgão dental	23
	2.1.1 Odontogênese	24
	2.2 Células tronco	29
	2.1.2 Células tronco mesenquimais	30
3	Objetivos	33
	3.1 Gerais	33
	3.2 Específicos:	33
4	Materiais e Métodos	35
	4.1 Análise Imunohistoquímica	35
	4.1.1 Confecção das lâminas histológicas	35
	4.1.2 Imunohistoquímica	36
	4.2 Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	37
	4.3 Obtenção de células da polpa dentária.....	38
	4.4 Meio de cultivo de células tronco neurais humanas (MCTN).....	39
	4.5 Ensaio Clonogênico	39
	4.5.1 Imunocitoquímica.....	40
	4.6 Análise Estatística	40
5	Resultados	43
	5.1 Análise da Expressão de marcadores de células tronco durante o desenvolvimento dentário	43
	5.1.1 Análise da expressão de marcadores de pluripotencialidade	43
	5.1.2 Análise da expressão de marcadores de células da Crista Neural	43
	5.2 Análise da expressão de marcadores de células tronco na polpa dentária adulta de humanos	44
	5.3 Cultivo de CTPD humana e análise do potencial ectomesenquimal	44
	5.4 Análise da capacidade clonogênica.....	45
	5.4.1 Análises imunofenotípicas das UFCs	46
6	Discussão.....	49
7	Conclusões	55
	Referências Bibliográficas	57
	Anexos.....	65

1 INTRODUÇÃO

Tratamentos utilizando células tronco têm emergido como estratégias muito interessantes na área da terapia celular, apresentando grande potencial de aplicação na Medicina e na Odontologia. O uso de células tronco tem sido tema de vários debates, tanto pela promessa do seu uso na cura de algumas doenças de difícil tratamento, como no âmbito das questões éticas de sua utilização. Apesar de várias destas questões não terem uma resposta satisfatória, é inegável que as pesquisas que vêm sendo realizadas com células tronco estão permitindo explorar uma nova via terapêutica baseada na recomposição de tecidos ou órgãos danificados por vários tipos de injúria (Souza; Elias, 2005).

A restauração funcional de determinados órgãos, como, por exemplo, no caso da medula óssea, já é uma realidade e constitui uma grande promessa em vários outros tecidos. Em alguns casos, como por exemplo, no tratamento de infartos do miocárdio, o uso de células tronco para fins de regeneração tecidual podem diminuir até a necessidade de um transplante cardíaco. Além disso, estudos a partir de células tronco vêm gerando avanços do conhecimento relacionado ao modo pelo qual um organismo complexo se desenvolve a partir de uma única célula. Os estudos com essas células também tem contribuído para melhorar nossa compreensão dos vários mecanismos celulares, como o processo de diferenciação celular, regulação imunológica e reparação tecidual, entre outras (Souza; Elias, 2005).

A descoberta de uma fonte acessível de células tronco que possa ser autóloga, eliminando assim a possibilidade de rejeição em casos de transplantes, representa um importante passo para a aplicação dessas células com propósitos terapêuticos. Nesse ponto, as células tronco adultas podem representar uma alternativa viável, já que podem ser encontradas em todos os órgãos (Morsczeck *et al.*, 2008).

Uma fonte de grande importância de células tronco adultas são as células encontradas em tecidos dentários, como as da polpa dentária (Gronthos *et al.*, 2002; Polli, 2011). A utilização de células de tecidos dentários tem se tornado um atrativo em terapia regenerativa devido ao fato de o dente não ser um órgão vital, ter fácil acesso e por normalmente serem descartados após a sua extração. Além disso, a retirada da polpa dentária da cavidade pulpar é altamente eficiente, e as suas células possuem ampla capacidade de diferenciação tornando-o ideal para uma possível aplicação na reconstrução de tecidos (d'Aquino *et al.*, 2009).

Um fator interessante das células tronco da polpa dentária se deve ao fato de essas terem a origem na crista neural (CN). A CN é uma estrutura embrionária transitória, formada por uma população de células progenitoras multipotentes que apresentam potencial tanto ectodermal como mesenquimal (potencial ectomesenquimal) (Le Douarin, 2004). Devido a isso, as células tronco adultas derivadas de células originadas da CN representam uma fonte atraente por apresentarem potencial tanto para derivados ectodermis como mesodermis. (Pelacho *et al.*, 2011).

Para a utilização das células da polpa dentária deixar de ser um simples potencial em terapias celulares, é necessário obter mais conhecimento sobre o seu padrão de expressão proteico para marcadores específicos, sobre os fatores que levam a sua diferenciação, assim como a localização dessas células no tecido. Esses conhecimentos podem ajudar a entender completamente as suas funções, além de ajudar na compreensão do processo de sinalização que acarreta na sua ativação.

Poucos estudos têm analisado comparativamente a expressão de marcadores em células tronco no organismo vivo (*in vivo*) com células que passaram por cultivo (*in vitro*). Analisar essas diferenças poderia ajudar a entender até que ponto o processo de cultivo interfere na sua multipotencialidade e no seu potencial de diferenciação celular. Além disso, vários estudos vêm demonstrando o seu potencial mesenquimal através de meios de cultivos indutivos (Polli, 2011; Gronthos *et al.*, 2000).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÓRGÃO DENTAL

Os dentes possuem a função de triturar alimentos podendo apresentar forma e número diferentes entre os diversos grupos de animais vertebrados. Essa estrutura pode existir apenas em uma fase da vida, ou simplesmente nos estágios embrionários, sendo seus germes dentários reabsorvidos antes do nascimento (Bergqvist, 2003). Devido ao seu grau de complexidade e diversidade entre as espécies animais, o dente vem sendo intensiva fonte de estudos nas áreas de desenvolvimento, ecologia, paleontologia e evolução (Jernvall; Thesleff, 2012).

Dentre os diferentes tipos de dentições encontradas nos grupos de vertebrados, a dos mamíferos difere devido a sua maior complexidade e baixa capacidade de renovação dos dentes. Apesar disso, em alguns grupos de mamíferos, a baixa capacidade de reposição foi compensada pelo crescimento contínuo de alguns dentes ou pela formação de uma coroa mais espessa (Jernvall; Thesleff, 2012).

O dente pode ser dividido em dois elementos anatômicos principais: a coroa e a raiz (Figura 1). A coroa é a parte visível do dente sendo revestida por um tecido duro cristalino chamado de esmalte. Já a raiz é recoberta por um material semelhante ao osso chamado de cimento. Logo abaixo destas camadas superficiais, formando a estrutura principal do dente, há um tecido mineralizado muito resistente que forma o corpo do dente chamado de dentina. A dentina também reveste a polpa dentária, tecido não mineralizado que está localizada no interior do dente, ocupando a cavidade pulpar (Figura 1) (Bergqvist, 2003).

A polpa dentária é um tipo de tecido conjuntivo frouxo constituído por fibroblastos, algumas células especializadas como células do sistema imune, células indiferenciadas, odontoblastos, vasos sanguíneos e fibras nervosas. Os fibroblastos são as células mais numerosas, sendo responsáveis pela formação e manutenção da substância intercelular da polpa dentária. Os histiócitos são células especializadas do sistema imunológico que estão distribuídos por toda a polpa, principalmente próximos aos vasos sanguíneos, fazendo parte do mecanismo de defesa desse tecido. Por sua vez, os odontoblastos são responsáveis pela síntese da matriz e mineralização da dentina e estão localizados próximos à face pulpar da dentina (Melfi; Alley, 2010).

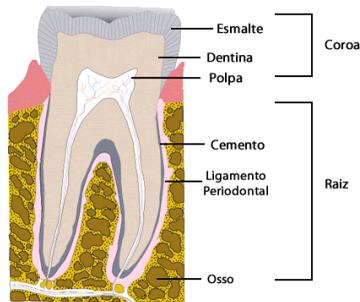


Figura 1. Esquema representativo dos tecidos dentários. Neste esquema podemos observar as duas principais regiões do dente, a coroa, parte visível do dente e a raiz, região intraóssea. Também podemos observar os outros tecidos dentários, assim como a extensão da dentina, o principal componente de suporte dentário. Adaptado de <http://protonodontologia.com/Periodontia.php>, acessado em 10/02/2013.

Além dessas estruturas, na região da raiz do dente, podemos encontrar também o ligamento periodontal (Figura 1). Essa estrutura corresponde a uma camada de tecido conjuntivo que envolve a raiz dentária, ficando entre o cemento e a lâmina do osso alveolar, fixando o dente ao osso. Outra função das células que compõe essa estrutura é a secreção de colágeno formando fibras que ajudam a suportar a intensa pressão ocorrida durante a mastigação (Melfi; Alley, 2010).

O dente é um órgão que tem uma origem embrionária mista, tendo participação tanto de derivados ectodermiais, quanto mesodermiais (Gronthos *et al.*, 2000). Devido a isso, para uma compreensão adequada da origem das células dos diferentes tecidos dentários é importante o entendimento da formação embriológica de cada um deles, através do estudo da odontogênese.

2.1.1 Odontogênese

Em humanos o primeiro sinal do desenvolvimento do dente ocorre entre a quinta e a sexta semana de vida, através de um espessamento do epitélio oral, denominado de lâmina dentária primária (Melfi; Alley, 2010). Este espessamento ocorre através de sinalizações e interações entre o tecido epitelial e o mesenquimal adjacente. As células que formam o esmalte dentário, denominadas ameloblastos, são derivadas do ectoderma que forma a lâmina dentária primária. Enquanto a dentina, a polpa dentária, o cemento, o ligamento periodontal são derivados de células mesenquimais. Acredita-se que a CN é a única

fonte formadora das células mesenquimais que darão sustentação para o desenvolvimento dentário durante a odontogênese (Miletich; Sharpe, 2004).

