RAPHAEL MARQUES DE ALMEIDA ROSA DA CRUZ

**Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo
esfoliado**

São Paulo

2016

RAPHAEL MARQUES DE ALMEIDA ROSA DA CRUZ

Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo esfoliado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão
Braga

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3381
FMVZ

Cruz, Raphael Marques de Almeida Rosa da
Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo esfoliado / Raphael
Marques de Almeida Rosa da Cruz. -- 2016.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. SHED. 2. Célula-tronco. 3. Neurônio. 4. Transdiferenciação. 5. Terapia celular.
I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 07 de junho de 2016
CEUAx N 1711281015

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: Anatomia

Equipe envolvida: Raphael Marques De Almeida Rosa Da Cruz - **executor** (—); Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (orientador)

Título do projeto: "DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 15/01/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.021 /13.

DECLARAÇÃO

*Em adendo ao PARECER 1001/CEP, de 13 de junho de 2011, declaro que esta Comissão não faz restrições às alterações propostas para o Projeto intitulado: "Reprogramação celular de polpa dentária humana para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos no autismo: projeto a fada do dente" sob responsabilidade dos autores Profa. Dra. **PATRÍCIA CRISTINA BALEIRO BELTRÃO BRAGA** e a aluna **GRACIELA CONCEIÇÃO PIGNATARI**, pois as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.*

São Paulo, 14 de maio de 2013.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CRUZ, Raphael Marques de Almeida Rosa da

Título: **Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo esfoliado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, que sempre me incentivaram
na busca pelo conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

À Deus

Por ouvir todos os dias meus pedidos de proteção, paciência e sabedoria.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Prof.^a Patricia

Pelas aulas maravilhosas, por ser a minha inspiração, por me acolher na vida científica, ter paciência para me acalmar, pela orientação, pelas lições de vida, por todo o incentivo e torcida e por toda a preocupação quando estive no Sudão do Sul. Obrigado mãe².

À minha família

Por todo o suporte emocional para passar pelo período universitário, saindo cedo e chegando tarde de casa, atrapalhando passeios e viagens por ter que cuidar das “minhas filhas” aos finais de semana, feriados, natal e ano novo.

À minha querida namorada

Por participar da minha escolha nada convencional para um obstetriz, me perguntando sobre os protocolos, ouvindo sobre diferenciação celular e iPSC, me dando suporte sempre que algo dava errado e sugerindo alternativas.

Aos amigos fora da faculdade

Que tiveram paciência em me ouvir durante anos “não dá pra sair com vocês, vou pro laboratório”.

Ao João Leonardo

Que me acolheu como um pai e abnegou de tantos haveres para tutelar este pagão simplório. Por zelar pelo meu bem estar, por todos os amplexos honestos e plangores autênticos. Pelos BK's e tantas outras comunhões que pleitas com tamanha voracidade e, irrefutavelmente, por toda pachouchada via e-mail, whatsapp ou diretamente.

À Gra

Por toda a atenção para o menininho ansioso, por todo o carinho, todos os embates e conversas. Pelos SHAM, por tantos experimentos desenhados e discutidos. Sou um cientista melhor e mais cuidadoso por tua causa.

À Fabielle

Por todos esses 6 anos de ajuda e ensinamentos. Por ter me ensinado a base de tudo - microscópio, cultura, limpeza e organização. Também por todos os conselhos e ajuda sempre que preciso.

À Isabella

Pelos 6 anos de ensinamentos com placentas, tecidos e células; com dentes e iPSC. Por nos levar para lugares tranquilos, gostosinhos, legais e baratinhos. Por perdoar minha dívida de 10 dólares a cada favor ou ajuda que eu pedia (nunca teria um milhão de dólares). E, claro, pelas caronas e cafés da manhã.

À Cristine

Que, apesar de pertencer a uma instituição federal, buscou a luz em nossa instituição, com sua célebre garrafa de água, o jeitinho meigo. Também pelas conversas em inglês no caminho de volta pra casa.

À Larissa

Por compartilhar de anseios, inseguranças, angústias, alegrias gracejos que só obstetrites em um laboratório entendem.

À Cecília

Por me proporcionar o tipo de amizade nerd que me faz tanta falta.

À Anita

Pelas conversas e risadas políglotas, pela paciência e ajuda com a minha mãe e pela oportunidade de conhecer o trabalho extraordinário que ela realiza.

À Katia

Por todos os momentos desde o começo do mestrado, por toda a tradução nas aulas de veterinária e por todo o cuidado com a minha dieta rígida.

Ao Marcos Vinícius

Por ter me avisado desde 2010 o que iria acontecer em 2016. Por todo o suporte e risada.

À Izabella

Por ter compartilhado o início da trajetória deste bote e que, por mais que a vida tenha nos levado para caminhos diferentes, continuamos com a amizade e parceria.

Ao Miguel,

Por ter me acolhido e ensinado num momento tão difícil da graduação, onde parecia ser impossível manter a vida de laboratório.

Aos amigos do departamento,

por fazerem parte desta fase tão especial da minha vida. Vocês todos contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

Aos funcionários da FMVZ/USP **Jaqueline, Rose-Eli, Índio, André e Ronaldo**

Por toda a ajuda nesses longos anos de FMVZ. Sem vocês nada disso teria acontecido.

Aos professores da FMVZ/USP **Antônio Assis Neto, José Roberto Kfoury Jr e Paula de Carvalho Papa**

Pelos auxílios e convivência

Ao CNPq

Pelo apoio financeiro a mim concedido.

“A cada escolha, uma renúncia” – Beltrão Braga, P.C.B.

RESUMO

CRUZ, R. M. A. R. **Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo esfoliado**. [Stem cell from human exfoliated deciduous teeth neuronal differentiation]. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células-tronco (CT) são células que apresentam propriedades de auto-renovação, capazes de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tipos de tecidos, por isso têm sido vistas como uma alternativa terapêutica para o tratamento de muitas doenças cujo tratamento convencional não é eficiente. Além disso, por sua plasticidade, as CT podem ser usadas para produzir modelos *in vitro* para o estudo de doenças, o que tem sido particularmente interessante para doenças que acometem o sistema nervoso. As células-tronco humanas de dente decíduo esfoliado (*Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*, SHED) são descritas em alguns trabalhos como capazes de se diferenciar em células neuronais através da transdiferenciação direta, um processo simples que possibilita a diferenciação de um tipo celular em outro por meio da utilização de agentes químicos. No entanto, a diferenciação de SHED em neurônios é contestada como sendo um artefato de cultura devido ação citotóxica destes agentes. Com base nesta premissa, o objetivo deste trabalho foi realizar protocolos para a produção de neurônios a partir das SHED utilizando modificações de métodos descritos na literatura e utilizados na diferenciação neuronal. Durante um dos protocolos utilizados, foi possível verificar a morfologia de células semelhantes à neurônio, porém após alguns dias de manutenção, as células voltavam ao formato fusiforme original. Com este trabalho podemos afirmar que, de acordo com os resultados obtidos, as SHED não geram neurônios funcionais.

Palavras-chave: SHED. Célula-tronco. Neurônio. Transdiferenciação. Terapia celular.

ABSTRACT

CRUZ, R. M. A. R. **Stem cell from human exfoliated deciduous teeth neuronal differentiation.** [Diferenciação neuronal de células-tronco de dente decíduo esfoliado]. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Stem cells (SC) are cells that present self-renewal properties, capable of generating cells types and reconstitute several tissue types. For this reason, they have been seen as a therapeutic alternative to the treatment of many diseases which conventional treatment is not efficient. Besides, because of its plasticity, SC may be used to produce in vitro models in order to study diseases, what is interesting to diseases that affect the nervous system. Human SC from SHED (Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED) are described in some papers as being capable of self-differentiation in neuronal cells through the direct transdifferentiation, a simple process that makes possible the differentiation of a cell type in another through the use of chemical agents. Nevertheless, SHED differentiation is refuted as being a artifact of culture due to cytotoxic action of these agents. Based on this premise, the aim of this study was to carry out protocols in order to produce neurons from SHED, using modifications and methods of neuronal differentiation described in the literature and used in the neuronal differentiation. During one of the protocols used, it was possible to verify the morphology of the cells as neuron-like, however, after some days of maintenance, they turn back to their original fusiform format. In this study, we can state, according to the obtained results, that SHED do not generate functional neurons.

Keywords: SHED. Stem cell. Neuron. Transdifferentiation. Cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de células-tronco derivadas do dente	24
Figura 2 - Esquema representativo de desenvolvimento em landscape	27
Figura 3 – Metodologia empregada na condição do protocolo I.....	35
Figura 4 – Metodologia empregada na condição 1	37
Figura 5 – Metodologia empregada na condição 2	37
Figura 6 – Metodologia empregada na condição 3	39
Figura 7 – Metodologia empregada na condição 4	40
Figura 8 - Cultura e caracterização das SHED.....	44
Figura 9 – Teste de micoplasma nas SHED	45
Figura 10 – Processo de obtenção de rosetas a partir das SHED	47
Figura 11 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição a	50
Figura 12 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição b	51
Figura 13 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição c	52
Figura 14 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição d	53
Figura 15 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição e	54
Figura 16 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3a	56
Figura 17 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3b	56
Figura 18 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3c	57
Figura 19 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3d	57
Figura 20 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3e	58
Figura 21 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 4	58
Figura 22 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3A	59
Figura 23 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3b	60

Figura 24 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição	
3c	60
Figura 25 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição	
3d	61
Figura 26 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição	
3e	61
Figura 27 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição	
4	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Oligos utilizados na PCR para o teste de micoplasma	33
Quadro 2 - Anticorpos primários para a imunofluorescência	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF-2	- do inglês, Basic fibroblast growth factor e do português fator de crescimento de fibroblasto
BSA	- do inglês, Bovine Serum Albumin e do português albumina sérica bovina
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
cm ³	- centímetro cúbico
CO ₂	- dióxido de carbono
DAPI	- 4',6-diamidino-2- phenylindol
DMEM	- do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	- do inglês, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline e do português Dulbecco tampão salina-fostato
EB	- do inglês, embryonic bodies e do português corpos embrióides
ES	- do inglês, embryonic stem cell e do português, célula-tronco embrionária
g	- força g
h	- horas
iPSC	- do inglês, induced pluripotent stem cell e do português células pluripotentes induzidas
MAP2	- do inglês, Microtubule-associated protein 2 e do português proteína associada a microtubulos 2
Mb	- mega base
min	- minutos
mL	- mililitro
mm	- milímetro

