**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

VIVIEN THIEMY SAKAI

**Mecanismos Envolvidos na Diferenciação de Células-
Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados Humanos
(SHED) em Odontoblastos e Células Endoteliais**

**BAURU
2009**

VIVIEN THIEMY SAKAI

**Mecanismos Envolvidos na Diferenciação de Células-
Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados Humanos
(SHED) em Odontoblastos e Células Endoteliais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru, da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de doutor em Odontologia.

Área de concentração: Odontopediatria
Orientadores: Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör e
Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

BAURU
2009

Sakai, Vivien Thiemy
Sa29m Mecanismos Envolvidos na Diferenciação de
Células-Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados
Humanos (SHED) em Odontoblastos e Células
Endoteliais / Vivien Thiemy Sakai – Bauru, 2009.
152 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadores: Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör
Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade de
Michigan: projeto de pesquisa aprovado em 27 de julho de
2007.

Número do protocolo: 09546

Dados Curriculares

Vivien Thiemy Sakai

13 de fevereiro de 1981

Nascimento em Piracicaba – SP

Filiação

Emilio Sakai e
Sônia Maria Buzetto Sakai

1999-2002

Curso de Graduação em Odontologia
na Faculdade de Odontologia de
Bauru – USP.

2003-2005

Curso de Pós-Graduação em
Odontologia em nível de Mestrado,
Área de Odontopediatria, na
Faculdade de Odontologia de Bauru –
USP.

2005 – Atual

Curso de Pós-Graduação em
Odontologia em nível de Doutorado,
Área de Odontopediatria, na
Faculdade de Odontologia de Bauru –
USP.

*"In the infinity of life where I am, all is perfect,
whole, and complete, and yet life is ever changing.
There is no beginning and no end,
only a constant cycling and recycling
of substance and experiences.
Life is never stuck or static or stale,
for each moment is ever new and fresh.
I am one with the very Power that created me, and this Power
has given me the power to create my own circumstances.
I rejoice in the knowledge that I have the power
of my own mind to use in any way I choose.
Every moment of life is a new beginning point
as we move from the old. This moment is a new point
of beginning for me right here and right now."*

Louise L. Hay

Agradeço a Deus por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida. Por todos os momentos felizes e pelos tristes também. Muitas coisas aprendi com eles e muitos valores guardei.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista...

Aos meus queridos pais, **Sônia Maria Buzetto Sakai** e **Emilio Sakai**, exemplo de trabalho e dedicação à família, incansáveis e íntegros, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, apoiaram as minhas escolhas e me deram força para enfrentar os desafios.

Aos meus amados irmãos, **Gisele Akemi Sakai** e **Rafael Luis Sakai**, que sempre me apoiaram em tudo e que são e serão sempre os meus melhores amigos.

À minha querida avó, **Elydia Bovi Buzetto**, sinônimo de mulher forte e batalhadora, que, apesar de há muitos anos já não saber mais quem é e quem eu sou, abençoa-me com seu olhar meigo e me faz uma pessoa melhor.

À **Graciela** e ao **Luciano**, que, não bastassem fazer meus irmãos felizes, ainda são pessoas maravilhosas, exemplos de dedicação ao trabalho e respeito à família.

“When you’re screwing up and nobody says anything to you anymore, that means they’ve given up on you. When you see yourself doing something badly and nobody’s bothering to tell you anymore, that’s a bad place to be. You may not want to hear it, but your critics are often the ones telling you they still love you and care about you, and want to make you better.”

Randy Pausch

MEU RECONHECIMENTO E GRATIDÃO

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, que me acompanha desde a graduação e sempre demonstrou acreditar no meu potencial. Obrigada por me orientar de maneira precisa e competente. Os seus valiosos ensinamentos serão lembrados e repassados durante toda a minha carreira profissional. A verdadeira ciência perdura pelo exemplo de pessoas como você. Com amizade, respeito e admiração, agradeço-lhe!

Ao **Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör**, mestre de mente brilhante e espírito nobre, que marcou uma etapa muito importante em minha vida e a quem associo tempos inesquecíveis de aprendizagem e de referência para a profissão. Meu eterno carinho e gratidão!

“Success is great – satisfying, good for the ego, capable of bringing reward and prosperity – but doing experiments that invariably bring the expected results may mean the questions aren’t tough enough. To fail, then struggle to understand why, may offer more insight and greater learning.”

Robert Cooke

À **Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, que sempre acreditou no meu trabalho, deu-me a liberdade necessária dividindo comigo as expectativas, conduziu-me a maiores reflexões e desta forma enriqueceu o meu aprendizado. Agradeço todas as palavras de encorajamento sempre carregadas de otimismo. Obrigada pelo carinho, amizade e confiança, e por todas as oportunidades que me foram concedidas.

À **Prof^a Dr^a Salete Moura Bonifácio da Silva**, que, com sua retidão de caráter, profundo conhecimento na área de Odontopediatria e imensa habilidade clínica, é um modelo de professora a ser seguido. Minha especial admiração e gratidão por todos os ensinamentos em Odontopediatria!

Ao **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, cuja convivência só me enriqueceu. Agradeço-lhe por ter me dado a oportunidade de participar em seu grupo de pesquisa!

Ao **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, referência de verdadeiro profissional, pelo seu saber, pela sua experiência e pelas notáveis qualidades humanas.

“The number one goal of teachers should be to help students learn how to learn. But another goal as important as that is to help students to judge themselves. Did they recognize their true abilities? Did they have a sense of their own flaws? Were they realistic about how others viewed them? In the end, educators best serve students by helping them be more self-reflective. The only way any of us can improve is if we develop a real ability to assess ourselves.”

Randy Pausch

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos adorados familiares e amigos, tanto aos “velhos” e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo, aos que lutam comigo no dia a dia quanto àqueles que estão sempre comigo no meu pensamento.

Sei que corro o risco de não dar conta desse “muitíssimo obrigada” como é merecido, pois será difícil exprimir o real valor que vocês têm em minha vida e reportar a importância dessa verdadeira “rede de solidariedade e de muito afeto” que vi formar ao meu redor e na qual me vi incluída.

Dificuldades existiram ao longo desses anos, mas longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Os raros momentos de angústias e sofrimento diluíram-se entre tantas demonstrações espontâneas de generosidade. Os muitos momentos de alegrias e realizações ficarão para sempre em minha memória e me lembrarão o quanto sou grata aos que me proporcionaram tudo isso.

Às amigas **Thais** e **Tiza**, por terem posto tanta sabedoria, cuidado e imaginação em nossa amizade. Obrigada por sempre serem honestas comigo, gentis e presentes. Obrigada por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesma. Obrigada por confiar-me seus pensamentos, suas decepções e seus sonhos, por saber que vocês podem contar comigo e por terem pedido minha ajuda quando precisaram dela. Obrigada por oferecerem ajuda sempre que tenho precisado. Com vocês, vivi o sentido da palavra grupo!

Ao amigo **Juliano**, pelas conversas enriquecedoras, tanto pessoais quanto profissionais, e por estar sempre por perto, por mais distantes que estivéssemos. Você é um dos grandes exemplos de pessoa íntegra e batalhadora que conheço!

“Quando procuro os meus amigos, noto que eles não têm noção de como me são necessários, de como são indispensáveis ao meu equilíbrio, porque eles fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida.” (Paulo Sant’Ana)

Aos pós-graduandos da Odontopediatria, **Vivi, Thiago Cruvinel, Dafna, Andréa Anzai, Ana Paula, Evaristo, Marcelo, Adriano, Heitor, Marina, Glades, Érika, Natalino, Marco Aurélio, Carla, Junia e Tati**, pelos bons momentos e conhecimentos compartilhados durante o curso.

Aos demais colegas de pós-graduação, em especial à **Bella, Karin, Adriana, Caio, Marta, Carol Morandini, Carla Sipert, Rafael Moretti e Andréa (Pili)** pela alegre convivência.

Ao **Thiago José Dionísio**, por estar sempre disposto a ajudar, mas principalmente ser essa pessoa tão dedicada e competente.

Às amigas funcionárias do departamento de Odontopediatria **D. Lia, Lílian, Fátima, Estela e Márcia**, por todos os anos de harmoniosa convivência e de preciosa ajuda.

À **Vera**, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, por todo o apoio e por ser sempre prestativa.

Aos professores das disciplinas de Fisiologia e Farmacologia, **Dr. Alceu, Dr. Flávio e Dr. Inge**, por serem sempre tão cordiais e simpáticos, permitindo que meus momentos no laboratório da Farmacologia fossem muito agradáveis.

Aos casais de amigos **Fabiana e Rubens e Márcia e Bruno** e à amiga **Kathleen**, pelos momentos de convívio, risos, trocas e afetos. Se outras razões não houvesse, tê-los conhecido teria bastado para fazer da minha estada em Ann Arbor um período muito especial da minha vida. Com muita saudades, obrigada!

Aos amigos **Gustavo** e **Eoin**, tão diferentes, mas igualmente generosos e de coração puro. Obrigada por toda a ajuda em momentos quando não tinha ninguém por perto para me socorrer.

Aos companheiros de laboratório, **Zhang, Zhihong, Kristy, Naoki, Ben, Sudha, Tatiana, Elliot, Atsushi, Clare** e **Kyun San**, pelo convívio sadio, apoio generoso e toda ajuda para realização das técnicas laboratoriais. Vocês foram maravilhosos!

Ao **Chris Edwards**, pela ajuda com o manuseio do microscópio confocal e pela gentileza com que sempre me atendeu em seu escritório.

Ao **Chris Strayhorn**, pelo preparo dos cortes histológicos apresentados nesse trabalho.

Ao **Kazuo**, pelo desenho do modelo apresentado na figura 2.

Ao **Eduardo Bresciani**, por generosamente me dar a oportunidade de conhecer o dia-a-dia da clínica de Odontopediatria na Universidade de Michigan e por me colocar em contato com os professores do departamento.

Aos **pacientes** que muito contribuíram para o meu enriquecimento profissional.

Aos **membros da banca examinadora**, meu muito obrigada – ainda que antecipadamente - por suas sugestões e críticas que só tenderão a acrescentar qualidade a este trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, brindaram-me com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

Todos vocês são co-autores deste trabalho!!!

AGRADECIMENTOS ADMINISTRATIVOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa do senhor diretor, **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, e da senhora coordenadora de pós-graduação, **Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, na pessoa do senhor diretor, **Prof. Dr. Peter Polverini**, por me permitir usufruir incrível infra-estrutura para realização desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

“Experience is what you get when you didn’t get what you wanted. It’s a reminder that failure is not just acceptable, it’s often essential.”

Randy Pausch

Sumário

RESUMO	xviii
---------------	--------------

ABSTRACT	xxi
-----------------	------------

1- INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	1
--	----------

1.1- Células-Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados Humanos (SHED)	6
1.2- Matrizes Condutivas	8
1.3- Sinalização Celular	10
1.3.1- Receptores para VEGF	12
1.4- Diferenciação de Células-Tronco em Células Endoteliais	15
1.4.1- Marcadores de células endoteliais.....	16
1.5- Diferenciação de Células-Tronco em Odontoblastos.....	17
1.5.1- Marcadores de odontoblastos	18

2- PROPOSIÇÃO	21
----------------------	-----------

3- MATERIAL E MÉTODOS	25
------------------------------	-----------

3.1- PARTE I: Avaliação da Capacidade de Diferenciação de SHED em Odontoblastos Funcionais	27
3.1.1- Células.....	27
3.1.2- Preparo das fatias de dente.....	27
3.1.3- Ensaio de migração celular	28
3.1.4- Indução da diferenciação de SHED em células produtoras de tecido mineralizado	29
3.1.4.1- Ensaio para detecção da fosfatase alcalina	29
3.1.4.2- RT-PCR para detecção de RNAm para DSPP, DMP-1 e GAPDH	30
3.1.4.3- Western Blot para detecção das proteínas DMP-1 e GAPDH	32
3.1.5- Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos.....	34

3.1.5.1- Tratamento com tetraciclina	35
3.1.6- Eutanásia dos animais e análise dos resultados.....	43
3.1.6.1- Microscopia confocal.....	43
3.1.6.2- RT-PCR para DSPP, DMP-1 e GAPDH	47
3.1.6.3- Análise histológica – hematoxilina e eosina (HE).....	47
3.1.6.4- Análise imunohistoquímica para DMP-1	48
3.2- PARTE II: Estudo do Efeito de VEGF na Diferenciação de SHED em Células Endoteliais.....	49
3.2.1- Células	49
3.3.2- Receptores para VEGF presentes em SHED..	49
3.3.2.1- RT-PCR para detecção de RNAm para VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 e GAPDH	50
3.3.2.2- Western Blot para detecção das proteínas VEGFR-1, VEGFR-2, NP- 1 e GAPDH.....	51
3.3.2.3- ELISA para quantificação da forma solúvel da proteína VEGFR-1	51
3.2.3- Western Blot para p-STAT3, p-ERK e p-AKT.....	52
3.2.4- Ensaio de proliferação de capilares	53
3.2.5- Ensaio de proliferação celular sulforrodamina B (SRB)	53
3.2.6- Ensaio de migração celular	54
3.2.7- Indução da diferenciação de SHED em células endoteliais <i>in vitro</i>	55
3.2.7.1- Preparo de matrizes condutivas e de fatias de dentina + matrizes	55
3.2.7.2- RT-PCR para detecção de marcadores de células endoteliais	56
3.2.8- Avaliação do destino de SHED-LacZ <i>in vivo</i>	57
3.2.8.1- Infecção de SHED com retrovírus (produção de SHED-LacZ ou SHED-LXSN.....	57
3.2.8.2- Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos	57
3.2.8.3- Coloração com x-gal para detecção de β -galactosidase.....	58
3.2.9- Silenciamento dos genes VEGFR-1 ou NP-1	58
3.2.9.1- Infecção de SHED com lentivírus (<i>short hairpin</i> RNA contra VEGFR- 1 ou NP-1	58
3.2.9.1.1- RT-PCR e Western Blot para VEGFR-1 e NP-1	60
3.2.9.2- Western Blot para p-STAT3, p-ERK e p-AKT.....	60
3.2.9.3- Ensaio de proliferação de capilares	60
3.2.9.4- Ensaio de proliferação celular SRB.....	61

4- RESULTADOS	63
<hr/>	
4.1- PARTE I: Avaliação da Capacidade de Diferenciação de SHED em Odontoblastos Funcionais	65
4.2- PARTE II: Estudo do Efeito de VEGF na Diferenciação de SHED em Células Endoteliais	81
 5- DISCUSSÃO	 109
<hr/>	
6- CONCLUSÕES	133
<hr/>	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
<hr/>	

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% = por cento

β-GP = beta-glicerofosfato

°C = graus Celsius

μg = micrograma

μm = micrometro

AA = ácido ascórbico

AKT = proteína quinase B

BMP = proteína morfogenética óssea

Caderina-VE = caderina vascular endotelial

CD31 = grupamento de diferenciação 31

CD54 = grupamento de diferenciação 54

cDNA = DNA complementar

CO₂ = dióxido de carbono

DAB = 3-3'-diaminobenzidina

DEX = dexametasona

DMP-1 = proteína 1 da matriz dentinária

DMP-2 = proteína 2 da matriz dentinária

DMP-3 = proteína 3 da matriz dentinária

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNase = desoxirribonuclease

DPP = fosfoproteína dentinária

DPSC = células-tronco da polpa dentária

DSP = sialoproteína dentinária

DSPP = sialofosfoproteína da dentina

DTT = ditionitrito

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EGM2-MV = meio de célula endotelial microvascular 2

ELISA = ensaio imunoenzimático

ERK = quinase reguladora de sinal extracelular

et al = e colaboradores

FBS = soro bovino fetal

Flk-1 = receptor 1 da quinase fetal de fígado

Flt-1 = receptor 1 da tirosina quinase do tipo fms

Flt-4 = receptor 4 da tirosina quinase do tipo fms

G418 = geneticina

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H₂O = água

HBS = HEPES-salina tamponada

HDMEC = células endoteliais de microvasos da derme de humanos

HE = hematoxilina e eosina

IgG = imunoglobulina G

K₃Fe(CN)₆ = hexacianeto de ferro tripotássico

K₄Fe(CN)₆ = hexacianeto de ferro tetrapotássico

kDa = kilodalton

KDR = receptor de domínio para inserção da quinase

LB = Luria-Bertani

MDPC-23 = células odontoblásticas de camundongo

MEM α = meio essencial mínimo alfa

mL = mililitro

mM = milimolar

mW = miliwatt

ng = nanograma

nm = nanômetro

nM = nanomolar

NP 40 = nonil fenoxi polietoxietanol

NP-1 = neuropilina 1

p-AKT = fosfo-AKT

pb = pares de base

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PECAM-1 = molécula-1 de adesão celular endotelial a plaquetas

p-ERK = fosfo-ERK

pH = potencial hidrogeniônico

PIGF = fator de crescimento placentário

PLLA = ácido poli-L-lático

p-STAT3 = fosfo-STAT3

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

RNase = ribonuclease

rpm = rotação por minuto

RT-PCR = transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SCID = imunodeficiência combinada grave

SDS = dodecil sulfato de sódio

SHED = células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos

shRNA = *short hairpin* ácido ribonucleic

SRB = sulforrodamina B

STAT3 = transdutor do sinal e ativador da transcrição 3

TBST = solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20

TGF β = fator de crescimento transformador beta

V = volt

VCAM = molécula 1 de adesão celular vascular

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 = receptor 1 para VEGF

VEGFR-2 = receptor 2 para VEGF

VEGFR-3 = receptor 3 para VEGF

x-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

----- *Resumo*

RESUMO

A engenharia de tecido pulpar tem como objetivo substituir a polpa dentária inflamada ou necrosada por um tecido saudável e funcional, capaz de formar nova dentina para reparar a estrutura dentária perdida. Assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a habilidade de diferenciação de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED) em odontoblastos funcionais, demonstrando a formação de tecido mineralizado *in vivo*; e estudar o efeito de VEGF em SHED com relação à estimulação de vias de sinalização celular (STAT3, AKT e ERK), proliferação, migração, formação de estruturas tubulares e diferenciação em células endoteliais. O início do processo de mineralização de SHED tratadas com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato pôde ser detectado por meio da produção da enzima fosfatase alcalina a partir da segunda semana de cultura, mas a expressão de RNAm para DSPP só foi observada após 28 dias de indução. Utilizando-se o modelo de fatias de dentes e matrizes condutivas implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos, demonstrou-se a diferenciação de SHED em células semelhantes a odontoblastos, as quais tiveram imunomarcagem positiva com o anticorpo DMP-1. A deposição de dentina, seguindo um ritmo centrípeto de crescimento, numa taxa de 14,1 μm por dia também foi demonstrada por meio da marcação com tetraciclina. O tratamento das SHED com VEGF estimulou a fosforilação de ERK e AKT e a diminuiu a fosforilação de STAT3 em um período de uma hora, provavelmente por meio de sua ligação com os receptores VEGFR-1 e NP-1 presentes nestas células. Além disso, VEGF intensificou a organização das SHED em estruturas tubulares, havendo

diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado e não tratado a partir do 5º dia de tratamento. Entretanto, VEGF não estimulou a proliferação nem a migração destas células. Os resultados de RT-PCR mostraram que SHED cultivadas em fatias de dentes e matrizes condutivas expressaram VEGFR-2 já após o primeiro dia de estímulo com VEGF. Ademais, os quatro marcadores de células endoteliais (VEGFR-1, VEGFR-2, CD31 e Caderina-VE) foram observados após 21 dias sob estímulo de VEGF, resultado ainda mais evidente aos 28 dias. *In vivo*, observou-se que SHED transfectadas com o gene LacZ foram capazes de formar estruturas semelhantes a vasos sangüíneos quando implantadas em camundongos, mas a presença de sangue no seu interior não pôde ser observada após 21 dias de implante. Portanto, SHED podem ser estimuladas a se diferenciar em odontoblastos funcionais, capazes de produzir estrutura mineralizada semelhante à dentina. Ademais, VEGF interfere nas vias de sinalização STAT3, ERK e AKT e estimula a formação de estruturas tubulares e a diferenciação de SHED em células endoteliais, mas não a proliferação e migração de SHED. Acreditamos que tecnologia igual ou semelhante à empregada neste estudo poderá eventualmente fornecer ferramentas clínicas para tratamentos endodônticos que visem à regeneração de um tecido pulpar completo e formação de tecido dentinário num futuro não muito distante.