A CN, como dito anteriormente, é uma estrutura embrionária transitória, formada por uma população de células progenitoras multipotentes com a capacidade de originar vários tipos celulares. Durante o processo de desenvolvimento craniofacial, as células da CN da região cefálica migram para os arcos faríngeos e para os processos frontonasais (Figura 2). Essas regiões por sua vez darão origem a estruturas da face, como a mandíbula, a maxila, o palato, as estruturas dentárias e boa parte da calota craniana (Gilbert, 2010).

A odontogênese é tradicionalmente dividida em estágios de acordo com as alterações morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento dentário (Figura 3). O primeiro deles é denominado fase de botão (Figura 3A e B), seguido das fases de capuz (Figura 3C e D), campânula (Figura 3E), coroa e raiz (Miletich; Sharpe, 2004).

Na fase de botão, as células ectodermais proliferam em direção ao interior do mesênquima adjacente formando uma estrutura em forma de botão (Figura 3A e B). Essas células, juntamente com as células mesenquimais que se condensam ao redor, formam o germe dentário. As células ectodermais que formam o botão continuam a sua proliferação de maneira assimétrica, originando uma estrutura com uma concavidade inferior, com aparência de um capuz envolvendo as células mesenquimais condensadas (Figura 3C e D) (Peters; Balling, 1999). Nessa fase já é possível distinguirmos as células que darão origem as estruturas dentárias. O epitélio em contínuo crescimento é denominado órgão do esmalte, que dentre outras funções, dará origem aos ameloblastos - células secretoras do esmalte. Já as células do mesênquima condensado, agora denominado papila dentária, formarão a dentina e a polpa dentária (Ruch, 1998). As células mais periféricas do mesênquima condensado se estendem ao redor do epitélio, formando o folículo dentário (Figuras 3D) (Jernvall; Thesleff, 2012).

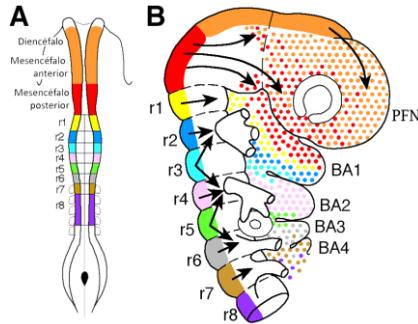


Figura 2. Esquema de um embrião demonstrando a migração das células da CN na região cefálica. As células da CN migram para os arcos faríngeos (BA) e para o processo frontonasal (PFN) originadas da região posterior do mesencefalo e dos rombômeros (r). (A e B) As cores representam as diferentes regiões do tubo neural de onde partem as células da CN. (B) As setas indicam as rotas migratórias e os mapas do destino das células da CN correspondente a cada região do tubo neural (Modificado de Creuzet; Couly; Le Douarin, 2005).

Na fase do desenvolvimento do dente, denominada de campânula (Figura 3E e F), ocorre o surgimento da morfologia definitiva da coroa do dente. Nessa fase as células do germe dentário começam o processo de diferenciação celular, começando a dar forma às estruturas dentárias. Nas células do epitélio interno do germe dentário ocorre a diferenciação dos ameloblastos que secretam o esmalte dentário (Thesleff, 2003). Já na face mesenquimal ocorre à diferenciação dos odontoblastos responsáveis pela secreção da dentina (Karcher-Djuricic *et al.*, 1985).

A etapa seguinte é denominada fase de coroa. Essa etapa se caracteriza pela deposição da dentina e esmalte formando a futura coroa do dente. A dentina é o primeiro tecido mineralizado a surgir em qualquer dente em desenvolvimento. A primeira camada de dentina é formada na área incisiva ou cuspídic do dente, tendo a sua formação progredindo camada por camada em direção à raiz. O início da formação da dentina é necessário para ocorrerem sinalizações permitindo a deposição do esmalte. Por sua vez, a formação do esmalte se inicia logo após a primeira camada de dentina e sobre a superfície da mesma (Karcher-Djuricic *et al.*, 1985).

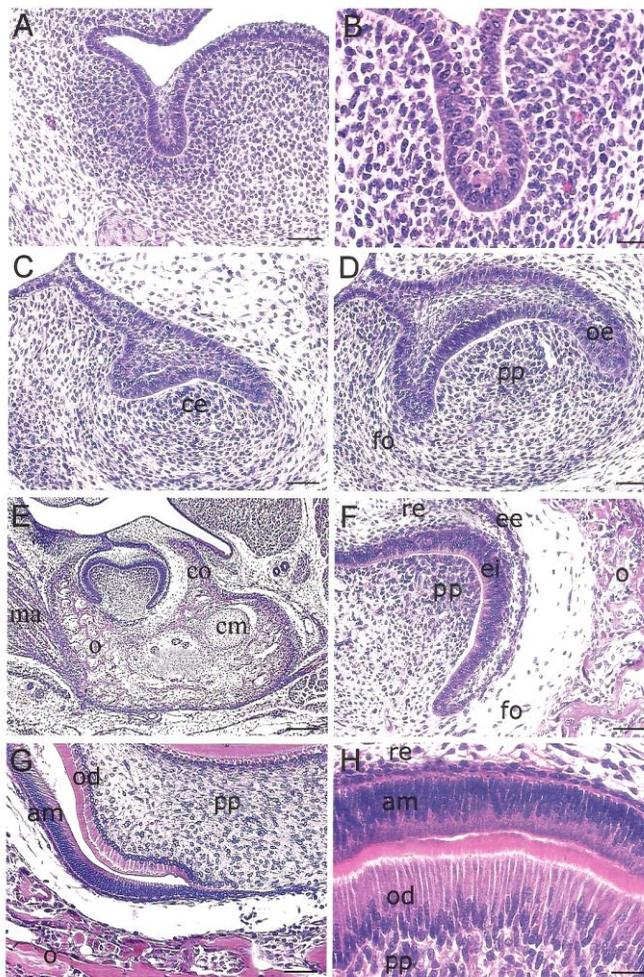


Figura 3. O desenvolvimento dentário nas suas diferentes fases. (A e B) fase de botão (F15); (C) início da fase de capuz (F17); (D) fase de capuz (F17); (E) fase de campânula (F19); (F) detalhe da alça cervical em formação; (G) alça cervical com odontoblastos e ameloblastos em diferenciação; (H) detalhe para os odontoblastos com dentina sendo depositada e pré-ameloblasto. Condensação ectomesenquimal (ce); papila dental (pp); folículo dentário (fo); órgão do esmalte (oe); cartilagem de Merckel (cm); cripta óssea (co); músculo masseter (ma); epitélio interno (ei); epitélio externo (ee); osso em formação (o) ameloblastos (am); odontoblastos (od); (Adaptado de Biz, 2007).

Após a formação da dentina e do esmalte dentário, inicia-se a fase de raiz. Conforme a dentina da raiz se forma, essa pode se dividir quando o dente é constituído de mais de uma raiz. A deposição de dentina é contínua até a completa formação do comprimento da raiz, que ocorre de forma geral de um a quatro anos após a erupção do dente na cavidade oral. Conforme a dentina está se formando apicalmente, um arranjo circular de fibras que vinha sendo depositado ao redor do germe dentário torna-se o ligamento periodontal. As células do ligamento, por sua vez, produzem o cimento que recobre a raiz dentária. Após o final da fase de raiz todas as estruturas envolvidas na sustentação do dente estão formadas (Melfi; Alley, 2010).

Durante o processo de odontogênese, surgem centros de sinalizações transitórios. Esses centros são constituídos por células não migratórias que expressam várias moléculas sinalizadoras como, por exemplo, o Fator de Crescimento Fibroblastóide (FGF) e a Proteína Morfogênica Óssea (BMP). O primeiro centro aparece ainda na fase de botão sendo formado através de sinalizações reguladas pelas células mesenquimais. O aparecimento de centros secundários é induzido por fatores liberados por centros formados anteriormente a estes. O aparecimento desses centros secundários está relacionado com a formação morfológica da coroa e na regulação do padrão multicúspides dos molares (Vaahtokari *et al.*, 1996).

Alguns animais, como, por exemplo, os seres humanos, têm mais de um conjunto de dentes, sendo uma dentição denominada decídua (popularmente conhecido como dentes de leite) e a outra permanente. Os dentes permanentes formam-se de modo semelhante aos dentes decíduos. Os brotos dos dentes permanentes, que tem antecessor decíduo, originam-se de extensões profundas da lâmina dentária, durante a fase de campânula dos dentes decíduos. Estes se formam em posição lingual ao broto dos dentes decíduos. Com o crescimento dos dentes permanentes, a raiz do dente decíduo correspondente é gradualmente reabsorvida por odontoclastos (Moore; Persaud, 2008).

