

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

Viviane Aparecida Balvedi Polli

AVALIAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA COMO NICHOS DE  
CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS DERIVADAS DA  
CRISTA NEURAL

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
Grau de Mestre em Biologia  
Celular e do Desenvolvimento  
Orientador: Prof(a). Dr(a).  
Andrea G. Trentin.

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P774a Polli, Viviane Aparecida Balvedi  
Avaliação da polpa dentária como nicho de células-  
troco/progenitoras derivadas da crista neural [dissertação] /  
Viviane Aparecida Balvedi Polli ; orientadora, Andrea  
Gonçalves Trentin. - Florianópolis, SC, 2011.  
80 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Crista neural. 2. Polpa dentaria. 3. Células-tronco.  
4. Marcadores biológicos. I. Trentin, Andrea Gonçalves.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.  
Titulo.

CDU 57

Viviane Aparecida Balvedi Polli

**AValiação DA POLPA DENTÁRIA COMO NICHOS DE  
CÉLULAS-TRONCO/PROGENTORAS DERIVADAS DA  
CRISTA NEURAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e \_\_\_\_\_ em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2011.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Andrea Gonçalves Trentin,  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz,  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof., Dr. Paulo Fernando Dias,  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof., Dr. Márcio da Silva Alvares,  
Universidade Federal de Santa Catarina



## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação à minha amada família, porque sem vocês eu nada seria...



## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente... OBRIGADA POR TUDO!

À minha mãe maravilhosa, Arlete, pelo amor, apoio, força, incentivo e encorajamento. Às minhas irmãs Cinthia e Daniela, vocês são meu exemplo de superação, de conquistas e de equilíbrio. Ao meu pai, Getúlio, por me ensinar que a vida nem sempre é fácil, mas que com perseverança, conseguimos tudo aquilo que quisermos. Ao meu cunhado Humberto, pelo amor dado em todos os momentos e pela sabedoria transmitida. Aos meus sobrinhos Ká, Murilo e Rômulo... Amo vocês!!! À minha meia família, Aldair, Maysa e Denis, sou grata por tornar-nos uma só família, com todas suas alegrias e confusões!

À pessoa muito importante na minha vida, Cristian, por estar junto comigo em cada momento, os dias alegres e os dias tristes, e por sempre acreditar – e me fazer convencer - que tudo vai dar certo.

A minha família inteira (tios, primos, primas, etc) que esta sempre torcendo por mim!!

Às minhas grandes amigas da graduação: Leila, hoje sigo seus passos, amanhã quero compartilhar minhas conquistas contigo para que juntas novamente estejamos. Gi, sem você este dia não estaria acontecendo... Sou eternamente grata a você amiga pelos bons e divertidos momentos que tivemos, e pela alegria que sempre contagia. Ana, você e sua família se fizeram a minha em PG, gostaria de agradecer por me deixar fazer parte da sua vida e queria que soubesse como sinto por estar longe e não poder aproveitar cada momento desta nova etapa da sua vida junto a vocês. Sinto saudades. Amigas, amo muito vocês!!!

Às minhas amigas de BC agradeço por compreenderem a ausência de momentos importantes, e por estarem torcendo por mim e me acompanhando a cada passo. Ju, Vika, Daí e Fran vocês são realmente parte de mim e sempre estarão do lado esquerdo do peito.

Aos meus novos amigos de Floripa que sempre me estenderam a mão, meu muito obrigado: Eder, Suzi, Cintia, Rodrigo, Sandra, Fer Borba, Silvia, Sá entre outros.

A Val, Moacir e família, seu incentivo e compreensão foram fundamentais para meu início.

Aos colegas do LACERT pelos ensinamentos, paciência, convivência e divertimento.

À Prof(a) Dr(a) Andrea G. Trentin por abrir as portas do seu laboratório e pelo constante aprendizado. Obrigado por colaborar com minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Marcio S. Alvarez por ceder seu laboratório e estar sempre disposto a ajudar.

A banca examinadora pelo intercâmbio de idéias, sugestões e discussões construtivas que se delinearam durante a qualificação e defesa desta dissertação.

Ao Dr. Gustavo Coura pela ajuda, ensinamentos, por sua colaboração cedendo os materiais e pela amizade.

À Prof.(a) Dr.(a) Michelle Tillmann Biz pela colaboração, auxílio, disponibilidade e pelas conversas incentivadoras.

Ao Prof. Dr. Giordano W. Calloni pelo apoio, aprendizado e confiança em todos os momentos. Obrigada por me permitir fazer dos seus alunos, também os meus.

A todos os professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelos ensinamentos transmitidos; e aos funcionários pela ajuda constante.

Aos voluntários que possibilitaram o estudo, meu especial agradecimento. Sem vocês não teria trabalho...

Ao LACERT, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina.

À Capes, CNPq, FAPESC e MCT pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que, por erro ou esquecimento meu, não foram expressamente mencionadas e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, a minha eterna gratidão.

## RESUMO

A crista neural (CN) é uma estrutura transiente presente durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados, sendo composta por um grupo de células originadas a partir das margens dorsais das pregas neurais durante o processo de neurulação. Os processos de migração e especificação das células da CN permitem classificá-las ao longo de todo eixo ântero-posterior do embrião: cranial, cardíaca, truncal e caudal; sendo que, cada região terá seus derivados específicos. Células da CN são células progenitoras altamente multipotentes que contribuem extensivamente para o desenvolvimento dos vertebrados dando origem a vários tipos celulares. Durante a neurulação, os progenitores originais da CN irão desaparecer junto com seu habitat inicial. Porém, mais tarde, locais como o dente aparecem como nichos tardios de progenitores oligopotentes derivados da CN, para manutenção e reparo destas estruturas, em vertebrados adultos. Neste trabalho, investigou-se *in vitro* a possibilidade de a polpa dental (PD) humana ser um possível nicho de CT/progenitoras da CN, sua característica mesenquimal e seu potencial de diferenciação e proliferação celular através de indução e análises fenotípicas das células da PD. A caracterização das células da PD como células-tronco mesenquimais foi observada, pelo potencial de diferenciação para fenótipos mesodermis (osteócitos, adipócitos e células de músculo liso), pela presença dos marcadores para CD73, CD90 e CD105 e ausência de CD45, avaliado por citometria de fluxo. As células da PD apresentam-se positivas para alguns marcadores de células-tronco embrionária (OCT4) e de células-tronco da CN (Snail, nestina), e negativas para outros (nanog; e p75 e SOX 10, respectivamente) avaliado por RT-PCR e imunocitoquímica. Os resultados demonstraram ainda, que as células de PD apresentam potencial de diferenciação neural pois foram positivas por RT-PCR e imunocitoquímica para marcadores precoces de neurônio ( $\beta$ -Tubulina III e Neurofilamento M) e de células gliais (P0), porém não apresentam os marcadores neuronais e gliais mais tardios (Periferina e GFAP, respectivamente). Todos os resultados foram semelhantes quando as células eram cultivadas em meio padrão e o meio da CN. Em conjunto, os resultados sugerem que as células de PD utilizadas neste trabalho são células tronco mesenquimais. As células de PD apresentam ainda características de células da CN, avaliado pela presença dos marcadores Snail e nestina e pelo potencial de diferenciação em fenótipos derivados da CN como neuronal, glial e muscular liso.

**Palavras-chave:** Crista neural. Polpa dental. Células-tronco mesenquimal.

## ABSTRACT

The neural crest (NC) is a transient structure of vertebrate development, originated at the dorsal margin of the neural folds during neurulation. The NC are classified along the antero-posterior axis of the embryo in cranial, cardiac, truncal and caudal. Each region has its specific derivatives. NC correspond to a collection of highly multipotent progenitors that contribute extensively to the development of vertebrates and give rise to various cell types. During neurulation, the original progenitors of the NC will disappear along with their original habitat. However, in adult vertebrates, oligopotent NC progenitors appear as clusters in tissues such as the teeth, for maintenance and repair of these structures. In this study, we investigated the human dental pulp (DP) as a possible niche of NC stem cells (SC)/ progenitor cells. We also analyze their *in vitro*, potential for mesenchymal and neural differentiation, and proliferation. The results shown that DP cells could be characterized as mesenchymal SC by the presence of CD73, CD90 and CD105 and absence of CD45 in addition to their potential to differentiate in adipogenic and osteogenic mesenchymal phenotypes. Moreover, DP cells show the embryonic stem cell marker such as OCT4, and NC markers such as SNAIL and nestin, although there are negative for others (nanog and p75, SOX10, respectively). Taken together, the results demonstrate that DP cells are in fact mesenchymal stem cells, and also have some properties of NC cells such as the presence of the cell markers, SNAIL and nestin, and neural and smooth muscle differentiation potential.

**Keywords:** Neural crest. Dental pulp. Mesenchymal stem cells.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Migração das células da CN truncal.....	2
Figura 2: Migração das células da CN cefálica.....	5
Figura 3: Origem embrionária dos diferentes tipos de células que formam um dente de um roedor.....	7
Figura 4: Esquema mostrando ciclo de vida do dente com contribuição células da CN.....	8
Figura 5: Propriedades fundamentais da CT.....	9
Figura 6: Fotografia de contraste de fase de células da PD humana após sete dias de cultura.....	28
Figura 7: Fotografias representativas de imunofluorescência para BrdU para avaliação da proliferação das células da PD.....	29
Figura 8: Análise quantitativa da incorporação de BrdU nas células da PD cultivadas em meio $\alpha$ -MEM (meio padrão) e meio da CN e, conforme descrito em Materiais e Métodos.....	29
Figura 9: Fotografias representativas das células cultivadas nos meios indutivos (A) osteogênico e (B) adipogênico.....	30
Figura 10. Histogramas representativos das fluorescências analisadas individualmente e plotadas a partir das análises fenotípicas para marcadores moleculares obtidos por citometria de fluxo das células da PD.....	32
Figura 11. Histogramas representativos dos isotipos controles (apenas células incubadas com controle de conjugado) e de cada marcador.....	33
Figura 12: Análises por RT-PCR da presença do RNAm para os marcadores de CT embrionárias (nanog e oct4), de CN (p75, Snail, Sox 10, Nestina), neurônios (periferina, NFM, $\beta$ - TubIII) e de células gliais (P0, GFAP) e $\alpha$ -SMA.....	35
Figura 13: (A) Fotografia representativa de células positivas para OCT4 (verde). Os núcleos totais foram corados com DAPI (azul).....	37
Figura 14: (A) Fotografia representativa de células positivas para Nestina (verde).....	37
Figura 15: (A) Fotografia representativa de células positivas para $\beta$ -TubIII (vermelho). Os núcleos totais foram corados com DAPI (azul).....	38
Figura 16: (A) Análise quantitativa da proporção de células positivas para P0 (P0 <sup>+</sup> ) nas culturas de células da PD cultivadas nos meio padrão e da CN. Os núcleos totais foram corados com DAPI (azul).....	38