Palavras-Chave: complexo dentino-pulpar, dentinogênese, endodontia, engenharia tecidual, mineralização, sinalização celular, vasos sangüíneos

----- *Abstract*

ABSTRACT

Dental pulp tissue engineering aims to replace the inflamed or necrotic pulp by a healthy and functionally competent tissue able to form new dentin in order to repair lost structure. The purposes of this work were: to evaluate the differentiation ability of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) into functional odontoblasts, showing the formation of mineralized tissue *in vivo*; and to study the effect of VEGF on SHED with regards to the stimulation of cell signaling pathways (STAT3, AKT and ERK), the proliferation, migration, capillary sprouting, and the differentiation into endothelial cells. The beginning of the mineralization process of SHED treated with dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate could be detected through the production of alkaline phosphatase after the second week of culture, but the expression of DSPP mRNA was only observed after 28 days of induction. Using the tooth slice and scaffold model implanted in the dorsum of immunocompromised mice, the differentiation of SHED into odontoblast-like cells, which were immunostained with DMP-1 antibody, was demonstrated. Dentin deposition following a centripetal rhythm, in a rate of 14.1 μm per day, was also shown through the tetracycline labeling. VEGF treatment of SHED stimulated the ERK and AKT phosphorylation, and decreased the phosphorylation of STAT3 over 1 hour period, presumably due to its binding to VEGFR-1 and NP-1 receptors in these cells. In addition, VEGF enhanced SHED organization into tubular structures, with statistically significant difference between the treated group and the non-treated one after the 5th day of treatment. However, VEGF did not stimulate proliferation and migration of these cells. RT-PCR results demonstrated that SHED seeded in the tooth slices and scaffolds expressed

VEGFR-2 after the first day of VEGF stimulation. Moreover, the four endothelial cell markers (VEGFR-1, VEGFR-2, CD31 and VE-Cadherin) were observed after 21 days of VEGF stimulation, and this result was even clearer after 28 days. *In vivo*, SHED transduced with LacZ gene were able to give rise to blood vessel-like structures when implanted in immunocompromised mice, but the presence of blood flow was not observed after 21 days of implantation. Therefore, SHED can be stimulated to differentiate into functional odontoblasts, which in turn are able to produce mineralized structure resembling dentin. Furthermore, VEGF interferes with the STAT3, ERK and AKT signalling pathways, and stimulates the formation of tubular structures and the differentiation of SHED into endothelial cells, but does not stimulate SHED's proliferation and migration. We believe that the same technology employed in this study or a similar one can eventually provide clinical tools for the endodontic treatments aiming at regenerating a complete pulp tissue and forming a dentin tissue in a near future.

Key-Words: dentin-pulp complex, dentinogenesis, endodontics, tissue engineering, mineralization, cell signaling, blood vessels.

----- *Introdução*
e Síntese Bibliográfica

1- INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento dentário ocorre por meio de sinalização indutiva mútua resultante da interação entre células do epitélio bucal e do ectomesênquima (Thesleff, Sharpe, 1997), ambas originárias de células da crista neural (Lumsden, 1988). Essas interações resultam na formação de uma camada externa de esmalte devido à atividade de células derivadas do epitélio bucal, denominadas ameloblastos, e uma camada interna de dentina mineralizada produzida por odontoblastos, os quais são derivados da papila dentária. A câmara pulpar dos dentes é composta por um tecido conjuntivo frouxo, também derivado da papila dentária, infiltrado por uma rede de vasos sangüíneos e fibras nervosas provenientes do forame apical. A estrutura dentária completa é circundada por osso e mantida em seu local por meio do ligamento periodontal, derivado do folículo dentário, o qual também é de origem ectomesenquimal. O ligamento periodontal é firmemente mantido por fibras de tecido conjuntivo (fibras de Sharpey) embebidas entre a fina camada externa mineralizada do cemento e a parede interna do osso alveolar (Shi et al., 2005).

Embora a composição estrutural complexa dos dentes garanta dureza e durabilidade, essas estruturas rígidas são vulneráveis a danos causados por trauma mecânico, agentes químicos, defeitos congênitos, câncer e infecções bacterianas. Diferentes de outros tecidos, tais como o ósseo, o qual tem a capacidade de reparação e remodelamento ao longo da vida pós-natal, os componentes relativamente estáticos dos dentes não sofrem regeneração imediata e completa após os insultos. Contudo, dentes adultos demonstram alguns processos reparadores limitados, tais como a formação de dentina

reparadora (terciária), uma matriz mineralizada pobremente organizada, e de dentina secundária, que serve como uma barreira protetora para a polpa dentária (Tziafas, 2004). Uma vez que a dentina/camada de odontoblastos é rompida, acredita-se que os pré-odontoblastos são recrutados do tecido pulpar (Carlile et al., 2000; Shi, Gronthos, 2003) para o local danificado antes de se desenvolverem em odontoblastos funcionais (Shi et al., 2005).

O objetivo da odontologia restauradora moderna é restabelecer funcional e esteticamente a estrutura dentária perdida (Edwards, Mason, 2006). Apesar do extenso conhecimento das patologias dentárias, a restauração ou substituição de tecidos doentes ou danificados recai basicamente no uso de materiais sintéticos, tais como o amálgama, as resinas compostas e as coroas metálicas ou de porcelana (Mooney et al., 1996; Shi et al., 2005; Edwards, Mason, 2006; Zhang et al., 2006). Entretanto, os materiais sintéticos claramente não são substitutos estruturais e funcionais adequados do tecido perdido, sendo incapazes de se remodelar frente a um insulto ou estímulo contínuo (Mooney et al., 1996). Embora esses materiais restauradores convencionais tenham se mostrado altamente efetivos na preservação dos dentes, eles apresentam uma vida útil limitada e, a longo prazo, requerem substituição. Além disso, uma porcentagem significativa dos dentes restaurados acabam por apresentar inflamação e necrose pulpar, requerendo tratamento endodôntico e reconstrução protética ou mesmo extração dentária. Portanto, o desenvolvimento de novas técnicas para regenerar a estrutura dentária perdida traria benefícios significativos à população (Edwards, Mason, 2006).

Atualmente, a engenharia de tecidos, que corresponde a uma ciência multidisciplinar que agrega conhecimentos de biologia, engenharia e ciências clínicas para o desenvolvimento de novos tecidos e órgãos (Nör, 2006), constitui uma promessa como um novo método para reparar defeitos congênitos e/ou tecidos doentes (Wu et al., 2004; Melero-Martin et al., 2007). Particularmente, a engenharia de tecido pulpar tem como objetivo substituir a polpa dentária inflamada ou necrosada por um tecido saudável e funcional, capaz de formar dentina a fim de reparar a estrutura dentária perdida devido à cárie ou trauma. Esta ciência baseia-se em princípios em que células indiferenciadas colocadas em matrizes biocompatíveis respondem a sinais específicos que induzem sua proliferação, migração e diferenciação em linhagens celulares mais especializadas.

Uma estratégia de engenharia tecidual, portanto, é cultivar células apropriadas em matrizes biodegradáveis construídas com as propriedades mecânicas desejáveis e, então, estimular o crescimento e diferenciação celular *in vitro*. Quando este conjunto é implantado *in vivo* pode sofrer remodelamento e maturação em um tecido funcional completo (Wu et al., 2004; Melero-Martin et al., 2007). Assim, a engenharia de tecido pulpar a partir da cultura de células pode ser o primeiro passo para a regeneração de dentina em dentes despolpados, bem como ser uma alternativa ao tratamento endodôntico convencional (Mooney et al., 1996), sendo que a grande vantagem desse procedimento é a manutenção da vitalidade do dente.

Desta forma, são fundamentais a identificação de células apropriadas, o desenvolvimento de matrizes condutivas e o entendimento dos sinais morfogenéticos requeridos para induzir células a regenerarem os tecidos que

foram perdidos (Nakashima, Akamine, 2005; Nör, 2006; Polak, Bishop, 2006; Srisuwan et al., 2006; Zhang et al., 2007).

1.1- Células-Tronco de Dentes Decíduos Exfoliados Humanos (SHED)

A identificação de populações de células-tronco capazes de regenerar estruturas dentárias organizadas tem gerado interesse no uso potencial de terapias com células-tronco pós-natais para tratar os danos causados por trauma, câncer, cárie dentária e doença periodontal (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Shi et al., 2005).

Células-tronco são geralmente definidas como células originadas de clones capazes de auto-renovação e de diferenciação em várias linhagens celulares (Gronthos et al., 2002; Polak, Bishop, 2006). Células-tronco pós-natais apresentam características únicas: existem como células indiferenciadas e mantêm esse fenótipo em função do ambiente e/ou de populações celulares adjacentes até que sejam expostas e respondam a sinais apropriados, têm habilidade de auto-replicação por longo período de tempo e mantêm seu potencial de diferenciação múltipla por toda a vida do organismo (Nakashima, Akamine, 2005). Estas células têm sido isoladas de vários tecidos, tais como a medula óssea, tecido neural, pele, retina e epitélio dentário, entre outros (Harada et al., 1999; Fuchs, Segre, 2000; Bianco et al., 2001; Blau et al., 2001).

Recentemente, Gronthos et al. (2000, 2002) identificaram populações de células-tronco pós-natais na polpa de dentes permanentes humanos (DPSC), dando início à utilização de um novo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração tecidual *in vivo*. Da mesma forma,

observou-se que o remanescente pulpar derivado de dentes decíduos também contém uma população de células-tronco pós-natais capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial, as quais foram denominadas de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED) (Miura et al., 2003).

DPSC e SHED demonstraram a habilidade de gerar um complexo semelhante ao dentino-pulpar quando co-implantadas com partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcio no tecido subcutâneo de camundongos imunodeprimidos. Implantes de DPSC e SHED desenvolveram áreas de tecido pulpar vascularizado, circundado por uma camada bem definida de células semelhante a odontoblastos, alinhadas ao redor de dentina mineralizada, com seus processos estendendo-se dentro de estruturas tubulares. Ademais, as fibras colágenas orientavam-se perpendicularmente à camada de odontoblastos dentro da dentina, característica de dentina primária. O material semelhante à dentina formado nos implantes tinha um aspecto globular mineralizado, compatível com a estrutura de dentina em dentes humanos. Além disso, as células semelhantes aos odontoblastos e às demais células pulpares originaram-se dos tecidos do doador (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003).

A transição da dentição decídua para a permanente é um processo fisiológico único em que o desenvolvimento e erupção dos dentes permanentes se dá simultaneamente à reabsorção da raiz dos dentes decíduos. Essa condição torna o dente decíduo um doador em potencial de células indiferenciadas para diferentes propósitos terapêuticos, principalmente no âmbito da regeneração do complexo dentino-pulpar.

Dentes decíduos, portanto, podem ser uma fonte viável de células-tronco para reparar estruturas dentárias danificadas, visto que as SHED podem ser congeladas e utilizadas posteriormente no indivíduo doador quando necessário (Nör, 2006). Embora a significância biológica da existência de SHED no tecido pulpar ainda tenha de ser determinada, estabeleceu-se uma base para estudos futuros com objetivo de determinar a eficácia de seu uso em terapias celulares (Miura et al., 2003).

1.2- Matrizes Condutivas

Além das células, outro componente essencial na regeneração tecidual é o uso de matrizes apropriadas. A função da estrutura tridimensional da matriz é fornecer local para adesão das células, dar suporte à proliferação, migração e diferenciação celulares (Nakashima, Akamine, 2005; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007), guiar o processo de crescimento e organização tecidual (Nör et al., 2001; Zhang et al., 2007) e servir como veículo para levar as células ao local onde se deseja regenerar o tecido (Mooney et al., 1996; Nakashima, Akamine, 2005). Matrizes utilizadas em engenharia de tecidos são normalmente tridimensionais e desenhadas para imitar as características da matriz extracelular natural (Zhang et al., 2006), devendo ser biocompatíveis, atóxicas e com resistência física e mecânica apropriada (Nakashima, Akamine, 2005). Podem também ser fabricadas a partir de materiais naturais ou sintéticos (Mooney et al., 1996; ; Zhang et al., 2007).

Polímeros sintéticos e biodegradáveis são matrizes atrativas por serem fabricadas com uma grande variedade de propriedades e estruturas

reproduzíveis. Além disso, o tempo de degradação das matrizes sintéticas pode ser determinado para coincidir com a formação do novo tecido originado a partir da cultura de células. Isso pode levar à formação de um tecido totalmente natural, sem a presença de qualquer corpo estranho permanente (Mooney et al., 1996).

Diversas matrizes têm sido desenvolvidas e testadas para a semeadura de células pulpares, tais como: polifosfato de cálcio, esponja de colágeno, cerâmica à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcio, fibras de titânio, esponja de ácido poliglicólico, esponja de ácido poli-L-lático (PLLA), entre outras (Mooney et al., 1996; Nör et al., 2001; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Apesar dos avanços nesse campo, a engenharia de tecido ainda enfrenta limitações importantes. Para a sobrevivência e proliferação celulares em tecidos originados a partir da engenharia tecidual e implantados *in vivo* é necessário um suprimento adequado de nutrientes e oxigênio (Brey et al., 2005; Hoebe et al., 2004; Wenger et al., 2005). Tecidos implantados com um volume maior do que 2 a 3 mm³ não permitem o recebimento de nutrientes, trocas gasosas e eliminação de toxinas, já que todos esses mecanismos são limitados pela distância de difusão (Melero-Martin et al., 2007). A difusão de oxigênio através dos tecidos, por exemplo, está limitada a uma distância de 100 a 200 µm. Portanto, o desenvolvimento de um sistema vascular é imprescindível para garantir que todas as células estejam dentro dessa distância (Hoebe et al., 2004).

Para superar os problemas relacionados à vascularização do novo tecido, algumas estratégias têm sido propostas. O uso de matrizes poliméricas biodegradáveis em camundongos imunodeprimidos tornou possível implantar

células endoteliais humanas no hospedeiro roedor para estudar o desenvolvimento de capilares. Células endoteliais de microvasos da derme de humanos (HDMEC), implantadas em camundongos por meio de esponjas de PLLA, organizam-se e se diferenciam em capilares que se anastomosam com o sistema vascular do camundongo e se tornam microvasos humanos funcionais contendo células sangüíneas do camundongo (Nör et al., 1999; Nör et al., 2000). Assim, os capilares no implante são delimitados por células endoteliais humanas e revestidos por células musculares lisas de camundongo, expressam marcadores específicos da angiogênese e transportam células sangüíneas do roedor (Nör et al., 2001). O desenvolvimento desse modelo de angiongênese humana em camundongos imunodeprimidos pode, portanto, ser usado para examinar condições fisiológicas e patológicas da formação de novos capilares sangüíneos (Nör et al., 2001).

1.3- Sinalização Celular

Alguns dos desafios mais difíceis nas terapias de engenharia tecidual atuais incluem o controle espacial e temporal da liberação de fatores de crescimento, mantendo uma resposta de neovascularização persistente e estimulando a formação de fenótipos de vasos para função tecidual adequada (Brey et al., 2005). O sucesso dessas terapias, portanto, irá requerer mais do que apenas um número maior de vasos sangüíneos; fluxo sangüíneo aumentado, níveis de oxigênio normais e fenótipos vasculares adequados devem ser obtidos nos novos tecidos (Brey et al., 2005).

Desta forma, a angiogênese, processo de desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é fundamental para garantir a viabilidade dos tecidos implantados. A angiogênese está sujeita a um controle complexo entre sinais estimulatórios (fatores pró-angiogênicos) e inibitórios (fatores anti-angiogênicos) para o crescimento dos vasos sangüíneos (Costa et al., 2004; Hoeben et al., 2004; Pandya et al., 2006; Grando Mattuella et al., 2007).

Embora os mecanismos moleculares responsáveis pela angiogênese não sejam completamente entendidos, um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Ferrara et al., 2003; Costa et al., 2004; Hoeben et al., 2004; Oswald et al., 2004; Wenger et al., 2005; Pandya et al., 2006), que é produzido por diversas células, tais como as células tumorais e as de músculos lisos e pericitos ao redor do endotélio vascular (Matsushita et al., 2000). VEGF, também denominado de VEGF-A, pertence à família de genes que inclui outros seis membros: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PlGF (fator de crescimento placentário) (Hoeben et al., 2004). O VEGF-A é uma molécula homodimérica com diferentes isoformas geradas pela ligação alternativa de éxons de um único gene, consistindo de polipeptídeos de 121, 145, 165, 183 e 206 resíduos de aminoácidos (Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Costa et al., 2004; Hoeben et al., 2004). Destes, o VEGF-A₁₆₅ é a isoforma mais abundante e mitogênica expressa e secretada na matriz extracelular (Costa et al., 2004; Ferrara, 2004; Grando Mattuella et al., 2007). Portanto, a partir deste momento, VEGF referir-se-á ao VEGF-A₁₆₅.