Após a formação dos tecidos dentários esses podem ser repostos, de forma limitada, no caso de injúria ao tecido. Isso se deve ao fato que em alguns tecidos dentários encontramos grupos de células indiferenciadas que são responsáveis pela reposição do tecido. Vários estudos apontam que é possível isolar essas células que podem ser multipotentes e cultivá-las em cultura (Techawattanawisal *et al.*, 2007; Widera *et al.*, 2007; Coura *et al.*, 2008). Estudos já evidenciaram que as células da polpa dentária de humanos apresentam uma população de células tronco com alta capacidade proliferativa e um grande potencial

de autorrenovação (Gronthos *et al.*, 2000) e de formar vasos sanguíneos funcionais *in vivo* (Cordeiro *et al.*, 2008). Adicionalmente, em trabalho anterior do nosso laboratório demonstrou-se que o ligamento periodontal humano possui células que, em cultura, apresentaram marcadores de CN, e células com capacidade de diferenciação em derivados mesodermiais (adipócitos e osteoblastos) e ectodermiais (neurônios) (Coura *et al.*, 2008). Além disso, em seu trabalho de dissertação de mestrado, Viviane Polli, estabeleceu método de cultivo e caracterizou as células da polpa dentária adulta humana como células tronco mesenquimais, demonstrando o seu potencial de diferenciação celular para adipócitos e osteoblastos (Polli, 2011). Apesar desses resultados indicarem que as células da polpa dentária são de fato derivadas da CN, esses experimentos não demonstraram que uma única célula possui potencial ectomesenquimal. Para podermos ter uma real afirmação sobre a origem das células da polpa dentária é necessário ensaios que demonstrem que uma única célula possa dar origem tanto a derivados ectodermiais como a derivados mesenquimais. Demonstrando dessa maneira, que essas apresentam potencial ectomesenquimal e que, portanto, são realmente derivadas da CN.

2.2 CÉLULAS TRONCO

As células tronco são definidas como células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação, capazes de dar origem a diferentes tipos celulares (Till; McCulloch, 1980; Morrison; Shah; Anderson, 1997).

Quando consideramos a sua capacidade de diferenciação as células tronco podem ser classificadas como sendo totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As células totipotentes são aquelas capazes de dar origem a todas as células do organismo, além dos anexos embrionários. Já as pluripotentes não tem a capacidade de dar origem aos anexos embrionários, mas tem a potencialidade de originar todos os tipos celulares que constituem o indivíduo. As multipotentes, por sua vez, têm potencialidade mais reduzida, podendo formar apenas determinadas linhagens celulares (Wagers; Weissman, 2004).

As células tronco também podem ser classificadas devido a sua origem em adultas ou embrionárias. As células tronco embrionárias (CTEs) são isoladas da massa interna do blastocisto, já as células tronco adultas (CTAs) são retiradas de tecidos diferenciados como, por exemplo, da pele e do dente. Acredita-se que as CTAs possam permanecer quiescentes até serem ativadas por algum tipo de lesão tecidual. Essas células vêm sendo consideradas importantes fontes de

células tronco para fins terapêuticos, pois podem ser obtidas do próprio paciente eliminando a rejeição. Além disso, o uso de CTAs atenuam as questões éticas inerentes à utilização de CTEs, como, o paradigma do início da vida, ou da falta de conhecimento sobre seu comportamento dentro de um organismo já formado (Morszeck *et al.*, 2008). Alguns autores vêm considerando ainda uma terceira fonte de origem de células tronco, as células tronco pluripotentes induzidas (iPS). Estas células são obtidas através da reprogramação de células somáticas. Neste processo genes, como Oct4 e Nanog, responsáveis por manter o estágio pluripotente, voltam a ser expressos pela célula (Avilion *et al.*, 2003). As iPS vem sendo fonte de intensa pesquisa pois apresentam características semelhantes às células tronco embrionárias apesar de poderem ser obtidas de células adultas (Maherali; Hochedlinger, 2008).

Acredita-se que as CTAs possam ser encontradas em todo o organismo. Uma forma de analisar a presença dessas células no organismo é através da expressão de genes e seus respectivos produtos proteicos, como marcadores dos diferentes tipos de células tronco e dos estágios de diferenciação celular. Desse modo, por exemplo, células com características da CN, podem ser identificadas pela presença dos marcadores proteicos Snail, p75, Sox10 e HNK1 (Sauka-Spengler; Bronner-Fraser, 2008). A análise da origem das células tronco encontradas no organismo é importante por permitir obter uma percepção do seu real potencial de diferenciação celular. Um grupo de células tronco que vem sendo isolado e amplamente caracterizado em organismos adultos são as células tronco mesenquimais.

2.2.1 Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes não-hematopoiéticas, que apresentam morfologia fibroblastóide e que são capazes de se diferenciar em derivados da linhagem mesenquimal, como adipócitos e osteócitos. Entretanto, estudos vêm demonstrando que estas células são capazes também de diferenciar, *in vitro* e *in vivo*, em derivados ectodermiais, como neurônios e astrócitos, (Pittenger *et al.*, 1999; Bianco; Gehron Robey, 2000; Jori *et al.*, 2005; Nardi; Meirelles, 2006). A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu em 2006 três critérios de classificação das CTM. O primeiro é a adesão ao plástico quando em cultura. O segundo é apresentar expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90 em mais de 95% das células, assim como não expressar os marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (menos de 5% das células da cultura). O terceiro critério é, em

condições de cultivo específicas, apresentar capacidade de diferenciação em derivados mesenquimais: osteócitos, adipócitos e condrócitos (Dominici *et al.*, 2006).

Células com características de CTMs vêm sendo isoladas de diferentes tecidos, como do tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), da derme (Lavker; Sun, 1983), do tecido muscular esquelético (Young *et al.*, 2001) da placenta (Cavallo *et al.*, 2011) e do dente (Coura *et al.*, 2008; Polli, 2011). De fato, sugere-se que células com características de CTMs residem em todos os órgãos e tecidos pós-natais. Esses dados indicam a possível existência de uma extensa rede de CTMs no organismo (Kassem; Kristiansen; Abdallah, 2004).

Uma fonte de CTMs de grande importância citada anteriormente é a polpa dentária (Mooney *et al.*, 1996; Gronthos *et al.* 2000; Miura *et al.*, 2003; Batouli *et al.*, 2003; Huang; Shagramanova; Chan, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007). Neste tecido foram identificadas populações de células clonogênicas, com alta capacidade proliferativa e habilidade de diferenciação em vários tipos celulares incluindo adipócitos e odontoblastos (Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003; Huang; Shagramanova; Chan, 2006, Polli, 2011). Pesquisas realizadas demonstraram que as células tronco da polpa dentária (CTPD) são capazes de formar dentina ectópica *in vitro* e *in vivo* (Gronthos *et al.* 2000; Miura *et al.*, 2003), além de originarem melanócitos espontaneamente (Paino *et al.*, 2010).

Alguns estudos abordam a capacidade das CTPD de formar derivados neurais. As CTPD quando implantadas em camundongos com lesões medulares, promovem melhora da condição física (Almeida *et al.*, 2010). Além disso, CTPD de camundongos diferenciam em neurônios funcionais quando implantadas em embriões de aves (Arthur *et al.*, 2009). Em trabalho de Király e colaboradores (2011) foi demonstrado que progenitores neurais de CTPD implantados em cérebros de camundongos tinham capacidade de se diferenciarem em neurônios.

Toda essa gama de estudos demonstra que as CTPD possuem capacidade de diferenciação para vários derivados celulares. Porém na literatura atual ainda há carência de estudos que demonstrem até que ponto o processo de cultivo interfere na sua multipotencialidade. Com base nestas constatações, o presente trabalho se propôs a estudar as características das CTPD, analisando sua multipotencialidade durante diferentes fases do desenvolvimento e em processo de cultivo. Além do mais, realizamos análises para marcadores característicos de células da CN *in vivo* e *in vitro*, analisando assim o seu potencial ectomesenquimal nessas duas condições. Também foram realizados

testes com meio de cultivo específico para isolamento de progenitores neurais (ectodermais), na tentativa de obtermos uma cultura pura, contendo um único progenitor celular.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Avaliar o potencial ectomesenquimal das células da polpa dentária em embriões com idade fetal de 17 dias (F17), 4 dias após o nascimento (D4) e em idade adulta, em modelo animal e humano.

3.2 ESPECÍFICOS:

- ✓ Avaliar in vivo, por imunohistoquímica, a expressão de marcadores proteicos de células tronco pluripotentes (Oct4, Nanog) e de progenitores indiferenciados da CN (Sox10, p75 e HNK1) na polpa dentária, em idade fetal de 17 dias, 4 dias após o nascimento e em idade adulta (90 dias) em modelo de rato.
- ✓ Analisar, por RT-PCR, a presença de marcadores moleculares de células tronco pluripotentes (Oct4, Nanog) e de células da CN (Sox10, p75, Nestina, Snail) na polpa dentária adulta humana.
- ✓ Avaliar o potencial de diferenciação ectomesenquimal em culturas de massa e clonais de células da polpa dentária adulta humana, pela expressão de marcadores de pluripotencialidade (Oct4), neurais (Nestina e β TubulinaIII) e mesenquimais (α SMA).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética com pesquisa em seres humanos (CEP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), protocolo n° 625/10. Todos os participantes desta pesquisa foram esclarecidos sobre os objetivos desse projeto e autorizaram a coleta através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (modelo em anexo – Anexo 1). Já o uso de ratos foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/UFSC) protocolo n° 22/CEUA/PRPE/2012.