Figura 17: (A) Fotografia representativa de células positivas para  $\alpha$ -SMA (verde). Os núcleos totais foram corados com DAPI (azul).....38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores utilizados na reação de RT-PCR.....	20
Tabela 2: Iniciadores utilizados na avaliação da expressão gênica.....	21
Tabela 3: Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações imunocitoquímicas e de análise fenotípica.....	23
Tabela 4: Marcadores utilizados na reação de RT-PCR.....	25



**LISTA DE SÍMBOLOS**

°C - graus Celsius  
cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados  
g - gravidade  
h - horas  
M - molar  
mg - miligrama  
min - minutos  
mL - mililitro  
mm<sup>3</sup> - milímetros cúbicos  
mM- milimolar  
μg - micrograma  
μL - microlitro  
μm - micrômetro  
μM - micromolar  
N - normal  
ng - nanograma  
nm - nanômetro  
rpm - rotações por minuto  
seg - segundos  
U - unidade  
x - vezes  
% - porcentagem



## LISTA DE ABREVIATURAS

Acs 1<sup>o</sup>- anticorpos primários  
Acs 2<sup>o</sup>- anticorpos secundários  
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro  
BrdU - 5-bromo-2- deoxiurina  
CFU - F - unidade formadora de colônias fibroblásticas  
CN - crista neural  
CO<sub>2</sub>- gás carbônico  
CT - célula-tronco  
CTA - célula-tronco adulta  
CTE - célula-tronco embrionária  
CTM - célula-tronco mesenquimal  
Cy - CyCromo  
Dapi – 4'-6- diamino – 2- fenilindol  
D-MEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMEM HG - *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*  
DO - densidade óptica  
EDTA - Etileno-dinitrilo-tetracético  
EGF - fator de crescimento epidermal  
FGF2 - fator de crescimento fibroblástico tipo 2  
FGF4 - fator de crescimento fibroblástico tipo 4  
FITC - fluoresceína isotiocianato  
HLA-DR - complexo de histocompatibilidade principal de classe II  
H<sub>2</sub>O- água  
LP - ligamento periodontal  
MAP-2 - proteína associada à microtúbulo  
MO - medula óssea  
NF-M - neurofilamento M  
dT - deoxirribonucleotídeos  
dNTPs – deoxirribonucleotídeos trifosfatados  
P0 - proteína zero  
PE - ficoeritrina  
PerCP - Complexo Proteína- Clorofila-Peridrina  
PBS - solução salina de fosfato tamponada  
PD - polpa dental  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaqueta  
PS - penicilia e streptomina (antibiótico/antifúngico)  
pH - potencial hidrogeniônico  
RNAsin -

Shh - sonic hedgehog

SFB - soro fetal bovino

TA - temperatura ambiente

T. A. – temperatura de anelamento

TAE - tris base, ácido acético, EDTA

TGF- $\alpha$  – fator de crescimento transformador alfa

TX – Texas red

$\alpha$  - MEM –  *$\alpha$ -Modified Eagle's Medium*

$\alpha$  – SMA – alfa actina de músculo liso

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. CRISTA NEURAL.....	1
1.2 CN e DESENVOLVIMENTO CEFÁLICO.....	4
1.2.1 CN Cefálica e Desenvolvimento Dental.....	5
1.2.2 Desenvolvimento Dental e Células-Tronco.....	8
1.2.3 Células-Tronco Mesenquimais.....	9
1.2.4 Células-Tronco da Polpa Dental.....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 CULTURA CELULAR.....	16
4.2 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS MESODERMAIS.....	17
4.2.1 Diferenciação Adipogênica.....	17
4.2.2 Diferenciação Osteogênica.....	17
4.3 ANÁLISE FENOTÍPICA DOS FENÓTIPOS ECTODERMAIS E MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS DA CN.....	18
4.3.1 Meio para Crescimento das Células da CN.....	18
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT- PCR) .....	18
4.3.2.1 Extração e Isolamento do RNA Total.....	18
4.3.2.2 Tratamento do RNA com DNase.....	19
4.3.2.3 Reação da RT.....	19
4.3.2.4 Amplificação.....	20
4.3.2.5 Visualização dos Produtos do RT-PCR.....	22
4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BrdU.....	22
4.5 IMUNOCITOQUÍMICA E ANÁLISE FENOTÍPICA.....	22
4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO MESODERMAL.....	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	26
5.1 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO, OTIMIZAÇÃO DA CULTURA E ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	26
5.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	28
5.3 CARACTERÍSTICA MESENQUIMAL.....	29
5.3.1 Diferenciação em Fenótipos Mesodermais.....	30

5.3.2 Determinação do Perfil Fenotípico Mesodermal por Citometria de Fluxo.....	31
5.4 ANÁLISE FENOTÍPICA.....	34
5.4.1 RT-PCR.....	34
5.4.2 Imunocitoquímica.....	36
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA.....	58
ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	59

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CRISTA NEURAL

Em 1868, Wilhelm His, embriologista suíço, identificou um grupo de células entre o tubo neural em desenvolvimento e a futura ectoderme epidermal, de embriões de aves, e sugeriu que este agrupamento seria responsável pela formação de gânglios espinhais e craniais. A esse agrupamento de células, ele chamou de cordão intermediário. Porém, o nome desta estrutura, como sendo designada de crista neural (CN) só foi usado pela primeira vez por Arthur Marshall, em 1879, em um artigo sobre o desenvolvimento de órgãos olfatórios (Hall, 2009).

A CN é uma estrutura transiente composta por um grupo de células originadas a partir das margens dorsais das pregas neurais durante o processo de neurulação do desenvolvimento de vertebrados (Le Douarin et al, 2004; Dupin et al, 2007). Durante e depois do fechamento do tubo neural em embriões de vertebrados, as células da CN destacam-se da ectoderme realizando o processo de delaminação, no qual as células destacadas arranjam-se em uma ou mais novas camadas paralelas. Desta forma as células da CN ficam localizadas na fronteira entre epitélios neurais e não neurais. A partir deste momento, elas adquirem um fenótipo migratório de células isoladas permitindo sua multiplicação e, conseqüentemente, infiltrando (ou invadindo) o mesoderma. É iniciada então uma extensiva migração destas células por todo o embrião estabelecendo seus mapas de destino (Le Douarin & Kalcheim, 1999).

Os mapas de destinos das células da CN foram estabelecidos no ano de 1970 pelo grupo da Profa. Nicole Le Douarin que realizou vários experimentos transplantando fragmentos do tubo neural de embriões de codorna, antes da migração das células da CN em embriões de galinha. Estes experimentos permitiram identificar as rotas migratórias da CN, bem como a potencialidade destas populações e as subpopulações dela derivadas uma vez que os núcleos das células de codorna podem ser identificados nos tecidos dos embriões de galinha (Le Douarin & Kalcheim, 1999; Le Douarin, 2008).

O processo de migração e especificação das células da CN permite classificá-las em regiões ao longo de todo eixo ântero-posterior do embrião (Figura 1). A CN pode ser então, dividida em CN cranial, CN cardíaca, CN truncal e CN caudal; sendo assim, cada região da CN terá seus derivados específicos. A diferenciação local apropriada das células CN é resultado da combinação de fatores extrínsecos do nicho embrionário (Bronner-Fraser et al, 1993 e 1995; Abzhanov et al, 2002; Couly et al, 2002; Thomas et al, 2008) e das propriedades intrínsecas de células que modificam a resposta a essas influências (McGonnell & Graham, 2002; Thomas et al, 2008). As células da CN cefálica, por exemplo, após a diferenciação produzem neurônios dos gânglios cervicais e células gliais, células pigmentares da pele (exceto as da retina), condrócitos, osteócitos, adipócitos, odontoblastos e a maioria das células musculares lisas dos vasos da cabeça (Le Lièvre & Le Douarin, 1975; Etchevers et al, 2001). Já as células da CN truncal originam, em grande parte, células do sistema nervoso periférico (SNP), como neurônios e células glia, e participam na formação de células endócrinas da glândula adrenal (Le Douarin & Kalcheim, 1999; Thomas et al, 2008; Le Douarin, 2008).

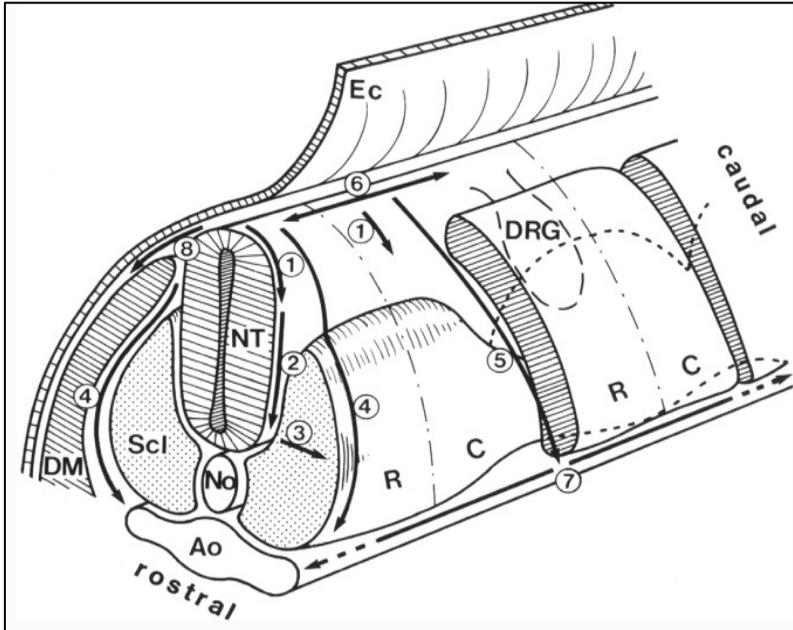


Figura 1: Migração das células da CN truncal. As setas indicam os diferentes caminhos pelos quais seguem as células da CN. (Scott et al., 2003).