VEGF pode iniciar a cascata de eventos envolvidos na angiogênese atuando como fator de proliferação, migração e sobrevivência para células endoteliais, tanto *in vivo* como *in vitro* (Matsushita et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Costa et al., 2004; Ferrara, 2004; Pandya et al., 2006). VEGF tem sido considerado o principal fator de crescimento para o desenvolvimento de células endoteliais, sendo que diversos estudos demonstram seus efeitos estritamente dose-dependentes no desenvolvimento vascular embrionário (Hirashima et al., 2003). Além disso, este fator de crescimento potencializa a permeabilidade vascular, a qual pode tanto preceder ou acompanhar a angiogênese (Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Hoeber et al., 2004). Conseqüentemente, há uma indução do aumento na condutividade hidráulica de pequenos vasos isolados, efeito este mediado pelo aumento do influxo de cálcio (Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004).

1.3.1- Receptores para VEGF

A especificidade do sinal desencadeado por meio de receptores do VEGF é decorrente da ativação combinada de múltiplas vias de sinalização celular (Cébe-Suarez et al., 2006). Assim, a ativação preferencial das diferentes vias de sinalização pelo VEGF contribui para funções biológicas especializadas distintas nos diversos tipos celulares.

VEGF tem seus efeitos biológicos determinados pela ligação com dois receptores tirosina quinase de alta afinidade: VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR em humanos ou Flk-1 em camundongos) (Matsushita et al., 2000; Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Hirashima et al., 2003; Costa et al., 2004; Ferrara, 2004; Tammela et al., 2005; Rahimi, 2006). VEGFR-3 (Flt-4)

também é um membro da mesma família, mas não é um receptor para VEGF, ligando-se a VEGF-C e VEGF-D (Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Rahimi, 2006).

VEGFR-1 codifica o domínio extracelular secretado como uma proteína solúvel, que é um potente antagonista do VEGF em função de sua ligação de alta afinidade, reduzindo a interação deste fator de crescimento com VEGFR-2 (Bicknell, Harris, 2004; Ferrara, 2004). Diversos estudos indicam que a função principal do VEGFR-1 durante a embriogênese é regular negativamente o sinal de VEGFR-2 por meio do seqüestro de VEGF (regular a acessibilidade do VEGF ao VEGFR-2 no desenvolvimento de vasos sangüíneos), ao invés da própria transdução do sinal de VEGFR-1 (Hirashima et al., 2003; Ferrara, 2004; Dutta et al., 2008). Apesar das funções altamente complexas e aparentemente contraditórias, VEGFR-1 possui atividades importantes na hematopoiese e no recrutamento de células monucleares (Ferrara, 2004).

VEGFR-2 é o maior mediador dos efeitos mitogênicos, angiogênicos e de maior permeabilidade do VEGF (Matsushita et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Hoeben et al., 2004; Rahimi, 2006). A ativação desse receptor durante a angiogênese induz à produção do fator de ativação plaquetário pelas células endoteliais, estimula a mitose e migração destas células e aumenta a permeabilidade vascular (Hoeben et al., 2004). Além disso, o VEGFR-2 está envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997), quimiotaxia e sobrevivência celular (Matsushita et al., 2000; Ferrara et al., 2003). VEGFR-2 é expresso principalmente em células endoteliais em proliferação, sendo pobremente expresso em vasos sangüíneos maduros (Ferrara et al., 2003; Song et al., 2005).

A sinalização promovida pelo VEGF é complicada pelo fato de que os ligantes e seus receptores interagem com proteínas celulares adicionais, tais como as neuropilinas, proteoglicanas de heparan sulfato, integrinas e caderinas. Essas interações permitem a coordenação da intensidade do sinal, do tempo e da especificidade com vias extracelulares desencadeadas por ligantes solúveis e interações célula-célula e célula-substrato (Cébe-Suarez et al., 2006).

Neuropilinas são receptores extracelulares para duas famílias diferentes de proteínas secretadas, VEGF e semarofinas (Fuh et al., 2000). Não apresentam atividade tirosina quinase, mas podem modificar a ligação aos receptores para VEGF que contêm essa atividade ou então se ligar diretamente ao VEGF para sinalizar uma resposta celular (Breen, 2007). Desta forma, as funções celulares específicas de VEGF podem ser ditadas pelas diferentes habilidades de interação com co-receptores, tais como a neuropilina 1 (NP-1) (Olsson et al., 2006). A ligação de VEGF com NP-1 favorece respostas angiogênicas e inicia a formação de ramificações vasculares (Whitaker et al., 2001; Ruhrberg et al., 2002; Olsson et al., 2006), intensificando a sinalização desencadeada por VEGFR-2. Estudos têm se concentrado no aumento da sinalização via VEGFR-2 (Fons et al., 2004), mas NP-1 também interage com VEGFR-1 (Fuh et al., 2000; Yamada et al., 2003) ou independentemente promove sinalização celular (Wang et al., 2007; Murga et al., 2005).

1.4- Diferenciação de Células-Tronco em Células Endoteliais

Células-tronco podem ser estimuladas a se diferenciar em um determinado fenótipo por meio da manipulação das condições da cultura nas quais são mantidas. Nesse sentido, é possível controlar ou restringir as vias de diferenciação disponíveis e gerar seletivamente culturas enriquecidas com um fenótipo particular. Tais manipulações incluem o estímulo de células com citocinas específicas, fatores de crescimento, aminoácidos, outras proteínas e íons ativos e co-cultura com um tipo celular ou tecido específico (Polak, Bishop, 2006).

Levenberg et al. (2002) mostraram que células-tronco embrionárias humanas puderam ser diferenciadas em células endoteliais, capazes de formar estruturas tubulares em matrigel, e formaram microvasos quando implantadas em camundongos imunodeprimidos. Também utilizando células-tronco embrionárias, Sone et al. (2007) identificaram o processo de diferenciação destas em componentes vasculares e demonstraram que a expansão e transplante das células vasculares no estágio de diferenciação apropriado pode constituir uma nova estratégia para a medicina regeneradora vascular.

Diversos trabalhos demonstraram que VEGF é um indutor de diferenciação de células-tronco em células endoteliais, sozinho ou em associação com outros fatores de crescimento (Oswald et al., 2004; Kano et al., 2005; Wosnitza et al., 2007; Jazayeri et al., 2008).

Oswald et al. (2004) mostraram a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células com fenótipo (expressão de VEGFR-2, VEGFR-1 e fator de von Willebrand) e características funcionais (capacidade de formação

de estruturas semelhantes a capilares) de células endoteliais com a utilização de VEGF na concentração de 50 ng/mL.

Recentemente, DPSC foram utilizadas para estudar a diferenciação osteogênica *in vitro* e *in vivo*. Os pesquisadores observaram que 30% das células que apresentavam VEGFR-2 também expressavam antígenos específicos para células endoteliais (CD54, fator de von-Willebrand, CD31 e enzima conversora de angiotensina), demonstrando a ocorrência de diferenciação sinérgica em osteoblastos e células endoteliais. *In vivo*, demonstraram inclusive a formação de tecido ósseo vascularizado (d'Aquino et al., 2007).

1.4.1- Marcadores de células endotéliais

Células endoteliais tipicamente expressam CD31, fator de von Willebrand, VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2, VCAM-1 e caderina-VE (Jazayeri et al, 2008). Os níveis de expressão de marcadores de diferenciação endotelial em nível de RNAm e proteína diferem de acordo com o estágio de diferenciação em que a célula se encontra e as condições de cultura (Vittet et al., 1996; Kim et al., 2008).

VEGFR-2 é um dos marcadores de diferenciação mais precoces de células endoteliais e células sangüíneas (Eichmann et al., 1997; Iida et al., 2005; Kim et al., 2008).

CD31 (PECAM-1) é um membro da superfamília das imunoglobulinas que é expresso por células endoteliais e subclasse de células hematopoiéticas em organismos adultos (Watt et al., 1995; DeLisser et al., 1997; Kim et al., 2008). Portanto, estágios iniciais de diferenciação definidos pela expressão de

VEGFR-2 e CD31 poderiam refletir o cometimento em direção à linhagem endotelial (Kim et al., 2008).

A expressão de caderina-VE foi observada nos estágios mais avançados de maturação vascular (Vittet et al., 1996). Nos estágios embrionários avançados, a expressão de caderina-VE é restrita à camada periférica das ilhas sangüíneas que dão origem a células endoteliais e ao endotélio da maioria dos tipos de vasos (Breier et al., 1996).

1.5- Diferenciação de Células-Tronco em Odontoblastos

Odontoblastos são células pós-mitóticas, responsáveis pela secreção de dentina primária. Após a dentinogênese primária, os odontoblastos permanecem funcionais e secretam dentina secundária fisiológica em uma taxa contínua, porém reduzida. Essas células retêm a capacidade de responder a estímulos ambientais leves e localmente regulam sua atividade secretória durante a dentinogênese reacional, levando à regeneração de dentina. Entretanto, estímulos mais intensos podem causar a morte da população de odontoblastos existente e, então, a regeneração de dentina é mediada por células provenientes de uma população precursora de odontoblastos (células-tronco) durante o processo de dentinogênese reparadora (Sloan, Smith, 2007).

Acredita-se que fatores de crescimento e moléculas bioativas seqüestradas na matriz dentinária possam ser capazes de sinalizar processos reparadores que levam à diferenciação de células-tronco em odontoblastos (Tziafas et al., 2000; Smith, Lesot, 2001; Goldberg, Smith, 2004; Murray et al., 2007).

Muitos estudos isolaram células pulpares de tecidos adultos de várias espécies e demonstraram sua alta taxa proliferativa e capacidade para se diferenciar em células formadoras de nódulos mineralizados *in vitro* (Tsukamoto et al., 1992; Kettunen et al., 1998; About et al., 2000). Entretanto, a especificidade dentinogênica de tais depósitos mineralizados nem sempre é clara. A evidência *in vivo* da capacidade de células pulpares produzirem dentina foi demonstrada por Gronthos et al. (2000), conforme descrição anterior (seção 1.1). Quando DPSC foram semeadas em uma superfície de dentina e implantadas em camundongos imunodeprimidos, uma estrutura semelhante à dentina reparadora foi depositada de maneira desorganizada na superfície dentinária (Batouli et al., 2003).

Trabalhos prévios com a utilização de SHED sugerem que estas células podem ser diferenciadas em células semelhantes a odontoblastos *in vivo*, embora os autores não tenham avaliado a capacidade destas células de secretar uma estrutura dentinária tubular organizada (Cordeiro et al., 2008).

1.5.1- Marcadores de odontoblastos

O fenótipo dos odontoblastos tem sido caracterizado principalmente por análises bioquímicas de proteínas da matriz dentinária que correspondem aos marcadores de diferenciação terminal. Odontoblastos secretam colágeno tipo I e outras proteínas não colágenas tais como a osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, osteocalcina, proteínas da matriz dentinária 1, 2 e 3 (DMP-1, DMP-2 e DMP-3, respectivamente) e sialofosfoproteína da dentina (DSPP), uma proteína que subsequente é clivada para originar dois produtos, a sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária (DPP)

(Butler, Ritchie, 1995; He et al., 2003; Papagerakis et al., 2002; Arana-Chavez, Massa, 2004; Priam et al., 2005). Embora também expresso em baixos níveis em tecidos ósseos, o gene DSPP é considerado o principal marcador de odontoblasto (Gronthos et al., 2000; Shi et al., 2001; Miura et al., 2003; Alliot-Licht et al., 2005; Liu et al., 2005; Yu et al., 2007), e DMP-1 tem se mostrado crucial na formação dos dentes, sendo implicado na regulação da mineralização (He et al., 2003; Prescott et al., 2008).

A avaliação de uma ou duas características de uma célula não é suficiente para se determinar conclusivamente se a célula resultante é um odontoblasto verdadeiro (Hargreaves et al., 2008). Até o presente momento, análises citológicas de polarização das células, seus processos e a matriz extracelular dentinária relacionada são ainda necessários para assegurar a identidade dos odontoblastos, visto que todas estas proteínas também são secretadas em diferentes quantidades pelos osteoblastos (Priam et al., 2005). Ademais, marcadores seletivos dos estágios iniciais ou intermediário de diferenciação dos odontoblastos ainda não foram identificados com precisão (Priam et al., 2005).

----- *Proposição*

2- PROPOSIÇÃO

Trabalhos prévios com a utilização de células-tronco pós-natais, tais como DSPC e SHED, apontaram para novas possibilidades em terapias celulares visando o desenvolvimento de novos tecidos. Ademais, o estabelecimento de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* adequados tem permitido avaliar tanto a formação e crescimento de vasos sangüíneos e a eficiência de moléculas ativas na promoção da angiogênese, bem como a expressão de marcadores de odontoblastos e a produção de tecido mineralizado semelhante à dentina. Contudo, não são encontrados relatos na literatura acerca dos mecanismos envolvidos na diferenciação de SHED em células endoteliais visando à formação de novos capilares e em odontoblastos funcionais, capazes de produção de dentina. Desta forma, justifica-se a realização de investigações adicionais para que esses aspectos sejam esclarecidos, visto que abordagens envolvendo a utilização de células apropriadas, matrizes condutivas e fatores de crescimento permitirão um melhor entendimento molecular e biológico do crescimento de vasos sangüíneos e diferenciação celular. Conseqüentemente, estas abordagens poderão possibilitar o desenvolvimento, num futuro não muito distante, de ferramentas moleculares e alternativas terapêuticas viáveis para a regeneração de tecidos danificados ou doentes.

Portanto, os objetivos gerais e específicos do presente projeto são:

- I. Avaliar a habilidade de diferenciação de SHED em odontoblastos funcionais:
 - a. Detectar a capacidade das SHED em produzir tecido mineralizado *in vitro*;
 - b. Demonstrar a formação de tecido mineralizado *in vivo* após a diferenciação de SHED em células semelhantes a odontoblastos.

 - II. Estudar o efeito de VEGF na diferenciação de SHED em células endoteliais:
 - a. Estudar o efeito de VEGF na fosforilação de algumas vias de sinalização (ERK, AKT e STAT3) em SHED;
 - b. Avaliar o efeito de VEGF em SHED com relação à proliferação, migração, formação de estruturas tubulares e diferenciação em células endoteliais;
 - c. Examinar o destino das SHED-LacZ após o implante em camundongos imunodeprimidos.
-

---- *Material e Métodos*

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- PARTE I: Avaliação da Capacidade de Diferenciação de SHED em Odontoblastos Funcionais

3.1.1- Células

Células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED), fornecidas pelo Dr. Songtao Shi (Dental Biology Unit, Craniofacial Skeletal Diseases Branch, NIH Bethesda, MD, EUA) foram mantidas em meio de cultura MEM α (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro bovino fetal 10% (FBS, Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen). Para todos os experimentos, foram utilizadas SHED nas passagens de 3 a 7.

As células foram divididas numa proporção de 1:3 quando atingiam 80% de confluência e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias.

3.1.2- Preparo das fatias de dente

Terceiros molares recentemente extraídos foram coletados de pacientes jovens (17 a 23 anos de idade) no departamento de Cirurgia Bucal, Hospital Universitário da Universidade de Michigan, após obtenção de consentimento livre esclarecido. Os tecidos moles residuais foram removidos com curetas periodontais, e as superfícies dentárias lavadas com álcool 70%.

Os dentes foram seccionados transversalmente na região cervical com disco diamantado em baixa velocidade e sob refrigeração com solução salina

tamponada com fosfato (PBS) a fim de se obter fatias de dentes com 1 mm de espessura e cavidade pulpar ampla (Gonçalves et al., 2007). Os tecidos pulpares foram removidos com o auxílio de uma sonda clínica, evitando-se tocar nas paredes dentinárias e danificar a camada de pré-dentina.

As fatias de dente foram imersas em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) durante 10 minutos em cada solução, lavadas com PBS estéril e então deixadas em PBS durante a noite a 4°C (Nör et al., 2001).

3.1.3- Ensaio de migração celular

Um ensaio fluorescente *in vitro* foi usado para determinar o efeito de fatores de crescimento e outras moléculas bioativas liberados pela dentina na migração de SHED através de uma membrana com poros de 8 µm. Para isso, 4 grupos foram estabelecidos: a. MEMα condicionado por fatias de dentes não tratadas; b. MEMα condicionado por fatias de dentes previamente tratadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%, pH 7.2, durante 1 minuto; c. MEMα; e d. MEMα suplementado com FBS 20%.

Para os dois primeiros grupos (experimentais), fatias de dentes individuais foram mantidas em 500 µL de MEMα por poço de uma placa de 24 poços (BD/Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA) por 3 dias a 37°C. Foram usados 500 µL de MEMα fresco com ou sem FBS 20% como controles positivo e negativo, respectivamente.

SHED, cultivadas por 24 horas em meio sem FBS, na contagem de 2×10^5 , foram semeadas em insertos individuais num volume de 200 µL de meio de cultura. Os insertos foram mantidos em cada poço nos quatro diferentes

grupos durante a noite para permitir a migração das células. Em seguida, os insertos foram removidos, e as células localizadas nos poços foram tripsinizadas, coletadas em tubo de microcentrífuga e centrifugadas a 3.835 x g, 4°C, por 10 minutos. Os pellets foram lavados com PBS e novamente centrifugados a 3.835 x g, 4°C, por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, os pellets foram transferidos para placas pretas de 24 poços com 450 µL de PBS e 50 µL de Cell Tracker™ Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 20 µM por poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos. A fluorescência relacionada às células foi determinada em comprimentos de ondas de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente, em espectrofotômetro (Genios Tecan, Tecan, Graz, Austria). Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

3.1.4- Indução da diferenciação de SHED em células produtoras de tecido mineralizado

SHED, na contagem de 2×10^3 , foram semeadas em cada poço de placas de 6 poços e cultivadas em meio de cultura suplementado com ácido ascórbico (100 µg/mL), dexametasona (10 nM) e β-glicerofosfato (10 mM). Como controle negativo, o mesmo número de células por poço foi cultivado em meio de cultura normal. O meio foi trocado a cada dois dias.

3.1.4.1- Ensaio para detecção da fosfatase alcalina

Após 14, 17, 21, 28 e 35 dias, o meio foi removido e as células lavadas com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por

30 minutos e novamente lavadas por duas vezes com PBS.

Os components A e B do kit para fosfatase alcalina (alkaline phosphatase Blue Microwell Substrate Component A and alkaline phosphatase Blue Microwell Substrate Component B, respectivamente; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) foram misturados em volumes iguais, e 1 mL foi colocado em cada poço e incubado por 10 minutos a 37°C. Após esse tempo, o reagente foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. As placas foram escaneadas e fotografias foram tiradas em microscópio de fase em aumento de 40X.

Os resultados foram obtidos de três poços por condição em cada período estudado.