4.1 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

4.1.1 Confeção das lâminas histológicas

As lâminas de embriões de ratos em estágios do desenvolvimento dentário em F17 (idade fetal de 17 dias), D4 (4 dias após o nascimento) e em estágio adulto (90 dias de vida) foram obtidas em parceria com a Profa. Dra. Michelle Tillmann Biz. O protocolo detalhado utilizado para a confecção dessas encontra-se no Anexo 2.

Para a análise das polpas dentárias em desenvolvimento, foram utilizados ratos Wistar - fetos de 17 dias (F17) e ratos nascidos de 4 dias (D4) - obtidos a partir de ratas do biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). O germe avaliado foi padronizado em sendo o primeiro molar inferior.

As ratas mães foram sacrificadas por sobre-dosagem de anestésico (Ketamina) e relaxante muscular (Xilazin), e os fetos foram sacrificados por decapitação. Já para a análise com animais após o nascimento, esses foram sacrificados seguindo-se o protocolo adotado para as ratas mães.

Para a obtenção das amostras de dentes com polpa dentária adulta, foram utilizados ratos Wistar machos com idade de 90 dias, sendo que a sua eutanásia foi realizada da mesma maneira que nos outros animais.

As amostras da polpa dentária em desenvolvimento (F17 e D4) foram fixadas com Metacarn¹ por 1 a 4 horas a 4^oC. Na presença de tecido calcificado, as amostras sofreram hidratação com sequências decrescentes de álcool e foram descalcificadas utilizando EDTA durante 4 a 14 dias, sob agitação e com trocas da solução de EDTA a cada 2

¹ Metacarn - 60% Metanol; 30% Clorofórmio; 10% Ácido Acético

dias. Após o período de descalcificação, as amostras foram desidratadas, com sequência crescente de álcool e seguiu-se o processamento.

A fixação das amostras de polpa dentária adultas foi realizada inicialmente por meio da perfusão com formol tamponado 4%. As amostras foram então pós-fixadas com formol 10%, desmineralizadas em EDTA e processadas para inclusão em parafina.

O processamento do material foi então realizado com três passagens em etanol absoluto por 30 minutos e 3 banhos de xilol por 30 minutos, seguindo-se a infiltração em Paraplast®, sendo essa em 3 passagens de 30 minutos, e posterior inclusão. Após, cortes sagitais seriados de 5µm foram obtidos.

4.1.2 Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica as lâminas passaram pelo processo de desparafinização onde eram deixadas por aproximadamente 3 horas em estufa a 75°C, sendo posteriormente transferidas para uma cuba contendo xilol onde permaneciam *overnight*. As lâminas eram então submetidas a um segundo banho de xilol por 20 minutos. Após este processo, foi realizado a reidratação com banhos consecutivos de álcool em concentração decrescente (absoluto, 95% e 85%), seguido de dois banhos em água destilada.

O passo seguinte consistiu em realizar a inibição da peroxidase endógena em solução de metanol com 6% de H₂O₂. Após esta etapa as lâminas passaram por dois banhos em solução salina tamponada de fosfato (PBS) e posterior recuperação antigênica em banho de tampão citrato (0,01M) a 96 °C por 40 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado através da incubação das lâminas por 50 minutos em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado em pó. Os anticorpos para Oct4, Nanog, Sox10, p75 e HNK1 foram incubados *overnight* segundo concentrações contidas na tabela 2.

Foram então realizados dois banhos de 5 minutos em PBS. Em seguida, o anticorpo secundário biotilado correspondente foi incubado por um período de 1 hora (especificações na tabela 3), seguido por lavagens em PBS e incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos.

A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro dihidrato) seguido de contracoloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas com concentrações crescentes de álcool (85%, 95% e absoluto) e a diafanizadas em dois banhos de xilol por 20 minutos cada.

As lâminas foram então montadas com Entellan (Millipore) e fotografadas em microscópio óptico (Olympus IX71) com sistema de captura de imagem (Olympus DP71).

4.2 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Foram coletadas polpas dentárias de terceiros molares de adultos humanos saudáveis em idade entre 14 e 50 anos. A extração do RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante: as polpas dentárias, logo após a retirada da cavidade pulpar, foram imersas em trizol e mantidas até a máxima dissociação do tecido. A solução foi então centrifugada e o sobrenadante transferido para novo microtubo onde foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merk). A solução então foi homogeneizada e submetida à centrifugação a 4°C. A fase aquosa incolor resultante da centrifugação, contendo o RNA, foi transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico (Sigma). A solução, então, foi mais uma vez submetida à centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* lavado com 1 mL de álcool etílico a 75% (Merck). Após, o sobrenadante foi removido e o *pellet* resultante correspondente ao RNA total ressuspenso em água livre de DNase e RNase e quantificado em espectrofotômetro. Em seguida, para evitar uma possível contaminação com DNA genômico, o RNA total foi tratado a enzima DNase utilizando o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), conforme as instruções do fabricante. Após este processo, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) com o uso Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), conforme especificações do fabricante. Brevemente, 1 μ g do RNA total foi incubado com 0,5 μ L de oligo(dT) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, as amostras foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos. Logo após, foi acrescentada à reação 0,5mM de nucleotídeos (dnTP), 50 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5ul tampão (ImProm-II™ 5X Reaction Buffer), 20 unidades da enzima inibidora de ribonuclease (Rnasin), 1 unidade da enzima transcriptase reversa e água livre de DNase e RNase. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C e 15 minutos a 70°C.

Para a realização da PCR foi utilizado o kit Master Mix (Promega), segundo orientações do fabricante. Para isso, foram utilizados iniciadores (*primers*, apresentados na tabela 1) sense e antisense para os genes de interesse (Tabela 1). As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf). As

amostras foram desnaturadas inicialmente a 94°C por 4 minutos e, em seguida, submetidas a 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para dissociação, 45 segundos à temperatura de anelamento do primer e 72°C por 1 minuto para extensão, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle interno da reação foi utilizado uma sequência iniciadora para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A análise das sequências amplificadas ocorreu através da visualização em gel de agarose a 2%.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de Anelamento (°C)/ Tamanho do fragmento (pb)
GAPDH	5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3' 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'	58/441
Nanog	5'-TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT-3' 5'-GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC-3'	58/286
Oct4	5'-CTCCTGAAGCAGAAGAGGATCAC-3' 5'-CTTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3'	58/398
p75	5'-GCC AGG ACA AGC AGA ACA CCG T-3' 5'-GCTTGCAGCTGTCCACCTCTTGA-3'	58/426
Snail	5'-AGACGCGAACTCAGGTGCCTT-3' 5'-GGAGCATGCCAGGAATGTT-3'	58/268
Sox10	5'-ACCTTGGGACACGGTTTCCACT-3' 5'-GTTGATGGGCCGCTTGACGTG-3'	56/475
Nestin	5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3' 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'	58/208

4.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA

As células da polpa dentária foram obtidas através de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos saudáveis. Após as exodontias os dentes foram lavados com solução fisiológica estéril e armazenados em meio de cultura que consistia em *α-modified minimum essential* (αMEM, Invitrogen), acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). A polpa dentária foi então removida da cavidade pulpar e imersa em solução enzimática contendo colagenase tipo 1 (Invitrogen) e dispase (Sigma). Após 1 hora a digestão enzimática era paralisada utilizando-se o meio de cultura citado anteriormente. Esse meio contendo as células foi então centrifugado a 500g por 10 minutos,

e o *pellet* obtido foi ressuspêndido em 4 mL de meio. A suspensão celular obtida era então mantida em garrafas de cultura de 25cm² (Corning), sendo que esta correspondia a passagem 0 (P0).

Após a confluência, as células s foram descoladas com solução de tripsina à 0,25% (Sigma) e ácido etilenodiamino tetra-acético à 0,02% (EDTA, Vetec). A reação foi paralisada em meio α MEM acrescido de 10% de SFB e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). Este meio será designado no decorrer do texto como meio controle (MC). As células foram então ressuspensas e transferidas para garrafas de cultura de 35cm² ou para placas de cultura de 24 poços (Corning) previamente revestidas com colágeno tipo I (50 μ g/mL). As culturas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade, com trocas de meio a cada 4 dias. As análises foram realizadas em passagens baixas (passagens 1 - P1 – a 3 - P3) e altas (passagens 8 - P8 – e 10 - P10).

4.4 MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO NEURAIS HUMANAS (MCTN)

Para a análise do potencial neural (derivados ectodermais) das células da polpa dentária foi utilizado o meio comercial de cultivo de células tronco neurais humanas *StemPro NSC SFM* (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. Brevemente, para a preparação de 500 mL de meio, foram utilizados 485 mL de knockout™ *Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Hans F12* (DMEM-F12), 10 μ g de FGF2, 10 μ g de Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e 5 mL de Glutamina 200mM. As células foram ressuspensas no meio acima, plaqueadas na densidade de 5x10⁴ células/cm², e mantidas em estufa úmida nas condições descritas anteriormente.

4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

Para a análise da capacidade de formação de colônias, que é usada para avaliar a presença de células tronco ou células progenitoras, foram realizados ensaios clonogênicos. As células foram cultivadas em baixa densidade (30 células por placa de 35 mm, Corning) em MC ou MCTN. A capacidade clonogência foi calculada pelo número de unidades formadoras de colônias (UFCs) e a capacidade proliferativa foi estimada pela quantificação do número de células por colônia (Bianco; Ghebron Robey, 2000). A potencialidade da célula fundadora da colônia foi avaliada pelos fenótipos presentes nas colônias através de imunocitoquímica como descrito abaixo.