Células da CN são células progenitoras altamente multipotentes que contribuem extensivamente para o desenvolvimento dos vertebrados dando origem a vários tipos celulares (Le Douarin & Kalcheim, 1999). Essa forte plasticidade celular sugere que a população de células da CN contenha múltiplos progenitores celulares, com potencialidades diferentes (Shakhova & Sommer, 2010; Dupin et al, 2010). Consequentemente, é aceito que as células da CN cefálica, assim como todas as outras subdivisões dela, possam também conter células-tronco (CT) progenitoras de uma ampla variedade de diferentes tipos celulares (Calloni et al, 2009). A maioria destes progenitores mostram diversas combinações de dois ou mais fenótipos em sua progênie. É importante ressaltar que estes progenitores intermediários exibem propriedades de CT como auto-renovação e sucessivas divisões em precursores multi ou unipotentes (Trentin et al. 2004).

Muitos trabalhos recentes evidenciam a capacidade que os progenitores derivados da CN tem de, sob influência de determinados fatores do microambiente, promover a condrogênese, osteogênese e gliogênese (Sarkar et al, 2001; Petiot et al, 2002; Ota & Ito, 2006; Calloni et al. 2007 e 2009; Costa-Silva et al. 2009; Garcez et al. 2009). Em 2004 demonstrou-se que para a diferenciação em melanócitos e para estimulação da proliferação de um progenitor bipotente de glia e melanócito, glia e neurônio ou glia e célula de músculo liso, se faz necessária a presença de endotelina 3 (Trentin et al, 2004). Em estudo, quando utilizado o fator de crescimento epidermal (EGF), *in vitro*, relatou-se a promoção de neurônios e melanócitos a partir de células da CN enquanto que o fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) promove a diferenciação glial (Garcez et al, 2009) e se os progenitores de CN forem tratados com sonic hedgehog (Shh) podem originar neurônios, células glia, melanócitos, células musculares lisas e condrócitos, *in vitro* (Calloni et al, 2007). Já os progenitores osteogênicos, sob as mesmas condições que o estudo anterior, observaram um aumento significativo da frequência de progenitores multipotentes (Calloni et al, 2009). Outro estudo, demonstrou ainda a importância da matriz extracelular como elemento fundamental do microambiente na determinação do destino das células da CN. No trabalho de Costa-Silva e colaboradores (2009), fica evidenciado um aumento da progênie de células musculares lisas quando as células da CN tanto da região cefálica quanto truncal são cultivadas sobre substato

de fibronectina; e este padrão se mantém conservado tanto em modelos de aves como de mamíferos.

Durante a neurulação, os progenitores originais da CN irão desaparecer junto com seu habitat inicial no momento do fechamento e amadurecimento do tubo neural. Porém, mais tarde no desenvolvimento do organismo, locais como gânglios entéricos (Kruger et al, 2002), gânglios da raiz dorsal (Li et al, 2007), o folículo piloso (Fernandes et al, 2004; Sieber-Blum et al, 2004; Wong et al, 2006), o dente (Miura et al, 2003), o coração (El-Helou et al., 2008) e até a medula óssea (Motohashi et al, 2007; Takashima et al, 2007) aparecem como nichos tardios de progenitores oligopotentes derivados da CN, para manutenção e reparo destas estruturas, em vertebrados adultos.

## 1.2 CN E DESENVOLVIMENTO CEFÁLICO

Durante o desenvolvimento de embriões de mamíferos, as células da CN migram antes do fechamento do tubo neural e originam o mesênquima facial. A característica migratória e origem ectodermal conferem às células da CN uma significativa e extensiva colaboração para a formação de estruturas da cabeça e pescoço destes animais (Creuzet et al, 2005). As células da CN cefálica migram ventrolateralmente povoando os arcos faríngeos e ali produzem um discreto edema, conferindo a cada um deles sua demarcação individual e forma característica (Figura 2). A migração das células da CN pelo primeiro arco faríngeo contribui para o processo nasal, palatino e do mesênquima, que culmina na formação de toda massa nasofrontal. O primeiro arco faríngeo, no homem, origina os ossos da mandíbula e o queixo, odontoblastos dos primórdios dentais, a cartilagem do ouvido interno e os ossos martelo e bigorna do ouvido médio (Couly et al, 2002; Koussoulakou et al, 2009). As células da CN cefálica originadas na região anterior do cérebro posterior, dão origem ao mesênquima do segundo arco faríngeo, que por consequência produz o osso estribo no homem, como também a maior parte da cartilagem facial. No terceiro, quarto e sexto arcos faríngeos, o mesênquima será originado das células da CN cervical. No homem o quinto arco faríngeo degenera (Couly et al, 2002).

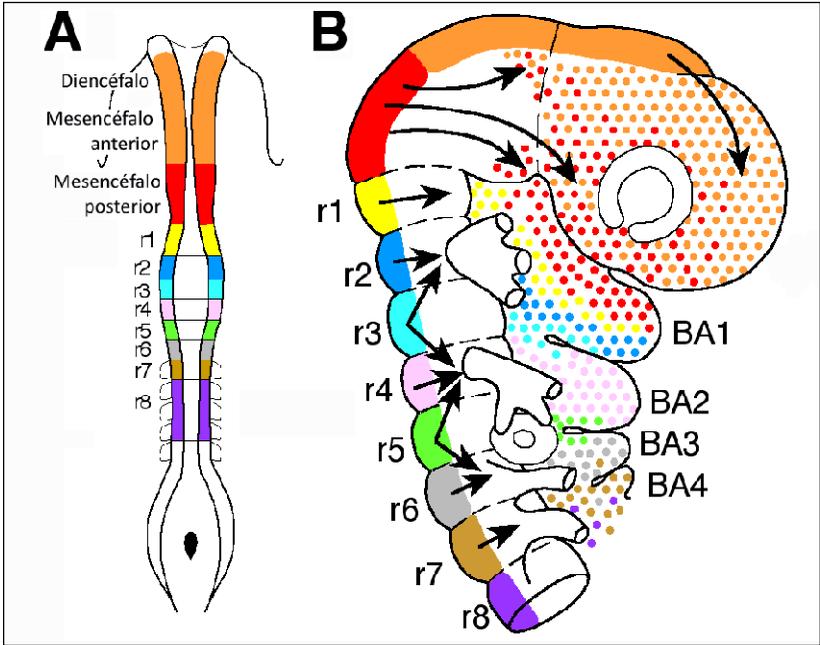


Figura 2: Migração da CN cefálica. A. Esquema de um embrião. As cores representam as regiões do tubo neural e o local de onde partem as células da CN. B. As setas indicam as rotas migratórias e os mapas do destino das células da CN. (Modificado de Couly et al, 2002).

### 1.2.1 CN CEFÁLICA E DESENVOLVIMENTO DENTAL

O desenvolvimento individual de um dente é caracterizado por uma série de recíprocas interações entre o epitélio e componentes mesenquimais do dente rudimentar (Le Douarin e Kalcheim, 1999; Koussoulakou et al, 2009). Sua formação envolve uma série orquestrada de eventos morfogênicos e moleculares que predizem a natureza dos sinais e os destinos celulares bem como sua padronização (Mitsiadis & Garf, 2009). Alguns dos fatores importantes presentes na morfogênese dental, bem como na morfogênese craniofacial são, por exemplo, o Shh, o FGF4, alguns membros da família das proteínas morfogênicas de osso (BMP) e outros fatores parácrinos, que estão concentrados em regiões onde ocorrem interações celulares (Ten Cate, 2000; Scott et al, 2003).

A importância da participação dos fatores de crescimento bem como da mesoderme e das células da CN, que migram para o primeiro

arco faríngeo, na odontogênese, já foi demonstrado em mamíferos. Para o desenvolvimento dos dentes são necessários dois tipos celulares: células derivadas da ectoderme estomodeal, que forma os ameloblastos, e as células derivadas da CN, células ectomesenquimais, que formam os odontoblastos e cementoblastos. Os ameloblastos (Figura 3). Esses dois tipos celulares, se justapõem no desenvolvimento da cavidade oral, interativamente para controlar todo o processo de iniciação, morfogênese e citodiferenciação. A sinalização célula-célula e seus alvos nucleares têm sido identificados como os principais mediadores do intercâmbio progressivo, complexo e gradual de informações entre ectoderme e ectomesenquima. A constante mudança de direção de sinalização e das respostas das células entre ectoderma e das células ectomesenquimais permite o controle contínuo das suas posições espaciais relativas e os seus estados diferenciados (Garcia – Castro, 2002).

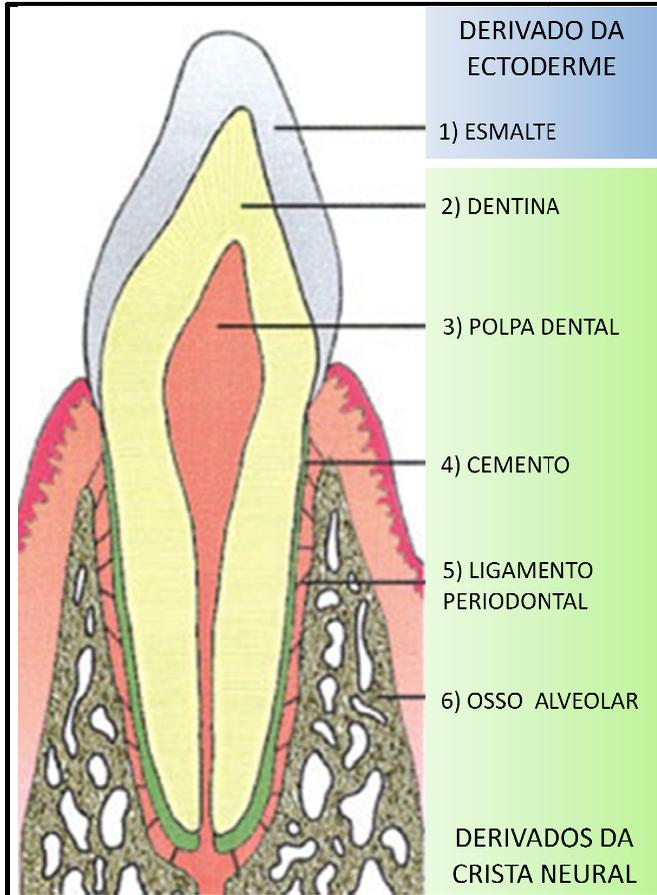


Figura 3: Origem embrionária dos diferentes tipos celulares que formam o dente de um roedor. A camada de origem ectodermal (em azul) de um dente maduro é aquela mais externa, mineralizada, composta pelo 1) esmalte que tem por função recobrir a coroa dental. Já os tecidos do órgão dental que tem origem das células da CN (em verde), são maioria: 2) a dentina, tecido mineralizado secretado por odontoblastos, que são células especializadas localizadas perifericamente a polpa dental; 3) a polpa dental; 4) o cemento, um tecido mineralizado que recobre a raiz do dente e é secretado pelos cementoblastos; 5) o ligamento periodontal (LP) que ancora o dente no alvéolo ósseo e 6) o alvéolo ósseo no qual o dente esta inserido. (Modificado de Miletich & Sharpe, 2004)

A indicação inicial de formação dos dentes é um espessamento que acontece na mucosa bucal, denominada de lâmina dental; e que,

posteriormente, acontece em forma de gomos no mesênquima adjacente, sendo este preenchido quase que completamente pelas células derivadas da CN (Figura 4, azul escuro). Com o passar do tempo de desenvolvimento, o dente em formação passa do estágio de botão para o estágio de capa, com aumento do volume e conseqüente aumento na concentração das células da CN na interface com o epitélio, enquanto a face externa do saco dental é menos populoso delas (Figura 4, azul claro). Na idade adulta, as células da CN contribuirão para a formação da polpa, dentina e cimento (Sharpe et al, 2001 ; Chai et al, 2000).