3.1.4.2- RT-PCR para detecção de RNAm para DSPP, DMP-1 e GAPDH

Após 7, 14, 21, 28 e 35 dias de tratamento, as células foram coletadas em 1 mL de Trizol em tubos de microcentrífuga para extração do RNA. Odontoblastos de camundongo (MDPC-23) foram utilizados como controle positivo das reações.

Para a extração de RNA, 0,2 mL of clorofórmio foi adicionado a cada tubo, o qual foi incubado em temperatura ambiente por 2-3 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.226 x g e 4°C durante 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionou 0,5 mL de isopropanol, e então o tubo foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente o tubo foi centrifugado a 13.226 x g e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e o pellet lavado com 1 mL de álcool 75% e centrifugado a 9.469 x g e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi

removido e, então, o pellet (RNA) foi dissolvido em 20 a 50 μL de água livre de DNase e RNase, de acordo com o seu tamanho.

A leitura da concentração de RNA foi realizada em espectrofotômetro (Genios Tecan, Tecan, Graz, Austria). O RNA foi diluído a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em água livre de DNase e RNase. Em cada amostra (3 μL de RNA) foram adicionados os seguintes reagentes: 19 μL de água livre de DNase e RNase, 25 μL de 2x Reaction Mix, 1 μL de SS III Taq Mix, 1 μL de cada primer (sense e anti-sense 10 mM).

Primers específicos para detecção de genes humanos foram desenhados de acordo com a sequência de cDNA publicado no GenBank. A diferenciação de SHED foi monitorada por meio da detecção de dois marcadores de odontoblastos: sialofosfoproteínas da dentina (DSPP, sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3', antisense 5'-TGCCATTTGCTGTGATGTTT-3'; tamanho antecipado 181 pb) e proteína 1 da matriz dentinária (DMP-1, sense 5'-CAGGAGCACAGGAAAAGGAG-3', antisense 5'-CTGGTGGTATCTTGGGCACT-3'; tamanho antecipado 213 pb). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como gene de referência constitutivo (sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e anti-sense 5'-CACCACCTTCTTGATGTCATC-3', tamanho antecipado 683 pb).

O processo de ciclagem térmica consistiu de transcrição reversa por 30 minutos a 55°C e 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação pela PCR. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C durante 1 minuto). As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo.

Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL), a 80 V durante 45 minutos. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador com intervalos de peso molecular igual a 100 pb. O cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados. Nesse momento, foi realizada fotodocumentação.

3.1.4.3- Western Blot para detecção das proteínas DMP-1 e GAPDH

Após 7, 14, 21, 28 e 35 dias de tratamento, as células foram coletadas em 1 mL de PBS em tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 3.835 x g e 4°C, durante 2 minutos, para a obtenção do pellet. O sobrenadante foi descartado, e o pellet resuspenso com 20 a 100 µL de NP 40 (tampão para lise das células), conforme seu tamanho. O tubo foi mantido em gelo por 10 minutos e novamente centrifugado a 13.226 x g e 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante (proteína) foi então transferido para um novo tubo.

A leitura da concentração de proteína foi realizada em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Genios Tecan, Tecan, Graz, Áustria), utilizando-se o programa Magellan (Tecan Trading AG, Suíça).

Para a eletroforese vertical em gel de acrilamida 10%, 20 µg de proteína foram utilizados por amostra, adicionando-se 1,6 µL de DTT (5 M), 4 µL de tampão de carregamento (NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água destilada em volume suficiente para completar um total de 15,6 µL. Os tubos de microcentrífuga contendo as amostras foram aquecidos a 95°C por 5 minutos. Em seguida, os géis foram carregados com as

amostras e deixados para correr a 130 V por cerca de 1 hora e meia em tampão composto por Tris (30 g/L), glicina (144 g/L) e SDS (10 g/L). Marcadores de peso molecular (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão.

As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (40 V por 1 hora e 15 minutos) em tampão que consistiu de Tris (2,9 g/L), glicina (14,4 g/L) e metanol 20%. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite seco desnatado 5% diluído em TBST durante uma hora e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários de coelho anti-DMP-1 humano (57 kDa; 1:3.000) e de camundongo anti-GAPDH humano (36 kDa; 1:100.000), sob agitação e a 4°C, durante a noite.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBST durante 15 minutos e incubadas com os anticorpos secundários contra IgG de camundongo ou rato, produzidos em cabra (1:10.000), por 2 horas, sob agitação, e em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBST durante 5 a 15 minutos, de acordo com o anticorpo utilizado. A detecção do sinal foi realizada com luminescência química (Thermo Scientific Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Fisher Scientific, Pittsburgh, NA, EUA) durante 5 minutos, e as membranas foram expostas a filmes radiográficos.

3.1.5- Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas em animais da Universidade de Michigan (University Committee on Use and Care of Animals - processo # 09546).

Fatias de dentes foram previamente seccionadas conforme descrição na seção 3.1.2, e partículas de cloreto de sódio com tamanho entre 250 e 425 μm foram colocadas no interior da câmara pulpar. PLLA (Boehringer Ingelheim, Germany) foi dissolvido em clorofórmio para produzir uma solução de polímero 5% (peso/volume), a qual foi gotejada sobre o sal. Após polimerização do PLLA, o sal foi dissolvido em água destilada durante 48 horas, a qual era trocada três vezes por dia (Nör et al., 2001).

No dia anterior à semeadura das células, os conjuntos fatias de dentes e matrizes condutivas porosas foram imersos em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) durante 10 minutos em cada solução e, em seguida, lavados com PBS estéril. Os conjuntos foram então deixados em PBS durante a noite a 4°C (Nör et al., 2001). Imediatamente antes da semeadura, as fatias de dentes e matrizes foram tratadas com EDTA 10%, pH 7,2, durante 1 min, e novamente lavadas com PBS estéril.

SHED, na contagem de 6×10^5 , foram ressuspensas em uma mistura de volumes iguais de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EUA) e MEM α (10 μL cada), e 20 μL foram colocados sobre as matrizes. Estas permaneceram na incubadora (37° C, 5% de CO₂) por 30 min para permitir adesão inicial das células.

Enquanto isso, fatias de dentes recém-extraídos com o tecido pulpar na câmara coronária foram obtidas e mantidas em meio de cultura MEM α

suplementado com FBS 20%, penicilina e estreptomicina 1%, anfotericina B 0,2% e vitamina C 0,17%.

Uma fatia de dente com tecido pulpar fresco e uma com a matriz semeada com SHED foram implantadas bilateralmente na região subcutânea do dorso de camundongos machos com imunodeficiência combinada grave (SCID) com idade entre 5 e 7 semanas (CB.17 SCID; Charles River, Wilmington, MA, EUA) (Figura 1). Como controles negativos, uma fatia de dente sem qualquer tecido ou matriz na câmara pulpar e uma fatia de dente apenas com a matriz, mas sem células, foram implantadas bilateralmente em outros animais.

Os camundongos foram anestesiados intramuscularmente com uma associação de 85% de ketamina (4.25 mg/kg, Ketaset, Fort Dodge, IA, EUA) e 15% de xilazina (0.25 mg/kg, AnaSed, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA, EUA) e tiveram seus pêlos removidos da região a ser operada. A região foi limpa com álcool 70%, uma incisão foi realizada no sentido crânio-caudal, e o tecido foi divulsionado a fim de se criar um espaço para inserção de duas fatias de dentes (uma em cada lado da incisão). As duas bordas da incisão foram unidas e coladas (3M™ Vetbond™ Tissue Adhesive, 3M, St. Paul, MN, EUA) (Figura 1).

Todos os procedimentos foram realizados com instrumentos estéreis e técnica asséptica dentro de um fluxo laminar para se evitar contaminação.

3.1.5.1- Tratamento com tetraciclina

Após 10 dias da implantação dos espécimes, 100 µL de tetraciclina hidrocloreata (T3383, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) foram injetados

intraperitonealmente (41,6 nmol/g de peso corporal) (Masatomi et al., 1996) (Figura 2). Esse procedimento foi repetido outras três vezes com intervalos de 5 dias entre as injeções (Figura 3).

Camundongos com implantes bilaterais (fatias de dentes com polpa e fatias de dentes com matriz e SHED) foram mantidos sem tratamento com tetraciclina como controles negativos adicionais.

Figura 1 – Seqüência operatória de implantação das amostras na região dorsal de camundongo. Após anestesia com ketamina (A), os pêlos da área a ser operada foram removidos (B), e uma incisão com lâmina de bisturi número 15C foi realizada (C). O tecido foi divulsionado (D) e uma amostra foi implantada em cada lado da incisão (E-F). Com a ajuda de uma pinça, os tecidos foram unidos (G) e colados com um adesivo de tecidos (H).

Figura 2 - Diagrama esquemático da estratégia para engenharia de tecido pulpar e marcação da dentina recém-formada com tetraciclina.

Figura 3 - Esquema da estratégia usada para a aplicação de tetraciclina e eutanásia dos animais para posterior aquisição dos dados.

3.1.6- Eutanásia dos animais e análise dos resultados

Uma semana após a última injeção (35 dias da implantação dos espécimes), os animais foram sacrificados por meio de dosagem excessiva de anestésico e deslocamento cervical, e os implantes recuperados (Figura 4) e colocados em PBS. Os tecidos localizados no interior das câmaras pulpare foram removidos cuidadosamente com pinça clínica sem tocar nas paredes dentinárias e armazenados em 1 mL de Trizol a -80°C para posterior análise por RT-PCR.

3.1.6.1- Microscopia confocal

As fatias de dentes armazenadas em PBS foram imediatamente examinadas por meio da microscopia confocal (microscópio confocal de varredura laser Olympus FluoView 500) utilizando-se os seguintes parâmetros: laser ultravioleta (LD405 nm – 35 mW), filtro de excitação de 405-488 nm e filtro de barreira de 465-495 nm.

Um incisivo central inferior de cada camundongo foi também removido e examinado por meio da microscopia confocal como um controle positivo da técnica.

O programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA) foi usado para calcular a distância entre as linhas de dentina marcadas pela tetraciclina.

Figura 4 - Remoção das amostras da região dorsal de camundongo. Após anestesia, a pele da região dorsal foi levantada, expondo as duas amostras (A), fatia de dente + polpa, como controle positivo (B) e fatia de dente + matriz condutiva + SHED (C)

3.1.6.2- RT-PCR para DSPP, DMP-1 e GAPDH

Os tecidos armazenados em Trizol foram descongelados e homogeneizados. Odontoblastos removidos de terceiros molares recém-extraídos também foram coletados em 1 mL de Trizol e usados como controle positivo. Duzentos μL de clorofórmio foram adicionados em cada tubo, e as amostras centrifugadas a $13.226 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O RNA foi precipitado com 500 μL de isopropanol, lavado com 500 μL de álcool 75% e dissolvido em 20 μL de água livre de DNase e RNase. Um μg de RNA total foi usado como molde para a produção de cDNA na RT-PCR de dois passos (SuperScriptTM III Platinum[®] Two-Step qRT-PCR Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quatro μL de cDNA foram usados para a reação de amplificação em um volume final de 25 μL (5,5 μL de água bidestilada, 1 μL de Taq polimerase, 1 μL de primer sense e 1 μL de anti-sense, 12,5 μL do coquetel da reação). Os primers para DSPP, DMP-1 e GAPDH foram os mesmos que os utilizados nos experimentos *in vitro* (seção 3.1.4.2), e a ciclagem térmica foi a mesma que a descrita anteriormente, com exceção de que agora 40 ciclos foram utilizados.

3.1.6.3- Análise histológica – hematoxilina e eosina (HE)

Amostras adicionais representativas de cada condição foram fixadas em solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% a 4°C por 24 horas imediatamente após a recuperação dos implantes. Em seguida, os espécimes foram desmineralizados em solução à base de ácido clorídrico e EDTA (Decalcifier II, Surgipath Medical Industries, Richmond, IL, EUA) de 24 a 48 horas em temperatura ambiente, e os espécimes preparados para histologia.

As lâminas histológicas (5 µm de espessura) foram coradas com HE ou deixadas sem coloração para realização de imunohistoquímica.

3.1.6.4- Análise imunohistoquímica para DMP-1

As lâminas foram aquecidas a 60°C por 20 minutos para início da desparafinização. Em seguida, passaram por dois banhos de xilol, dois banhos de álcool absoluto, um de álcool 95% e um de álcool 75%. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em solução para recuperação de antígeno (Target Retrieval Solution; Dako, Carpinteria, CA, EUA) a 90°C por 20 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena, peróxido de hidrogênio 3% foi gotejado sobre os cortes histológicos e deixado por 15 minutos. O reagente universal para bloqueio de coloração não específica (Background Sniper; Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) foi gotejado sobre os cortes e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos, seguido de lavagem em PBS. O anticorpo primário contra DMP-1 humano produzido em coelho (gentilmente cedido pelo Dr. L. Fisher, NIH/NIDCR) na diluição de 1:200 foi gotejado sobre os cortes e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. Como controle negativo, foi utilizado o anticorpo contra imunoglobulina G (IgG) produzido em coelho na diluição de 1:200. As lâminas foram então lavadas em tampão de lavagem (Wash Buffer 10X; Dako, Carpinteria, CA, EUA) três vezes por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com a sonda e o polímero do kit MACH 3 contra coelho (MACH 3 rabbit-probe horseradish-peroxidase polymer kit; Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) durante 20 minutos, com 3 lavagens intermediárias de 15 minutos e duas lavagens finais de 10 minutos. Finalmente, a reação foi revelada utilizando-se a solução 3-3'-diaminobenzidina

(DAB; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) por 1 minuto, e os cortes lavados com água destilada e contra-corados com hematoxilina. A montagem das lâminas foi feita com solução aquosa de montagem (VectaMount AQ; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA).

3.2- PARTE II: Estudo do Efeito de VEGF na Diferenciação de SHED em Células Endoteliais

3.2.1- Células

SHED eram cultivadas conforme descrito na seção 3.1.1. Células endoteliais de microvasos da derme de humanos (HDMEC) eram mantidas em meio de cultura EGM2-MV (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e foram utilizadas nas passagens de 6 a 9 como controle positivo nos experimentos de diferenciação em células endoteliais.

3.2.2- Receptores para VEGF presentes em SHED

Para análise dos receptores para VEGF presentes em SHED por meio das técnicas de RT-PCR e Western Blot, 2×10^5 células foram semeadas em placas de 6 cm de diâmetro e deixadas para aderir por 24 h. Em seguida, as células foram privadas de FBS durante a noite e então estimuladas ou não com VEGF (50 ng/mL) por 24 horas. Como controle positivo, foram usadas HDMEC mantidas em meio de cultura sem FBS.

A detecção e quantificação da forma solúvel de VEGFR-1, foi feita por meio do ensaio de imuno-absorção ligado à enzima (ELISA). Para isso, 2×10^4 SHED foram semeadas em placas de 6 poços e deixadas para aderir por 24

horas. Em seguida, as células foram privadas ou não de FBS durante a noite e então estimuladas ou não com VEGF (50 ng/mL, num volume total de 1,5 mL de meio) por 24 horas. Como controle positivo, foram usadas HDMEC semeadas na mesma concentração e mantidas em meio de cultura sem FBS.

3.2.2.1- RT-PCR para detecção de RNAm para VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 e GAPDH

As células foram coletadas em 1 mL de Trizol e processadas para RT-PCR de um passo. A extração de RNA e a ciclagem térmica da RT-PCR foram realizadas conforme descrição na seção 3.1.4.2.

Os primers específicos para detecção de genes humanos (com reação cruzada com genes de camundongo), desenhados de acordo com a sequência de cDNA publicado no GenBank, foram: VEGFR-1 (sense 5'-CCTCACTGCCACTCTAATTGTC-3' e antisense 5'-ACAGTTTCAGGTCCTCTCCTTC-3', tamanho antecipado 475 pb), VEGFR-2 (sense 5'-CTCATGTCTGAACTCAAGATCC-3' e antisense 5'-CCAGAATCCTCTTCCATGCTCA-3', tamanho antecipado 928 pb) e NP-1 (sense 5'-CGATTTGGACAGAGACT-3' e antisense 5'-TCAGGGAATCCATCCCAGAT-3', tamanho antecipado 432 pb). GAPDH foi usado como gene de referência constitutivo (sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e anti-sense 5'-CACCACCTTCTTGATGTCATC-3', tamanho antecipado 683 pb).

Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

3.2.2.2- Western Blot para detecção das proteínas VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 e GAPDH

As células foram coletadas em 1 mL de PBS. Todos os passos para realização da técnica Western Blot, desde a extração de proteína até a revelação dos resultados, foram feitos de acordo com a descrição na seção 3.1.4.3. Pequenas modificações ocorreram apenas nas seguintes etapas: uso de gel de acrilamida 9%; carregamento do gel com 30 µg de proteína por poço; uso de anticorpos primários de coelho anti-VEGFR-1 (180 kDa; 1:1.000) e anti-VEGFR-2 (200 kDa; 1:1.000) e de camundongo anti-NP-1 (130 kDa; 1:1.000) e anti-GAPDH (36 kDa; 1:100.000).

Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

3.2.2.3- ELISA para quantificação da forma solúvel da proteína VEGFR-1

O meio condicionado pelas células durante 24 horas foi coletado em um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 13.226 x g, 4°C, por 5 minutos para remoção de células e debris. O número total de células foi determinado para posterior normalização dos dados. Para quantificação da forma solúvel de VEGFR-1, utilizou-se um kit para ELISA específico (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Todos os reagentes e as diluições seriadas da proteína VEGFR-1 padrão foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Cem µL do diluente RD1-68 e 100 µL das diluições seriadas de VEGFR-1 e dos meios condicionados nos diferentes tratamentos foram adicionados em cada poço e incubados sob agitação, por 2 horas, em temperatura ambiente. Os poços foram aspirados e lavados 4 vezes com 400

μL do tampão de lavagem. Adicionaram-se 200 μL do conjugado VEGFR-1 em cada poço, os quais foram novamente incubados sob agitação, por 2 horas, em temperatura ambiente, seguido de 4 lavagens com 400 μL do tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados em cada poço 200 μL da solução substrato, a qual foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, sem agitação e protegida de luz. Adicionaram-se então 50 μL da solução em cada poço para parar a reação. A densidade óptica foi determinada imediatamente em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram normalizados pelo número de células presentes em cada poço.

3.2.3- Western Blot para p-STAT3, p-ERK e p-AKT

Western Blot foi utilizado para verificar e comparar a fosforilação das vias de sinalização STAT3, ERK e AKT após estímulo de SHED e de HDMEC com VEGF. Para isso, 2×10^5 células foram semeadas em placas de 6 cm de diâmetro e deixadas para aderir por 24 h. Em seguida, as células foram privadas de FBS durante a noite e então estimuladas com VEGF (50 ng/mL) por 15, 30, 45 ou 60 minutos ou mantidas sem tratamento.