4.5.1 Imunocitoquímica

As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e depois lavadas com PBS. Após a fixação, as culturas foram permeabilizadas com solução de PBS-Triton a 0,25% por 30 minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as células foram incubadas por 40 minutos com SFB diluído a 10% em PBS. Os anticorpos primários foram incubados por uma hora a temperatura ambiente (especificações na tabela 2). As células foram então lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e subsequentemente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados à fluorocromos (especificações na tabela 3).

Os núcleos foram corados com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI). As marcações foram então visualizadas em microscópio epifluorescente Olympus IX71 e as imagens foram capturadas com câmera Olympus DP71. As proporções fenotípicas foram então determinadas através da relação entre o número de células positivas para determinado marcador e o número total de núcleos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados pelo teste t de *student*. Estas análises foram realizadas com o software GraphPad Prism4®. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados.

Anticorpo Primário	Imonoglobulina	Diluição	Fabricante
Anti- β TubulinaIII	IgG1	1:600	Promega
Anti-alfa actina de músculo liso (α SMA)	IgG2a	1:800	Sigma
Anti-Nestina	IgG	1:100	Abcam
Anti-Oct4	IgG	1:300	Chemicon
Anti-Proteína 75	IgG1	1:100	Santa Cruz
Anti-Sox 2	IgG2b	1:200	Chemicon
Anti-Nanog	IgG	1:100	Chemicon

Tabela 3. Anticorpos secundários utilizados

Anticorpo Secundário	Fabricante	Diluição
Anti-IgG1 de camundongoFITC	Southern Biotech	1:100
Anti-IgG GAR Alexa Fluor® 488	Invitrogen	1:75
Anti-IgG MAG Peroxidase	Sigma	1:100
Anti IgG2a GAM Texas Red	Southern Biotech	1:100
Anti-IgG2b GAM FITC	Chemicon	1:100
Anti-IgG Biotinilado GAR	Sigma	1:150
Anti-IgG1 Biotinilado GAM	Abcam	1:150
Streptavidina-Peroxidase	Sigma	1:100

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO

Inicialmente, analisamos a expressão de marcadores proteicos característicos de células tronco pluripotentes (Nanog, Oct4) e de células da CN indiferenciadas (Sox10, p75 e HNK1) por imunohistoquímicas em cortes histológicos de dente de embriões de ratos de 17 dias (F17), animais com 4 dias após o nascimento (D4) e em idade adulta de 90 dias. Essas idades correspondem respectivamente à fase de capuz, a fase de coroa e ao dente já totalmente formado.

5.1.1 Análise da expressão de marcadores de pluripotencialidade

A expressão de marcadores de pluripotencialidade, Nanog e Oct4, foi observada em grande proporção nas células da polpa dentária nas três idades analisadas.

Em idade de F17, notamos que todas as células apresentam marcação intensa desses marcadores. Esse padrão de expressão também foi observado em D4, onde todas as células foram positivas, mesmo na região onde os odontoblastos se encontram em estágio mais diferenciado. Na fase adulta também houve intensa expressão desses marcadores, sendo que pudemos observar que a maior parte das células foram positivas para Nanog e Oct4.

5.1.2 Análise da expressão de marcadores de células da Crista Neural

A expressão de marcadores de células da CN (Sox10, p75 e HNK1) se deu de maneira diferenciada entre os marcadores analisados.

A análise para Sox10 demonstrou que as células do dente expressam essa proteína desde as fases mais iniciais do desenvolvimento, tendo as células em F17 sido positivas em sua maioria. Essa expressão se mantém em D4, mesmo na região onde se encontram os odontoblastos mais diferenciados. Na fase adulta Sox10 continua sendo expresso por mais de 90% das células.

Já a análise para p75 demonstrou que esse marcador não é expresso no início do desenvolvimento dentário na idade de F17. Por outro lado, em D4 a grande maioria das células é positiva para essa proteína, que voltam a não expressá-las na fase adulta.

Nas análises para a expressão de HNK1, por sua vez, não foram encontradas marcação nas células da polpa dentária em F17 e D4, que passa a ser expresso pela grande maioria das células na fase adulta.

Em conjunto os resultados das análises imunohistoquímicas sugerem que as células da polpa dentária expressam as proteínas características de células tronco pluripotentes Oct4 e Nanog desde o período embrionário de 17 dias até a fase adulta na maiorias das células. Com relação aos marcadores de células de CN, a proteína Sox10 apresenta perfil parecido tendo a sua expressão desde o período embrionário de 17 dias até a fase adulta. Já os marcadores p75 e HNK1 são expressos em pelo menos uma fase do desenvolvimento da polpa dentária. Esses marcadores apresentaram expressão diferenciada nas fases analisadas, onde encontramos marcação para p75 em D4 e para HNK1 em idade adulta na grande maioria das células. Esse resultado sugerem que as células da polpa dentária de ratos podem se manter em estado multipotente por todo o seu desenvolvimento até no adulto.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO NA POLPA DENTÁRIA ADULTA DE HUMANOS

A seguir analisamos, por RT-PCR, se a polpa dentária adulta de humanos também expressa marcadores de células pluripotentes (Oct4, Nanog) e de CN (Sox10, p75, Snail e Nestina). As análises foram positivas para a expressão gênica (RNA mensageiro - mRNA) de Nanog, Oct4, Sox10, p75, Snail e Nestina.

Esses resultados demonstram que a polpa dentária adulta humana expressa genes característicos de células tronco pluripotentes (Oct4 e Nanog) e de células da CN (Snail, Sox10 e Nestina), sugerindo que a polpa dentária humana possa conter células tronco ou células progenitoras multipotentes.

5.3 CULTIVO DE CTPD HUMANA E ANÁLISE DO POTENCIAL ECTOMESEENQUIMAL

Como as células da CN apresentam potencial ectomesenquimal, resolvemos analisar se em cultivo as CTPD adultas humanas seriam capazes de originar progenitores com esta potencialidade. As células foram então isoladas e cultivadas em meio controle (MC) e em MCTN.

Após o cultivo, as células foram analisadas por imunofluorescência para a presença do marcador de pluripotencialidade Oct4, dos marcadores neurais β Tubulina III e Nestina (fenótipo ectodermal), e do marcador de células do músculo liso α SMA (fenótipo mesenquimal).

As análises foram realizadas em passagens baixas (P1-P3) e em passagens altas (P8-P10), para avaliar se o tempo de cultivo interfere na expressão desses marcadores.

Os resultados mostraram que a maior proporção das células foram positivas para Oct4, Nestina e β Tubulina III, tanto nas culturas mantidas em MC como nas células mantidas em MCTN nas passagens analisadas. No entanto, observamos redução de cerca de 10 vezes na porcentagem de células positivas para α SMA nas culturas mantidas em MCTN em comparação ao MC. Esse resultado foi observado tanto em alta quanto em baixa passagem.

Com relação à morfologia celular, os resultados demonstraram que as células da polpa dentária adulta humana, quando cultivada em MC, em ambas as passagens, e em MCTN em baixa passagem, apresentam morfologia fibroblastóide, característico de células mesenquimais. No entanto, as células mantidas em MCTN em passagens altas, apresentam morfologia mais alongada e fusiforme, demonstrando que esse meio induz uma alteração morfológica nas células da polpa dentária adulta humana.

5.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Os resultados obtidos pelas análises imunofenotípicas demonstraram que as células de polpa dentária apresentam marcadores de células pluripotentes (Oct4), de células neurais (Nestina e β Tubulina III), assim como de células mesenquimais (α SMA). Desse modo, os resultados demonstram que essas células expressam marcadores de células multipotentes, de derivados mesodermiais e de derivados ectodermiais.

Após essas análises, resolvemos avaliar a potencialidade das células da polpa dentária através de ensaios clonogênicos. Para isso, analisamos se as células da polpa dentária adultas humanas apresentavam a capacidade de originar unidades formadoras de colônias (UFCs) que é uma das características de células tronco ou células progenitoras (Bianco; Gehron Robey, 2000). Nesse ensaio uma quantidade mínima de células dissociadas é plaqueada (30 células/poço de 35cm²), de modo que essas ficam isoladas, e ao proliferarem originam colônias independentes, indicando assim a presença de células tronco ou células progenitoras (Bianco; Gehron Robey, 2000). Este ensaio permite ainda, pela análise dos fenótipos celulares encontrados na colônia, identificar a potencialidade da sua célula fundadora e pela análise do número de células em cada colônia, estimar o potencial de proliferação celular.

A taxa de formação de colônia foi similar em MC e MCTN em passagem baixa. Valor similar aos encontrados em baixa passagem foi observado quando as células eram mantidas em MC em altas passagens.

Por outro lado, uma redução de 14 vezes foi observada quando as células eram cultivadas em MCTN em altas passagens, indicando menor proporção de células tronco ou células progenitoras.