NG -	do inglês, Neural growth (media), do português, meio de crescimento neural
NPC -	do inglês, Neural Progenitor Cells e do português células progenitoras neurais (CPN)
°C -	Graus Celcius
Oct-3/4 -	do inglês, octamer 4
PBS -	do inglês, Phosphate Buffered Saline e do português tampão salina-fostato
PCR -	do inglês, polymerase chain reaction e do português reação em cadeia da polimerase
RNA -	acido ribonucleico
rpm -	rotações por minuto
SFB -	do inglês Serum fetal bovine e do português, Soro Fetal Bovino
SFBi -	soro fetal bovino inativado
SHED -	do inglês Stem cell from human exfoliated decidous teeth, Células-tronco de dente decíduo esfoliado
SNC -	Sistema nervoso central
Sox2 -	do inglês
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
µL -	microlitros
µm-	micrometros
µM-	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	22
2.1.1	Células-tronco derivadas de tecido dental.....	24
2.2	TRANSDIFERENCIAÇÃO	25
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODO	31
4.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA.....	31
4.2	MANUTENÇÃO E EXPANSÃO DAS SHED	32
4.3	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE MICOPLASMA NA CULTURA DE SHED.....	32
4.3.1	Teste de micoplasma por PCR (Polymenrase Chain Reaction).....	32
4.3.2	Tratamento das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) com Plasmocina	33
4.4	PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS A PARTIR DE CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA.....	33
4.4.1	Protocolo I	34
4.4.1.1	Obtenção de EB- <i>like</i>	34
4.4.1.2	Produção de rosetas.....	34
4.4.2	Protocolo II	35
4.4.2.1	Pré-diferenciação química	35
4.4.2.2	Produção de neurônios.....	36
4.4.3	Protocolo III	38
4.4.3.1	Pré-diferenciação química	38
4.4.3.2	Produção de neurônios.....	39
4.5	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA	40
5	RESULTADOS	43
5.1	CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO.....	43
5.1.1	Análise da presença da bactéria Micoplasma nas células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED)	45

5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EB-LIKE.....	46
5.2.1	Protocolo I	46
5.2.2	Protocolo II	48
5.2.3	Protocolo III	55
5.3	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA.....	59
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O estudo de doenças que afetam o sistema nervoso permanece um desafio à ciência. Muitas destas doenças têm uma origem idiopática, ou seja, ainda desconhecida, portanto a obtenção de amostras biológicas para estudos *in vitro* seriam de extrema valia. Entretanto, a aquisição de amostras biológicas do sistema nervoso central através de uma biópsia não é eticamente possível, pois oferece risco ao paciente que não justificaria a coleta para estudo. Sendo assim, a maioria dos estudos de doenças neurodegenerativas ou do neurodesenvolvimento ficam limitados a estudos de cérebros *post-mortem*, que apesar de valiosos, oferecem um panorama distante do real uma vez que o cérebro não se encontra mais em atividade, mas com o tecido fixado. Além disso, nestes casos, as informações obtidas refletem o quadro terminal da doença, o que não auxilia na compreensão do quadro de evolução fisiopatológica da doença. Sendo assim, modelos de estudos com células vivas e viáveis, se possível preservando o *background* genético dos pacientes, seria de extrema valia.

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, capazes de se multiplicarem por longos períodos, através do processo de mitose, e de grande plasticidade, se transformando em células especializadas com funções particulares. As CT são classificadas de acordo com o potencial de diferenciação, sendo as células-tronco mesenquimais (CTM), também chamadas de multipotentes ou adultas, detentoras de boa plasticidade, porém mais limitadas em relação às totipotentes e pluripotentes, encontradas na mórula e no blastocisto, respectivamente. Em tempo, as CTM são as células que estão presentes no organismo após o nascimento e durante toda a vida (SI et al., 2011).

As CTM foram definidas em 2006, pelo Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Tissular da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) como células capazes de se diferenciarem em adipócitos, condroblastos e osteoblastos. Além disso, as CTM são aderentes ao plástico quando colocadas em cultura celular; expressam CD73, CD90 e CD105, não expressam CD11b, CD14, CD19, CD35, CD45, CD79 e HLA-DR (FRIEDENSTEIN et al., 1974; RYAN et al., 2005; DOMINICI et al., 2006; BASSI et al., 2012; RYU et al., 2014).

Existem alguns nichos de CTM no organismo. Um desses nichos, muito interessante, são os dentes, onde tipos de células-tronco são facilmente isoladas a partir de diversos tecidos dentários (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; KERKIS et al., 2006; SONOYAMA et al., 2006; CASAGRANDE et al., 2011). Os tipos de células-tronco derivadas de tecido dentário são: células-tronco de polpa dentária (CTPD), células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) (cuja sigla se mantém do inglês, *Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*), células-tronco de ligamento periodontal (CTLP), células-tronco da papila apical (CTPA) e as células-tronco progenitoras do folículo dental (CTPFD) (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009). Acredita-se que mesmo localizadas dentro de uma única unidade funcional, as origens diferentes de cada grupo lhes conferem características distintas (GRONTHOS et al., 2000; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009).

As células extraídas da polpa dentária (CTPD e SHED) são de origem ectomesenquimal, provenientes da crista neural (GRONTHOS et al., 2002). As CT extraídas de polpa dentária são multipotentes, altamente proliferativas e clonogênicas (GRONTHOS et al., 2000) e ainda possuem a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares distintas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MIURA et al., 2003; HAU et al., 2006; ISHKITIEV et al., 2010; CHEN et al., 2012), o que as torna uma fonte atrativa de CT. Diversos trabalhos já demonstram a capacidade das SHED para se diferenciarem em células neuronais, porém sua caracterização foi baseada na morfologia e em ensaios celulares e moleculares, mas nunca em ensaios funcionais (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003; ARTHUR et al., 2008).

Sabe-se que a geração de células neurais funcionais é possível a partir de células-tronco pluripotentes ou embrionárias, as quais não estão presentes após o nascimento do indivíduo. Em 2006, foi descrito por Takahashi e Yamanaka uma tecnologia capaz de gerar células-tronco pluripotentes induzidas (*"induced pluripotent stem cells"*, iPSC) a partir de fibroblastos murinos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006) ou de fibroblastos humanos (TAKAHASHI et al., 2007). A partir desta tecnologia foi possível a geração de modelos celulares para o estudo de doenças do sistema nervoso, inclusive fornecendo uma plataforma para o teste de fármacos *in vitro* (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011, 2013). Com isso, diversos grupos vêm utilizando a tecnologia de reprogramação para estudar doenças

neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento (KONDO et al., 2013; YU et al., 2014; YAP et al., 2015).

A modelagem de doenças através das iPSC é uma excelente ferramenta para o estudo dos mecanismos envolvidos em doenças em geral, mas é um processo caro e demorado. Nosso grupo trabalha com SHED desde 2008 e, neste trabalho, nosso objetivo era desenvolver um protocolo para gerar células neuronais funcionais a partir de SHED, o que proporcionaria maior agilidade e custo benefício para estudar doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento, principalmente que se manifestam durante a infância.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco adultas, são células derivadas do mesoderma embrionário que se aderem ao plástico em cultura celular. As CTM foram isoladas pela primeira vez por Friedenstein, a partir do estroma de medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1974; RYAN et al., 2005; BASSI et al., 2012; RYU et al., 2014). Existem outras nichos e fontes conhecidas de CTM, como a placenta, líquido e membrana amniótica, cordão umbilical, polpa de dente, pele, tecido adiposo, periósteo, tendões, músculo e mucosa (ZATZ, 2004; ATALA, 2009; CAPLAN, 2009; ABUMAREE; JUMAH, 2012; BASSI et al., 2012; RYU et al., 2014). O Comitê de células-tronco mesenquimais e teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs então 3 critérios para definir as MSC: aderência ao plástico, expressão de antígenos de superfície específicos e potencial para diferenciação em diferentes linhagens (DOMINICI et al., 2006).

A morfologia das CTM assemelha-se à fibroblastos, apresentando formato fusiforme e são caracterizadas pela capacidade de formar unidades formadoras de colônias fibroblastoides (do inglês “*fibroblast colony-forming units*” [CFUs]) nas primeiras passagens *in vitro* e pelo potencial de se diferenciarem em osteócitos, adipócitos e condrócitos (BASSI et al., 2012; MAKINO et al., 2013). Além disso, as CTM não expressam marcadores de superfície hematopoiéticos CD14, CD34, CD45, CD133 e marcador endotelial CD31, e são positivas para os marcadores CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD73, CD90, CD105, CD166, Stro-1 (RYAN et al., 2005; PAROLINI et al., 2008; VAAGS et al., 2009; YI; SONG, 2012).

Mais recentemente, estudos mostraram que as CTM secretam diversos tipos de fatores de crescimento quando estimuladas, incluindo Fator de Crescimento Vascular Endotelial (do inglês “*vascular endothelial growth factor* – VEGF), Fator de crescimento fibroblástico (*basic fibroblast growth factor* -FGF2), Fator de Crescimento hepatocitário (*hepatocyte growth factor* - HGF) e Fator de Crescimento tipo-insulínico 1 (*insulin-like growth factor 1* - IGF-1) (BASSI et al., 2012; RYU et al., 2014). Por conta da produção desses e de outros fatores e de sua capacidade

plástica, as CTM têm sido consideradas como potenciais para proporcionar um tratamento eficaz para uma ampla gama de doenças, sendo utilizadas em várias aplicações em medicina regenerativa, como por exemplo para reparação de tecido e entrega de genes. Ao longo dos últimos anos, as CTM isoladas a partir de medula óssea, tecido adiposo e tecidos do cordão umbilical têm sido usadas como principais fontes para terapias celulares. Entretanto, a polpa dentária e a membrana amniótica podem ser alternativas para obtenção de CTM por apresentarem a mesma capacidade plástica e pelo processo de obtenção ser menos invasivo comparado a aspiração da medula óssea clássica (GRIFFIN; RITTER; MAHON, 2010; BASSI et al., 2012; RYU et al., 2014).

No caso do uso em protocolos de terapia celular, as CTM podem ser detectadas em níveis baixos em diversos tecidos após infusão intravenosa e em maior quantidade em locais lesionados, dado o efeito trófico das mesmas, já descrito na literatura (FRIEDENSTEIN et al., 1974; LE BLANC; RINGDÉN, 2007).

Além da plasticidade, as CTM apresentam capacidade imunomodulatória, que pode ser observada através da inibição da proliferação de linfócitos T em reações mistas de linfócitos. Em geral as células alogênicas são destruídas pela resposta imune do hospedeiro, porém estudos na área de imunologia tem mostrado que as CTM não seguem este preceito (RYAN et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2011; BASSI et al., 2012; MAKINO et al., 2013).

O potencial clínico reconhecido das CTM como imunomoduladoras envolve protocolos de tratamento de isquemia aguda do miocárdio, acidente vascular cerebral, lesão renal, doença inflamatória do intestino, doença do enxerto contra o hospedeiro, esclerose múltipla, diabetes mellitus e transplante de órgãos (CAPLAN, 2009; GRIFFIN; RITTER; MAHON, 2010; HORWITZ; ANDREEF; FRASSONI, 2012). É provável que uma combinação de atividade parácrina das CTM e o contato célula-célula permite que estas células tenham estes efeitos regenerativos e imunomoduladores (YI; SONG, 2012).