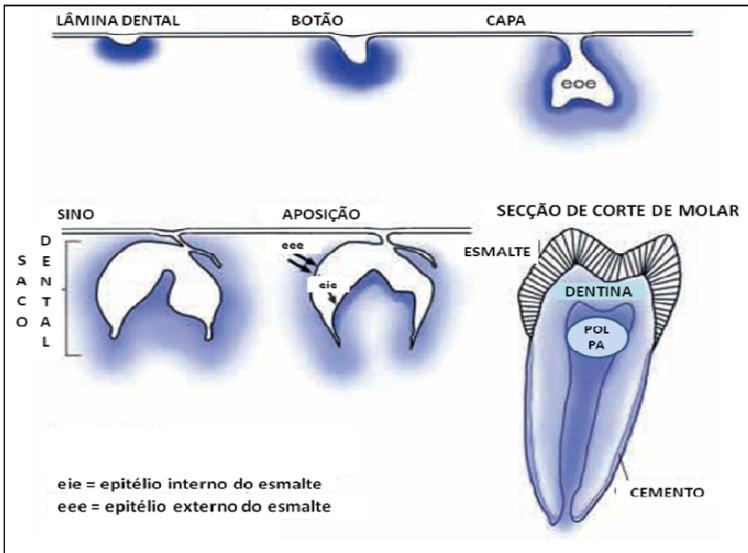


Figura 4: Esquema mostrando o processo de odontogênese, com contribuição das células da CN. Em azul escuro, células derivadas da CN e azul claro, interface epitélio/ mesênquima pouco populosa de células da CN (Modificado de Chai et al, 2000).

## 1.2.2 DESENVOLVIMENTO DENTAL E CT

Organismos pluricelulares são compostos por diferentes tipos de células. Todas estas células são derivadas de células precursoras ou CT. Estas CT são definidas como células clonogênicas não especializadas, com capacidade de se auto-renovar e de se multiplicar originando vários tipos de linhagens celulares especializados. A auto-renovação acontece

por divisões simétricas, onde ocorre a geração apenas de novas CT; ou ainda assimetricamente, originando CT e células progenitoras comprometidas fenotipicamente (Sanders et al, 2006). As CT podem ser classificadas quanto a sua potencialidade em totipotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de tecidos embrionários e anexos embrionários); pluripotentes (capazes de produzir todos os tipos celulares de um embrião); multipotentes (contribuem para renovação e/ou produção de tecidos de uma camada germinativa ou tecidos determinados) e as unipotentes (originam uma linhagem celular) (Wagers & Weissman, 2004) (Figura 5). As CT mantêm ativos genes diferentemente da maioria das células somáticas, e são estes genes que conferem a elas as características de potencialidade e indiferenciação. O produto gênico deles geralmente são fatores de transcrição como Oct-4, Nanog, Sox2 dentre outros, que são responsáveis pelo controle do estado de CT.

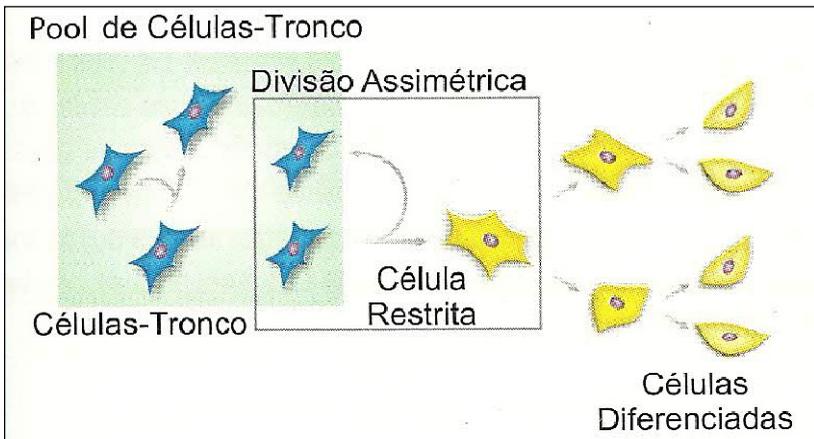


Figura 5: Propriedade fundamental da CT: capacidade de se dividir dando origem a células que permanecem indiferenciadas, repondo o pool de CT, ou a células que se diferenciam e amadurecem (Modificado de Zago & Covas, 2006).

As CT são classificadas ainda em dois grupos: células-tronco embrionárias (CTE), que derivam da massa celular interna do blastocisto e são pluripotentes; e as células-tronco adultas (CTA), são aquelas que permanecem indiferenciadas e quiescentes no tecido diferenciado e podem renovar-se e especializar-se para produzir tipos celulares especializados. O papel primário das CTA em um organismo vivo é

manter e reparar o tecido no qual elas são encontradas. As CTA são células multipotentes encontradas em uma variedade de tecidos como medula óssea, sangue, pele, folículo piloso, córnea e retina, fígado, PD, LP e trato gastrointestinal (Slack, 2000).

Pesquisas vêm sendo feitas no sentido de identificar possíveis nichos de CT da PD. No trabalho de Harada e colaboradores (1999), os resultados indicam que as CT do dente residem no “loop” do epitélio cervical, que é constituído por um cerne central de células reticulares estreladas, rodeado por uma camada basal de células epiteliais, e que dão lugar à ampliação da progênie diferenciada dentro do esmalte formado pelos ameloblastos. Outros trabalhos, como no de Nishihara e col. (2007), sugerem que as CT encontradas nos germes dentais de terceiros molares humanos sejam células-tronco mesenquimais (CTM). Marcadores de CTM foram identificados ainda em polpa de dentes decíduos de humanos (Gronthos et al, 2002; D’Aquino et al, 2009).

### 1.2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM)

O conceito atual de CTM foi citado pela primeira vez por Caplan em 1991, e surgiu da proposta de que CT isoladas da medula óssea seriam correspondentes a CTM de embrião. Experimentos que demonstravam esta teoria, já vinham sendo realizados desde a década de 70, e ficou provado o potencial osteogênico associado à medula óssea (MO) através de experimentos de transplante da MO. As CTM foram identificadas por Friedenstien e Cols. em 1966, que as denominou então de células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) (Bianco et al, 2008).

As CTM são células multipotentes capazes de suportar a hematopoese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como os condrócitos, adipócitos e os tenócitos. Elas estão presentes e têm sido isoladas em diferentes tecidos, como músculo esquelético (Kamprera et al, 2006), tecido adiposo, cordão umbilical, placenta, sistema circulatório (Beyer & Meirelles, 2006), PD (Huang et al, 2009) e LP (Gronthos et al, 2006; Coura et al, 2008).

Em cultura as CTM são facilmente selecionadas pela facilidade de adesão ao plástico, por sua morfologia fibroblastóide e por sua capacidade proliferativa. A cultura tem característica homogênea e a expansão em meios de cultivo simplificados, com baixa concentração de SBF, facilitam seu manuseio e utilização. Para a caracterização fenotípica de uma CTM é necessário que as células expressem um conjunto de marcadores celulares, antígenos de superfície, que a

identifiquem. Portanto, as CTM são descritas não expressando marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14 ou CD11; moléculas coestimulatórias como CD80 e CD40, marcadores de células endoteliais (KDR ou VEGFR e VE-caderina), complexos de histocompatibilidade principal da classe II (HLA-DR) e moléculas de adesão como CD31 ou PECAM-1 e CD56. Todavia, as CTM podem expressar antígenos de superfície como CD105 (endoglina, que está relacionado com as células progenitoras endoteliais), CD90 (Thy-1, negativo para progenitores hematopoéticos), CD73 (marcador de subpopulações de células B e T, células dendríticas e células dos centros germinativos), CD 44 e moléculas de adesão como CD106, CD29 e ICAM-1 (Zago e Covas, 2006; Chamberlain, 2007).

Existe ainda outra possibilidade de evidenciar uma CTM. A diferenciação em fenótipos mesodermiais como adipogênico, condrogênico e osteogênico *in vitro* (Krampera et al, 2006). A diferenciação adipogênica ocorre quando as células são cultivadas na presença de isobutilmetilxantina, pois esta substância ativa o gene PPAR $\alpha$  e a sintetase de ácidos graxos, resultando num acúmulo de gotículas de lipídeos (Beyer & Meirelles, 2006). A diferenciação condrogênica se estabelece quando as CTM são cultivadas em ambientes tridimensionais com em meios com baixas concentrações de soro bovino fetal (SBF) e na presença de TGF- $\alpha$ . Nestas condições, as células rapidamente mudam sua morfologia e começam a secretar glicosaminoglicanos, colágeno do tipo II e outros componentes normais da matriz cartilaginosa normal (Mackay et al, 1998; Barry et al, 2001). Para a diferenciação osteogênica as células devem ser mantidas em presença de indutores que incluem  $\beta$ -glicerofosfato, ácido ascórbico, dexametasona e SBF. Desta forma as CTM adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio (Beyer & Meirelles, 2006). A diferenciação neural das CTM foi demonstrada exigindo a presença de fatores como FGF, PDGF e BDNF em meio de cultura neuronal (Woodbury et al, 2003).