A seguir analisamos o tamanho dos clones gerados, avaliando o número de células por UFC. Esta análise é um indicativo da capacidade proliferativa das células de polpa dentária. De acordo com o número de células, as colônias foram classificadas em pequenas (5 a 20 células), médias (21 a 35 células) e grandes (mais de 35 células). Os resultados demonstram uma redução do tamanho das colônias com as passagens, tanto no MC quanto no MCTN. Em passagens baixas, quase toda totalidade dos clones mantidos em MC são de tamanho grande e uma pequena proporção de tamanho médio. Não foram observados clones pequenos nessa condição experimental. Por outro, o MCTN proporcionou uma redução 1,5 vezes na proporção dos clones grandes, acompanhado de aumento de 18 vezes na proporção dos clones médios e o aparecimento uma pequena proporção de clones pequenos. Em altas passagens, há uma redução de 1,2 vezes na proporção dos clones grandes cultivados em meio controle, em comparação às passagens baixas. Esse resultado é acompanhado por aumento nos clones médios (13 vezes) e pequenos (1,7 vezes). Interessantemente não foram observadas UFCs de tamanho grande em altas passagens cultivadas em MCTN. A grande maioria dos clones nessa condição experimental apresentava tamanho pequeno, um aumento de 49 vezes quando comparado ao meio controle na mesma passagem, e de aproximadamente 9 vezes quando comparado ao MCTN em passagens baixas. Desse modo, os resultados demonstram que o MCTN promove uma redução significativa no tamanho dos clones em relação ao meio controle, sugerindo uma redução na capacidade proliferativa desses progenitores.

5.4.1 Análises imunofenotípicas das UFCs

Com o intuito de identificar os fenótipos celulares presentes nos clones, avaliando o potencial de diferenciação mesenquimal e ectodermal, realizamos ensaios de imunocitoquímica para os marcadores Nestina e β TubulinaIII (células ectodermis) e α SMA (células mesodermis) nos clones.

Nas análises realizadas, encontramos clones que contém apenas células positivas para α SMA, clones com células positivas para β TubulinaIII e Nestina e clones que apresentam células com expressão

das três proteínas analisadas evidenciado o potencial ectomesenquimal.

Clones contendo exclusivamente células positivas para α SMA foram encontrados apenas em passagens baixas e em MC. A maior porcentagem de clones mantidos em MC expressam os três marcadores tanto em baixa como em alta passagem. Como as proteínas analisadas abrangeram características ectodermias (β TubulinaIII e Nestina) como mesenquimais (α SMA), nossos resultados demonstram que a maioria das células da polpa dentária nesse meio de cultivo apresentam potencial ectomesenquimal, embora um percentual significativo apresentar apenas potencial neural. Por outro lado, a maior porcentagem dos clones mantidos em MCTN (em ambas as condições de passagem) apresentam potencial apenas neural, o que representa um aumento de cerca de 2 vezes em relação ao MC. Além disso, o MCTN promove tanto em baixa como em alta passagem redução de cerca de 3 vezes na proporção de clones que expressam os três marcadores, em relação ao meio controle. Esses resultados sugerem que o MCTN possa estar estimulando o potencial neural das células da polpa dentária em detrimento do ectomesenquimal.

Em conjunto, os resultados de cultivo das células da polpa dentária demonstram que essas mantém a expressão proteica de OCT4, característico de células pluripotentes, assim como de marcadores ectodermiais (β TubulinaIII e Nestina) e mesodermal (α SMA). Além disso, através de ensaios de UFCs demonstramos que as células da polpa dentária apresentam capacidade clonogênica, que é uma característica de células multipotentes, com potencial mesodermal (apenas células positivas para α SMA), potencial neural (células positivas para β TubulinaIII e Nestina) e células com potencial ectomesenquimal (com células positivas para α SMA, β TubulinaIII e Nestina). Esse resultado, em conjunto com as alterações morfológicas, a redução da capacidade clonogênica, redução do tamanho dos clones e aumento na proporção de clones neurais em detrimento dos mesenquimais ou ectomesenquimais, sugerem que o MCTN esteja direcionando as células da polpa dentária humana adulta para o fenótipo neural.

6 DISCUSSÃO

As células tronco da polpa dentária (CTPD) têm sido extensivamente estudadas com intuito de fins terapêuticos devido à sua similaridade com outras CTMs e por serem relativamente fáceis de serem obtidas e propagadas (Karaöz *et al.*, 2010). Em trabalho anterior do nosso laboratório demonstramos que as células da polpa dentária apresentavam adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide e potencial de diferenciação mesenquimal, originando adipócitos e osteócitos, além de marcação positiva para CD73, CD90 e CD105. Esses resultados caracterizaram essas células como CTPD. Ao mesmo tempo, os nossos resultados demonstraram que essas células apresentavam a expressão de marcadores de pluripotência (Oct4 e Nanog) e de CN (Snail e Nestina) (Duarte, 2010; Polli, 2011). No presente estudo, aprofundamos estes dados analisando as características de multipotencialidade, *in vivo* e *in vitro* e o potencial ectomesenquimal.

Inicialmente analisamos a expressão de componentes característicos de células tronco e de células da CN, como proteínas e carboidrato específicos, durante o desenvolvimento dentário. Para isso, analisamos a expressão de Oct4 e Nanog, marcadores de pluripotencialidade, assim como p75, Sox10 e HNK1, marcadores de CN.

Os fatores de transcrição Oct4 e Nanog encontram-se no centro da regulação de genes responsáveis pela diferenciação celular suprimindo a expressão desses, indicando que esses fatores estão relacionados com a manutenção da pluripotencialidade celular. Sabe-se que Oct4 regula diretamente Nanog e Sox2, também envolvido na manutenção da pluripotencialidade (Nichols *et al.*, 1998; Avilion *et al.*, 2003). Embora a maioria desses estudos tenha sido realizada com CTEs, trabalhos com CTMs adultas vêm demonstrando que os mecanismos utilizados por essas proteínas são similares entre essas populações de células tronco (Greco; Rameshwar, 2007; Ferro *et al.*, 2012). Recentemente, Tsai e colaboradores (2012) demonstraram que Nanog e Oct4 mantêm a multipotencialidade de CTMs através dos mesmos mecanismos utilizados em CTEs. Além do mais, foi demonstrada redução na expressão desses fatores em CTMs adultas em processo de diferenciação para derivados osteogênicos e adipogênicos. Esses dados demonstram uma relação dos níveis de expressão dos fatores Oct4 e Nanog com o estado de diferenciação das CTMs adultas, da mesma forma que ocorre em CTEs. Isso sugere que esses fatores também podem estar relacionados com a manutenção da

multipotencialidade de CTMs adultas (Tsai *et al.*, 2012; Ferro *et al.*, 2012).

Em nossos experimentos observamos uma intensa marcação dos fatores de transcrição Oct4 e Nanog por imunohistoquímica em células da polpa dentária em F17, D4 e em idade adulta de ratos. Além disso, a expressão do mRNA para esses fatores de transcrição, também pode ser observada por RT-PCR em células da polpa dentária humana adulta. Esses resultados sugerem a presença de células multipotentes na polpa dentária. Um dado curioso é que, em trabalho anterior do nosso grupo, as análises de RT-PCR realizadas com células da polpa dentária humana adulta mantidas em cultura foram negativas para Nanog, apesar da expressão de Oct4 ter sido positiva. Esse resultado pode sugerir que as células da polpa dentária mantidas em cultura perdem a expressão de fatores de pluripotencialidade. Podemos sugerir ainda, que a expressão de Oct4 nas células da polpa dentária em cultura pode estar relacionada com variantes de Oct4 não envolvidas com a pluripotencialidade celular (Lee *et al.*, 2007). Esse dado corrobora com o fato da marcação encontrada para Oct4, através da técnica de imunofluorescência ter sido encontrada apenas no citoplasma. Em estudo de Ferro e colaboradores (2012) foi descrito uma variante do gene Oct4 (Oct4B) expressos em CTPD após o período de diferenciação celular. Essa variante foi encontrada apenas na região citoplasmática, não exercendo função de regulação gênica e manutenção da pluripotencialidade. Sendo assim, para concluirmos o real papel de Oct4 e Nanog nas células da polpa dentária, são necessários maiores estudos analisando as variantes desses fatores.

A seguir, analisamos se as células da polpa dentária *in vivo* apresentavam a expressão de marcadores da CN (Sox10, HNK1, p75, Nestina e Snail). Em estudos anteriores do laboratório, foi demonstrado que as células do ligamento periodontal humano, que tem origem embrionária a partir da CN, em cultura, expressam HNK1 e p75 (Coura *et al.* 2008). Além disso, estudos *in vitro* vêm comprovando a existência de células com características da CN na polpa dentária de humanos e ratos (Gronthos *et al.*, 2000; Techawattanawisal *et al.*, 2007; Sonoyama *et al.*, 2008).

O Sox10 (*Sry-related HMG-BOX gene 10*) é um fator de transcrição expresso em células da CN e seus derivados, como células neurais e melanócitos. Esse fator é essencial durante o desenvolvimento, sendo que embriões *knockout* para esse gene apresentam migração irregular das células da CN (Dutton *et al.*, 2001). Em humanos, mutações ou deleção do gene Sox10 acarreta em más formações do

sistema nervoso entérico, além de problemas de mielinização (Pingault *et al.*, 1998; Southard-Smith; Kos; Pavan, 1998). Em nossos experimentos de imunohistoquímica, observamos a expressão de Sox10, em F17, D4 e em dentes adultos. A expressão desse fator de transcrição é fundamental para a sobrevivência das células da CN e a manutenção da sua potencialidade (Haldin; LaBonne, 2010) e regulação da diferenciação celular (Kim *et al.*, 2003). Sendo assim, podemos sugerir que a expressão de Sox10 em células da polpa dentária durante a odontogênese até a fase adulta possa estar relacionado com a manutenção do estado indiferenciado de progenitores celulares com características da CN.