2.1.1 CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO DENTAL

As células-tronco de origem dental tem sido alvo de interesse por parte de inúmeros grupos de pesquisadores nos últimos anos devido a facilidade de obtenção de exemplares, pela possibilidade de extração do material de forma indolor e principalmente a condição das células estarem preservadas da ação de radiação solar (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; BOJIC et al., 2014).

Os ensaios voltados para pesquisas utilizando células-tronco com origem na estrutura dentária foram capazes de caracterizar cinco fontes diferentes de obtenção de células, sendo elas: células-tronco de popa dentária (CTPD), células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) (cuja sigla se mantém do inglês, *Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*), células-tronco de ligamento periodontal (CTLP), células-tronco da papila apical (CTPA) e as células-tronco progenitoras do folículo dental (CTPFD) (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009) (Figura 1). Acredita-se que mesmo localizadas dentro de uma única unidade funcional, as origens diferentes de cada grupo lhes conferem características distintas (GRONTHOS et al., 2000; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009)

Figura 1 – Tipos de células-tronco derivadas do dente

Fonte: Modificado de (BOJIC et al., 2014)

Legenda: Diferentes tipos de células-tronco no tecido dental: dente decíduo esfoliado (SHED); pólo dentário (CTPD); progenitoras do folículo dental (CTPFD), de papila apical (CTPA) e do ligamento periodontal (CTLP).

A descoberta dessas populações celulares em humanos estimulou o interesse no estudo da regeneração dos tecidos periodontais (BARTOLD et al., 2000). Diversos ensaios clínicos com células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária estão sendo realizados em animais, porém em humanos ainda não estão sendo testadas, mas se mostram muito promissoras para aplicação em futuras terapias celulares em humanos. Trabalhos *in vivo* demonstraram a possibilidade de regeneração e revascularização de tecido pulpar (HUANG; YAMAZA, 2009) e outros *in vitro* mostram a possibilidade de utilizar células tronco de polpa de dente para terapia celular em fígado (ISHKITIEV et al., 2010) e doenças isquêmicas (GANDIA et al., 2008).

Além de estudos regenerativos, as SHED têm se mostrado de grande interesse para estudos de modelagem celular *in vitro*, em especial para doenças neurodegenerativas, já que as SHED são originadas à partir do ectoderma oral e do mesênquima da crista neural (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009). Atualmente diversos estudos utilizam o método de reprogramação celular com as células SHED para a obtenção de neurônios para investigar doenças como autismo (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014), síndrome de Williams (CHAILANGKARN et al., 2016) e doenças infecciosas como Zika vírus (CUGOLA et al., 2016).

2.2 TRANSDIFERENCIAÇÃO

A transdiferenciação é um processo pelo qual a célula indiferenciada se transformada em outro tipo celular com funções e fenótipo diferentes por meio de estímulos, sem necessidade de retroceder ao estágio de pluripotência. Para este processo são geralmente utilizadas as CTM, abundantes no organismo, como por exemplo os adipócitos ou fibroblastos para a diferenciação em células neuronais ou cardiomiócitos (ZHOU; MELTON, 2008; JOPLING; BOUE; IZPISUA BELMONTE, 2011; IWAUCHI-DOI; ZARET, 2014; MEIVAR-LEVY; FERBER, 2015).

O grupo de Weintraub foi um dos primeiros a realizar tal experimento, induzindo fibroblastos, adipócitos e hepatócitos à diferenciação em células musculares com super-expressão de um regulador de diferenciação muscular – MyoD - (WEINTRAUB et al., 1989), porém este processo não era muito claro e não se sabia como aplicar o mesmo procedimento de diferenciação para outros tipos

celulares. Em 2008, Zhou e colaboradores realizaram experimentos paralelos aos de reprogramação de iPSC e foram capazes de transformar células pancreáticas exócrinas em células beta pancreáticas ao reexpressar 3 fatores de transcrição (ZHOU et al., 2008). A partir desses estudos entre células de mesma origem embrionária (Figura 2) foi possível realizar a transdiferenciação entre linhagens diferentes, a exemplo da obtenção de células neuronais induzidas funcionais, a partir de fibroblastos, cuja origem comum é ectodérmica (VIERBUCHEN et al., 2010), ou hepatócitos (MARRO et al., 2011) utilizando os mesmos 3 fatores de transcrição - *Ascl1*, *Brn2*, and *Myt1l*.

Além do uso de fatores de transcrição, diversos pesquisadores têm demonstrado a eficiência na utilização de suplementos nos meios de cultura em transdiferenciação *in vitro*, em especial para a diferenciação neural. Para verificar o sucesso da transdiferenciação são analisados a morfologia celular e os marcadores celulares e moleculares (JORI et al., 2005). Entretanto, sabe-se que a utilização de alguns suplementos, como o ácido retinóico e o β -mercaptoetanol, pode modificar a morfologia celular gerando um fenótipo neural, o que pode ser considerado como artefato de técnica, vindo a dificultar a caracterização da célula pela morfologia (NEUHUBER et al., 2004; MAMMADOV; KARAKAS; ISIK, 2011). A expressão de marcadores neurais e gliais em protocolos de transdiferenciação neural com ácido retinóico e *forksolin* mostrou-se bastante efetiva, decorrente à menor toxicidade destes elementos (SAFFORD et al., 2004; KINGHAM et al., 2007; BAE et al., 2011; NOURBAKSH et al., 2011).

Figura 2 - Esquema representativo de desenvolvimento em *landscape*

Fonte: Modificado de (CRESPO; DEL SOL, 2013)

Legenda: Modelo representativo de desenvolvimento em *landscape* proposto por CRESPO, 2013. Neste modelo é possível verificar de modo simplificado os passos da diferenciação celular, desde as células pluripotentes até as células especializadas e os possíveis passos para transdiferenciação. Em A, Transdiferenciação entre células especializadas, mas de mesma linhagem; Em B, transdiferenciação entre células especializadas de diferentes linhagens; em C, especialização celular após diferenciação.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo testar novos protocolos para diferenciar células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) em células neuronais e estudar suas características morfológicas e funcionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a produção de EB a partir das SHED em meio de cultura com os fatores N2 e B27 é capaz de induzir a diferenciação neuronal das SHED.
- Verificar se a pré-indução química nas SHED em meio suplementado ou não com soro fetal bovino, com a adição de beta-mercaptoetanol seguido de ácido ascórbico e dorsomorfina e posterior cultivo como EB, pode produzir a transdiferenciação neuronal das SHED.
- Verificar se a pré-indução química com ácido ascórbico e dorsomorfina é capaz de induzir a transdiferenciação neuronal das SHED.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o nº 1711281015 e faz parte do Projeto “A Fada do Dente”, projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas sob o nº 1001.

As SHED foram obtidas através de doações ao “Projeto a Fada do Dente” mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), onde dentes decíduos que caem espontaneamente são enviados ao Laboratório de Células-Tronco (LCT) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP em tubo contendo “meio de transporte” - DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo), 5% de antibiótico-antimicótico (500U/mL penicilina, 500µg/mL estreptomicina e 2,5µg/mL anfotericina – Sigma, SL, USA) e 1% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen, CA, USA) - a 4°C para o posterior isolamento das SHED, feito de acordo com protocolo adaptado de MIURA et al., 2003. Para o isolamento, as SHED foram obtidas utilizando apenas a Colagenase tipo I (Invitrogen). Para isso, os dentes foram lavados 3x com PBS contendo 5% da solução de antibiótico-antifúngico. Após esse procedimento as polpas foram retiradas com auxílio de uma agulha, colocadas em um tubo contendo 1 mL de colagenase (3mg/mL) e deixadas em banho-maria a 37°C por 40 minutos. Depois, a colagenase foi inativada e o tubo contendo as células foi centrifugado (200g – 5 min). Após essa centrifugação, o precipitado formado foi ressuspenso em meio de cultura composto por DMEM/F12 contendo 10% de SFB comum, 2% de antibiótico, 1% de L-glutamina (Invitrogen) e 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen). As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2 MANUTENÇÃO E EXPANSÃO DAS SHED

A cultura das SHED foi mantida no meio descrito acima até atingirem confluência adequada para repique, em torno de 80%. Para repique e amplificação, as células foram lavadas em PBS, dissociadas da placa por uma solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen), e distribuídas 10^4 células por cm^2 . Para que não houvesse diferenciação celular, as células foram mantidas semiconfluentes, em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO_2 . A cada 4-5 dias as células eram repicadas e o meio trocado a cada 2-3 dias.

4.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE MICOPLASMA NA CULTURA DE SHED

O micoplasma é uma bactéria intracelular encontrada na cavidade oral e sua presença é dificilmente notada em culturas celulares, a não ser pela diminuição do crescimento das células eucarióticas, porém, quando presente pode afetar a reprogramação celular (LAWRENCE; BASHIRI; DEHGhani, 2010).

4.3.1 Teste de micoplasma por PCR (Polymenrase Chain Reaction)

As culturas foram submetidas à avaliação de presença de *Mycoplasma sp* utilizando 1 mL do sobrenadante do meio de cultivo coletado 48h após a troca de meio, podendo ser utilizado a fresco ou mantido em freezer -20°C até a utilização. Para tanto, foi centrifugado 1 mL do sobrenadante do meio por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 15µL de água Milli-Q autoclavada. Para o PCR foi utilizado 1µL do precipitado previamente ressuspendido, 10µM de Oligonucleotídeo (Quadro 1) sense (Myco A) e anti-sense (Myco B), 10µM de dNTP, 50mM, MgCl_2 , tampão de enzima, e por último 1U da enzima Taq DNA Polymerase (5U/µL) (Invitrogen) e água Milli-Q em quantidade suficiente para completar a reação em 25µL.

As amostras foram colocadas no termociclador para realizar a reação. Iniciou-se com 94°C por 4 min para abrir a fita dupla de DNA, seguidos por 40 ciclos de 94°C durante 45 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Para finalização, a amostra foi submetida a 72°C por 10 minutos e mantida a 4°C até ser utilizada.

Foi preparado gel de agarose à 1,5% para correr as amostras de PCR em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) e foi adicionado 1µL de *SYBR Safe DNA Stain* (Invitrogen) para posterior visualização em transiluminador UV.

Quadro 1 - Oligos utilizados na PCR para o teste de micoplasma

Myco A (sense)	GGCGAATGGGTGAGTAACCG
Myco B (anti-sense)	CGGATAACGCTTGCGACCTATG

4.3.2 Tratamento das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) com Plasmocina

As culturas de células contaminadas por micoplasma foram submetidas ao tratamento com Plasmocina (Invivogen, CA, EUA). Estas células foram plaqueadas em placas de Petri de 60mm com baixa confluência e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias adicionando 25µg/mL de Plasmocina, por 16 dias. Junto ao tratamento foi realizado PCR nos dias 6, 10 e 16, para verificar a presença do micoplasma. Foi coletado sobrenadante destas células 48h após o final do tratamento, sem que este meio fosse trocado, para realizar a PCR (conforme item 3.3.1) e confirmar a ausência de micoplasma.