As células foram coletadas em 1 mL de PBS. Todos os passos para realização da técnica Western Blot, desde a extração de proteína até a revelação dos resultados, foram feitos de acordo com a descrição na seção 3.1.4.3, com exceção da utilização de géis de acrilamida 9%.

Foram utilizados os anticorpos primários de coelho anti-STAT3 humano (82 kDa; 1:2.000), anti-AKT humano (64 kDa; 1:2.000), anti-p-AKT humano (64 kDa; 1:1.000) e anti-p-ERK humano (38 kDa; 1:2.000) e os de camundongo anti-p-STAT3 (82 kDa; 1:1.000) e anti-ERK (38 kDa; 1:4.000).

Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

3.2.4- Ensaio de proliferação de capilares

A fim de se investigar o efeito do VEGF no potencial angiogênico das SHED, realizou-se um ensaio de proliferação de capilares. Placas de 6 poços foram cobertas com 1,5 mL de colágeno (Vitrogen 100 collagen, Angiotech BioMaterials, Palo Alto, CA). Após sua polimerização, 5×10^4 SHED foram adicionadas em cada poço e deixadas para aderir durante a noite. As células foram tratadas com VEGF (50 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura (controle) durante 11 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias. O número de estruturas tubulares foi contado a cada dois dias, durante 11 dias, em microscópio de fase em aumento de 100X. Dez campos foram analisados por poço, com três poços por tratamento.

Em experimentos independentes, a porcentagem de estruturas tubulares em relação ao número total de células também foi determinada durante uma semana.

Para a comparação entre o grupo tratado e o não tratado, realizou-se o teste t, com $p < 0,05$ para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas. Os resultados obtidos são representativos de três experimentos independentes.

3.2.5- Ensaio de proliferação celular sulforrodamina B (SRB)

A densidade ótima de células por poço para ensaio de proliferação (2500-3000 células) foi previamente determinada por meio de análise da curva

de crescimento. Células, na contagem de 2500, foram semeadas em cada poço das placas de 96 poços utilizando-se 100 µL meio de cultura acrescido de VEGF (10 ou 50 ng/mL) ou não (controle), o qual era trocado a cada dois dias. As células foram fixadas nos 7 dias seguintes por meio da adição de ácido tricloroacético gelado (concentração final de 10%) e incubadas por 1 hora a 4°C. A proteína celular, então, foi corada por meio da adição de SRB 4% em ácido acético 1% e incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. O excesso de SRB foi removido pela lavagem dos poços com ácido acético 1%, e as placas foram deixadas para secar. SRB remanescente foi solubilizado em Tris-base 10 mM não tamponado, e a absorbância determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm (Genios Tecan, Tecan, Graz, Austria). Os dados foram obtidos a partir de 6 poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

3.2.6- Ensaio de migração celular

Um ensaio de migração foi utilizado para determinar a capacidade de migração de SHED em resposta ao VEGF. Para isso, 5 grupos foram estabelecidos: a. MEM α ; b. MEM α + VEGF (10 ng/mL); c. MEM α + VEGF (50 ng/mL); d. MEM α + VEGF (100 ng/mL); e e. MEM α suplementado com FBS 20%. Todos os procedimentos foram os mesmos que os descritos na seção 3.1.3.

3.2.7- Indução da diferenciação de SHED em células endoteliais *in vitro*

3.2.7.1- Preparo de matrizes condutivas e de fatias de dentes + matrizes

Para o preparo de matrizes de PLLA, um béquer de vidro de 100 mL foi revestido com uma solução de silicone (Sigmacoat; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) e deixado para secar durante a noite. Um g de PLLA foi dissolvido em 20 mL de clorofórmio para produzir uma solução de polímero 5% (peso/volume). Partículas de cloreto de sódio com tamanho entre 250 e 425 μm (3,45 g) foram misturadas a 1,67 mL do polímero no béquer, o qual foi mantido dentro do fluxo laminar até a evaporação completa do clorofórmio (um dia). O disco de PLLA foi removido do béquer com o auxílio de uma espátula, cortado com uma lâmina em tamanho de 6 mm x 6 mm e desinfetado em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%).

As fatias de dentes com a matriz no seu interior foram preparadas conforme descrição na seção 3.1.5.

As matrizes e as fatias de dentes + matrizes foram acomodadas no interior de placas com 24 poços. SHED, na contagem de 6×10^5 , foram ressuspensas em uma mistura de volumes iguais de Matrigel e MEM α (10 μL cada), e 20 μL foram colocados sobre as matrizes. Estas permaneceram na incubadora (37° C, CO₂ 5%) por 30 min para permitir adesão inicial das células. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de meio de cultura suplementado ou não com VEGF (50 ng/mL) sobre as células. O meio (com ou sem VEGF) foi trocado a cada 2 dias.

3.2.7.2- RT-PCR para detecção de marcadores de células endoteliais

A diferenciação das SHED em células endoteliais foi verificada por meio de RT-PCR para avaliação da cinética de expressão dos seguintes marcadores: VEGFR-1, VEGFR-2, CD31 e Caderina-VE.

Três matrizes com as células ou três fatias de dentes + matrizes com células foram combinadas em um único tubo de microcentrífuga contendo 1 mL de Trizol após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de cultura e congeladas a -80°C até o momento da extração do RNA.

Após a extração de RNA, realizou-se RT-PCR de dois passos, conforme descrição na seção 3.1.6.2. Os primers utilizados foram: VEGFR-1 humano (sense 5'-ACTCCCTTGAACACGAGAGTTC-3' e anti-sense 5'-GATTTCTCAGTCGCAGGTAACC-3', tamanho antecipado 374 pb), VEGFR-2 humano (sense 5'-GCTGTCTCAGTGACAAACCCAT-3' e anti-sense 5'-CTCCCACATGGATTGGCAGAGG-3', tamanho antecipado 373 pb), CD31 humano e de camundongo (sense 5'-TACTCAGTCATGGCCATGGT-3' e anti-sense 5'-TTGGCCTTGGCTTTCCTCAG-3', tamanho antecipado 1025 pb), Caderina-VE humana e de camundongo (sense 5'-CCTGGTATAACCTGACTGTG-3' e anti-sense 5'-TGTGATGGTGAGGATGCAGA-3', tamanho antecipado 528 pb) e GAPDH humano e de camundongo (sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e anti-sense 5'-CACACCTTCTTGATGTCATC-3', tamanho antecipado 683 pb).

Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3.2.8- Avaliação do destino de SHED-LacZ *in vivo*

3.2.8.1- Infecção de SHED com retrovírus (produção de SHED-LacZ ou SHED-LXSN)

A infecção das SHED com retrovírus recombinantes que carregam o gene LacZ ou LXSN (vetor vazio) foi feita em dois turnos com a utilização do meio condicionado por células PA 317-LacZ e meio de cultura MEM α numa proporção de 1:1 e 4 μ g/mL de polibrene. A seleção das células foi feita com o antibiótico G418 (800 μ g/mL), e a checagem da inserção estável do gene LacZ nas células foi feita pela coloração com x-gal para detecção de β -galactosidase. Para isso, SHED-LacZ e SHED-LXSN foram cultivadas em lâminas com 3 poços (10^4 células/poço) por 24 horas, fixadas com solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% por 30 minutos e coradas com solução de x-gal 2,5%, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 0,5 M e $K_3Fe(CN)_6$ 1 M durante a noite.

Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

3.2.8.2- Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos

Um total de 6×10^5 SHED, transfectadas com o gene LacZ ou LXSN, foram semeadas em fatias de dentes e implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos, conforme descrição na seção 3.1.5. Em cada camundongo, uma fatia com SHED-LacZ e uma com SHED-LXSN foram implantadas bilateralmente.

Após 21 dias, os animais foram eutanasiados, conforme descrição na seção 3.1.5, e os espécimes fixados em solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% por uma hora.

3.2.8.3- Coloração com x-gal para detecção de β -galactosidase

Após a fixação inicial dos tecidos, os espécimes foram incubados em solução de x-gal 2,5%, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 0,5 M e $K_3Fe(CN)_6$ 1 M durante a noite. Após esse período, os espécimes foram novamente fixados durante 24 horas, desmineralizados em solução à base de ácido clorídrico e EDTA de 24 a 48 horas em temperatura ambiente e preparados para histologia. As lâminas histológicas (5 μm de espessura) foram coradas com HE ou deixadas sem coloração para posterior contra-coloração com safranina O 0,01% por 1 minuto.

3.2.9- Silenciamento dos genes VEGFR-1 ou NP-1

3.2.9.1- Infecção de SHED com lentivírus (*short hairpin* RNA contra VEGFR-1 ou NP-1)

Inicialmente, bactérias previamente transformadas por plasmídeos de transferência contendo shRNA contra VEGFR-1, NP-1 ou controle (vetor vazio) foram colocadas em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 $\mu g/mL$) e zeomicina (100 $\mu g/mL$) em frascos Erlenmeyer. Às bactérias contendo os plasmídeos de empacotamento (psPAX2) e de envelope (pMD2), foi adicionado o meio LB suplementado apenas com ampicilina (100 $\mu g/mL$). Os frascos foram incubados a 37°C e sob agitação (240 rpm) durante a noite.

A extração do DNA plasmideal foi realizada por meio de procedimentos de minipreparação (lise celular, ligação do DNA plasmideal, lavagem e eluição) utilizando-se o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA) e seguindo as orientações do fabricante. O DNA plasmideal foi quantificado em espectrofotômetro.

A transfecção transitória de células 293T com vetores lentivirais foi realizada pelo método fosfato de cálcio. Brevemente, 2×10^6 células 293T foram semeadas em placas de 10 cm e deixadas para aderir durante a noite em meio DMEM suplementado com FBS 10% e penicilina e estreptomicina 1%. No dia seguinte ou quando as células estavam cerca de 50% confluentes, o meio foi removido e 6 mL de meio fresco foram adicionados à cultura. Paralelamente, prepararam-se os coquetéis de transfecção contendo 876 µL de plasmídeo [21 µg do plasmídeo de transferência (VEGFR-1, NP-1 ou controle), 21 µg do plasmídeo de empacotamento (psPAX2) ou 10,5 µg do plasmídeo de envelope (pMD2G)], 124 µL de CaCl_2 2 M e 1 mL de HBS 2X. A mistura contendo os vetores foi adicionada gota a gota às células e homogeneizada. Após 8 horas, o meio foi substituído por 10 mL de meio de cultura (DMEM). Após 22 horas, o meio foi trocado, permanecendo por 24 horas, quando foi coletado e centrifugado a 3.000 g, 4°C, por 5 minutos em tubos com filtro (Millipore Steriflip Sterile Disposable Vacuum Filter Units; Fisher Scientific; Pittsburgh, NA, EUA). Dez mL de meio foram acrescentados às células e uma segunda coleta foi feita no dia seguinte. O sobrenadante foi congelado a -80°C.

A infecção de SHED com o sobrenadante contendo o lentivírus foi feita em garrafas de 75 cm², quando as células apresentavam 60 a 70% de confluência. O coquetel de infecção foi preparado com 3 mL do sobrenadante, 4 µg/mL de polibrene e meio de cultura MEMα para completar um volume final de 6 mL e, então, adicionado às células. Após 4-6 horas, outros 6 mL do coquetel de infecção foram adicionados e deixados em contato com as células durante a noite. O meio foi substituído por meio fresco e deixado por mais 24 h. As células foram selecionadas com o antibiótico puromicina (1 µg/mL) e

posteriormente foi feita a checagem da inserção estável do vetor de transferência (shRNA-VEGFR-1 ou shRNA-NP-1) nas células por meio de RT-PCR e Western Blot.

3.2.9.1.1- RT-PCR e Western Blot para VEGFR-1 e NP-1

RT-PCR de um passo e Western Blot foram realizados conforme descrito nas seções 3.2.2.1 e 3.2.2.2, respectivamente, a fim de se confirmar o silenciamento dos genes VEGFR-1 e NP-1.

Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

3.2.9.2- Western Blot para p-STAT3, p-ERK e p-AKT

Para avaliar a influência dos receptores VEGFR-1 e NP-1 na fosforilação de STAT3, ERK e AKT, realizou-se a técnica Western Blot utilizando-se as SHED transfectadas com shRNA-VEGFR-1, shRNA-NP-1 ou shRNA-controle e estimuladas por VEGF. A técnica foi a mesma que a descrita na seção 3.2.3.

3.2.9.3- Ensaio de proliferação de capilares

Para avaliar a influência dos genes VEGFR-1 e NP-1 na formação de estruturas tubulares, realizou-se um ensaio de proliferação de capilares, conforme descrito na seção 3.2.4, com as células transduzidas com shRNA-VEGFR-1, shRNA-NP-1 ou shRNA-controle e estimuladas ou não por VEGF durante uma semana. O número de estruturas tubulares foi contado a cada dois dias.

Os dados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

3.2.9.4- Ensaio de proliferação celular SRB

Para avaliar a influência dos genes VEGFR-1 e NP-1 na proliferação das células transduzidas com shRNA-VEGFR-1, shRNA-NP-1 ou shRNA-controle e estimuladas ou não por VEGF durante uma semana, realizou-se um ensaio de proliferação SRB, conforme descrito na seção 3.2.5.

Os dados foram obtidos de seis poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

----- *Resultados*

4- RESULTADOS

4.1- PARTE I: Avaliação da Capacidade de Diferenciação de SHED em Odontoblastos Funcionais

A capacidade de migração de SHED em direção a um estímulo foi avaliada por meio do ensaio de migração celular, em que o estímulo utilizado foi o meio de cultura condicionado pelas fatias de dentes previamente tratadas ou não com EDTA 10%. Observou-se que um maior número de SHED migrou através da membrana porosa no grupo em que fatias de dentes previamente tratadas com EDTA foram utilizadas para condicionamento do meio, sendo que este número foi aproximadamente a metade daquele observado para o controle positivo (MEM α + FBS 20%) e três vezes maior do que para o controle negativo (apenas MEM α). Já no grupo em que as fatias de dentes sem qualquer tratamento anterior foram utilizadas, a migração das células foi aproximadamente um terço da observada para o controle positivo e o dobro da detectada para o controle negativo. Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos (ANOVA a um critério, seguido do método de Dunnett; $p < 0,001$) (Figura 5).

Para verificar a capacidade de mineralização das células em meio de cultura indutor de diferenciação (contendo dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato) em células como os odontoblastos e osteoblastos, realizou-se um experimento para se detectar a atividade da enzima fosfatase alcalina. A mineralização dependente da enzima fosfatase alcalina foi observada apenas nas células cultivadas em meio de diferenciação. O início desse processo foi detectado ao microscópio a partir da segunda semana de cultura, sendo visível

a olho nu a partir de 17 dias e aumentando gradativamente até 35 dias. A mineralização não pôde ser observada nas células mantidas em meio de cultura convencional em nenhum momento (Figura 6).

Nas mesmas condições do experimento anterior, as células foram coletadas para extração de RNA e proteína e posterior realização das técnicas de RT-PCR e Western Blot, respectivamente, para alguns marcadores encontrados em odontoblastos. RNAm para DSPP foi detectado a partir de 28 dias, aumentando aos 35 dias. Para DMP-1, a expressão de RNAm foi detectada em todos os períodos, independente do meio de cultura em que as células foram mantidas. Contudo, sua produção protéica diferiu conforme o meio utilizado, sendo maior aos 7, 21 e 28 dias nas células cultivadas em meio indutor de diferenciação. Já aos 14 e 35 dias, a produção de DMP-1 foi maior nas células mantidas em meio de cultura convencional (Figura 7).

Figura 5: Gráfico representativo da migração *in vitro* de SHED em direção ao meio MEMα, MEMα condicionado por fatias de dentes não tratadas, MEMα condicionado por fatias de dentes previamente tratadas com EDTA 10% ou MEMα suplementado com FBS 20% (controle positivo). Símbolos diferentes (#, φ e δ) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Os dados representam os valores médios ($\pm$ desvio padrão) de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

Figura 6: Detecção da mineralização dependente da enzima fosfatase alcalina produzida por SHED cultivadas em meio de cultura suplementado por dexametasona (DEX; 10 nM), ácido ascórbico (AA; 100 μg/mL) e β-glicerofosfato (β-GP; 10 mM) (a-j) ou meio de cultura convencional (k-t) até 35 dias. (a-e) e (k-o) representam poços de placas de 6 poços em que as células foram mantidas e coradas com solução para detecção da enzima fosfatase alcalina. (f-j) e (p-o) são as imagens obtidas dos mesmos poços em microscópio de fase em aumento de 40X.

Figura 7: Análise da expressão gênica de DSPP (181 pb), DMP-1 (213 pb) e GAPDH (683 pb), por meio de RT-PCR (a), e produção protéica de DMP-1 (57 kDa) e GAPDH (36 kDa), por meio de Western Blot (b), de SHED cultivadas em meio de cultura suplementado por dexametasona (DEX; 10 nM), ácido ascórbico (AA; 100 μ g/mL) e β -glicerofosfato (β -GP; 10 mM) ou meio de cultura convencional até 35 dias. Odontoblastos de camundongo (MDPC-23) foram utilizados como controle positivo das reações. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Para se verificar a diferenciação de SHED em odontoblastos bem como a produção de dentina *in vivo*, realizou-se a implantação das fatias de dentes semeadas com SHED no dorso de camundongos imunodeprimidos e o tratamento destes com injeções periódicas de tetraciclina.

Inicialmente, a fim de se verificar a eficácia da tetraciclina na quelação do cálcio e, conseqüentemente, sua incorporação nos tecidos em mineralização, incisivos inferiores dos camundongos foram removidos e analisados por meio de microscopia confocal. Verificou-se que as quatro injeções da droga foram efetivas na marcação da dentina que estava sofrendo o processo de mineralização no momento de sua aplicação. Além disso, a distância entre a primeira e a quarta linha nos pontos mais incisais da frente de mineralização dentinária foi de aproximadamente 527 μm , correspondendo a porção da dentina que foi mineralizada ao longo de 15 dias (Figura 8).

A análise por microscopia confocal dos espécimes removidos do dorso dos camundongos revelou a marcação de dentina por tetraciclina nas fatias de dentes que haviam sido implantadas com polpa dentária e com matriz + SHED, sendo que a quantidade foi 4 vezes maior nesta última (distância de aproximadamente 50 μm e 211,5 μm , respectivamente, entre a primeira e a quarta linha marcadas pela tetraciclina). Nenhuma marcação foi observada nos espécimes implantados sem células (fatias de dentes com matriz ou fatias de dentes vazias; Figura 9).