Analisamos ainda a expressão do antígeno HNK1, que é um carboidrato relacionado com a adesão e reconhecimento celular (Nordlander, 1993). O anticorpo anti-HNK1, específico contra esse açúcar, foi desenvolvido para reconhecimento da célula de defesa *human natural killer*. Posteriormente, foi descoberto que esse também era encontrado nas células da CN e nos seus derivados celulares em mamíferos, aves, anfíbios e peixes (Vincent; Duband; Thiery, 1983; Bronner-Fraser, 1986; Sadaghiani; Vielkind, 1990; Nordlander, 1993). Em nossos experimentos de imunohistoquímica, não obtivemos marcação para HNK1 nas fases iniciais analisadas do desenvolvimento dentário (F17 e D4), o que pode estar relacionado com o seu papel essencial para a migração das células da CN (Vincent; Duband; Thiery, 1983; Bronner-Fraser, 1986). Contudo, marcação intensa desse epítipo foi observada em células da polpa dentária de dentes adultos, sugerindo que esse marcador pode voltar a ser expresso por essas células mais tardiamente. O fato de nas fases iniciais do desenvolvimento da polpa dentária não termos encontrado marcação para HNK1, pode estar relacionado com este açúcar ser descrito como essencial para a fase de migração das células da CN, mas não há dados até o momento que mostrem que ele seja essencial para a manutenção dessas células no tecido (Vincent; Duband; Thiery, 1983; Bronner-Fraser, 86). Essa observação pode justificar a expressão de Sox10 em F17 e D4, pois este fator de transcrição, ao contrário de HNK1, é importante para a manutenção das células da CN.

Além da expressão dos componentes celulares citados até aqui, analisamos ainda a expressão do receptor de baixa afinidade das neurotrofinas, o p75. As neurotrofinas compreendem uma família de fatores de crescimento que incluem os fatores NGF, BDNF, NT-3 e NT-4. O receptor p75 é abundantemente expresso em células precursoras neuronais estando envolvido na formação e crescimento axonal

(Pataputian; Reichardt, 2001). Além disso, esse receptor é considerado um marcador de células da CN (Morrison *et al.*, 1999). Em trabalho anterior do nosso grupo, foi demonstrada a expressão de p75 nas células do ligamento periodontal adulto mantidas em cultivo (Coura *et al.*, 2008). Considerando que o ligamento e a polpa dentária apresentam a mesma origem embrionária, esperávamos encontrar células p75 positivas na polpa dentária. Porém, os nossos dados demonstraram que não há expressão desse receptor nem na fase de capuz nem na fase adulta.

Embora os resultados obtidos não apresentem a expressão de p75 na fase de capuz (F17), Wen e colaboradores (2012) demonstraram a expressão de p75 no início da odontogênese, na fase de botão, fase anterior à fase de capuz. Nos experimentos realizados foi observado ainda a expressão de p75 em D4 e resultado negativo outra vez em idade adulta. Esse último resultado também foi comprovado através da análise de RT-PCR. Esses fatos sugerem que, possivelmente, pode haver picos de expressão de p75 durante o desenvolvimento do dente.

Outra proteína analisada que também é característica de derivados da CN, considerada também marcador de células progenitoras neurais, foi a Nestina (Lobo *et al.*, 2004; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Stemple; Anderson, 1992). A Nestina é uma proteína de filamento intermediário presente em células imaturas, estando presente em níveis elevados em linhagens celulares do sistema nervoso. Nos nossos experimentos observamos a expressão gênica de Nestina na polpa dentária humana adulta nas análises *in vivo* por RT-PCR. Esses resultados sugerem células com capacidade neural na polpa dentária humana, indicando que essas células apresentam, possivelmente, potencial ectodermal *in vivo*.

Além da Nestina, também foi observado por RT-PCR em células da polpa dentária humana adulta à expressão do gene Snail. Esse gene está envolvido na indução das células da CN, sendo essencial para a transição epitélio-mesenquimal (Leptin, 1991; LaBonne; Bronner-Fraser, 2000).

Em conjunto os resultados das análises de imunohistoquímica e RT-PCR, demonstraram a expressão de Sox10, p75, HNK1, Snail e Nestina durante o desenvolvimento dentário de ratos ou na polpa dentária humana adulta, sugerindo a presença de células com características da CN. Esses dados levantaram a possibilidade de que as células da polpa dentária apresentassem potencial ectomesenquimal. Essa possibilidade foi avaliada em células da polpa dentária humana adulta mantidas em cultura.

As células da polpa dentária foram mantidas em meio controle (MC) e meio de cultura de CT neurais (MCTN) e analisadas para a expressão de Oct4, α SMA, Nestina e β TubulinaIII. A proteína α SMA é expressa em derivados mesenquimais. O marcador β TubulinaIII, por sua vez, é descrito na literatura como característicos de células neurais (Stemple *et al.*, 1992; Lobo *et al.*, 2004). Sendo assim, a presença desses marcadores em conjunto indicaria um possível potencial ectomesenquimal. Os resultados demonstraram que as células da polpa dentária expressam Oct4, β Tubulina e Nestina, em proporções similares entre os meios MC e MCTN. Porém, observamos redução significativa na proporção de células positivas para α SMA, quando essas eram mantidas em MCTN. Adicionalmente, observamos nas células mantidas nesse meio, alterações morfológicas, sendo que as células que apresentavam até então morfologia fibroblastóide, passam a apresentar uma morfologia alongada com prolongamentos citoplasmáticos. Na literatura as mudanças morfológicas estão relacionadas com mudança na expressão proteica das células, o que pode ser acarretada por um processo de diferenciação celular (Wolpert *et al.*, 2008). Sendo assim, em conjunto, esses resultados podem indicar que as células mantidas em MCTN estejam avançando no seu programa de diferenciação celular.

Uma vez que os ensaios de cultura em massa, ou seja, com um grande número de células cultivadas por poço, não fornece informações sobre a potencialidade de uma célula específica, resolvemos realizar a seguir ensaios de UFCs. Esses são ensaios clonais, permitindo assim analisar a capacidade de diferenciação celular de uma única célula.

Os ensaios de UFCs demonstraram que as células da polpa dentária apresentam potencial clonogênico, demonstrando assim a sua característica multipotente. É importante destacar, que obtivemos uma eficiência clonogênica consideravelmente maior do que os obtidos em outros estudos descritos na literatura: Gronthos e colaboradores (2000) obtiveram apenas 0,7%, e Cheng e colaboradores (2008) obtiveram em torno de 33% de eficiência clonogênica. Diferenças metodológicas, como o meio e tempo de cultivo utilizado podem explicar essas diferenças.

Ao analisarmos as UFCs em relação aos meios adotados (MC vs MCTN) notamos um decaimento na capacidade de formação de colônias das células mantidas em MCTN com o decorrer das passagens. Esse resultado pode estar relacionado com um possível decaimento no número de progenitores, podendo indicar que as células estariam passando por processo de diferenciação celular. Observamos ainda

diminuição do tamanho dos clones cultivados em MCTN, quando comparado ao MC, sugerindo redução na capacidade proliferativa das células, coerente com um processo de diferenciação celular. Esses dados corroboram os resultados de cultura em massa, onde o MCTN parece estar promovendo diferenciação neural ou promovendo a seleção de progenitores neurais. Apesar desses resultados, não observamos morfologia tipicamente neuronal. Isso pode ser explicado pelo curto período de cultura em MCTN. É possível também que haja necessidade de substituição do MCTN por outro meio indutivo para haver completa diferenciação neuronal.

A seguir, realizamos análises imunofenotípicas nas UFCs. Nesses experimentos observamos células positivas para Nestina e β Tubulina (característicos de derivados ectodermiais) e células positivas para α SMA (característico de derivados mesodermiais) em uma mesma colônia, em ambos os meios de cultivo. Esse resultado demonstra que as células de polpa dentária apresentam potencial ectomesenquimal na fase adulta, mesmo quando cultivadas por longo período e está de acordo com a origem das células da polpa dentária pela CN (Miletich; Sharpe, 2004; Techawattanawisal *et al.*, 2007). Além disso, demonstram que essas células mantêm o potencial ectomesenquimal ao longo do desenvolvimento dentário.

Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a polpa dentária contenha uma população de células multipotentes, com capacidade clonogênica e com potencial ectomesenquimal. Análises imunohistoquímicas e de RT-PCR indicam a presença dessas células desde o desenvolvimento dentário até a fase adulta de ratos, e na fase adulta humana. O cultivo em MCTN das células da polpa dentária humana adulta sugerem que essas células apresentam potencial de diferenciação neural. Esses dados demonstram que as CTPD apresentam potencial para fins terapêuticos.

7 CONCLUSÕES

- A polpa dentária contém células multipotentes que são encontradas durante o desenvolvimento embrionário até a fase adulta, apresentando a expressão de marcadores de pluripotencialidade, como Nanog e OCt4, marcadores de CN, como Sox 10, e capacidade clonogênica.
- A polpa dentária humana contém células com características de CN mesmo em fase adulta.
- As células da polpa dentária apresentam potencial ectomesenquimal.
- As células da polpa dentária apresentam potencial neural quando cultivados em meio indutivo apropriado.
- As células da polpa dentária apresentam um possível potencial no uso em terapias celulares devido a sua multipotencialidade e característica ectomesenquimal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. M. DE *et al.* HUMAN DENTAL PULP CELLS: A NEW SOURCE OF CELL THERAPY IN A MICE MODEL OF COMPRESSIVE SPINAL CORD INJURY. **Journal of Neurotrauma**, v. 1-37, p. 1-37, 2010.