4.4 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS A PARTIR DE CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA

Foram realizados diferentes protocolos de diferenciação, como descrito em seguida.

4.4.1 Protocolo I

As células de polpa dentária foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após atingirem em torno de 70% de confluência foram utilizados três meios: o próprio meio SHED, o meio mTeSR (Stem Cell Technologies) e o Essencial 8 Basal Medium (Life Technologies). Essas condições foram mantidas por 48 horas em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO₂.

4.4.1.1 Obtenção de EB-*like*

Após este período, as células foram removidas da placa e cultivadas em suspensão em placas de 6 poços, em meio N2 - (DMEM/F12 suplementado com N2 1x (Invitrogen) contendo 1µM de dorsomorfina (Tocris, Ellisville, MO, USA) e 10µM de SB431542 (Stemgent, Massachusetts, USA) sob agitação de 90 rpm por 5 dias, em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO₂. Estas estruturas foram denominadas EB-*like* (do inglês *embryoid bodies*) e foram produzidas para a obtenção de rosetas.

3.4.1.2 Produção de rosetas

Para obtenção das rosetas, os EB-*like* obtidos foram coletados, transferidos para uma nova placa tratada com Matrigel (BD Biosciences) para adesão e mantidos com meio NBF (DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 0,5x N2 (Life Technologies), 0,5x B27 (Invitrogen), 20ng/mL de bFGF-2 (Life Technologies) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) por 48 h em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO₂.

Figura 3 – Metodologia empregada na condição do protocolo I

Fonte: (CRUZ, R. M. A. R., 2016)

Legenda: Após expansão das SHED, as células foram condicionadas no dia 0 com três meios diferentes; no segundo dia foram colocadas em *shaker* e mantidas por 5 dias para a obtenção de EB-like. No dia 7 as células foram plaqueadas em Matrigel para a obtenção de rosetas

4.4.2 Protocolo II

As células de polpa dentária foram plaqueadas em 10 placas de 100mm e após atingirem em torno de 80% de confluência, foram submetidas à pré-diferenciação química.

4.4.2.1 Pré-diferenciação química

Foram realizadas duas condições de pré-indução química durante 3 dias; denominamos “condição 1” e “condição 2” – em quintuplicata para cada condição. No primeiro dia, na condição 1, o meio foi trocado por *Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification* (Alpha-MEM – LGC Biotecnologia) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen) + 1mM beta-mercaptoetanol (Life Technologies). Na condição 2, o meio foi trocado por Alpha-MEM + 1mM beta-mercaptoetanol. No segundo dia, subdividimos a “condição 1” em 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, e a “condição 2” em 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, e os meios foram trocados, adicionando-se + 2mM de beta-mercaptoetanol aos meios de condição 1 e 2. Manteve-se essa composição do meio por 48h; porém adicionando-se 100µM de Ácido Ascórbico (Synth) para as subcondições “a”; 1µM de dorsomorfina e 10µM de SB431542 para as subcondições

“b”; 100µM de Ácido Ascórbico + 1µM de dorsomorfina +10µM de SB431542 para as subcondições “c”; as subcondições “d” e “e” não tiveram a adição de nenhum suplemento supramencionado. Após este período, as células foram removidas da placa e cultivadas em suspensão como EB por 5 dias em rotação constante de 90 rpm. Os seguintes meios foram usados como descrito a seguir: as subcondições “a”, “b”, “c”, “d” foram mantidas em meio NGF (DMEM/F12 suplementado com 0,5x N2 0,5x Gem21 (Gemini Bio-products, CA, USA), 20ng/mL de bFGF-2 e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). A subcondição “e” foi mantida em meio Essencial 8 contendo 1µM de dorsomorfina e 10µM de SB431542. Por todo o tempo de experimento as células foram mantidas em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO₂.

4.4.2.2 Produção de neurônios

Os EB *like* foram plaqueados em placas revestidas com 10 µg/mL poliornitina (Sigma-Aldrich) para as superfícies de plástico e 1 µg/mL para as superfícies de vidro, e revestida com 2,5 µg/mL de laminina (Life Technologies) para as superfícies de plástico e 5 µg/mL para as superfícies de vidro. As células foram cultivadas em meio NB + 10µM de Ácido Ascórbico, sem suplementação de bFGF-2. Esse meio foi mantido por 2 semanas, período considerado suficiente para a diferenciação neuronal, sendo trocado a cada 3-5 dias. As células foram monitoradas diariamente por microscópio EVOS (Life Technologies), procurando verificar a morfologia característica de neurônios.

Figura 4 – Metodologia empregada na condição 1

Fonte: (CRUZ, R. M. A. R., 2016)

Legenda: Após expansão das SHED, as células foram condicionadas no dia 0, subdivididas entre as condições a-e, no quarto dia foram colocadas em *shaker* e mantidas por 5 dias para a obtenção de EB-*like*. No dia 9 as células foram plaqueadas em Matrigel para a obtenção de neurônios.

Figura 5 – Metodologia empregada na condição 2

Fonte: (CRUZ, R. M. A. R., 2016)

Legenda: Após expansão das SHED, as células foram condicionadas no dia 0, subdivididas entre as condições a-e, no quarto dia foram colocadas em *shaker* e mantidas por 5 dias para a obtenção de EB-*like*. No dia 9 as células foram plaqueadas em Matrigel para a obtenção de neurônios.

4.4.3 Protocolo III

As células de polpa dentária foram plaqueadas em 10 placas de 100mm e após atingirem em torno de 80% de confluência, foram submetidas à pré-diferenciação química.

4.4.3.1 Pré-diferenciação química

Foram realizadas duas condições durante 3 dias; denominamos “condição 3” e “condição 4”. No primeiro dia, na condição 3, o meio foi trocado Alpha-MEM contendo 1mM beta-mercaptoetanol. Na condição 4, o meio foi trocado por Alpha-MEM. No segundo dia, subdividimos a “condição 3” em 3a, 3b, 3c, 3d, 3e e os meios foram trocados, adicionando-se + 1mM de beta-mercaptoetanol aos meios de condição 3. Manteve-se essa composição do meio por 48h; porém adicionando-se 100µM de Ácido Ascórbico para as subcondições “a”; 1µM de dorsomorfina e 10µM de SB431542 para as subcondições “b”; 100µM de Ácido Ascórbico + 1µM de dorsomorfina + 10µM de SB431542 para as subcondições “c”; a subcondição 1d e 1e não tiveram a adição de nenhum suplemento supramencionado; na “condição 4”, não houve qualquer suplementação. Após este período, as células foram removidas da placa e cultivadas em suspensão como EB por 5 dias em rotação constante de 90 rpm. Os seguintes meios foram usados como descrito a seguir: as subcondições “a”, “b”, “c”, “d” foram mantidas em meio NGF e 1% penicilina/estreptomicina. A subcondição “e” foi mantida em meio N2 contendo 1µM de dorsomorfina e 10µM de SB431542. A “condição 4” foi mantida em meio NGF e 1% penicilina/estreptomicina. Por todo o tempo de experimento as células foram mantidas em ambiente úmido, à 37°C contendo 5% de CO₂.

4.4.3.2 Produção de neurônios

Os EB *like* foram dissociados suavemente e plaqueados em placas revestidas com 10 µg/mL poliornitina para as superfícies de plástico e 1 µg/mL para as superfícies de vidro, e revestida com 2,5 µg/mL de laminina para as superfícies de plástico e 5 µg/mL para as superfícies de vidro. As células da “condição 3” foram cultivadas em meio NB + 15µM de Ácido Ascórbico, sem suplementação de bFGF-2; já as células da “condição 4”, foram cultivadas em meio NB sem adição de suplementos. Esse meio foi mantido por 2 semanas, período considerado suficiente para a diferenciação neuronal, sendo trocado a cada 3-5 dias. As células foram monitoradas diariamente por microscópio EVOS, procurando verificar a morfologia característica de neurônios.

Figura 6 – Metodologia empregada na condição 3

Fonte: (CRUZ, R. M. A. R., 2016)

Legenda: Após expansão das SHED, as células foram condicionadas no dia 0, subdivididas entre as condições a-e, colocadas em *shaker* no quarto dia e mantidas por 5 dias para a obtenção de EB-*like*. No dia 9 as células foram plaqueadas em Matrigel para a obtenção de neurônios.

Figura 7 – Metodologia empregada na condição 4

Fonte: (CRUZ, R. M. A. R., 2016)

Legenda: Após expansão das SHED, as células foram condicionadas no dia 0, subdivididas entre as condições a-e, colocadas em *shaker* no quarto dia e mantidas por 5 dias para a obtenção de EB-*like*. No dia 9 as células foram plaqueadas em Matrigel para a obtenção de neurônios.

4.5 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

As SHED foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13mm em placas de 24 poços, na confluência de 5×10^4 e mantidas até obter 60-70% da confluência e os EB-*like* foram dissociados mecanicamente e plaqueados em lamínulas de vidro de 13mm, pré-tratadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de poli-ornitina e $5 \mu\text{g/mL}$ de laminina em placa de 24 poços, mantidas até obterem 70-80% da confluência. Os meios de cultura foram removidos e seguiu-se o protocolo para a análise por imunocitoquímica, descrito abaixo.

As células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15M de NaCl, 0,05% de Tween-20), fixadas com 4% de paraformaldeído (Sigma) e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100. Após o bloqueio com 5% de BSA (Sigma), as células foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2) por 1h à temperatura ambiente. Após a terceira lavagem em tampão, foram adicionados os respectivos anticorpos secundários, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 e Alexa Fluor 647 (Life Technologies) de acordo com os primários (diluição 1:500) e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas de microscopia foram montadas no meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para as

fotografias microscópicas, foi utilizada uma câmera Nikon Eclipse i80 (Nikon, TO, Japão).

Quadro 2 - Anticorpos primários para a imunofluorescência

Anticorpo	Hospedeiro	Diluição	Código	Marca	Secundários
Anti CD73	Coelho	1:200	Ab59462	Abcam	555 vermelho
Anti Nestina	Galinha	1:100	Ab81755	Abcam	647 branco
Anti MAP-2	Camundongo	1:100	Ab5392	Abcam	488 verde

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO

A extração das SHED foi realizada conforme protocolo adaptado de Miura et al. (2003). Observamos o desprendimento de células da polpa dentária 5 dias após o isolamento (Figura 8A). As células cresceram conforme as características de CTM, com característica morfológica semelhante a fibroblasto e boa adesão ao plástico (Figura 8B). As SHED utilizadas nos protocolos de transdiferenciação deste trabalho foram provenientes do mesmo paciente, estavam em sétima passagem (P7) e foram amplificadas até serem obtidas as quantidades desejadas para os experimentos com protocolos distintos, descritos previamente (item 3.4). Estas células são rotineiramente utilizadas em nosso laboratório e já foram amplamente caracterizadas, conforme expressão gênica das SHED verificada por qPCR, confirmando a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais - vimentina, CD105 e CD73 – e a baixa expressão do marcador de pluripotência Oct3/4, (Figura 8C). Já a expressão de marcadores celulares para as SHED foi verificada por ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-vimentina, anti-CD73 e anti-CD105 (Figura 8D e 8E).