Na análise histológica dos cortes corados com HE, observou-se a estrutura característica do tecido pulpar nos espécimes implantados com polpa dentária: tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado, com vasos sangüíneos no seu interior e revestido por uma camada de odontoblastos

dispostos de maneira colunar e alinhados em contato com a dentina. Nos cortes dos espécimes implantados com matriz e SHED, o tecido conjuntivo apresentou-se menos celularizado, e as células em contato com a dentina dispunham-se de maneira alongada ou cúbica. Quando apenas a matriz foi implantada no interior das fatias de dentes, o tecido conjuntivo resultante mostrou-se pouco celularizado e com aspecto fibrilar, com a presença de vasos sangüíneos congestos e ausência de uma camada organizada de células em contato direto com a dentina. Finalmente, nos cortes histológicos dos espécimes em que as fatias de dentes foram implantadas vazias, observou-se a presença de um tecido conjuntivo fibroso, rico em vasos sangüíneos e com uma camada de células alongadas em contato com a dentina (Figura 9).

Em análise imunohistológica, apesar da coloração de fundo observada em todos os grupos, a presença de uma linha contínua em contato com a dentina, marcada em marrom escuro (referente às células imunomarcadas por DMP-1), foi observada apenas nos espécimes implantados com polpa dentária e com matriz + SHED. Nenhuma marcação foi observada no corte histológico em que IgG foi usado como anticorpo primário para controle negativo da reação (Figura 9).

Ao avaliar a presença de DSPP e DMP-1 nos tecidos coletados do interior das fatias de dentes após 35 dias de implantação, verificou-se que o RNAm para esses dois marcadores estavam expressos nos grupos implantados com polpa dentária e com matriz + SHED. A intensidade das bandas de DSPP e DMP-1 referentes à polpa dentária foi similar à dos odontoblastos (controle positivo), e ambas foram mais intensas do que aquela observada para os tecidos referentes à matriz + SHED (Figura 10).

Figura 8: (a) Hemi-arco mandibular de camundongo contendo um incisivo central que foi utilizado como controle positivo da incorporação da tetraciclina em tecidos em mineralização. (b) Imagem da microscopia confocal do incisivo central inferior do camundongo marcado pelas quatro injeções de tetraciclina aplicadas a cada cinco dias.

Figura 9: Análise por microscopia confocal (a-d), histológica com coloração de hematoxilina e eosina (e-h) e imunohistoquímica para DMP-1 (i-l) dos espécimes removidos do dorso do camundongo após 35 dias da implantação. O anticorpo primário IgG foi usado como controle negativo em uma das lâminas contendo a polpa dentária (m). As fatias de dentes haviam sido implantadas com os seguintes conteúdos no seu interior: polpa dentária, matriz + SHED, apenas matriz ou sem conteúdo (vazia)

Figura 10: Análise por RT-PCR da expressão de DSPP (181 pb), DMP-1 (213 pb) e GAPDH (683 pb) presentes nos tecidos moles removidos do interior da câmara pulpar das fatias de dentes após 35 dias de implantação. As fatias de dentes haviam sido implantadas com os seguintes conteúdos no seu interior: polpa dentária, matriz + SHED, apenas matriz ou sem conteúdo (vazia). Odontoblastos removidos de terceiros molares recém extraídos foram usados como controle positivo da reação. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.2- PARTE II: Estudo do Efeito de VEGF na Diferenciação de SHED em Células Endoteliais

As análises por RT-PCR e Western Blot dos receptores para VEGF mostraram que SHED expressam quantidades significativas de RNAm para VEGFR-1 e NP-1 e também das proteínas, mas não de VEGFR-2. Após 24 horas de estímulo com VEGF, SHED parecem apresentar um aumento na expressão desses receptores. A forma solúvel da proteína VEGFR-1 não é expressa por SHED. Comparativamente, HDMEC apresentam os três receptores para VEGF tanto em nível de RNAm como de proteína (Figura 11).

As vias de sinalização STAT3, ERK e AKT foram avaliadas após estímulo de SHED e de HDMEC com VEGF. Observou-se uma diminuição da fosforilação de STAT3 até 60 minutos após o estímulo com VEGF em SHED, enquanto que a fosforilação de ERK e de AKT foi aumentada nesse período. O mesmo padrão foi observado em HDMEC, contudo a resposta ao VEGF parece ocorrer de forma mais imediata (15 a 30 minutos após o estímulo) em HDMEC, principalmente em relação às vias de STAT3 e ERK. Além disso, parece haver uma relação inversa entre estas duas vias de sinalização, tanto em SHED como em HDMEC, em que os eventos de aumento e diminuição de fosforilação de ERK e STAT3, respectivamente, parecem ocorrer simultaneamente.

A contagem no número de estruturas tubulares formada por SHED quando cultivadas em colágeno num ensaio de formação de capilares mostrou que estas células são capazes de formar tais estruturas independente de qualquer tratamento, as quais aumentam progressivamente ao longo do tempo. Contudo, quando estimuladas por VEGF, há uma intensificação na organização

das SHED em estruturas tubulares, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado e não tratado a partir do 5º dia de tratamento com VEGF (teste t; $p < 0,001$). Tal diferença pôde ser confirmada por meio de avaliação visual das imagens das culturas após 7 e 11 dias de estímulo das células com VEGF (Figura 13).

Para se confirmar que o VEGF era responsável direto por estimular as SHED a se organizarem em estruturas tubulares e descartar a possibilidade de que haveria uma proliferação aumentada das células e, conseqüentemente, maior número de estruturas tubulares (proporcional ao aumento do número de células) no grupo tratado com VEGF, realizou-se também a contagem do número total de células. Verificou-se que no grupo tratado com VEGF a porcentagem de estruturas tubulares em relação ao número total de células era maior do que no grupo não tratado, e esta diferença era estatisticamente significativa em todos os períodos avaliados (1 a 7 dias). Este resultado foi confirmado por meio do experimento SRB, em que células estimuladas por VEGF não apresentaram qualquer alteração do seu ritmo de proliferação quando comparadas com células não tratadas, evidenciando que VEGF não exerce influência sobre a taxa de proliferação de SHED (Figura 14).

Figura 11: Caracterização dos receptores para VEGF presentes em SHED, tratadas ou não (C = controle) com VEGF, em comparação com HDMEC. A expressão de RNA foi detectada por meio de (A) RT-PCR (VEGFR-2: 928 pb; VEGFR-1: 475 pb; NP-1: 432 pb; GAPDH: 683 pb) e a de proteína por (B) Western Blot (VEGFR-2: 200 kDa; VEGFR-1: 180 kDa; NP-1: 130 kDa; GAPDH: 36 kDa) e (C) ELISA; neste experimento, SHED foram avaliadas tanto na presença como na ausência de FBS 10%. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 12: Comparação das vias de sinalização STAT3, ERK e AKT estimulados por VEGF em SHED e HDMEC. A fosforilação das proteínas foi avaliada em células não estimuladas (C = controle) e estimuladas por VEGF (50 ng/mL) após 15, 30, 45 e 60 minutos por meio da técnica Western Blot. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 13: VEGF estimula a organização das SHED em estruturas tubulares. (A) Comparação entre o número de estruturas tubulares formadas por SHED quando cultivadas em colágeno e estimuladas ou não com VEGF (50 ng/mL) durante 11 dias. * $p < 0,05$. (B) Aspecto microscópico (400X) da organização de SHED em estruturas tubulares compostas por células alinhadas e vacuolizadas. (C) Aspecto microscópico (200X) da organização de SHED em estruturas tubulares nos grupos tratado ou não tratado com VEGF após 3, 7 e 11 dias de tratamento. Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

Figura 14: VEGF não interfere na taxa de proliferação das SHED. (A) Comparação entre as porcentagens de estruturas tubulares formadas, com relação ao número total de células, quando SHED foram cultivadas em colágeno e estimuladas ou não com VEGF (50 ng/mL) durante 7 dias. * $p < 0,05$. Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes. (B) Comparação entre as taxas de proliferação de SHED estimuladas ou não com VEGF (10 ng/mL ou 50 ng/mL), quando cultivadas em placas de 96 poços, e avaliadas por meio da técnica SRB. Os resultados foram obtidos de seis poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

O efeito de VEGF na migração de SHED foi avaliado por meio de um ensaio de migração celular. Diferentes concentrações de VEGF (10, 50 e 100 ng/mL) em meio MEM α foram utilizadas como possível estímulo à migração das células e comparadas com o efeito produzido por MEM α puro (controle negativo) ou suplementado com FBS 20% (controle positivo). Observou-se que o número de células que migraram através da membrana porosa em direção ao meio contendo VEGF, independente da sua concentração, não diferiu daquele em que apenas o meio foi utilizado. Além disso, a migração em direção ao VEGF foi estatisticamente menor do que aquela em direção ao meio contendo FBS 20% (Figura 15).

O efeito de VEGF na diferenciação de SHED em células endoteliais *in vitro* foi avaliado usando-se o modelo de fatias de dente e/ou matrizes condutivas. Em estudos preliminares, o estímulo de VEGF durante um mês em células cultivadas em placas de 6 cm não alterou o padrão de expressão de VEGFR-2, CD31 e Caderina-VE (dados não mostrados). Os resultados de RT-PCR mostraram que SHED cultivadas em fatias de dentes + matrizes condutivas expressaram VEGFR-2 já após o primeiro dia de estímulo com VEGF. Ademais, os quatro marcadores de células endoteliais (VEGFR-1, VEGFR-2, CD31 e Caderina-VE) foram observados após 21 dias sob estímulo de VEGF, resultado ainda mais evidente aos 28 dias. Células tratadas e cultivadas apenas em matrizes condutivas também apresentaram os marcadores de células endoteliais, com exceção de Caderina-VE, após 28 dias de tratamento com VEGF (Figura 16).

Para se confirmar a capacidade de diferenciação de SHED em células endoteliais *in vivo*, introduziu-se o gene LacZ nas células para possibilitar a

avaliação do seu destino após implantação em camundongos imunodeprimidos. Antes da implantação, no entanto, a efetividade do procedimento de infecção das SHED com este gene foi confirmada *in vitro* por meio da coloração com x-gal das células produtoras de β -galactosidase (Figura 17).

Confirmada a introdução estável do gene LacZ nas células, deu-se início ao experimento *in vivo* e, após 21 dias, pôde-se detectar que as células implantadas formaram estruturas específicas no tecido. Tais estruturas mostravam-se arredondadas ou tubulares e se localizavam próximas a vasos sangüíneos amplos, sugerindo a diferenciação de SHED-LacZ em células endoteliais formadoras de estruturas vasculares próximas aos vasos sangüíneos do camundongo (Figura 18).

Figura 15: VEGF não estimula a migração das SHED. Meio de cultura MEM α puro, MEM α suplementado com VEGF em diferentes concentrações (10, 50 ou 100 ng/mL) e MEM α suplementado com FBS 20% foram colocados em placas de 24 poços e utilizados como estímulo à migração das SHED, semeadas em inserts individuais, através de uma membrana com poros de 8 μ m. * $p < 0,001$. Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

Figura 16: VEGF estimula a diferenciação de SHED em células endoteliais quando cultivadas em fatias de dentes + matriz condutiva. SHED foram cultivadas em matrizes condutivas ou em fatias de dentes + matrizes, estimuladas com VEGF (50 ng/mL) ou mantidas sem tratamento (C = controle) e coletadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias para avaliação de marcadores de células endoteliais (VEGFR-1: 374 pb; VEGFR-2: 373 pb; CD31: 1025 pb; e Caderina-VE: 528 pb) e de GAPDH (683 pb) por meio de RT-PCR. HDMC foram utilizadas como controle positivo para os marcadores.

Figura 17: Detecção *in vitro* da β -galactosidase produzida por SHED transfectadas com o gene LacZ (a) ou LXSN (b) para checagem da inserção estável destes genes. As células foram fixadas e coradas com x-gal e, então, analisadas em microscópio de fase em aumento de 200X.

Figura 18: Coloração por x-gal para detecção de β -galactosidase produzida por células contendo o gene LacZ. SHED-LacZ foram semeadas em fatias de dentes + matrizes e implantadas em camundongos imunodeprimidos. Após 21 dias, os espécimes foram recuperados e imediatamente corados com x-gal. Cortes histológicos foram preparados e avaliados em microscópio de fase em aumento de 400X após coloração com HE (a) ou safranina O 0,01%(b). As estruturas marcadas apresentavam formato arredondado ou tubular, semelhante a vasos sanguíneos.

Com o intuito de se verificar a importância de cada um dos receptores para VEGF presentes em SHED nas diversas funções celulares, realizou-se o silenciamento dos genes VEGFR-1 e NP-1 e, posteriormente, sob estímulo do VEGF, avaliaram-se a fosforilação de STAT3, ERK e AKT, bem como a resposta das células diante de experimentos funcionais, tais como o ensaio de proliferação de capilares e o ensaio de proliferação SRB.

A eficácia do silenciamento do gene VEGFR-1 foi analisada por meio das técnicas RT-PCR e Western Blot em SHED infectadas por dois clones derivados de diferentes células. Como a resposta ao silenciamento foi semelhante para ambas as células, optou-se por utilizar nos demais experimentos as células provenientes da infecção pelo clone 2 (Figura 19).

Quando as SHED com shRNA-VEGFR-1 foram estimuladas com VEGF, observou-se uma alteração no padrão de fosforilação de STAT3 e AKT em comparação com as células controle (SHED com shRNA-c). Para STAT3, a fosforilação foi menor em todos os períodos avaliados para as células com shRNA-VEGFR-1. Já para AKT, o padrão de fosforilação não se alterou nestas células após serem estimuladas por VEGF, o que não ocorreu com as células controle, as quais apresentaram um aumento da fosforilação de AKT após estímulo com VEGF. Não houve diferença no padrão de fosforilação de ERK entre as células silenciadas e as não silenciadas (Figura 19).

A eficácia do silenciamento do gene NP-1 também foi analisada por meio das técnicas RT-PCR e Western Blot em SHED infectadas por dois clones derivados de diferentes células. Como a resposta ao silenciamento foi um pouco melhor para o clone 1 (verificada pela menor expressão da proteína NP-1), optou-se por utilizar nos demais experimentos as células provenientes da

infecção por este clone (Figura 20).

Quando as SHED com shRNA-NP-1 foram estimuladas com VEGF, observou-se uma alteração no padrão de fosforilação de ERK em comparação com as células controle (SHED com shRNA-c), sendo que a resposta ao tratamento com VEGF foi menos intensa do que nas células utilizadas como controle. Não houve diferença no padrão de fosforilação de STAT3 e AKT entre as células silenciadas e as não silenciadas (Figura 20).

Em ensaio de proliferação de capilares, observou-se que as SHED utilizadas como controle (shRNA-c) apresentaram o mesmo comportamento das células não transfectadas, ou seja, houve um aumento progressivo do número de estruturas tubulares, o qual foi intensificado pelo tratamento com VEGF ($p < 0,05$). No entanto, as SHED transfectadas com shRNA-VEGFR-1 praticamente não foram capazes de formar estruturas tubulares ao longo de 7 dias, nem mesmo quando tratadas com VEGF. Já aquelas transfectadas com shRNA-NP-1 demonstraram o mesmo padrão de formação de estruturas tubulares que as células utilizadas como controle quando mantidas em colágeno sem qualquer tratamento. Contudo, quando estimuladas por VEGF, apesar de haver um aumento significativo no número de estruturas capilares em comparação com as células não tratadas ($p < 0,05$), este não foi tão intenso quanto o que ocorreu com as células utilizadas como controle (shRNA-c) e estimuladas por VEGF ($p < 0,05$).

Para verificar se a taxa de proliferação das células transfectadas com shRNA-VEGFR-1 ou shRNA-NP-1 seria diferente daquela das células utilizadas como controle, realizou-se um ensaio de proliferação SRB. Os

resultados mostraram que as três células apresentaram a mesma taxa de proliferação, independente de tratamento com VEGF (Figura 22).

Figura 19: Checagem do silenciamento do gene VEGFR-1 em SHED infectadas por dois clones derivados de diferentes células (shRNA-VEGFR-1, clones 1 e 2) e comparados com o controle (shRNA-c) por meio de RT-PCR (A) e Western Blot (B) para posterior seleção do melhor clone a ser utilizado nos demais experimentos. (C) O efeito do silenciamento de VEGFR-1 nas vias de sinalização STAT3, ERK e AKT foi avalliado, por meio de Western Blot, em SHED estimuladas por VEGF após 15, 30, 45 e 60 minutos. Foram utilizadas células infectadas pelo clone 2.

Figura 20: Checagem do silenciamento do gene NP-1 em SHED infectadas por dois clones derivados de diferentes células (shRNA-NP-1, clones 1 e 2) e comparados com o controle (shRNA-c) por meio de RT-PCR (A) e Western Blot (B) para posterior seleção do melhor clone a ser utilizado nos demais experimentos. (C) O efeito do silenciamento de NP-1 nas vias de sinalização STAT3, ERK e AKT foi avaliada, por meio de Western Blot, em SHED estimuladas por VEGF após 15, 30, 45 e 60 minutos. Foram utilizadas células infectadas pelo clone 1.

Figura 21: Comparação entre o número de estruturas tubulares formadas por SHED shRNA-VEGFR-1, shRNA-NP-1 e shRNA-c (controle) quando cultivadas em colágeno e estimuladas ou não com VEGF (50 ng/mL) durante 7 dias. Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

Figura 22: Comparação entre a taxa de proliferação de SHED shRNA-VEGFR-1, shRNA-NP-1 e shRNA-c (controle), estimuladas ou não com VEGF (10 ng/mL ou 50 ng/mL), quando cultivadas em placas de 96 poços e avaliadas por meio da técnica SRB. Os resultados foram obtidos de seis poços por condição e são representativos de três experimentos independentes.

----- *Discussão*

5- DISCUSSÃO

Com os avanços no conhecimento da biologia das células-tronco e dos conceitos emergentes de engenharia tecidual, diversos pesquisadores têm focado seus esforços em pesquisas que visam à formação de um dente completo (Duailibi et al., 2004; Honda et al., 2005; Young et al., 2002) como possível alternativa para a substituição de dentes perdidos no futuro (Yen, Sharpe, 2008). Contudo, se o desenvolvimento de um dente natural leva vários anos para ocorrer, não estamos convencidos de que o crescimento de dentes completos com o uso de células de origem alogênica ou xenogênica tenha significativa aplicabilidade clínica. Ao invés disso, acreditamos que pesquisas que objetivem procedimentos clínicos para regenerar um complexo dentino-pulpar funcional provavelmente tenham maior impacto na Odontologia (Hargreaves et al., 2008).