ARTHUR, A. *et al.* Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2229-37, set. 2009.

AVILION, A. A *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 126-40, 1 jan. 2003.

BATOULI, S. *et al.* Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 12, p. 976-981, 1 dez. 2003.

BERGQVIST, L. P. The Role Of Teeth In Mammal History. v. 2, n. 6, p. 249-257, 2003.

BIANCO, P.; GEHRON ROBEY, P. Marrow stromal stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1663-68, jun. 2000.

BIZ, M. T. **DISTRIBUIÇÃO , EXPRESSÃO E PAPEL DAS GTPases RhoA E Rac1 NAS FASES INICIAS DE DESENVOLVIMENTO DO GERME DENTÁRIO E NA DIFERENCIAÇÃO DE AMELOBLASTOS E.** [S.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Developmental Biology**, v. 115, n. 1, p. 44-55, maio. 1986.

CAVALLO, C. *et al.* Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1418-30, maio. 2011.

CORDEIRO, M. M. *et al.* Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. **JOE**, v. 34, n. 8, p. 962-969, 2008.

COURA, G. S. *et al.* Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 5, p. 531-6, out. 2008.

CREUZET, S.; COULY, G.; DOUARIN, N. M. LE. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 5, p. 447-59, nov. 2005.

D'AQUINO, R. *et al.* Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 312B, n. 5, p. 408-15, 15 jul. 2009.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-17, jan. 2006.

DOUARIN, N. M. LE. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 9, p. 1089-102, set. 2004.

DUARTE, B. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA DE HUMANOS.** [S.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

DUTTON, K. A *et al.* Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4113-25, nov. 2001.

FERRO, F. *et al.* Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41774, jan. 2012.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology.** 9. ed. [S.l.] Sinauer Associates, 2010. p. 711

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, 5 dez. 2000.

GRONTHOS, S. *et al.* Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-35, 2002.

HALDIN, C. E.; LABONNE, C. SoxE factors as multifunctional neural crest regulatory factors. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 3, p. 441-4, mar. 2010.

HUANG, G. T.-J.; SHAGRAMANOVA, K.; CHAN, S. W. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 11, p. 1066-73, nov. 2006.

JERNVALL, J.; THESLEFF, I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. **Development**, v. 139, n. 19, p. 3487-97, out. 2012.

JORI, F. P. *et al.* Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, n. 4, p. 645-55, 1 mar. 2005.

KARCHER-DJURICIC, V. *et al.* A cellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. **Differentiation**, v. 29, n. 2, p. 169-75, 1985.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, n. 5, p. 209-14, nov. 2004.

KIM, J. *et al.* SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. **Neuron**, v. 38, n. 1, p. 17-31, 2003.

KIRÁLY, M. *et al.* Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 3, p. 371-81, set. 2011.

LABONNE, C.; BRONNER-FRASER, M. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. **Developmental Biology**, v. 221, n. 1, p. 195-205, 1 maio. 2000.

LAVKER, R. M.; SUN, T. Epidermal stem cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 1, p. 121-27, 1983.

LEE, G. *et al.* Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 1468-75, dez. 2007.

LEPTIN, M. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. **Genes & Development**, v. 5, n. 9, p. 1568-1576, 1 set. 1991.

LOBO, M. V. T. *et al.* Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. **Cell and Tissue Research**, v. 316, n. 3, p. 369-76, jun. 2004.

MAHERALI, N.; HOCHEDLINGER, K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 595-605, 4 dez. 2008.

MELFI, R. C.; ALLEY, K. E. **Embriologia e Histologia Oral de Permar**. 10. ed. [S.l.] Santos Editora, 2010. p. 297

MILETICH, I.; SHARPE, P. T. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. **Birth Defects Research. Part C, Embryo today: reviews**, v. 72, n. 2, p. 200-12, jun. 2004.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, 13 maio. 2003.

MOONEY, D. J. *et al.* Engineering dental pulp-like tissue in vitro. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 6, p. 865-8, 1996.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. 7. ed. [S.l.] Elsevier, 2008. p. 365

MORRISON, S. J. *et al.* Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 737-49, 5 mar. 1999.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. **Cell**, v. 88, p. 287-98, 1997.

MORSCZECK, C. *et al.* Somatic stem cells for regenerative dentistry. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, n. 2, p. 113-18, jun. 2008.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. D. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 174, p. 249-82, jan. 2006.

NORDLANDER, R. H. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of *Xenopus*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 335, n. 4, p. 538-51, 22 set. 1993.

PAINO, F. *et al.* Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. **European Cells & Materials**, v. 20, p. 295-305, jan. 2010.

PELACHO, B. *et al.* Adult stem cells: from new cell sources to changes in methodology. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 154-60, abr. 2011.

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth: where and how to make them. v. 15, n. 2, p. 59-65, 1999.

PINGAULT, V. *et al.* SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. **Nature Genetics**, v. 18, n. 2, p. 171-173, 1998.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-47, 2 abr. 1999.

POLLI, V. **AVALIAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA COMO NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO / PROGENITORAS DERIVADAS DA CRISTA NEURAL**. [S.l.] Universidade do estado de Santa Catarina, 2011.

RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. On the origin of the term “stem cell”. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 35-38, 7 jun. 2007.

RUCH, J. V. Odontoblast commitment and differentiation. **Biochemistry Cell Biol**, v. 76, n. 6, p. 923-38, 1998.

SADAGHIANI, B.; VIELKIND, J. R. Distribution and migration pathways of HNK-1-immunoreactive neural crest cells in teleost fish embryos. **Development**, v. 110, n. 1, p. 197-209, set. 1990.

SANCHEZ-RAMOS, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 2, p. 247-56, ago. 2000.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 557-68, jul. 2008.

SONOYAMA, W. *et al.* Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth : A Pilot Study. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 2, 2008.

SOUTHARD-SMITH, E. M.; KOS, L.; PAVAN, W. J. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. **Nature**, v. 18, p. 60-4, 1998.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As Células-Tronco e o seu Potencial na Reparação de Órgãos e Tecidos . *In: Manual de instrução programada: Princípios de hematologia e hemoterapia*. segunda ed. [S.l.] Perfusion online, 2005. p. 190.

STEMPLE, D. L.; ANDERSON, D. J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. **Cell**, v. 71, n. 6, p. 973-85, 11 dez. 1992.

TECHAWATTANAWISAL, W. *et al.* Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 4, p. 917-23, 15 jun. 2007.

THESLEFF, I. Developmental biology and building a tooth. **Quintessence**, v. 34, n. 8, p. 613-20, 2003.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. Hemopoietic stem cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 605, p. 431-59, 1980.

TSAI, C.-C. *et al.* Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. **Molecular Cell**, v. 47, n. 2, p. 169-82, 27 jul. 2012.

VAAHTOKARI, A. *et al.* The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. **Mechanisms of Development**, v. 54, n. 1, p. 39-43, jan. 1996.

VINCENT, M.; DUBAND, J. L.; THIERY, J. P. A cell surface determinant expressed early on migrating avian neural crest cells. **Brain Research**, v. 285, n. 2, p. 235-8, ago. 1983.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-48, 5 mar. 2004.

WEI, X. *et al.* Expression of mineralization markers in dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 6, p. 703-8, jun. 2007.

WEN, X. *et al.* Characterization of p75(+) ectomesenchymal stem cells from rat embryonic facial process tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 427, n. 1, p. 5-10, 12 out. 2012.

WIDERA, D. *et al.* Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 3, p. 447-60, jun. 2007.

WOLPERT, L. *et al.* **Principios de Biologia do Desenvolvimento**. [S.l.] Artmed, 2008. p. 576

YAMADA, Y. *et al.* Cluster analysis and gene expression profiles : A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. **Biomaterials**, v. 27, p. 3766-3781, 2006.

YOUNG, H. E. *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 1 set. 2001.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Avaliação do ligamento periodontal e da polpa dental como nicho de células tronco derivada da Crista Neural”

Pesquisador Responsável: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Gonçalves Trentin RG: 4518154-3

Pesquisador(es) participante(s): Beatriz Dal Pont Duarte, Michelle Tillmann Biz

Telefones para contato: (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Avaliação do ligamento periodontal e da polpa dental como nicho de células tronco derivada da Crista Neural”, de responsabilidade da pesquisadora Prof^ª. Dr^ª. Andréa Gonçalves Trentin. A seguir lhe serão apresentadas informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Célula-tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células tronco derivadas do ligamento periodontal e polpa dental. Atualmente as células tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras desordens médicas e odontológicas.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados o ligamento periodontal e polpa dental retirados da raiz do dente e da cavidade interna do dente, respectivamente. Estas estruturas serão retiradas durante as cirurgias de retirada do dente do ciso, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A

partir destes fragmentos realizaremos culturas de células tronco do ligamento periodontal e da polpa dental para compreendermos melhor o funcionamento/comportamento destas células. Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células tronco do ligamento periodontal e polpa dental, como por exemplo, na reconstituição do tecido ósseo. Reforçamos que os fragmentos de dente que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de dente retirado durante a cirurgia e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre a sua participação garantindo a sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador: _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”, e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável:

_____ **RG:** _____

Florianópolis, ____ de _____ de 2011.