#### 1.2.4 CT DA POLPA DENTAL

A PD é um tecido conjuntivo frouxo envolvido pela dentina que se comunica com o periodonto. Sua porção periférica é caracterizada pela sua participação na formação dentinária durante a vida do dente, além de manter a integridade da dentina. Caracteriza-se por apresentar uma população variada de células, unidas por substância intercelular

amorfa, constituídas principalmente de glicosaminoglicanos, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, glicoproteínas e água. A substância intercelular fibrosa é principalmente de natureza colágena do tipo I e III. Apresenta ainda um amplo suprimento vascular e nervoso (Stevens et al, 2008).

A proliferação das células da papila dentária de origem ectomesenquimal ocorre durante a odontogênese e é responsável pelo molde da futura junção amelodentinária. As diferenciações citológicas associadas à histogênese da PD ocorrem em primeiro lugar na periferia da papila dentária com o epitélio dental interno no início da dentinogênese. A papila dentária passa a ser denominada de PD somente quando fica delimitada por dentina. Todavia, a diferenciação celular continua a ocorrer lentamente por vários anos, uma vez que, as células especializadas são fundamentais na manutenção da substância intercelular (Stevens et al, 2008).

As células que se fazem presentes na PD podem ser odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e, recentemente, observou-se células com características mesenquimais indiferenciadas (Miura et al, 2003). Estas células mesenquimais indiferenciadas se mostraram promissoras na Medicina e na Odontologia, uma vez que, exibem um potencial para diferenciação neuronal em PD humanas de dentes permanentes e decíduos (Gronthos et al, 2002; Miura et al, 2003; Nosrat et al, 2003), apresentam capacidade de regeneração da dentina (Iohara et al, 2004), possuem capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e podem servir de fonte de tecido ósseo (Harada et al, 2008).

Um trabalho anterior desenvolvido no laboratório “Célula-Tronco e Regeneração Tecidual” (Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/ Centro de Ciências Biológicas/ UFSC), em 2008, resultado da Tese de Doutorado do aluno Gustavo S. Coura demonstrou que o LP humano representa um potencial nicho de células-tronco com características da CN. Em culturas de células de LP foram identificadas células com fenótipos mesodermiais (adipogênico, osteogênico e de músculo liso), células com características de CT da CN (células marcadas positivamente para Nestina, HNK1 e p75) e células que apresentaram marcadores de tipos celulares diferenciados como  $\beta$ -tubulina III, Neurofilamento M (NF-M), Periferina e Proteína associada microtúbulo 2 (MAP-2) (marcadores de neurônios), Alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, marcador de célula de músculo liso) e Proteína zero (P0, marcador de célula glial). Desse modo, o LP humano possui células que apresentaram marcadores de CT da CN, marcadores

mesodermis e neurais (Coura et al., 2008). Portanto, se a PD e o LP compartilham da mesma origem embrionária, derivadas das células da CN, e se apresentam populações celulares com características mesodermis, surge à pergunta: a PD pode compartilhar da expressão dos marcadores indiferenciados da CN assim como o LP? É a PD capaz de retomar sua origem embrionária e reverter a um fenótipo indiferenciado? As células da PD são CT multipotentes? Como estas perguntas não foram respondidas no trabalho de Coura e colaboradores (2008), surgiu à necessidade da elaboração de um trabalho que pudesse responder as perguntas sugeridas sobre a PD e, por conseguinte, vir ao encontro de nossos anseios.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA CELULAR

Um total de sete terceiros molares vitais e erupcionados foram extraídos de indivíduos adultos (18 – 35 anos de idade), não fumantes, de ambos os sexos, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. O estudo conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH/UFSC, protocolo No. 625/10). Os voluntários foram devidamente informados sobre a pesquisa. Após as exodontias, os dentes foram lavados com solução fisiológica estéril e armazenados em tubos de polipropileno com meio de cultura padrão *α-Modified Eagle's Medium* ( $\alpha$ -MEM, Invitrogen) acrescido de 20% soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e antibiótico (100U/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina) (PS). O dente foi seccionado com broca, de maneira menos invasiva possível a fim de preservar o tecido pulpar. A PD foi então removida, com auxílio de uma cureta, e incubada por 1 h, em tubo de polipropileno contendo meio de cultura padrão descrito acima. Após este procedimento, a PD foi incubada em estufa com solução de digestão enzimática contendo 3 mg/mL de collagenase tipo 1 (Sigma) e 4 mg/mL de dispase (BD) por 01 h de incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C (Jo et al, 2007). A digestão enzimática das amostras foi paralisada pela saturação em meio de cultura descrito acima. Posteriormente a centrifugação (500 x g, 7 min), os *pellets* celulares foram ressuspensos em 2 ml do meio de cultura  $\alpha$ -MEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM) e *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (D-MEM HG) e PS. A suspensão de células isoladas foi obtida passando as células através de um filtro celular de 70  $\mu$ m (BD); e após foi acrescentado 2 ml do meio de cultura padrão e posteriormente se deu a transferência para as garrafas de cultivo (25 cm<sup>2</sup>). O meio de cultivo das garrafas foi modificado conforme o objetivo proposto para cada experimento, descrito abaixo. O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. As células foram cultivadas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. As passagens utilizadas nos experimentos foram as passagens 4 e 6.

## 4.2 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS MESODERMAIS

### 4.2.1 Diferenciação adipogênica

Para indução da diferenciação adipogênica,  $5 \times 10^3$  células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%, dexametasona  $10^{-6}$  M, indometacina a  $50 \mu\text{M}$  e insulina a  $10 \mu\text{g/mL}$  (todos Sigma) e PS. Como controle, foi utilizado  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10% e PS. As células foram mantidas como descrito acima com troca de meio a cada 3 dias. Após 40 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído (Vetec) a 4% e coradas com a solução de Oil-Red-O (Sigma) a 0,2% em isopropanol (Merck) (Lillie e Ashburn, 1943). A coloração foi precedida de lavagem das células em cultura com tampão fosfato-salina (PBS) e com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, por 2 vezes. Para proceder à coloração, as placas foram incubadas, por 50 min, em temperatura ambiente com a solução do corante e então lavadas com água destilada por três vezes. A leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, com aumentos de 100 x e 400 x. Os experimentos foram feitos em triplicata com três repetições em cada linhagem avaliada.

### 4.2.2 Diferenciação osteogênica

Para indução da diferenciação osteogênica,  $5 \times 10^3$  células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%, dexametasona  $10^{-7}$  M, ascorbato-2 fosfato a  $50 \mu\text{g/ml}$  e  $\beta$ -glicerofosfato a 20 mM (todos Sigma) e PS. Como controle, foi utilizado  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10% e PS. As células foram mantidas como descrito acima, com troca do meio a cada três dias. A revelação dos nódulos de mineralização foi determinada no dia 40, através da técnica de coloração com vermelho Alizarina 2% (pH = 4,1 - 4,3), para observação da deposição de cálcio. Para o início de execução da técnica, primeiramente, as células foram lavadas uma vez com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min a temperatura ambiente (TA), lavadas uma vez com água destilada e depois de coradas com a solução de vermelho de Alizarina por 5 min. Posteriormente, as placas foram lavadas várias vezes para a análise de imagens. Os nódulos de mineralização pela deposição de cálcio foram observados através de microscopia de luz e contraste de fase (microscópio Olympus modelo CK 40), em campo claro e as imagens foram fotografadas através de máquina digital Olympus modelo C-5060, em aumentos de 100x e 400x. Os experimentos foram feitos em triplicata com três repetições em cada linhagem estabelecida.

## 4.3 ANÁLISE DE FENÓTIPOS ECTODERMAIS E DE MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS DA CN

### 4.3.1 Meio para o crescimento de células derivadas da CN

Para o crescimento e diferenciação em células semelhantes à CN ou seus derivados, foram utilizadas as seguintes condições descritas na literatura para o cultivo das CTE da CN, de embriões de aves e camundongos (Trentin et al. 2004; Coura et al, 2008, Garcez et al, 2009; Costa-Silva et al., 2009): as células foram cultivadas na densidade de  $1 \times 10^3$  células/poço (placas de 24 poços) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de 10% SFB, 2% de extrato de embrião de galinha, hormônios e fatores de crescimento [transferrina (10 mg/ml), hidrocortisona (0,1 mg/ml), glucagon (0,01 ng/ml), insulina (1 ng/ml), T3 (triiodotironina, 0,4 ng/ml), fator de crescimento epidermal (EGF, 0,1 ng/ml) e fator de crescimento fibroblástico tipo 2 (FGF2, 1 ng/ml)] e PS. Todos os fatores de crescimento e hormônios foram adquiridos do fabricante Sigma. As células foram mantidas como descrito acima com troca do meio a cada três dias. As culturas foram analisadas para a presença de marcadores celulares específicos por imunocitoquímica ou reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa (RT-PCR) (Trentin et al. 2004; Coura, 2008, Garcez et al, 2009; Costa-Silva et al., 2009).

### 4.3.2 Análise da Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR)

#### 4.3.2.1 Extração e isolamento do RNA total

Para realização do RT-PCR, o RNA total foi isolado utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, SP, Brasil), conforme instruções do fabricante. 1 mL de Trizol<sup>®</sup> foi usado para cada 25 cm<sup>2</sup> de área da placa de cultura. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 min a TA e foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck) (para separação das fases orgânicas e aquosa) para cada 1 mL de Trizol<sup>®</sup> utilizado. As amostras foram agitadas rigorosamente por 15 seg e incubadas por 3 min a TA. Depois de centrifugadas as amostras, a 15000 x g por 15 min (4°C), a fase aquosa (camada superior, menos colorida) foi transferida para um tubo estéril. A esta fase, onde se encontra o RNA total, foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck), para precipitação do RNA. Seguiu-se nova incubação por 10 min a TA. As amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 10 min (4 °C) e o sobrenadante descartado. O sedimento formado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol (Merck) a 75% (diluído em água tratada com o detergente DEPC

0,1% autoclavada), inibidores de RNases. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6000 x g por 5 min (4°C). Após a evaporação do etanol dos tubos, o RNA obtido foi eluído em 50 µL de água livre de RNase e armazenado a -20°C. Para quantificar o RNA total obtido após o processo de extração, as amostras foram analisadas por espectrofotometria, em espectrofotômetro Nanovue (Eppendorf, Hamburg) através da leitura simultânea da densidade ótica (DO) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, observando-se a razão entre eles.