Desta forma, pesquisas adicionais sobre terapias regenerativas devem ser conduzidas para estabelecer métodos confiáveis e seguros para todos os dentes requerendo tratamento endodôntico (Murray et al., 2007). Os objetivos dos procedimentos endodônticos regenerativos são: regenerar um tecido semelhante à polpa, idealmente um complexo dentino-pulpar; regenerar a dentina coronária comprometida, como por exemplo após exposição por cárie; e regenerar raízes reabsorvidas, bem como dentina cervical e apical (Murray et al., 2007). Além disso, a engenharia de tecido pulpar pode fornecer um novo sistema para estudar e manipular os processos de reparo pulpar e de formação de dentina reparadora que ocorre após injúria ou manipulação cirúrgica (Mooney et al., 1996).

Para a renegeração do tecido dentinário nos procedimentos de engenharia de tecido pulpar utilizando-se células-tronco, é fundamental que estas células tenham capacidade de diferenciação em odontoblastos. Para isto, a migração de células progenitoras ao sítio injuriado para diferenciação em uma nova geração de células semelhantes a odontoblastos será um importante evento de recrutamento celular durante a regeneração, quando a vitalidade dos odontoblastos primários é comprometida (Sloan, Smith, 2007).

Tem sido fortemente sugerido que as superfícies de dentina expostas e as moléculas bioativas acumuladas neste tecido forneceria os sinais necessários que determinariam as funções celulares como migração e diferenciação (Tziafas, 2004; Smith, 2003). Isto porque fatores de crescimento são importantes na sinalização para diferenciação de odontoblasto e estimulação à secreção de matriz dentinária. Tais fatores de crescimento são secretados por odontoblastos e depositados na dentina, onde permanecem em forma ativa por meio de interações com outros componentes (Murray et al., 2007). Em caso de injúria ao tecido dentinário, estes fatores de crescimento e moléculas bioativas seriam liberados e iniciariam a sinalização de regeneração do complexo dentino-pulpar (Tziafas et al., 2000; Smith, Lesot, 2001; Sloan, Smith, 2007).

Com base nisto e no conhecimento de que o tratamento da dentina com EDTA pode solubilizar vários componentes não colágenos da matriz dentinária e fatores de crescimento (Graham et al., 2006; Beltz et al., 2003; Smith, 2002; Huang et al., 2006), os quais podem ter um efeito indutor na diferenciação de células progenitoras em odontoblastos (Smith, 2002; Huang et al., 2006), no presente estudo o objetivo do ensaio de migração utilizando-se de meio

condicionado com as fatias de dentes foi verificar a possibilidade de liberação destes fatores e a capacidade de migração das SHED em direção a este estímulo. Observamos que, de fato, EDTA foi capaz de liberar estímulos da dentina às células, e estas responderam por meio de maior migração em direção ao meio condicionado por fatias pré-tratadas com EDTA em comparação com o meio condicionado por fatias sem tratamento anterior ou com o meio não condicionado. Apesar de não termos realizado uma análise aprofundada dos fatores liberados pela dentina nesse processo, possíveis candidatos são o fator de crescimento transformador beta (TGF β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Estas são importantes famílias de fatores de crescimento envolvidas na sinalização celular para diferenciação de odontoblastos, estimulação da secreção de matriz dentinária, desenvolvimento dentário e regeneração (Roberts-Clark, Smith, 2000; Smith et al., 1998; Nakashima, Reddi, 2003; Saito et al., 2004; Iohara et al., 2004).

Para avaliar a capacidade de mineralização das SHED em cultura, utilizamos meio indutor contendo dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato e avaliamos a produção da enzima fosfatase alcalina. Em experimentos *in vitro* (Bellows et al., 1991), assim como em mutações na fosfatase alcalina, que levam à hipofosfatasia nos homens (Whyte, 1994), existem boas evidências de que esta enzima esteja envolvida no processo de mineralização. Por pertencer a uma classe de proteínas de superfície celular que se apresentam ligadas covalentemente a complexos fosfolipídicos de fosfatidilinositol na membrana plasmática (Turksen, Aubin, 1991), acredita-se que a fosfatase alcalina esteja envolvida na sinalização transmembrana, promovendo a formação de cristais nas vesículas da matriz e removendo

inibidores de nucleação (Hui et al., 1993). A presença de níveis elevados de fosfatase alcalina parece ser necessária para iniciar o processo de mineralização de tecidos conjuntivos (Liu et al., 2005), pois provê um enriquecimento local de fosfato inorgânico para a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (Azari et al., 2008). Estudos prévios mostraram que a fosfatase alcalina está envolvida na indução da deposição de hidroxiapatita em matrizes de colágeno *in vivo* (Beertsen, van den Bos, 1992). Väkevä et al. (1990) mostraram que a fosfatase alcalina é um pré-requisito para a diferenciação e possível especialização das células pulpares *in vivo*. Além disso, acredita-se que ela participe na adesão, migração e diferenciação dos osteoblastos (Hui et al., 1993).

A dexametasona tem sido amplamente utilizada em cultura de células da polpa dentária para promover sua mineralização (Kasugai et al., 1993; Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003). Alliot-Licht et al. (2005) observaram que a dexametasona diminuiu a proliferação celular e aumentou consideravelmente a atividade da fosfatase alcalina em cultura de DPSC (350% após 14 dias). Além disso, houve um aumento da expressão de RNAm para DSPP quando as células foram tratadas com dexametasona por 14 dias em cultura. Tais fatos são consistentes com os nossos dados, visto que, embora não tenhamos quantificado a produção da enzima fosfatase alcalina, também observamos ao microscópio o início do processo de mineralização a partir da segunda semana de cultura. Entretanto, a expressão de RNAm para DSPP só pôde ser detectada após 28 dias de indução. Esta diferença pode estar relacionada ao diferente tipo celular utilizado ou ao fato de que, além de

dexametasona, também suplementamos o meio com ácido ascórbico e β -glicerofosfato.

O ácido ascórbico é um indutor importante de diferenciação de osteoblastos, estimulando a secreção de matriz extracelular rica em colágeno e de efetores gênicos específicos, tais como a fosfatase alcalina, a osteocalcina e a osteopontina (Monson et al., 1997; Beck et al., 2000). Já o meio suplementado com β -glicerofosfato promove mineralização porque serve como doador de fosfato inorgânico para a deposição de fosfato de cálcio após degradação pela fosfatase alcalina (Orimo, Shimada, 2008). Liu et al. (2005) observaram que ácido ascórbico, β -glicerofosfato e extratos de dentina induziram a diferenciação de DPSC em células semelhantes a odontoblastos bem como a mineralização *in vitro*, estimulando significativamente a expressão de RNAm para DSPP.

Além de DSPP, a análise dos nossos resultados para DMP-1 sugere a existência de mecanismos de regulação pós-transcricional da expressão genética, visto que durante todo o período foi possível detectar RNAm para DMP-1, mas em apenas alguns momentos houve a produção da proteína. Interessantemente, a expressão de proteína foi muito mais intensa nas células tratadas com meio indutor de diferenciação do que naquelas mantidas em MEM α aos 7, 21 e 28 dias. Já aos 14 e 35 dias, a relação se inverteu, embora a intensidade das bandas seja muito mais fraca mesmo para as células mantidas em meio de cultura comum. Presume-se, portanto, que essa regulação pós-transcricional tenha algum significado biológico importante, requerendo investigações adicionais para que este mecanismo seja desvendado. Assim, um melhor entendimento desses eventos moleculares na

biomineralização em geral e na biomineralização de dentes em particular terão implicações clínicas importantes no reparo e regeneração tecidual (Liu et al., 2005).

Tendo comprovado a capacidade de mineralização das SHED *in vitro*, realizamos um experimento *in vivo* utilizando o modelo de fatias de dentes e matrizes condutivas implantadas com SHED em camundongos imunodeprimidos a fim de se analisar a diferenciação das células-tronco em odontoblastos funcionais. Além disso, utilizamos a tetraciclina para promover a marcação do tecido dentinário secretado pelas células recém diferenciadas e em processo de mineralização, visto que ela tem sido considerada um marcador confiável de crescimento em estudos com dentes (Kawasaki, 1975; Iinuma et al., 2002; Santini, Ivanovic, 1996; Masatomi et al., 1996).

A tetraciclina foi introduzida em 1948 como um antibiótico de amplo espectro que pode ser usado no tratamento de infecções comuns em crianças e adultos. Um dos efeitos colaterais corresponde à sua incorporação nos tecidos que estão se calcificando no momento da administração. A tetraciclina tem a habilidade de quelar os íons cálcio e de se incorporar nos dentes, cartilagens e ossos (Sánchez et al., 2004; Conchie et al., 1970).

As imagens obtidas por microscopia confocal dos incisivos centrais do camundongo foram a primeira evidência de que nosso procedimento era adequado com relação à técnica de marcação da dentina durante a sua mineralização (especificamente a dose de tetraciclina apropriada) e ao método de avaliação dos espécimes pós-implantação (adequados filtros de excitação e de barreira no microscópio confocal para análise da fluorescência da tetraciclina) adotados neste estudo.

Surpreendentemente, o mesmo padrão com quatro linhas bem definidas observadas nos incisivos de camundongo também pôde ser visto nas fatias de dentes implantadas com SHED e matriz. Este achado sugere a diferenciação das células-tronco em células semelhantes a odontoblastos seguida por uma intensa atividade secretória, resultando em ampla separação dos incrementos de dentina marcados por tetraciclina.

Comparativamente, nos espécimes implantados com polpa dentária, uma atividade secretória lenta, semelhante à dentinogênese secundária, em que há uma notável diminuição da atividade secretória dos odontoblastos (Arana-Chavez, Massa, 2004; Sloan, Smith, 2007; Larmas, 2008), pôde ser detectada por meio do padrão de linhas sucessivas de dentina marcadas muito próximas umas das outras, sendo difícil distinguir as linhas individuais. Para sanar tal dificuldade, uma alternativa seria a utilização alternada de dois corantes fluorescentes diferentes, tais como a tetraciclina e a calceína (Linuma et al., 2002).

Portanto, este é o primeiro trabalho demonstrando um padrão regular de deposição de dentina por células semelhantes a odontoblastos ao longo do tempo, processo esse que imita a dentinogênese primária ou secundária, em que a dentina é depositada camada por camada, seguindo um ritmo centrípeto de crescimento.

Além da marcação da dentina em mineralização, o uso da tetraciclina permitiu avaliar a taxa de deposição dentinária ao longo de um período determinado de tempo. Como a tetraciclina é depositada na dentina em mineralização, a distância entre duas linhas adjacentes corresponde à taxa de formação de dentina durante o período entre as aplicações sucessivas da

droga (Kawasaki et al., 1977). Tem sido relatada uma taxa de crescimento da dentina primária de 4-16 μm por dia, e a da dentina secundária num ritmo mais lento (Kawasaki et al., 1977; Almushayt et al., 2006). Em nosso estudo, as taxas de crescimento foram aproximadamente 3,3 e 14,1 μm por dia para os espécimes implantados com polpa dentária e com SHED + matriz, respectivamente.

As diferentes taxas de deposição de dentina entre ambos os grupos (fatias de dente implantadas com polpa dentária ou com matriz + SHED) podem estar relacionadas aos estágios distintos do ciclo celular em que as células se encontram (pré-odontoblastos, odontoblastos secretórios, odontoblastos transicionais e odontoblastos velhos ou em descanso) (Larmas, 2008). Nossa hipótese é de que as células semelhantes a odontoblastos diferenciadas a partir das SHED estavam na fase secretória, enquanto que os odontoblastos presentes na polpa provavelmente já estavam passando para a fase de odontoblastos transicionais ou mesmo maduros. O que permanece a ser elucidado é se a menor taxa de deposição de dentina por odontoblastos de um tecido pulpar convencional ocorre devido à falta de estímulo ou inibição de secreção em função da fase do ciclo em que as células se encontram (Sloan, Smith, 2007).

Vale ressaltar a importância da configuração espacial na apresentação do sinal durante a diferenciação de odontoblastos e a necessidade de se considerar essa característica durante qualquer tentativa de se imitar o reparo pulpar (Goldberg, Smith, 2004). Isto porque, em condições normais, após a última mitose e antes da diferenciação dos odontoblastos, os pré-odontoblastos se alinham perpendicularmente à membrana basal, e apenas as células-filhas

adjacentes à membrana basal sofrem diferenciação terminal em odontoblastos. Huang et al. (2006) demonstraram que o contato direto das células pulpares com a dentina tratada mecânica e quimicamente pareceu promover a diferenciação das células pulpares em odontoblastos, com os processos odontoblásticos se estendendo para dentro dos túbulos dentinários existentes. Assim, o modelo de fatias de dente tratadas previamente com EDTA utilizado em nosso trabalho parece ser bastante apropriado para o estudo da diferenciação de odontoblastos e avaliação da mineralização do tecido dentinário. Isto porque se a regeneração em um canal despolpado for possível clinicamente, então este canal precisa ser primeiramente limpo com agentes químicos (pelo menos com NaOCl e EDTA) e mecanicamente tratado durante tratamento endodôntico de rotina. A fim de se produzir nova dentina pelo tecido pulpar regenerado, as células-tronco pulpares teriam que ser capazes de se aderir às paredes dentinárias tratadas e, subseqüentemente, proliferar e diferenciar em odontoblastos para a produção de nova dentina (Huang et al., 2006b).

Ademais, é necessária uma melhor compreensão do controle ou regulação dos eventos regenerativos que ocorrem durante este processo para que futuramente tais procedimentos encontrem aplicação clínica. Isto é importante, pois se a regeneração ocorrer de maneira descontrolada, tornar-se-á inevitável a obliteração da câmara pulpar e perda da vitalidade do dente (Sloan, Smith, 2007).

Nas análises dos cortes histológicos corados com HE, a organização característica do tecido conjuntivo pulpar e da camada de odontoblastos (células colunares, polarizadas, com a porção distal penetrando nos túbulos

dentinários) não pôde ser detectada em nenhum dos grupos estudados, com exceção daquele em que a polpa dentária foi implantada com as fatias de dentes. Contudo, mesmo não colunares, uma camada de células dispôs-se continuamente em contato com as paredes internas da câmara coronária das fatias de dentes implantadas com SHED e matriz. Aliada a esse fator, a imunomarcação positiva utilizando-se o anticorpo DMP-1 neste mesmo local sugere que estas células em contato com a dentina são células semelhantes a odontoblastos. A marcação com DMP-1 também foi positiva no grupo implantado com polpa dentária, embora de maneira menos intensa do que no grupo SHED + matriz. Isto sugere as diferentes taxas de mineralização nestes grupos, visto que DMP-1 é relacionado à regulação da mineralização (He et al., 2003; Prescott et al., 2008).

Estes achados foram reforçados pelos resultados da RT-PCR utilizando-se as amostras coletadas do interior das fatias de dentes para detecção de DSPP e DMP-1. Coletivamente, nossos dados sugerem que SHED são capazes de se diferenciar em odontoblastos funcionais. Assim sendo, apesar de o exato mecanismo envolvendo a diferenciação de odontoblastos não tenha sido determinado, os resultados obtidos são promissores para as aplicações de engenharias teciduais futuras.

Na segunda etapa deste trabalho, estudamos a possibilidade de diferenciação das SHED em células endoteliais. O reparo de tecidos baseado em terapias com células endoteliais tem sido alvo em muitas aplicações, como para a formação de vasos sangüíneos e válvulas cardíacas e para o tratamento de tecidos isquêmicos. Avanços recentes criaram a possibilidade de se usar células progenitoras endoteliais e células-tronco como fonte para as aplicações

terapêuticas, incluindo a vascularização de tecidos criados a partir da engenharia tecidual (Levenberg, 2005).

Um dos princípios fundamentais em engenharia de tecidos recai na necessidade de se manter vascularização no tecido recém-formado suficiente para suportar seu crescimento. Assim, o sucesso das estratégias de engenharia tecidual depende criticamente da extensão de infiltração de vasos sangüíneos nas matrizes biodegradáveis condutivas. Esforços para estimular o crescimento vascular em tecidos produzidos a partir da engenharia tecidual têm sido dirigidos para o desenvolvimento de estratégias com a utilização de fatores de crescimento para induzir a migração e proliferação de células endoteliais e/ou a utilização de células-tronco que possam se diferenciar na linhagem endotelial (Jabbarzadeh et al., 2008). Em nosso estudo, utilizamos esta segunda estratégia, em que SHED foram induzidas por VEGF a se diferenciarem em células endoteliais.

VEGF é amplamente utilizado para induzir a diferenciação endotelial de células-tronco embrionárias e adultas, tanto sozinho ou em combinação com outros fatores de crescimento (Jazayeri et al., 2008; Kano et al., 2005; Oswald et al., 2004; Wosnitza et al., 2007). Ele age por meio da ligação com os receptores específicos, sendo a molécula sinalizadora mais importante envolvida no desenvolvimento inicial dos vasos sangüíneos. Assim, a regulação apropriada do VEGF é crucial para a formação de capilares normais (Carmeliet et al., 1996; Shalaby et al., 1995).

Cada tipo de receptor é responsável por um conjunto de moléculas sinalizadoras controladas de maneira temporal e espacial, as quais dão origem à transdução específica de sinal na membrana plasmática. Além disso, o

desencadeamento do sinal também é determinado pela competição entre os vários receptores pelo VEGF e pela estrutura tridimensional exata formada pelo complexo ligante-receptor-co-receptor, a qual determina a eficácia com que os resíduos de tirosina intracelulares são fosforilados e, subseqüentemente, expostos às moléculas sinalizadoras subjacentes. Todos esses fatores exercem impacto na intensidade e cinética com que vias de sinalização individuais são ativadas e executam suas funções (Cébe-Juarez et al., 2006).

Assim sendo, diferenças na ativação das vias de sinalização induzidas por VEGF em SHED estudadas neste trabalho em comparação com HDMEC já eram esperadas, visto que HDMEC, além de expressar uma quantidade muito grande da forma solúvel do VEGFR-1, também apresenta VEGFR-2. A forma solúvel de VEGFR-1 não é uma proteína transmembrana e não contém o domínio tirosina quinase, não sendo, portanto, capaz de transdução de sinal. Entretanto, ela tem a capacidade de se ligar ao VEGF, regulando negativamente a atividade deste fator de crescimento pela prevenção de sua interação com VEGFR-2 (Karamysheva, 2008). Desta forma, os eventos fosforilativos observados em SHED devem-se à ligação do VEGF com VEGFR-1 e NP-1, enquanto que em HDMEC, há também uma interação com outros dois receptores (VEGFR-2 e VEGFR-1 solúvel). Assim, a resposta ao VEGF pareceu ocorrer mais rapidamente (15 a 30 minutos após o estímulo) em HDMEC do que em SHED, principalmente em relação às vias de STAT3 e ERK. Nossa hipótese é de que tal diferença esteja intimamente relacionada à ligação do VEGF aos diferentes receptores, resultando na transdução de sinais ao núcleo da célula e ultimamente influenciando o comportamento celular diferentemente de SHED e HDMEC.