Figura 8 - Cultura e caracterização das SHED

Fonte: (RUSSO, 2015, adaptado figuras C e D por CRUZ, 2016). Figuras A e B (CRUZ, 2016)

Legenda: A) Células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) após 5 dias da coleta B) Cultura de SHED com aproximadamente 80% de confluência. C) Análise da expressão gênica de vimentina, CD105, CD73 e Oct4 por qPCR. D) Análise de imunofluorescência para a expressão dos marcadores Vimentina, CD105 e CD73. Magnificação: A-B) 10x e barras de 400 μm e D) 20x.

5.1.1 Análise da presença da bactéria *Micoplasma* nas células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED)

O teste para análise de contaminação por micoplasma das SHED foi realizado usando duplicatas experimentais em momentos diferentes através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos que contém homologia com várias espécies de micoplasma. As SHED utilizadas neste projeto já foram utilizadas pelo nosso grupo, portanto já haviam sido tratadas (conforme descrito no item 3.3.2) e os testes destas amostras foram negativas para a presença da bactéria, conforme observado pela ausência da banda de DNA correspondente a 460pb. Convém ressaltar que foram utilizados controles negativos e positivos, bem como água, como controles da PCR (Figura 9). Após a confirmação da ausência de contaminação das células com o micoplasma foi possível iniciar o processo de transdiferenciação.

Figura 9 – Teste de micoplasma nas SHED

Fonte: CRUZ, 2016

Legenda: A) marcador de peso molecular de DNA (*ladder* de 100 pb). B, C, D) Amostras de SHED em triplicata, com ausência da banda de DNA característica de amplificação de micoplasma. E) H₂O utilizada na reação de PCR, banda ausente. F) Controle negativo, banda ausente. G) Controle positivo, banda de 460pb positiva.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EB-LIKE

5.2.1 Protocolo I

No protocolo I foram utilizados três meios diferentes para o cultivo das SHED antes da cultura em suspensão. As células utilizadas nesta etapa estavam em nona passagem (P9).

As fotomicrografias referentes ao processo de obtenção das rosetas estão apresentadas de forma esquemática na figura 5. A partir das SHED com 80% de confluência (Figura 10A) foram colocados novos meios e mantidos por 48h (Figura 10B) e cultivadas em suspensão por 5 dias para gerar EB-*like*. O processo, no entanto, mostrou-se pouco efetivo para o objetivo, já que a formação de EB-*like* foi ineficaz (Figura 10C), impossibilitando desta forma a obtenção de rosetas e, por vezes, obtendo novamente células com a morfologia característica das SHED antes do processo de transdiferenciação (Figura 10D). É importante ressaltar que, durante o protocolo, o crescimento celular das SHED foi prejudicado (Figura 10B) por estarem com meios mTeSR e Essencial 8, já que estes meios são específicos para células embrionárias.

Figura 10 – Processo de obtenção de rosetas a partir das SHED

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de produção de rosetas a partir de SHED com meios diferenciados A) SHED em P9 e 80% de confluência de meios diferentes B) Células 48h após início do protocolo, com Meio SHED, mTeSR e E8 respectivamente C) Células em suspensão com meio N2 para a formação de *EB-like*, sem sucesso D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NBF, onde não houve formação de rosetas. Magnificação: A-D) 10x e barras de 400 μm

5.2.2 Protocolo II

No protocolo II as células utilizadas estavam em nona passagem (P9) ao início do protocolo (Figura 8A) e, após atingirem a confluência desejada, as SHED foram subdivididas em condição “1” e “2” (com e sem Soro Fetal Bovino) e, após, em subcondições “a”, “b”, “c”, “d”, “e” de acordo com o suplemento adicionado, como descrito no item 4.4.2. As fotomicrografias estão esquematicamente organizadas nas figuras 11 a 15 de forma a comparar o processo de diferenciação das condições com o mesmo tipo de indutor no intervalo de 11 dias, passando pelas etapas de pré-indução química (Figura 11A, D3), células ao início da cultura em suspensão (Figura 11B, D4), após três dias em suspensão (Figura 11C, D6) para a formação de EB-like, um dia após plaqueamento para diferenciação em neurônios (Figura 11D, D9) e dois dias após (Figura 11E, D11). Foi possível verificar que a presença de SFB (condição 1) prejudicou o crescimento celular, ao comparar a condição “1” e a condição “2” nas figuras 11, 12, 13, 14, 15.

A utilização de Ácido Ascórbico (Figura 11) fez com que as células apresentassem morfologia alterada após o terceiro dia de protocolo (Figuras 11A, 11B) e, ao contrário da condição 1 (Figura 11C, condição 1), a condição 2 proporcionou a formação de EB *like* na cultura a partir do sexto dia (Figura 11C, condição 2). Após o plaqueamento para a diferenciação em neurônios, houve uma morte celular exacerbada entre o nono e o décimo dias de experimento, restando poucas células com aspecto de sofrimento e morte celular (Figuras 11D e 11E).

O uso de dorsomorfina + SB431542, (Figura 12) mostrou menor alteração na morfologia das células até o terceiro dia (Figura 12A), porém com maior sofrimento celular após o quarto dia (Figura 12B). Após colocada em suspensão, a cultura sem SFB apresentou grande quantidade de EB *like* (Figura 12C, condição 2c) e, assim como as outras, não houve formação de corpos embrioides na condição 1 (Figura 12C, condição 1c) porém, no décimo dia de experimento, restam poucas células em sofrimento em ambas as condições (Figuras 12E).

Já a utilização de Ácido Ascórbico + dorsomorfina + SB431542 (Figura 13) fez com que as células apresentassem morfologia fusiforme no terceiro dia (Figura 13A). Já no dia seguinte, as células apresentaram uma morfologia que se assemelhava mais à de células progenitoras neurais (Figura 13B). Ao cultivar as células em

suspensão, houve um crescimento de colônias *EB-like* maior que nas subcondições “a” e “b”, também com a morfologia mais próxima aos EB na condição sem SFB (Figura 13C, condição 2c); na condição com SFB houve a formação de colônias disformes (Figura 13C, condição 1c).

Na subcondição d, não foi utilizado suplemento de indução, o que conferiu um resultado semelhante ao do controle do protocolo II. As células apresentaram morfologia disforme a partir do terceiro dia (Figuras 14A e 14B) e, em cultura sob agitação, houve formação de poucas *EB-like* e alta morte celular (Figura 14C). Após o plaqueamento destas células, não houve crescimento (Figura 14D e 14E).

A subcondição “e” seguiu o mesmo processo da subcondição “d”, porém com meio diferente quando colocada em suspensão. Nos primeiros dias as células apresentaram morfologia disforme (Figuras 15A e 15B) da mesma forma que na condição anterior, porém em suspensão, formaram colônias com formato próximo ao *EB-like* (Figura 15C). Ao plaquear, pôde ser vista quantidade maior de células (Figura 15D), porém com taxa de morte celular acentuada no dia seguinte (Figura 15E).

Figura 11 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição a

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com Ácido Ascórbico como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 1” e “condição 2” A) SHED após a adição de Ácido Ascórbico em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-*like* em meio NBF no quarto dia de protocolo (4D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-*like* (D6) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11). Magnificação: A-E 10x e barras de 400 μm

Figura 12 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição b

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com dorsomorfina + SB431542 como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 1” e “condição 2” A) SHED após a adição de dorsomorfina + SB431542 em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quarto dia de protocolo (4D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like (D6) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11). Magnificação: A-E 10x e barras de 400 µm

Figura 13 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição c

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com Ácido ascórbico + dorsomorfina + SB431542 como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 1” e “condição 2” A) SHED após a adição de Ácido ascórbico + dorsomorfina + SB431542 em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quarto dia de protocolo (4D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like (D6) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11). Magnificação: A-E 10x e barras de 400 μ m

Figura 14 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição d

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED sem pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 1” e “condição 2” A) SHED após troca de meio sem pré-indutor químico em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-*like* em meio NBF no quarto dia de protocolo (4D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-*like* (D6) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11). Magnificação: A-E 10x e barras de 400 μm

Figura 15 – Processo de transdiferenciação a partir das SHED, subcondição e

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED sem pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 1” e “condição 2” A) SHED após troca de meio sem pré-indutor químico em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-*like* em meio E8 + dorsomorfina + SB431542 no quarto dia de protocolo (4D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-*like* (D6) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11). Magnificação: A-E 10x e barras de 400 μ m

5.2.3 Protocolo III

O protocolo III foi baseado nos resultados obtidos do protocolo II (item 5.2.2) com modificações a fim de aumentar as taxas de sobrevivência. As células utilizadas estavam em nona passagem (P9) ao início do protocolo (Figura 8A) e, após atingir a confluência desejada, as SHED foram subdivididas em condição “3” e, após, em “a”, “b”, “c”, “d”, “e” de acordo com o suplemento adicionado como descrito no item 4.4.3 (semelhante à condição “2” no item 4.4.2). Na condição “4”, o meio foi trocado por Alpha-MEM e não houve suplementação com agentes indutores (como descrito em 4.4.3).

As fotomicrografias estão esquematicamente organizadas de forma a comparar o processo de diferenciação com os diferentes tipos de indutor no intervalo de 13 dias, passando pelas etapas de pré-indução química (A), células ao início da cultura em suspensão (B) para a formação de EB-like, após dois dias em suspensão (C), um dia após plaqueamento para diferenciação em neurônios (D), dias após (E) e 4 dias após (F).