#### **4.3.2.2 Tratamento do RNA com DNase**

O tratamento foi realizado para eliminação do DNA das amostras de RNA para experimentos de RT-PCR. Após a extração do RNA, colocou-se em um microtubo estéril: 1 µg de cada amostra de RNA, 1 µL de tampão 10 x de reação da DNase (Promega, SP, Brasil), 1 U de DNase RQ1 RNase *free* (Promega) e água livre de RNases, em um volume total de reação de 10 µL. Em seguida, a amostra foi incubada por 30 min a 37 °C. Para inativar a ação da enzima DNase RQ1 RNase *free*, foi adicionado 1 µL da solução de parada e a reação foi aquecida por 10 min a temperatura de 65°C. O RNA foi então quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro Nanovue (Eppendorf, Hamburg).

#### **4.3.2.3 Reação da Transcriptase Reversa**

Foram usados 3 µg de RNA na reação de transcrição reversa, para síntese de cDNA, usando o kit ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega), segundo orientações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada em três etapas: (1) em microtubo estéril, foram acrescentados Oligo dT, RNA total extraído e água livre de RNases para um volume final de 5 µL de reação. As amostras foram então submetidas a um ciclo de 70°C por 5 min e imediatamente postas no gelo por outros 5 min. Após esta etapa, foram adicionados à solução: o tampão de reação da enzima concentrado 5 x, magnésio, dNTPs, RNAsin, água e a enzima transcriptase reversa. Na sequência, esta solução foi homogeneizada, centrifugada por 5 seg à 10000 x g e em seguida incubada à 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h, e finalmente a 70 °C por 15 min. Ao final da reação, o DNA complementar (cDNA) foi armazenado à -20 °C, compondo um banco de cDNA para posterior utilização nas reações de PCR.

### 4.3.2.4 Amplificação

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 1 µL da reação de RT, iniciadores senso e antisense específicos para cada gene analisado (Integrated DNA Technologies, Inc) (tabelas 1 e 2) e o kit GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega). As reações de amplificação de cDNA tiveram de 40 a 45 ciclos (desnaturação a 94 °C por 1 minuto; temperatura de anelamento (T.A.) por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min), com uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 5 min e uma etapa final de extensão de 72 °C por 7 min. A amplificação de um *housekeeping gene* - GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) - foi usada como controle interno da reação.

Tabela 1. Marcadores utilizados na reação de RT-PCR

Expressão gênica	Fenótipo
Nanog e OCT4	CTE
P75, Sox 10, Snail e Nestina	CT/progenitora da CN
NFL, Periferina e β-Tub III *	Neurônio (Neurônio ou CTM) *
α-SMA	Célula muscular lisa
P0 e GFAP	Célula Glial

Marcadores agrupados conforme o fenótipo.

Tabela 2 Iniciadores utilizados na avaliação da expressão gênica

OLIGO NUCLEOTÍDEOS	S/ AS	SEQUÊNCIAS	T.A.
GAPDH	S	5'-ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC-3'	58
	AS	5'-ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC-3'	
NANOG	S	5'-TGC AAA TGT CTT CTG CTG AGA T-3'	58
	AS	5'-GTT CAG GAT GTT GGA GAG TTC-3'	
OCT4	S	5'-CTC CTG AAG CAG AAG AGG ATC AC-3'	58
	AS	5'-CTT CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA-3'	
P75	S	5'-GCC AGG ACA AGC AGA ACA CCG T- 3'	58
	AS	5'-GCT TGC AGC TGT TCC ACC TCT TGA-3'	
SNAIL	S	5'-AGA CGC GAA CTC AGG TGC CTT-3'	58
	AS	5'-GGA GCA TGC GCC AGG AAT GTT-3'	
SOX 10	S	5'-ACC TTG GGA CAC GGT TTT CCA CT- 3'	56
	AS	5'-GTT GAT GGG CCG CTT GAC GTG-3'	
NESTINA	S	5'-CAG CTG GCG CAC CTC AAG ATG-3'	58
	AS	5'AGG GAA GTT GGG CTC AGG ACT GG-3'	
PERIFERINA	S	5'-CGG TCC ACC GCC CTC ACT AT-3'	58
	AS	5'-CGG TCC ACC GCC CTC ACT AT-3'	
NFL	S	5'-GCT CCC AGG TCT TTG GCC GAT-3'	58
	AS	5'-GGT TGG TTG GTT GGT GAT GGG G- 3'	
B-TUB III	S	5'-AGA TGT ACG AAG ACG ACG AGG AG-3'	55
	AS	5'-GTA TCC CCG AAA ATA TAA ACA CAA A-3'	
P0	S	5'-TCT GCC CTT ACA CCC ATG ACT GA- 3'	58
	AS	5'-TCC CCC ACT CCC TGA CCT ATG AG- 3'	
GFAP	S	5'-GGT TGG TTG GTT GGT GAT GGG G- 3'	61
	AS	5'-TGG AGG GCG ATG TAG TAG GTG C- 3'	
α-SMA	S	5'-CGA TAG AAC ACG GCA TCA TC-3'	54
	AS	5'-CAT CAG GCA GTT CGT AGC TC-3'	

Iniciadores senso (S) e antiseno (AS) utilizados na avaliação da expressão de proteínas. Iniciadores e suas respectivas seqüências S e AS e a TAnel em °C.

### 4.3.2.5 Visualização dos produtos do RT-PCR

Os produtos amplificados nas reações de RT-PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 2% (p/v) preparados em tampão TAE (Tris base, ácido acético e EDTA). Os géis foram corados com Blue Green (Promega), e em seguida visualizados sob luz ultravioleta em transluminador e fotografados para documentação com câmera fotográfica digital (KODAK) utilizando o programa UVP Life Science Software.

## 4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR INCORPORAÇÃO COM BRDU

A proliferação foi avaliada por ensaio de incorporação com BrdU (5-bromo-2- deoxiurina, Invitrogen) que corresponde a um análogo da timidina, incorporando-se ao DNA das células que estão proliferando. O procedimento foi realizado conforme descrito previamente por Costa-Silva e colaboradores (2009) com modificações. Após 9 dias de cultura, as células em meio da CN foram incubadas com 1 µg/mL de BrdU durante 24 horas. Após o período de incubação as células foram lavadas por três vezes com PBS e fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 min. Logo após, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e incubadas com solução de ácido clorídrico a 2N durante 30 min a 37 °C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e procedeu-se a reação imunocitoquímica, descrita no item 4.5.

## 4.5 IMUNOCITOQUÍMICA E ANÁLISE FENOTÍPICA

Para a realização do ensaio de imunocitoquímica e análise fenotípica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 min, em TA, lavadas três vezes em PBS e permeabilizadas com PBS-Triton-X-100 a 0,25% durante 15 min a TA. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com SBF a 5% durante 40 min a TA e em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários específicos (Tabela 3), durante 1 h à TA. A seguir procedeu-se a três lavagens com PBS-Tween 20 a 0,05% à TA e à incubação com os anticorpos secundários durante 1 h à TA. Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongos ou coelhos conjugados à fluoresceína isotiocianato (FITC), Texas Red (TX) ou Alexa 488 (Tabela 3). A seguir foram realizadas mais três lavagens com

PBS-Tween a TA. O núcleo das células foi corado com solução de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) 50 ng/mL, durante 15 seg, à TA. As marcações fluorescentes das expressões fenotípicas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus IX71.

Tabela 3. Anticorpos primários (Acs 1°) e secundários (Acs 2°) utilizados nas reações imunocitoquímicas e de análise fenotípica.

Fenótipo	Acs 1°	Diluição Ac 1°	Acs 2°	Diluição Ac 2°
<b>CTE</b>	Anti-nanog IgG de Coelho - policlonal	1:200	Anti-IgG de Coelho – Alexa 488	1:100
<b>CTE</b>	Anti-Oct4 IgG de Coelho - policlonal	1:200	Anti-IgG de Coelho – FITC	1:75
<b>CN indiferenciada</b>	Anti -P75 IgG1 de Camundongo monoclonal	1:100	Anti-IgG de Camundongo - Alexa 488	1:100
<b>Precursor neural/ CT</b>	Anti-nestina IgG1 de Coelho - policlonal	1:250	Anti-IgG de Coelho – Alexa 488	1:100
<b>CN indiferenciada</b>	Anti-HNK1 IgM de Camundongo monoclonal	35µL*	Anti-IgM de camundongo – FITC	1:75
<b>Precursor neural</b>	Anti-P0 IgG de Coelho policlonal	1:500	Anti-IgG de Coelho – FITC	1:75
<b>Neurônio</b>	Anti-β-tub III IgG1 de Camundongo - monoclonal	1:500	Anti-IgG1 de Camundongo – TX	1:75
<b>Células de músculo liso</b>	anti-αSMA IgG2a de Camundongo Monoclonal	1:800	Anti- IgG2a de Camundongo – FITC	1:75
<b>Proliferação celular</b>	Anti-BrdU IgG1 de Camundongo - monoclonal	1:100	Anti-IgG1 de Camundongo – FITC	1:75

Acs 1° foram obtidos da Chemicon (nanog, OCT4, p75), Santa Cruz (P0), Promega ( $\beta$ -tub III) e Sigma ( $\alpha$ -SMA). E os Acs 2° foram obtidos da Zymed (Anti-IgM de camundongo – FITC, Anti-IgG1 de Camundongo – TX ) e da SouthernBiotech (Anti-IgG de Coelho – Alexa488, Anti-IgG de Coelho – FITC, Anti-IgG de Camundongo -Alexa 488, Anti-IgG de Coelho – FITC, Anti-IgG2a de Camundongo – FITC).

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO MESODERMAL

As CTM da PD foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise da presença de moléculas de superfície celular CD73, CD90 e CD105 que são consideradas como marcadores positivos de CTM (Pittenger, et al, 1999), e a ausência de moléculas de superfície celular CD45, que são considerados marcadores negativos de CTM.

A realização do ensaio do perfil fenotípico mesodermal teve um mínimo de 5.000 eventos adquiridos. Para a avaliação da característica mesodermal, foi necessário um mínimo de  $3 \times 10^6$  células para realização do experimento em citômetro. Portanto, até que o número de células desejadas fosse atingido, a cultura foi mantida em garrafa de cultivo com meio da CN. Depois de transcorrido o tempo necessário, as células foram lavadas por três vezes em PBS e tripsinizadas por 1 minuto a 37 °C. A inativação enzimática foi realizada com solução de PBS acrescido de 10% de SBF. As células foram então centrifugadas a 2000xg por 5 min, repetindo este procedimento por mais duas vezes. O sedimento foi ressuspendido em 100 ml de solução PBS acrescida de SBF 10%. As amostras foram então ajustadas para uma concentração celular de  $1 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> e incubadas com os anticorpos (quantidades de uso, especificadas, de cada anticorpo na Tabela 4) monoclonais conjugados a fluorocromos por 40 min à 4°C, em ausência de luz (Tabela 4).

Os dados obtidos foram analisados no programa Flowjo. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através de regiões que são definidas em gráficos nos quais foram plotados área versus granuliosidade, gerados pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizou-se um gráfico de histograma para se delimitar a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo monoclonal de coelho anti-IgG de camundongo marcado com FITC, PE e PerCP- Cy. A partir da definição destes parâmetros, iniciou-se a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários. Os resultados foram plotados em forma de histograma.

Tabela 4: Anticorpos Monoclonais utilizados na avaliação do fenótipo mesodermal

<b>Marcador</b>	<b>Volume</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Fonte Comercial</b>
<b>Isotipo</b>	5µl	IgG1 de Camundongo - FITC	BD Pharmingen
<b>Isotipo</b>	5µl	IgG1 de Camundongo - PE	BD Pharmingen
<b>Isotipo</b>	5µl	IgG1 de Camundongo PerCP- Cy	BD Pharmingen
<b>CD45</b>	2,5µl	IgG1de Camundongo anti-humano - FITC	BD Pharmingen
<b>CD73</b>	5µl	IgG1de Camundongo anti-humano - PE	BD Pharmingen
<b>CD90</b>	1µl	IgG1de Camundongo anti-humano - FITC	BD Pharmingen
<b>CD105</b>	10 µl	IgG1 de Camundongo anti-humano - PerCP- Cy	BD Pharmingen
<b>CD73/ CD90/ CD105</b>	5 µl + 1 µl + 10 µl	IgG1de Camundongo anti-humano – PE + FITC+ PerCP- Cy	BD Pharmingen

Foi realizado o método de marcação simples e dupla, com anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: fluoresceína isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE) e PerCP-Cy. Estes anticorpos são dirigidos contra antígenos de superfície de células-tronco mesenquimais: CD 45 (-), CD 73 (+), CD 90 (+) e CD (105).

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças foi avaliada através da análise do teste t de Student, pelo programa Graphpad Prism. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

## 7. CONCLUSÕES

- O modelo de cultura estabelecido foi adequado para os objetivos propostos. Os meios de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de 10% SBF e da CN são equivalentes em relação à adesão, morfologia e proliferação celular e expressão de marcadores de CTE, CT da CN, neurais e de músculo liso.

- As células derivadas da PD foram caracterizadas como CTM: com capacidade de adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, alto potencial proliferativo positivo para CD 73, CD90 e CD 105, e negativa para CD 45.

- As células de PD apresentam ainda características de células da CN, avaliado pela presença do marcador Snail e nestina e pelo potencial de diferenciação em fenótipos derivados da CN como neuronal, glial e muscular liso com necessidade de maiores estudos.

## REFERÊNCIAS

- ABZHANOV, A; TZAHOR, E; LASSAR, A B. and TABIN, C J. Dissimilar regulation of cell differentiation in mesencephalic (cranial) and sacral (trunk) neural crest cells in vitro. **Development**, v. 130, p. 4567–4579, 2002.
- ARTHUR, A; RYCHKOV, G; SHI, S; KOBLAR, S A. and GRONTHO, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. **Stem Cells**. v. 26, p. 1787-1795, 2008.
- BARRY, F; BOYNTON, R E; LIU, B and MURPHY, M J. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research**. v. 268, 189-200, 2001.
- BEYER NARDI, N and MEIRELLES L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handb Exp Pharmacol**. v. 174, p. 249-82, 2006.
- BIANCO P; ROBEY, P G; SIMMONS P J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**. v. 2, p. 313-319, 2008.
- BIOEDEN. **Science Behind Dental Pulp SCs**. p. 1-19. Disponível em: <<http://biodenasia.com//forms/4.pdf>>, 2007. Acesso em 02 janeiro 2011.
- BRONNER-FRASER, M. Mechanisms of neural crest migration. **BioEssays**, v. 15. p. 221-230, 1993.
- BRONNER-FRASER, M. Origins and developmental potential of the neural crest. **Exp. Cell Res**. v.2, 405-417, 1995.
- CALLONI, G W; GLAVIEUX-PARDANAUD, C; LE DOUARIN, N M and DUPIN, E. Sonic hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Developmental Biology**. v. 50, p. 19879- 19884, 2007.
- CALLONI, G W; LE DOUARIN, N M and DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic,

melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Developmental Biology**, v. 22, p. 8947- 8952, 2009.

CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v. 9, p. 641-650, 1991.

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

CHAMBERLAIN, G; FOX, J; ASHTON, B and MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739-2749, 2007.

COSTA-SILVA, B; COSTA, MC.; Melo, F R.; NEVES, S M.; ALVAREZ-SILVA, M; CALLONI, G W. and TRENTIN, A G. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Experimental Cell Research**, v. 315, p. 955- 967, 2009.

COULY, G; CREUZET, S; BENNACEUR, S; VINCENT, C and LE DOUARIN, N M. Interactions between hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. **Development**, v. 129, p. 1061-1073, 2002.

COURA, G S.; GARCEZ, R C.; MENDES DE AGUIAR, C. B. N.; ALVAREZ-SILVA, M and TRENTIN, AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodont Res**, v. 43, p. 532-536, 2008.

CHILTON, P; MCATEER, HELEN and LILFORD, RICHARD. The current applications of cell therapy in neurodegenerative disorders. **The University of Birmingham**. p. 1-71, 2010. Disponível em: [http://www.haps.bham.ac.uk/publichealth/methodology/hes/Cell\\_Therapy\\_Review\\_PC\\_HM\\_RJL.pdf](http://www.haps.bham.ac.uk/publichealth/methodology/hes/Cell_Therapy_Review_PC_HM_RJL.pdf). Acesso em: 02 janeiro 2011.

CREUZET, S; COULY, G; VINCENT, C and LE DOUARIN, NM. Patterning the neural crest derivatives during development of the

vertebrate head: insights from avian studies. **J. Anat.** v. 207, p 447-459, 2005.

D'AQUINO, R; ROSA, A; LAINO, G; CARUSO, F; GUIDA, L; RULLO, R; HECCHI, V; LAINO, L; TIRINO, V and PAPACCIO, G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. **Journal of Experimental Zoology**, v. 312B, p. 408-415, 2009.

DUPIN, E; CALLONI, G; REAL, C; TRENTIN, A G. and LE DOUARIN, N M. Neural crest progenitors and stem cells. **Science Direct**, v. 330, p. 521-529, 2007.

DUPIN, E; CALLONI, G and LE DOUARIN, NM. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. **Cell Cycle**, v. 9, n. 2, p. 1 - 9, 2010.

EL-HELOU, V; BEGUIN, P C; ASSIMAKOPOULOS, J; CLEMENT, R; GOSSELIN, H; BRUGADA, R; AUMONT, A; BIERNASKIE, A; VILLENEUVE, L; LEUNG, T K; et al. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, p.694-702, 2008.

ETCHEVERS, H C; VINCENT, C; LE DOUARIN, NM. And COUDY, G F. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. **Development**, v.128, p. 1059-1068, 2001.

FERNANDES, K J; MCKENZIE, I A; MILL, P; SMITH, K M; AKHAVAN, M; BARNABE-HEIDER, F; BIERNASKIE, J; JUNEK, A; KOBAYASHI, N R; TOMA, J G. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. **Nat. Cell Biol.**, v. 6, p. 1082-1093, 2004.

FRIEDENSTEIN, A J; PIATETZKY-SHAPIRO, I I; PETROKOVA, K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embriology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

GARCIA-CASTRO, M I; MARCELLE C and BRONNER- FRASER M. Ectodermal wnt function as a neural crest inducer. **Science**, v. 297, p. 848-851, 2002.

GARCEZ, R C; TEIXEIRA, B L; SCHIMITT, S S; ALVAREZ-SILVA, M and TRENTIN, A G. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 29, p. 1087-1091, 2009.

GRONTHOS, S; BRAHIM, J; LI, W; FISHER, L W; CHERMAN, N; BOYDE, A; DENBESTER, P; ROBEY, P G and SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res.**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GRONTHOS, S; MROZIK, K; SHI, S and BARTOLD, P M. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Calcif Tissue Int**, v. 79, n. 5, p. 310- 317, 2006.

HALL, B K. The neural crest in development and evolution. USA: **Springer-Verlag**, 1999.

HALL, B K. The neural crest and neural crest cells in vertebrates development and evolution. USA: **Springer Science Business Media**, 2009.

HARADA, H; KETTUNEN, P; JUNG, H S; MUSTONEN, T; WANG, A and THESLEFT, I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and fgf signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 105-120, 1999.

HARADA, H and OHSHIMA, H. New perspectives on tooth developmental and the dental stem cell niche. **Arch Histolo Cytol**, v. 67, p. 1-11, 2008.

HOU, L. and HONG, T. Stem cells and neurodegenerative diseases. **Sci.China C.Life Sci.**, v. 51, n. 4, p. 287-294, 2008.

HUANG, G T; GRONTHOS, S and SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J Dental Res**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

IOHARA, K; NAKASHIMA, M; ITO, M; ISHIKAWA, M and AKAMINE, A. Dentin Regeneration by Dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. **J Dent Res**, v. 83, p. 590-595, 2004.

JO, Y Y; LEE, H J; KOOK, S Y; CHOUNG, H W; PARK, J Y; CHUNG, J H; CHOUNG, Y H; KIM, E S; YANG, H C; CHOUNG, P H. Isolation and characterization of post natal stem cells from human dental tissues. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 4, p. 767-773, 2007.

KAMPRERA, M; PIZZOLO, G; APRILI, G and FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, p. 678-683, 2006.

KERKIS, I; KERKIS, A; DOZORTSEV, D; STUKART-PARSONS, G C; GOMES, M; MASSIRONI, S M; PEREIRA, L V; CAPLAN, A I and CERRUTI, H F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**. v. 184, n. 3-4, p. 105-162, 2006.

KIM, D; KIM, C H, MOON, J I; CHUNG, Y G; CHANG, M Y; HAN, B S; KO, S Y; CHA, K Y; LANZA, R and KIM, K S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, p.472-473, 2009.

KOUSSOULAKOU, D S; MARGARITIS, L H and KOUSSOULAKOS, S L. A Curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, p. 226-243, 2009.

KRUGER, G M; MOSHER, J T; BIXBY, S; JOSEPH, N; IWASHITA, T and MORRISON, S J. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. **Neuron**, v. 35, p. 657-669, 2002.