A diminuição da quantidade de beta-mercaptoetanol na condição “3”, em comparação com a condição “2”, contribuiu para que a morfologia das células ficasse bastante alterada (Figuras 16A, 17A, 18A, 19A, 20A). Também foi modificado o meio da condição “e” quando em suspensão (Figura 16B e 16C), já que, de acordo com os protocolos anteriores, o meio E8 não é muito eficiente. Entretanto, não houve formação de EB-like nas culturas em suspensão, porém, o aumento do Ácido ascórbico após a cultura em suspensão manteve as culturas vivas por mais tempo (Figuras 16F, 17F, 18F, 19F, 20F)

Já na condição 4, não foi utilizado SFB, beta-mercaptoetanol ou qualquer outro suplemento de pré-indução química. Antes da cultura em suspensão, a cultura de SHED foi mantida apenas com ALPHA MEM manteve seu formato fibroblastóide, porém um pouco mais alongado e disforme (Figura 21A). Já em suspensão, formou EB-like razoavelmente disforme (Figuras 21 B e C) e, após plaqueamento, sem adição de Ácido ascórbico, as células apresentaram formato próximo ao de progenitores neurais (Figura 21D) e manteve a taxa de replicação, porém as células adquiriram novamente o formato fibroblastóide (Figura 21E) e morrem alguns dias depois (Figura 21F)

Figura 16 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3a

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com Ácido Ascórbico como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após a adição de Ácido Ascórbico em terceiro dia de protocolo (3D) B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quinto dia de protocolo (5D) C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like (D7) D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo (D9) E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel (D11) F) Cultura após 4 dias de plaqueamento em Matrigel (D13). Magnificação: A-F 10x e barras de 400 μ m

Figura 17 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3b

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com dorsomorfina + SB431542 como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após a adição de com dorsomorfina + SB431542 em terceiro dia de protocolo B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quinto dia de protocolo C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel. F) Cultura com 13 dias após início de protocolo. Magnificação: A-F 10x e barras de 400 μ m

Figura 18 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3c

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED com Ácido ascórbico + dorsomorfina + SB431542 como pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após a adição de Ácido ascórbico + dorsomorfina + SB431542 em terceiro dia de protocolo B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quinto dia de protocolo C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel. F) Cultura com 13 dias após início de protocolo. Magnificação: A-E 10x e barras de 400 µm

Figura 19 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3d

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED sem pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após troca de meio sem pré-indutor químico em terceiro dia de protocolo B) Células em suspensão para a formação de EB-like em meio NBF no quinto dia de protocolo C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-like D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel. F) Cultura com 13 dias após início de protocolo. Magnificação: A-F 10x e barras de 400 µm

Figura 20 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 3e

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED sem pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após troca de meio sem pré-indutor químico em terceiro dia de protocolo B) Células em suspensão para a formação de EB-*like* em meio N2 + dorsomorfina +SB431542 no quinto dia de protocolo C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-*like* D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB e Ácido Ascórbico com nove dias de protocolo E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel. F) Cultura com 13 dias após início de protocolo. Magnificação: A-F 10x e barras de 400 μ m

Figura 21 - Processo de transdiferenciação a partir das SHED, condição 4

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Protocolo de transdiferenciação a partir de SHED sem pré-indutor químico para a diferenciação neuronal em “condição 3” A) SHED após troca de meio sem pré-indutor químico em terceiro dia de protocolo B) Células em suspensão para a formação de EB-*like* em meio NBF no quinto dia de protocolo C) Células após dois dias em suspensão para a formação de EB-*like* D) Plaqueamento das células em suspensão em Matrigel com meio NB sem suplementos com nove dias de protocolo E) Cultura após 2 dias de plaqueamento em Matrigel. F) Cultura com 13 dias após início de protocolo. Magnificação: A-F 10x e barras de 400 μ m

5.3 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

A análise foi realizada com as células do protocolo 3 no décimo terceiro dia de cultura (Figuras 22F, 23F, 24F, 25F, 26F, 27F). Estas células foram analisadas a fim de verificar se expressavam marcadores mesenquimais ou neuronais. Para isso foram utilizados os marcadores CD73, Nestina e MAP2, como descrito no item 4.5. Os resultados mostram que as células expressam MAP2 (Figuras 22B, 23B, 24B, 25B, 26B, 27B) e CD73 (Figuras 22C, 23C, 24C, 25C, 26C, 27C), porém não expressam Nestina (Figuras 22D, 23D, 24D, 25D, 26D, 27D) sugerindo que estas células não se diferenciaram.

Figura 22 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3a

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Figura 23 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3b

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Figura 24 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3c

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Figura 25 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3d

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Figura 26 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 3e

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Figura 27 – Análise Imunocitoquímica das células após protocolo condição 4

Fonte: (CRUZ, 2016)

Legenda: Análise da expressão dos marcadores DAPI (A), MAP2 (B), CD73 (C), Nestina (D) e sobreposto (E) por imunofluorescência mostrando que as células continuaram expressando marcadores mesenquimais. Magnificação: 10x.

Discussão

6 DISCUSSÃO

As células-tronco revolucionaram a medicina e a forma de estudar as doenças, produzindo células e tecidos *in vitro* que servem inclusive para o teste de fármacos, em plataformas que possibilitam maior rapidez e segurança. Pensando na produção de tipos celulares *in vitro*, a transdiferenciação é um processo de grande aplicabilidade e que revela que o conhecimento científico acerca da irreversibilidade e imutabilidade das linhagens celulares ainda é precário.

Tendo em vista a grande utilidade das CTM para o estudo e ou o tratamento de doenças, principalmente para estudar doenças neurodegenerativas, o domínio de técnicas de transdiferenciação seriam uma alternativa à produção das iPSC, já que o processo de produção de células neurais, sem passar pelas iPSC, diminuiriam substancialmente o trabalho e o custo do processo. Além disso, a transdiferenciação de CTM para células neuronais abririam portas para um possível tratamento autólogo mais seguro, pois diferentemente das CTM, as iPSC formam teratomas *in vivo* e não há maneira de garantir que todas as células iPSC em cultivo estariam pré-diferenciadas antes da aplicação (ZHOU; MELTON, 2008).

Este projeto explorou a utilização de CTM extraídas da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) como célula-tronco escolhida para os testes de transdiferenciação neuronal. Apesar de vantajosas pela facilidade de obtenção e sua origem embrionária ectomesenquimal (CHEN et al., 2013), células-tronco derivadas de tecidos dentais apresentam taxa relativamente alta de contaminação pela bactéria do gênero micoplasma (*Mycoplasma* sp), por ser parte da flora da região oral. A presença desta bactéria muitas vezes inviabiliza a cultura celular, como amplamente descrito na literatura, e faz-se necessário o tratamento com antibiótico antes de sua utilização (UPHOFF; DENKMANN; DREXLER, 2012). A presença da bactéria pode não apenas afetar a taxa de multiplicação como também atrapalhar o processo de transdiferenciação celular (informação não publicada). Por esse motivo foram realizados testes de PCR antes de realizar os protocolos de transdiferenciação. As células utilizadas neste projeto foram tratadas com Plasmocina conforme descrito pelo fabricante, e, como demonstrado nos resultados do PCR, estavam livres de contaminação.

Os protocolos usados para transdiferenciação neuronal das SHED seguiram preceitos e usaram reagentes anteriormente descritos para indução neuronal. O β -mercaptoethanol é um agente redutor utilizado em processos de reprogramação e diferenciação celular. Já foi visto que este composto foi eficientemente usado na diferenciação neuronal de certos tipos celulares em neurônios como as células-tronco do tecido adiposo (ASCs) (PAVLOVA et al., 2012), células hepáticas fetais (LIU; ZHANG, 2004), hESCs (LEE et al., 2007), respeitando-se, o limite de toxicidade para as células em diferenciação (LU; BLESCH; TUSZYNSKI, 2004; TAHA et al., 2013)

O ácido ascórbico, por sua vez, funciona como um anti-oxidante liberado na fenda sináptica durante as sinapses (HARRISON; MAY, 2010), modulador de neurotransmissão (LEVINE et al., 1985; TODD; BAUER, 1988; MAJEWSKA; BELL; LONDON, 1990) ou cofator na produção de neurotransmissores (LEVINE; MORITA; POLLARD, 1985). No que se diz respeito a neurogênese, o ácido ascórbico já foi utilizado em meio suplementado com N2 para a diferenciação de rosetas neurais, para a formação de neurônios motores (LEE et al., 2007), nociceptivos (BOISVERT et al., 2015) e até mesmo dopaminérgicos (YAN et al., 2005) a partir de hESCs. Além disso, sua presença em meio de co-cultura com células de Schwann e neurônios foi capaz de diferenciar tais células da glia e promover consequente formação de lâmina basal e mielina (ELDRIDGE; BUNGE; BUNGE, 1989). Em protocolos *in vivo*, o ácido ascórbico esteve relacionado ao aumento da taxa neurogênica em condições pós-AVC isquêmico (CORBETT et al., 2015).

Há algumas décadas, Zalani e colaboradores discutiram os níveis de ácido ascórbico em cérebros em formação de fetos em todos os estágios gestacionais. Foi visto que em todos eles, o ácido ascórbico esteve presente em maiores níveis cerebrais se comparado às adrenais (ZALANI; RAJALAKSHMI; PAREKH, 1989) e sabe-se que, devido ao seu potencial antioxidante, o ácido ascórbico consegue melhorar o processo de reprogramação celular e, enfim, a produção de iPSCs (ESTEBAN et al., 2010). Desta forma, as propriedades e demais funções biológicas do Ácido Ascórbico são potencialmente interessantes na construção de novos protocolos de diferenciação direta ou via reprogramação para a produção de células neurais e, em uma visão mais ampla, para a medicina regenerativa.

Como o objetivo deste trabalho foi testar diferentes protocolos para a diferenciação, o primeiro protocolo teve como intuito verificar se o procedimento

utilizado para produzir iPSC e diferencia-las em neurônios poderiam ser usadas para transdiferenciar as SHED em neurônios. Durante o protocolo, houve alteração na morfologia das células, porém, ao final do protocolo, estas células voltaram à morfologia original.

Os resultados de caracterização morfológica obtidos mostram que a utilização do β -mercaptoetanol modifica rapidamente a estrutura das células em cultivo e que o ácido retinóico promove uma mudança mais lenta, porém ambos promovem a morfologia de células *neuron-like*, o que corrobora com outros estudos que apontam resultados semelhantes. Estes estudos descrevem esta alteração da morfologia como sendo artefato técnico devido ao sofrimento celular, quebra do citoesqueleto e retração da borda celular atribuídos à toxicidade desses compostos (NEUHUBER et al., 2004; MAMMADOV; KARAKAS; ISIK, 2011). Em nossos protocolos, um aspecto de sofrimento celular foi observado quando as células estavam sob o modelo 2D, ou seja, aderidas a placa de cultura sob a forma de monocamada. Entretanto, a morfologia fusiforme original das SHED ficou relativamente preservada, com o formato fusiforme ainda mais afilado, mas observando-se poucas e pequenas protrusões celulares, mas que não lembravam neuritos. A avaliação da diferenciação neural tem sido fortemente baseada na morfologia das células e na expressão de marcadores neurais (JORI et al., 2005; YU et al., 2007). No nosso trabalho, porém, a medida que os dias de indução seguiam, as células começaram a desaparecer, provavelmente por um processo de morte celular, o qual não foi identificado como sendo apoptose nem necrose. Por isso, não foi possível realizar experimentos para verificar a atividade elétrica destas células.

A expressão de marcadores neurais através de ensaios imunofluorescência é uma medida usada em diversos protocolos de diferenciação celular e também foi usada neste projeto para verificar a eficácia da transdiferenciação (BAE et al., 2011; NOURBAKHSI et al., 2011). Entretanto, nossos resultados revelaram que a maioria das células continuou expressando os marcadores de células-tronco mesenquimais originalmente expressos e poucas células expressaram o marcador de neurônios em diferenciação MAP2.