LAINO G; CARINCI, F; GRAZIANO, A; D'AQUINO, R; LANZA, V; DE ROSA, A; GOMBOS, F; CARUSO, F; GUIDA, L; RULLO, R; MENDITTI, D and PAPACCIO, G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **J Craniofac Surg.**, v. 17, n. 3, p. 511-515, 2006.

LE DOUARIN, N and KALCHEIM, C. The neural crest. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK, 1999.

LE DOUARIN, N M; CREUZET, S and DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, p. 4637-4650, 2004.

LE DOUARIN, N M. A Developmental patterning deciphered in avian chimeras. **Dev. Growth Differ. Suppl**, v. 1, p.11-28, 2008.

LE LIEVRE, C S and LE DOUARIN, N M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 34, p. 125-154, 1975.

LI, H Y, SAY, E H and ZHOU, X F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root Ganglia. **Stem Cells**, v. 25, p. 2053-2065, 2007.

LILLIE, R D and ASHBURN L L. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by herxheimer's technique. **Arch. Pathol.**, v. 36, p. 432-440, 1943.

LOCASCIO, A; VEGA, S; FRUTOS, C A; MANZANARES, M and NIETO, A M. Biological potential of a functional human snail retrogene. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 277, n. 43, p. 38803-38809, 2002.

MACKAY, A M; BECK, S C; MURPHY, M J; BARRY, F P; CHICHESTER, C O and PITTENGER, M F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. **Tissue Engineering**, v.4, n. 4, p. 415-428, 1998.

MENICANIN, D; BARTOLD, M P; ZANNETTINO, A C W and GRONTHOS, S. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports.**, v. 5, n. 1, p. 36-50, 2009.

MCGONNELL, I M and GRAHAM, A. Trunk neural crest has skeletogenic potential. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 767-771, 2002.

MICHALCZYK, K and ZIMAN, M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization. **Histol Histopathol**, v. 20, p. 665-671, 2005.

MILETICH, I and SHARPE, P T. Neural Crest Contribution to Mammalian Tooth Formation. **Birth Defects Research**, v. 72, p. 200-212, 2004.

MILEWICZ, D M; OSTERGAARD, J R; ALA-KOKKO, L M; KHAN, N; GRANGE, D K; MENDOZA-LONDONO, R; BRADLEY, T J; OLNEY, A H, ADÈS, L; MAHER, J F; GUO, D; BUJA, L M; KIM, D; HYLAND, J C and REGALADO, E S. De novo ACTA2 mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle dysfunction. **Am J Med Genet A.**, v. 152A, n. 10, p. 2437-2443, 2010.

MITSIADIS, T A; GRAF, D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. **Birth Defects Research**, v. 87, p. 199-211, 2009.

ITSUI, K ; TOKUZAWA, Y; et al. The homeoprotein nanog is required for maintenance of Pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v.113, p. 631-642, 2003.

MIURA, M; GRONTHOS, S; ZHAO, M; LU, B; FISHER, L W; ROBEY, P G and SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 5807-5812, 2003.

MORSCZECK, C; GOTZ, W; SCHIERHOLZ, J; ZEILHOFER, F; KUHN, U; MOHL, C et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biol.**, v. 24, p. 155-165, 2005.

MOTOHASHI, T; AOKI, H; CHIBA, K; YOSHIMURA, N and KUNISADA, T. Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 25, p. 402–410, 2007.

NAKAO, K; MORITA, R; SAJI, Y; ISHIDA, K; TOMITA, Y; OGAWA, M; SAITOH, M; TOMOOKA, Y and TSUJI, T. The development of a bioengineered organ germ method. **Nat Methods.**, v. 4, n. 3, p. 227-230, 2007.

NISHIHARA, D; IWAMATSU-KOBAYASHI, Y; HIRATA, M ; KINDAICHI, J and KOMATSU, M. Mesenchymal stem cells in human wisdom tooth germs. **Interface Oral Health Science**, p. 187- 188, 2007.

NOSRAT, I V; SMITH, C A; MULLALLY, P; OLSON, L and NOSRAT, C A. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. **Eur J Neurosci.**, v. 19, p. 2388-2398, 2004.

OKITA, K; NAKAGAWA, M; HYENJONG, H; ICHISAKA, T and YAMANAKA, S; Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**, v. 322, p. 949-953, 2008.

OTA, M and ITO, K. BMP and FGF-2 regulate neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia. **Dev. Dyn.**, v. 235, p. 646-655, 2006.

OTAKI, S; UESHIMA, S; SHIRAISHI, K; SUGIYAMA, K; HAMADA, S; YORIMOTO, M and MATSUO, O. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. **Cell Biol Int.**, v. 31, n. 10, p. 1191-1197, 2007.

PALMER, T D; SCHWARTZ, P H; TAUPIN, P; KASPAR, B; STEIN, S A and GAGE F H. Cell culture: progenitor cells from human brain after death. **Nature**, v. 411, p. 42-43, 2001.

PETIOT, A; FERRETTI, P; COPP, A J and CHAN, C T. Induction of chondrogenesis in neural crest cells by mutant fibroblast growth factor receptors. **Dev. Dyn.**, v. 224, p. 210-221, 2002.

PITTENGER, M F; MACKAY, A M; BECK, S C; JAISWAL, R K; DOUGLAS, R; MOSCA, J D; MOORMAN, M A; SIMONETTI, D W; CRAIG, S and MARSHAK, M. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

REDDY, S; OZGUR, K; LU, M; CHANG, W; MOHAN, S; KUMAR, C C and RULEY, H E. Exstructure of the human smooth muscle  $\alpha$ -actin gene. **The Journal of Biol Chemistry**, v. 265, n. 3, p. 1683-1687, 1990.

SANDERS, R C; SLAYTON, W B; COGLE, C; FISHER, R C and SCOTT, E W. **Stem cell research. Paediatr Respir Rev**, v.7, n. 2, p.135-140, 2006.

SARKAR, S A; PETIOT, A; COPP, P; FERRETTI, P and THOROGOOD, P. FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. **Development**, v. 128, p. 2143-2152, 2001.

SHAKHOVA, O and SOMMER, L. Neural crest-derived stem cells, StemBook, ed. **The Stem Cell Research Community**, StemBook, <http://www.stembook.org>. 2010.

SHARPE, P T. Neural Crest and Tooth Monphogenesis. **Adv Dent Res.**, v. 15, p. 4-7, 2001.

SCOTT, G F. *Biologia do desenvolvimento*, 5ed. São Paulo: **Funpec**, 2003.

SIEBER-BLUM, M; GRIM, M; HU, Y F and SZEDER, V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. **Dev. Dyn.**, v. 231, p. 258-269, 2004.

SLACK, J M. Stem cells in epithelial tissues. **Science**. Washington, v. 287, n. 5457, p. 1431-1433, 2000.

STEVENS, A; ZULIANI, T; OLEJNIK, C; LEROY, H; OBRIOT, H; KERR-CONTE, J; FORMSTECHE, P; BAILLIEZ, Y and POLAKOWSKA, R R. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. **Stem Cells and Development**, v. 17, p. 1175- 1184, 2008.

TAI, M H; CHANG, C C; OLSON, L K and TROSKO, J E. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 495-502, 2005.

TAKASHIMA, Y; ERA, T; NAKAO, K; KONDO, S; KASUGA, M; SMITH, A G and NISHIKAWA, S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. **Cell**, v. 129, p. 1377-1388, 2007.

TAKEDA, A; JIMI, T; WAKAYAMA, Y; MISUGI, N; MIYAKE, S and KUMAGAI, T. Demonstration of cathepsins B, H and L in xenografts of normal and Duchenne-muscular-dystrophy muscles transplanted into nude mice. **Biochem. J.**, v. 288, p. 643-648, 1992.

TEN CATE, R A T. The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. **Periodontology**. v.13, p. 9-19, 2000.

TRENTIN, A G; GLAVIEUX-PARDANAUD, C; LE DOUARIN, N M and DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **PNAS**, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

THOMAS, S; THOMAS, M; WINCKER, P; BABARIT, C; XU, P; SPEER, M C; MUNNICH, A; LYONNET, S; VEKEMANS, M and ETCHEVERS, H C. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. **Development**, v. 129, p. 1061-1073, 2002.

WAGERS, A J; WEISSMAN, I L. Plasticity of adult stem cells. **Cell.**, v. 5, n. 5, p. 639-648, 2004.

WIESE, C; ROLLETSCHEK, A; KANIA, G; BLYSZCZUK, P; TARASOV, K; V. TARASOVA, Y; WERSTO, R P; BOHELER, K R and WOBUS, A M. Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 2512-2522, 2004.

WONG, C E; PARATORE, C; DOURS-ZIMMERMANN, M T; ROCHAT, A; PIETRI, T; SUTER, U; ZIMMERMANN, D R; DUFOUR, S; THIERY, J P; MEIJER, D et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **J. Cell Biol.**, v. 175, p. 1005-1015, 2006.

WOODBURY, D; SCHWARTZ, E J; PROCKOP, D J; BLACK, I B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**, v. 15, n. 61, p. 364-370, 2003.

ZAGO, M A e COVAS, D T. Células-tronco a nova fronteira da medicina. São Paulo: **Atheneu**; 2006.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 625

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

APROVADO

PROCESSO: 625 FR: 321274

TÍTULO: Avaliação do ligamento periodontal e polpa dental humanos como nichos de células-tronco derivados da crista neural.

AUTOR: Andrea Gonçalves Trentin, Viviane Aparecida Balvedi Polli, Gustavo dos S Coura, Beatriz Dal Pont Duarte, Márcio Alvarez

FLORIANÓPOLIS, 26 de Abril de 2010.

Coordenador do CEPSH UFSC

*Prof. Washington Portela de Souza*  
Coordenador do CEP/PRPe/UFSC

# ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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 polpa dental como nichos de células-tronco derivados da crista neural"

**Pesquisador Responsável:** Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Gonçalves Trentin, RG:4518154-3

**Pesquisadores e participantes:** Viviano A B Polli, Gustavo S Coura, Beatriz D P Duarte

**Telefones para contato:** (48) 37216905/ (48) 99765155

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa "Avaliação do ligamento periodontal e polpa dental como nichos de células-tronco derivados da crista neural", de responsabilidade da pesquisadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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 odontológicas, como implantes e reconstrução da estrutura óssea.

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 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 reconstrução 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 sua participação, garantindo 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) assinasse esse documento (verso).

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

### CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa "Avaliação do potencial terapêutico e biotecnológico de células tronco isoladas de folículo piloso humano" e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.