A ideia deste projeto em usar as SHED como células-tronco candidatas a transdiferenciação neuronal se deu em função de sua origem ser ectomesenquimal, e, portanto, as SHED poderiam ser mais susceptíveis para a diferenciação neuronal que outras CTM, pouco descritas na literatura como células capazes de fazer

neurônios funcionais. Os trabalhos que realizaram a diferenciação neuronal das SHED e CTPD mostram que, assim como neste trabalho, as células expressam marcadores neuronais em pequena escala e continuam expressando marcadores mesenquimais após o processo de diferenciação (MORSCZECK et al., 2010; ELLIS et al., 2014; OSATHANON et al., 2014).

Neste trabalho nós utilizamos protocolos descritos na literatura capazes de induzir diferenciação neuronal de células-tronco embrionárias e iPSC, e também lançamos mão de protocolos de pré-indução química que poderiam dar mais força ao processo de diferenciação neuronal. Entretanto, mesmo usando várias estratégias, não foi possível observar nem mesmo uma morfologia nas SHED pós-diferenciação que indicasse que as mesmas estavam se diferenciando em células neurais.

Com os resultados obtidos neste projeto podemos afirmar que as SHED não têm capacidade de se diferenciar em neurônios funcionais através do método de transdiferenciação por indução química. Entretanto, sabemos que as SHED podem se diferenciar em neurônios funcionais se antes forem submetidas ao processo de indução de pluripotência. Estes achados corroboram com a tese de que as CTM não podem se diferenciar em células do sistema nervoso, cuja origem embrionária vêm de um folheto diferente das células mesenquimais, ou seja, ectoderma e mesoderma, respectivamente.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

- As SHED podem apresentar formato “*neuron-like*” após indução química, porém isto pode ser devido ao sofrimento celular, deixando-as disformes e assemelhando-se a um neurônio;
- Os meios utilizados para a produção de EB e neurônios mostrou-se ineficaz na indução da diferenciação neuronal das SHED;
- O uso do Beta-Mercaptoetanol e do Ácido Ascórbico, regularmente utilizados na literatura para o processo de transdiferenciação com indução química, induziram sofrimento e aparentemente houve morte celular;
- A presença da dorsomorfina e do SB431542 mostrou-se ineficaz para o processo de diferenciação quando as células foram cultivadas no sistema 3D;
- As células mantiveram a expressão do marcador mesenquimal (CD73) após os protocolos de indução química utilizados neste trabalho;
- A morte celular inviabilizou a realização de experimentos como RT-PCR e análise de cálcio para verificar a atividade destas células;
- Os protocolos de transdiferenciação por indução química testados foram ineficazes para induzir diferenciação neuronal das SHED.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABUMAREE, M.; JUMAH, M. A. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, p. 375–392, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12015-011-9312-0>>. Acesso em: 22 set. 2014.
- ARTHUR, A.; RYCHKOV, G.; SHI, S.; KOBLAR, S. A.; GRONTHOS, S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. **Stem Cell**, v. 26, n. 7, p. 1787–1795, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0979>>.
- ATALA, A. Regenerative Medicine: Past and Present. **Medicine Studies**, v. 1, n. 1, p. 11–31, 19 mar. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12376-009-0008-6>>. Acesso em: 18 jun. 2014.
- BAE, K. S.; PARK, J. B.; KIM, H. S.; KIM, D. S.; PARK, D. J.; KANG, S. J. Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 401, 2011. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2011.52.3.401>>.
- BARTOLD, P. M.; MCCULLOCH, C. A. G.; NARAYANAN, A. S.; PITARU, S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 253–269, out. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0757.2000.2240113.x>>. Acesso em: 9 dez. 2014.
- BASSI, Ê. J.; DE ALMEIDA, D. C.; MORAES-VIEIRA, P. M. M.; CÂMARA, N. O. S. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 8, n. 2, p. 329–42, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881832>>. Acesso em: 15 maio. 2014.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; MAIORKA, P. C.; OLIVEIRA, N. A. J.; LIZIER, N. F.; WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MUOTRI, A. R.; KERKIS, I. Feeder-Free Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Immature Dental Pulp Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 11, p. 1707–1719, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457612>>.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; RUSSO, F. B.; FERNANDES, I. R.; MUOTRI, A. R. In-a-dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for human diseases. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 1, p. 11–17, jan. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.22231>>. Acesso em: 7 jan. 2015.
- BOISVERT, E. M.; ENGLE, S. J.; HALLOWELL, S. E.; LIU, P.; WANG, Z.-W.; LI, X.-J. The Specification and Maturation of Nociceptive Neurons from Human Embryonic Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16821, 2015.
- BOJIC, S.; VOLAREVIC, V.; LJUJIC, B.; STOJKOVIC, M. Dental stem cells -

characteristics and potential. **Histology and Histopathology**, v. 29, p. 699–706, 2014.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. **Journal of Pathology**, v. 217, n. October 2008, p. 318–324, 2009.

CASAGRANDE, L.; CORDEIRO, M. M.; NÖR, S. A.; NÖR, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, p. 1–7, 2011.

CHAILANGKARN, T.; TRUJILLO, C. A.; FREITAS, B. C.; HRVOJ-MIHIC, B.; HERAI, R. H.; YU, D. X.; BROWN, T. T.; MARCHETTO, M. C.; BARDY, C.; MCHENRY, L.; STEFANACCI, L.; JÄRVINEN, A.; SEARCY, Y. M.; DEWITT, M.; WONG, W.; LAI, P.; ARD, M. C.; HANSON, K. L.; ROMERO, S.; JACOBS, B.; DALE, A. M.; DAI, L.; KORENBERG, J. R.; GAGE, F. H.; BELLUGI, U.; HALGREN, E.; SEMENDEFERI, K.; MUOTRI, A. R. A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 338–343, 10 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature19067>>.

CHEN, B.; SUN, H.-H.; WANG, H.-G.; KONG, H.; CHEN, F.-M.; YU, Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. **Biomaterials**, v. 33, n. 20, p. 5023–5035, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516606>>. Acesso em: 28 maio. 2014.

CHEN, J.; LIN, M.; FOXE, J. J.; PEDROSA, E.; HRABOVSKY, A.; CARROLL, R.; ZHENG, D.; LACHMAN, H. M. Transcriptome Comparison of Human Neurons Generated Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Dental Pulp and Skin Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75682, out. 2013.

CORBETT, A.; SIEBER, S.; WYATT, N.; LIZZI, J.; FLANNERY, T.; SIBBIT, B.; SANGHVI, S. Increasing Neurogenesis with Fluoxetine, Simvastatin and Ascorbic Acid Leads to Functional Recovery in Ischemic Stroke. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 9, n. 2, p. 158–166, jun. 2015.

CRESPO, I.; DEL SOL, A. A general strategy for cellular reprogramming: The importance of transcription factor cross-repression. **Stem Cells**, v. 31, n. 10, p. 2127–2135, out. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1473>>.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C.; DIAS, J. L. M.; GUIMARÃES, K. P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G. C.; ROMERO, S.; POLONIO, C. M.; CUNHA, I.; FREITAS, C. L.; BRANDÃO, W. N.; ROSSATO, C.; ANDRADE, D. G.; FARIA, D. de P.; GARCEZ, A. T.; BUCHPIGEL, C. A.; BRACONI, C. T.; MENDES, E.; SALL, A. A.; ZANOTTO, P. M. de A.; PERON, J. P. S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 11 maio 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature18296>>.

DE OLIVEIRA, L.; LAROCCA, R.; SASS, N.; CÂMARA, N. O. S. Proportion of invariant NKT cells in normal pregnant women at term: an evaluation in peripheral blood, placenta and umbilical cord blood. **American Journal of Reproductive Immunology** (New York, N.Y. : 1989), v. 65, n. 1, p. 11–12, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20825379>>. Acesso em: 19 maio. 2014.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, a; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

ELDRIDGE, C. F.; BUNGE, M. B.; BUNGE, R. P. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina. **The Journal of Neuroscience**: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 9, n. 2, p. 625–638, 1989.

ELLIS, K. M.; O'CARROLL, D. C.; LEWIS, M. D.; RYCHKOV, G. Y.; KOBLAR, S. a. Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 30, 2014. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/5/1/30>>.

ESTEBAN, M. A.; WANG, T.; QIN, B.; YANG, J.; QIN, D.; CAI, J.; LI, W.; WENG, Z.; CHEN, J.; NI, S.; CHEN, K.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, F.; HE, W.; LABUDA, K.; SONG, Y.; PETERBAUER, A.; WOLBANK, S.; REDL, H.; ZHONG, M.; CAI, D.; ZENG, L.; PEI, D. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. **cell stem cell**, v. 6, n. 1, p. 71–9, 2010.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATSINIK, N. V.; PANASYUK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331–340, 1974.

GANDIA, C.; ARMIÑAN, A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; LLEDÓ, E.; RUIZ, A.; MIÑANA, M. D.; SANCHEZ-TORRIJOS, J.; PAYÁ, R.; MIRABET, V.; CARBONELL-UBEROS, F.; LLOP, M.; MONTERO, J. A.; SEPÚLVEDA, P. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 638–645, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079433>>. Acesso em: 19 nov. 2014.

GRIESI-OLIVEIRA, K.; ACAB, A.; GUPTA, A. R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. **Molecular Psychiatry**, 2014.

GRIFFIN, M. D.; RITTER, T.; MAHON, B. P. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. **Human Gene Therapy**, v. 21, n. 12, p. 1641–55, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718666>>. Acesso em: 19 maio. 2014.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531–535, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154405910208100806>>.

- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–30, 5 dez. 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin c function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 6, p. 719–730, 2010.
- HAU, G.; LOPES, C.; BALDINI, M.; GARBELINI, M.; PAULETTO, C.; LEAL, G.; SLUSARZ, P. Revisão Preliminar sobre a Viabilidade de Utilização de Células-tronco Provenientes de Dentes Humanos decíduos e Permanentes na Regeneração Tecidual. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 1, p. 47–55, 2006.
- HORWITZ, E. M.; ANDREEF, M.; FRASSONI, F. Mesenchymal Stromal Cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 419–425, 2012.
- HUANG, G. T. J.; YAMAZA, T. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 2, 2009. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2009.0518>>. Acesso em: 11 dez. 2014.
- HUANG, G. T.-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792–806, set. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2830488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 jul. 2014.
- ISHKITIEV, N.; YAEGAKI, K.; CALENIC, B.; NAKAHARA, T.; ISHIKAWA, H.; MITIEV, V.; HAAPASALO, M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 3, p. 469–74, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171365>>.
- IWAFUCHI-DOI, M.; ZARET, K. S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming. **Genes & Development**, v. 28, n. 24, p. 2679–2692, 15 dez. 2014. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.253443.114>>.
- JOPLING, C.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 79–89, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252997>>.
- JORI, F. P.; NAPOLITANO, M. A.; MELONE, M. A. B.; CIPOLLARO, M.; CASCINO, A.; ALTUCCI, L.; PELUSO, G.; GIORDANO, A.; GALDERISI, U. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, n. 4, p. 645–655, 2005.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; 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. 105–116, 2006.

KINGHAM, P. J.; KALBERMATTEN, D. F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S. J.; WIBERG, M.; TERENCE, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v. 207, n. 2, p. 267–274, 2007.

KONDO, T.; ASAI, M.; TSUKITA, K.; KUTOKU, Y.; OHSAWA, Y.; SUNADA, Y.; IMAMURA, K.; EGAWA, N.; YAHATA, N.; OKITA, K.; TAKAHASHI, K.; ASAKA, I.; AOI, T.; WATANABE, A.; WATANABE, K.; KADOYA, C.; NAKANO, R.; WATANABE, D.; MARUYAMA, K.; HORI, O.; HIBINO, S.; CHOSHI, T.; NAKAHATA, T.; HIOKI, H.; KANEKO, T.; NAITOH, M.; YOSHIKAWA, K.; YAMAWAKI, S.; SUZUKI, S.; HATA, R.; UENO, S.-I.; SEKI, T.; KOBAYASHI, K.; TODA, T.; MURAKAMI, K.; IRIE, K.; KLEIN, W. L.; MORI, H.; ASADA, T.; TAKAHASHI, R.; IWATA, N.; YAMANAKA, S.; INOUE, H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 4, p. 487–96, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193459091300012X>>.

LAWRENCE, B.; BASHIRI, H.; DEGHANI, H. Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 218–223, 2010.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 5, p. 509–25, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949362>>. Acesso em: 9 maio. 2014.

LEE, H.; SHAMY, G. A.; ELKABETZ, Y.; SCHOFIELD, C. M.; HARRISON, N. L.; PANAGIOTAKOS, G.; SOCCI, N. D.; TABAR, V.; STUDER, L. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. **Stem Cells**, v. 25, p. 1931–1939, 2007.

LEVINE, M.; MORITA, K.; HELDMAN, E.; POLLARD, H. B. Ascorbic acid regulation of norepinephrine biosynthesis in isolated chromaffin granules from bovine adrenal medulla. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 29, p. 15598–603, 1985.

LEVINE, M.; MORITA, K.; POLLARD, H. Enhancement of norepinephrine biosynthesis by ascorbic acid in cultured bovine chromaffin cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 24, p. 12942–7, 1985.

LIU, G.; ZHANG, Y. [Differentiation of human fetal liver CD34+ cells into neuronal cells induced by beta-ME and BHA in vitro]. **Chinese Journal of Applied Physiology**, v. 20, n. 3, p. 280–3, ago. 2004.

LU, P.; BLESCH, A.; TUSZYNSKI, M. H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact? **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 2, p. 174–191, 2004.

MAJEWSKA, M. D.; BELL, J. A.; LONDON, E. D. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Research**, v. 537, n. 1–2, p. 328–332, dez. 1990.

MAKINO, Y.; YAMAZA, H.; AKIYAMA, K.; MA, L.; HOSHINO, Y.; NONAKA, K.; TERADA, Y.; KUKITA, T.; SHI, S.; YAMAZA, T. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 609–15, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3684232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

MAMMADOV, B.; KARAKAS, N.; ISIK, S. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 47, n. 7, p. 484–491, 2011.

MARRO, S.; PANG, Z. P.; YANG, N.; TSAI, M. C.; QU, K.; CHANG, H. Y.; SÜDHOF, T. C.; WERNIG, M. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 4, p. 374–382, 2011.

MEIVAR-LEVY, I.; FERBER, S. Reprogramming of liver cells into insulin-producing cells. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 6, p. 873–882, dez. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X15001025>>.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739319>>.

MM, E.; GC, P.; CFB, B.; PCB, B. The Use of SHED in Cellular Therapy and Disease Modeling. **Journal of Interdisciplinary Medicine and Dental Science**, v. 2, n. 5, p. 1–6, 2014.

MORSCZECK, C.; VÖLLNER, F.; SAUGSPIER, M.; BRANDL, C.; REICHERT, T. E.; DRIEMEL, O.; SCHMALZ, G. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 4, p. 433–40, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590907>>.

NEUHUBER, B.; GALLO, G.; HOWARD, L.; KOSTURA, L.; MACKAY, A.; FISCHER, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 2, p. 192–204, 2004.

NOURBAKHSH, N.; SOLEIMANI, M.; TAGHIPOUR, Z.; KARBALAIE, K.; MOUSAVI, S.-B.; TALEBI, A.; NADALI, F.; TANHAEI, S.; KIYANI, G.-A.; NEMATOLLAHI, M.; RABIEI, F.; MARDANI, M.; BAHRAMIYAN, H.; TORABINEJAD, M.; NASR-ESFAHANI, M.-H.; BAHARVAND, H. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. **The International**

Journal of Developmental Biology, v. 55, n. 2, p. 189–95, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671222>>.

OSATHANON, T.; SAWANGMAKE, C.; NOWWAROTE, N.; PAVASANT, P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. **Oral Diseases**, v. 20, n. 4, p. 352–358, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12119>>.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILIC, G.; BÜHRING, H.-J.; EVANGELISTA, M.; HENNERBICHLER, S.; LIU, B.; MAGATTI, M.; MAO, N.; MIKI, T.; MARONGIU, F.; NAKAJIMA, H.; NIKAIDO, T.; PORTMANN-LANZ, C. B.; SANKAR, V.; SONCINI, M.; STADLER, G.; SURBEK, D.; TAKAHASHI, T. a; REDL, H.; SAKURAGAWA, N.; WOLBANK, S.; ZEISBERGER, S.; ZISCH, A.; STROM, S. C. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells** (Dayton, Ohio), v. 26, n. 2, p. 300–311, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975221>>. Acesso em: 1 maio. 2014.

PAVLOVA, G.; LOPATINA, T.; KALININA, N.; RYBALKINA, E.; PARFYONOVA, Y.; TKACHUK, V.; REVISHCHIN, A. In Vitro Neuronal Induction of Adipose-Derived Stem Cells and their Fate after Transplantation into Injured Mouse Brain. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 30, p. 5170–5177, out. 2012.

RUSSO, F. B. **Geração de Células Pluripotentes Induzidas de Pacientes com Transtorno do Espectro Autista**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of Inflammation** (London, England), v. 2, p. 8, 26 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1215510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

RYU, J.-S.; JUNG, Y.-H.; CHO, M.-Y.; YEO, J. E.; CHOI, Y.-J.; KIM, Y. II; KOH, Y.-G. Co-culture with human synovium-derived mesenchymal stem cells inhibits inflammatory activity and increases cell proliferation of sodium nitroprusside-stimulated chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 4, p. 715–20, 16 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769201>>. Acesso em: 2 jun. 2014.

SAFFORD, K. M.; SAFFORD, S. D.; GIMBLE, J. M.; SHETTY, a. K.; RICE, H. E. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. **Experimental Neurology**, v. 187, n. 2, p. 319–328, 2004.

SI, Y.-L.; ZHAO, Y.-L.; HAO, H.-J.; FU, X.-B.; HAN, W.-D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 93–103, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727988>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; FANG, D.; YAMAZA, T.; SEO, B.-M.; ZHANG, C.; LIU, H.; GRONTHOS, S.; WANG, C.-Y.; WANG, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PloS One**, v. 1, n. 1, p. e79, jan. 2006.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1762318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 set. 2014.

TAHA, M. F.; JAVERI, A.; KHEIRKHAH, O.; MAJIDIZADEH, T.; KHALATBARY, A. R. Neural differentiation of mouse embryonic and mesenchymal stem cells in a simple medium containing synthetic serum replacement. **Journal of Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 1–10, 2013.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TODD, R. D.; BAUER, P. A. Ascorbate Modulates 5-[³H]Hydroxytryptamine Binding to Central 5-HT₃ Sites in Bovine Frontal Cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 50, n. 5, p. 1505–1512, maio 1988.

UPHOFF, C. C.; DENKMANN, S. a.; DREXLER, H. G. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with plasmocin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 1, 2012.

VAAGS, A. K.; ROSIC-KABLAR, S.; GARTLEY, C. J.; ZHENG, Y. Z.; CHESNEY, A.; VILLAGÓMEZ, D. A. F.; KRUTH, S. A.; HOUGH, M. R. Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. **Stem Cells**, v. 27, n. 2, p. 329–340, 2009.

VIERBUCHEN, T.; OSTERMEIER, A.; PANG, Z. P.; KOKUBU, Y.; SÜDHOF, T. C.; WERNIG, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1035–1041, 2010.

WEINTRAUB, H.; TAPSCOTT, S. J.; DAVIS, R. L.; THAYER, M. J.; ADAM, M. A.; LASSAR, A. B.; MILLER, A. D. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 14, p. 5434–8, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=297637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

YAN, Y.; YANG, D.; ZARNOWSKA, E. D.; DU, Z.; WERBEL, B.; VALLIERE, C.; PEARCE, R. a; THOMSON, J. a; ZHANG, S.-C. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. **Stem Cells** (Dayton, Ohio), v. 23, n. 6, p. 781–90, 2005.

YAP, M. S.; NATHAN, K. R.; YEO, Y.; LIM, L. W.; POH, C. L.; RICHARDS, M.; LIM, W. L.; OTHMAN, I.; HENG, B. C. Neural Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells for Nontherapeutic Applications: Toxicology, Pharmacology, and In Vitro Disease Modeling. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 105172, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089911>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4454762>>.

YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 2, p. 213–221, 2012.

YU, D. X.; DI GIORGIO, F. P.; YAO, J.; MARCHETTO, M. C.; BRENNAND, K.; WRIGHT, R.; MEI, A.; MCHENRY, L.; LISUK, D.; GRASMICK, J. M.; SILBERMAN, P.; SILBERMAN, G.; JAPPELLI, R.; GAGE, F. H. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 3, p. 295–310, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.009>>.

YU, J.; WANG, Y.; DENG, Z.; TANG, L.; LI, Y.; SHI, J.; JIN, Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biology of the Cell** / Under the auspices of the European Cell Biology Organization, v. 99, n. 8, p. 465–474, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371295>>. Acesso em: 19 maio. 2014.

ZALANI, S.; RAJALAKSHMI, R.; PAREKH, L. J. Ascorbic acid concentration of human fetal tissues in relation to fetal size and gestational age. **The British Journal of Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 601–6, 1989.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 247–256, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142004000200016&script=sci_arttext>. Acesso em: 23 jun. 2014.

ZHOU, Q.; BROWN, J.; KANAREK, A.; RAJAGOPAL, J.; MELTON, D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 627–632, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07314>>.

ZHOU, Q.; MELTON, D. A. Extreme Makeover: Converting One Cell into Another. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 4, p. 382–388, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590908004852>>.