A formação de vasos sangüíneos envolve vias sinalizadoras e regulatórias que não foram completamente elucidadas. Contudo, pesquisas nessa área têm fornecido um melhor entendimento deste processo (Levenberg, 2005).

STAT3 tem um papel essencial na manutenção da capacidade de auto-renovação de células-tronco embrionárias, sendo que a ausência de sua ativação induz à diferenciação celular (Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998). Em nosso trabalho, a função de STAT3 não foi determinada em SHED, mas observamos uma diminuição de sua fosforilação sob estímulo do VEGF. Se em SHED esta molécula tiver função semelhante à observada em células-tronco embrionárias, esta ausência de ativação poderá ser um evento importante para a diferenciação das células.

A ativação de ERK nas células endoteliais medeia eventos proliferativos (Zhang et al., 2008; Takahashi et al., 2001) e promove a sobrevivência celular e a ramificação de capilares (Mavria et al., 2006). Nas SHED, a ativação de ERK pelo VEGF provavelmente não está relacionada à proliferação celular, visto que, apesar de aumento da fosforilação de ERK após estímulo por VEGF, o uso deste fator de crescimento não alterou a taxa de proliferação das células mantidas em cultura. Esta é uma das importantes diferenças em relação às células já diferenciadas. Contudo, vale ressaltar que células endoteliais apresentam VEGFR-2, e que as vias de sinalização ativadas por VEGFR-1 são pouco caracterizadas, e apenas efeitos proliferativos e migratórios fracos são mediados por este receptor (Cébe-Juarez et al., 2006). Além disso, células-tronco embrionárias de camundongo mostraram alta atividade de ERK quando estimuladas a se diferenciarem, sendo que a supressão desta via promoveu a

auto-renovação destas células (Burdon et al., 1999; Liu et al., 2007). Xu et al. (2008) observaram que a ativação sustentada por até 14 dias de ERK é necessária para a diferenciação de células-tronco da medula óssea em células endoteliais. Nossa análise das vias de sinalização restringiu-se à primeira hora após o estímulo com VEGF, mas, em estudos futuros, seria importante a verificação destas vias por um período maior.

Nas células endoteliais, AKT é ativado por uma variedade de estímulos e regula múltiplas etapas críticas na angiogênese, incluindo a sobrevivência celular, migração e formação de estruturas capilares (Shiojima, Walsh, 2002). Da mesma forma, essa via de sinalização foi relacionada à sobrevivência, mitogênese e migração de células progenitoras endoteliais (Qi et al, 1999). Mukherjee e Rotwein (2009) demonstraram que a ativação de AKT constitui parte do programa molecular necessário para provocar a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos.

Conforme observado em SHED e em HDMEC, as vias STAT3 e ERK tiveram eventos fosforilativos antagônicos simultâneos, sugerindo-se possível comunicação entre elas. Liu et al. (2007) relataram que o sinal de MAPK-ERK pode ser um mecanismo de regulação negativa para STAT3. Contudo, estas são apenas especulações, visto que apenas por meio de experimentos com a utilização de inibidores específicos dessas vias de sinalização ou pela transdução celular para silenciamento de STAT3, ERK ou AKT, por exemplo, seria possível se especificar as funções celulares relacionadas a elas.

O entendimento das vias de sinalização celular relacionadas ao processo de diferenciação de células-tronco em células endoteliais bem como a possibilidade de manipulação das condições do meio de modo que tais vias

sejam ativadas ou bloqueadas serão fundamentais para se poder controlar os mecanismos necessários para se guiar o destino celular. Apesar do nosso conhecimento limitado atual, certamente os mecanismos moleculares que dão origem às propriedades únicas das células-tronco serão desvendados e, então, estes poderão ser explorados como ferramentas poderosas nas descobertas básicas e aplicações clínicas (Liu et al., 2007).

O conceito de crescimento de células endoteliais em matriz de colágeno surgiu da observação de que, *in vivo*, células endoteliais estão constantemente em contato com componentes da matriz extracelular. Assim, para que essas células apresentem um fenótipo mais semelhante ao observado *in vivo*, elas precisam estar rodeadas de matriz extracelular (Deltos et al., 1982). Como o colágeno é o principal componente da matriz extracelular, pesquisadores decidiram semear células endoteliais em matrizes de colágeno e notaram mudança drástica na sua morfologia, de forma que se assemelhavam à microvasculatura *in vivo* (Deltos et al., 1982; Montesano et al., 1983).

A formação de tubos é um processo complexo que requer a vacuolização das células em cultura, o que se acredita ser específico de células endoteliais (Hirsch et al., 2008). Desta forma, ensaios *in vitro* para a formação de estruturas tubulares têm sido utilizados para revelar o potencial endotelial de populações específicas de células (Hirsch et al., 2008). Em nosso estudo, observou-se a formação de diversas estruturas tubulares quando SHED foram semeadas em colágeno, mas um número maior pôde ser detectado quando as células foram tratadas com VEGF. Além disso, como observada nas fotos, parte das estruturas estavam desfocadas, indicando que segmentos das estruturas tubulares estavam em um diferente plano devido à

natureza tridimensional dos vasos. Contudo, testes mais rigorosos do verdadeiro potencial de diferenciação celular são necessários, tais como a detecção de marcadores específicos e a aplicação em modelos *in vivo*.

No experimento de diferenciação de SHED em células endoteliais sob estímulo do VEGF, observou-se que as células adquiriram marcadores específicos ao longo do tempo, o que sugere que os marcadores endoteliais são expressos em etapas seqüenciais, conforme já observado por Kim et al. (2008). Assim, VEGFR-2 mostrou-se um marcador de diferenciação inicial, seguido de CD31 e caderina-VE, a qual pode ser considerada um marcador de células mais maduras, totalmente diferenciadas (Kim et al., 2008). Vale ressaltar que, *in vivo*, as células liberam VEGF no local em que se localizam de maneira bem controlada, tanto espacial como temporalmente, o que permite a formação de complexos ligante-receptor. Isto difere significativamente dos modelos de cultura de células, onde fatores de crescimento são administrados de uma única vez, o que requer grande cautela na extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para situações *in vivo* (Cébe-Juarez et al., 2006).

Diversos modelos animais têm sido utilizados para se testar o potencial endotelial de prováveis células progenitoras ou células-tronco, tais como a implantação de células de interesse em matrizes poliméricas condutivas no dorso de camundongo. Tais modelos são úteis para se determinar se uma população-alvo específica pode contribuir para neovascularização de um determinado tecido. Para esse propósito, é imperativo que a população-alvo seja distinguível de células vasculares do hospedeiro, permitindo-se determinar se as prováveis células progenitoras incorporaram-se na vasculatura existente, bem como quantificar a que extensão isso ocorreu. Uma das formas utilizadas

é a marcação genética das células progenitoras que serão implantadas no animal (células que expressam LacZ ou GFP, por exemplo). A marcação das células permite a análise microscópica posterior da vasculatura existente no local do implante para se determinar se houve a incorporação das células marcadas na camada do endotélio ou de células murais dos vasos sanguíneos (Hirsch et al., 2008).

Para aplicações de engenharia tecidual, é importante o conhecimento da seqüência de eventos que ocorrem ao longo do tempo e que levam à formação de vasos funcionais. A presença de estruturas semelhantes a vasos marcadas pela coloração x-gal, diferenciadas a partir das SHED-Lacz, e sem a presença de células sanguíneas no seu interior sugere que estas ainda não se anastomosaram com os vasos sanguíneos do camundongo para reestabelecer o fluxo de oxigênio e nutrientes.

Malero-Martin et al. (2007) observaram em análises ao longo do tempo de implantes contendo uma mistura de células progenitoras endoteliais e de músculo liso da veia safena que as células pareciam dispersas no implante até o dia 2, organizavam-se em estruturas tubulares sem células sanguíneas até o dia 4, e formavam vasos funcionais, contendo glóbulos vermelhos até o dia 7. Em nosso estudo, a ocorrência tardia da formação de vasos e a ausência de fluxo sanguíneo até o dia 21 podem estar relacionadas com a presença da matriz de PLLA, a qual deve ser reabsorvida e substituída por um tecido funcional, com a necessidade de diferenciação das células na linhagem endotelial, visto que implantamos células-tronco e não células precursoras endoteliais, e com a disponibilização de fatores de crescimento, como o VEGF, de maneira não controlada. Acreditamos que, se os implantes tivessem sido

deixados por um tempo maior do que 21 dias, talvez tivesse sido possível detectar vasos sangüíneos com fluxo de sangue no seu interior.

É importante salientar que a existência de células marcadas na camada de células endoteliais por si só não é indicativa de diferenciação em células endoteliais funcionais. A fim de se demonstrar que a alteração fenotípica ocorreu *in vivo*, é crítico se avaliar a expressão de genes e/ou proteínas indicativos de células endoteliais maduras e funcionais, tais como caderina-VE, VEGFR-2 e CD31, entre outros (Hirsch et al., 2008). Assim, reconhecemos que um dos pontos fracos deste trabalho foi a ausência de comprovação, por meio de técnica imunohistoquímica, por exemplo, de que as estruturas marcadas em azul (células que expressam β -galactosidase) também apresentariam os marcadores de células endoteliais. Contudo, apesar de nossa análise restringir-se apenas à observação do fenótipo (características morfológicas) das estruturas marcadas, acreditamos que esta não é uma especulação infundada, visto que Cordeiro et al. (2008) observaram a presença de vasos funcionais utilizando a mesma metodologia que a empregada neste trabalho.

Apesar da impossibilidade de se controlar a liberação de fatores de crescimento no local dos implantes, sugere-se que a hipóxia relativa gerada localmente estimulou a expressão de VEGF, presumivelmente através da ativação do fator induzível de hipóxia 1 alfa. Esse fator transcricional é conhecido por estimular a expressão de VEGF e iniciar a cascata angiogênica nos tecidos em hipóxia (Maxwell, Ratcliffe, 2002; Marti, 2005; Bao et al., 2008), resultando na ramificação vascular em direção à área hipóxica (Srisuwan et al., 2006).

Alternativamente, sabe-se que a matriz dentinária contém VEGF e que este fator de crescimento é bioativo quando liberado (Roberts-Clark, Smith, 2000). Portanto, as atividades funcionais potenciais dos fatores de crescimento seqüestrados na matriz dentinária parecem ser extensas. Além da indução da diferenciação de odontoblastos, conforme descrito anteriormente, essas moléculas podem sinalizar a proliferação, a migração e a diferenciação celular na polpa. Assim, a presença de fatores angiogênicos pode ser importante na estimulação da formação de novos capilares nos locais de reparo. Deve ser reconhecido, entretanto, que as células estão sendo expostas a um coquetel de fatores de crescimento, os quais podem levar a interações complexas e respostas celulares diversas. Tais respostas podem não ser facilmente previsíveis com base apenas na somatória de atividades conhecidas de fatores de crescimento individuais (Smith, 2003).

Após observar que SHED responde ao estímulo do VEGF por meio da formação de estruturas tubulares e da diferenciação em células endoteliais *in vitro*, decidimos checar a importância dos receptores presentes nesta célula (VEGFR-1 e NP-1) para o desencadeamento das respostas observadas. Para isto, silenciámos individualmente tais receptores em SHED e as estimulamos com VEGF. Inicialmente, verificamos as alterações ocorridas nas vias de sinalização celular nas células silenciadas em comparação àquelas utilizadas como controle. Interessantemente, o padrão de fosforilação de STAT3 e AKT nas células transduzidas com shRNA-VEGFR-1 foi diferente daquele observado nas células com shRNA-controle, enquanto que, para as células transduzidas com shRNA-NP-1, a única via estudada que se mostrou alterada em relação às células controle foi a de ERK.

A análise das vias de sinalização celular neste trabalho permitiu obter apenas dados preliminares, os quais merecem um estudo mais aprofundado para se poder determinar a função de tais vias em SHED e verificar sua importância na diferenciação destas células. Até o presente momento, nenhuma conclusão pode ser tomada com base nestes resultados.

Nos ensaios de proliferação de capilares, ficou evidente a importância do receptor VEGFR-1 na formação das estruturas tubulares observada quando as SHED são cultivadas em colágeno, visto que a capacidade de formação dessas estruturas foi praticamente insignificante quando houve o silenciamento deste receptor (shRNA-VEGFR-1), independente de qualquer tratamento com VEGF. Diferentemente, SHED transduzidas com shRNA-NP-1 comportaram-se de forma semelhante às células controles (shRNA-controle) quando mantidas sem tratamento, ou seja, foram capazes de formação das estruturas tubulares em um ritmo lento. Já quando estimulada por VEGF, houve uma intensificação da formação das estruturas, mas não em ritmo suficiente para atingir os níveis observados nas células controles. Estes resultados sugerem que o receptor VEGFR-1 exerce papel fundamental na capacidade de formação das estruturas tubulares em SHED, e que esta função é aumentada em função da habilidade de interação do VEGF com o co-receptor NP-1. Adicionalmente, observou-se que o silenciamento destes receptores não teve qualquer influência na taxa de proliferação das células.

Embora a engenharia de vasos sangüíneos constitua grande promessa para as aplicações terapêuticas em diversas áreas, desde a produção de vasos isolados ou de uma rede vascular até a neovascularização *in vivo* de vários tecidos, ainda existem diversos desafios que precisam ser enfrentados antes

que esses métodos possam ser utilizados para o tratamento de doenças e regeneração de tecidos perdidos (Levenberg, 2005).

Em nosso estudo, usamos fatias de dentes com apenas um milímetro de espessura para começar a entender o potencial de SHED nas aplicações de engenharia pulpar. Obviamente, a translação desta estratégia para a clínica irá requer testes animais adicionais, o desenvolvimento de modelos *in situ* e a habilidade de se fabricar um tecido em toda a extensão do canal radicular para as pesquisas clínicas. Contudo, estamos otimistas de que tecnologia igual ou semelhante à empregada neste estudo poderá eventualmente fornecer ferramentas clínicas para tratamentos endodônticos que visem à regeneração de um tecido pulpar completo e formação de tecido dentinário num futuro não muito distante.

----- *Conclusões*

6- CONCLUSÕES

A análise conjunta dos dados obtidos permite sugerir que:

- I. SHED pode ser estimulada a se diferenciar em odontoblastos funcionais;
 - a. SHED produz tecido mineralizado decorrente da enzima fosfatase alcalina *in vitro* quando estimulada com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato;
 - b. *In vivo*, após a diferenciação de SHED em odontoblastos, há a formação progressiva de estrutura mineralizada semelhante à dentina.

 - II. VEGF auxilia na indução da diferenciação de SHED em células endoteliais;
 - a. VEGF estimula um aumento da fosforilação de ERK e AKT e diminuição da fosforilação de STAT3 em SHED *in vitro*;
 - b. VEGF estimula a formação de estruturas tubulares e diferenciação de SHED em células endoteliais, mas não a proliferação e migração de SHED;
 - c. SHED-LacZ são capazes de se diferenciar em células endoteliais *in vivo*.
-

----- *Referências*
Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res*. 2000;258(1):33-41.
 2. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*. 2005;321(3):391-400.
 3. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006;13(7):611-20.
 4. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(8):1367-73.
 5. Azari F, Vali H, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Croisy A, Sears SK, Tabrizian M, McKee MD. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Struct Biol*. 2008;162(3):468-79.
 6. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res*. 2008 May 12. [Epub ahead of print]
 7. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976-81.
 8. Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8352-7.
 9. Beertsen W, van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*. 1992 Jun;89(6):1974-80.
 10. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*. 1991;14(1):27-40.
 11. Beltz RE, Torabinejad M, Poursmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod*. 2003;29(5):334-7.
-

12. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
 13. Bicknell R, Harris AL. Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:219-38
 14. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-41.
 15. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007;102(6):1358-67.
 16. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnürc H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 1996;87(2):630-41.
 17. Brey EM, Uriel S, Greisler HP, McIntire LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. *Tissue Eng*. 2005;11(3-4):567-84.
 18. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 1999;210(1):30-43.
 19. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):169-79.
 20. Carlile MJ, Sturrock MG, Chisholm DM, Ogden GR, Schor AM. The presence of pericytes and transitional cells in the vasculature of the human dental pulp: an ultrastructural study. *Histochem J*. 2000;32(4): 239-45.
 21. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435-9.
 22. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(5):601-15.
 23. Conchie JM, Munroe JD, Anderson DO. The incidence of staining of permanent teeth by the tetracyclines. *Can Med Assoc J*. 1970;103(4):351-6.
 24. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
-

-
25. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004; 112(7-8): 402-12.
 26. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007;14(6):1162-71.
 27. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997;151(3):671-7.
 28. Delvos U, Gajdusek C, Sage H, Harker LA, Schwartz SM. Interactions of vascular wall cells with collagen gels. *Lab Invest.* 1982;46(1):61-72.
 29. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004;83(7):523-8.
 30. Dutta D, Ray S, Vivian JL, Paul S. Activation of the VEGFR1 chromatin domain: an angiogenic signal-ETS1/HIF-2alpha regulatory axis. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25404-13.
 31. Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration. *Head Face Med.* 2006;2:16.
 32. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5141-6.
 33. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
 34. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25(4):581-611.
 35. Fons P, Herault JP, Delesque N, Tuyaret J, Bono F, Herbert JM. VEGF-R2 and neuropilin-1 are involved in VEGF-A-induced differentiation of human bone marrow progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2004;200(3):351-9.
 36. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100(1):143-55.
-

37. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*. 2000;275:26690-5.
 38. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27.
 39. Gonçalves SB, Dong Z, Bramante CM, Holland GR, Smith AJ, Nör JE. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. *J Endod*. 2007;33(7):811-4.
 40. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006 May;27(14):2865-73.
 41. Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, de Figueiredo JA, Nör JE, de Araujo FB, Fossati AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod*. 2007;33(5):524-30.
 42. Gronthos S, Brahini J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
 43. Gronthos S, Mankani M, Brahini J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
 44. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*. 1999;147(1):105-20.
 45. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*. 2008;34(7 Suppl):S51-6.
 46. He G, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:240-5.
 47. Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Matsumura K, Kawasaki K, Shibuya M, Nishikawa SI. A chemically defined culture of VEGFR2⁺ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. *Blood*. 2003;101(6):2261-7.
 48. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(9):1584-95.
-

-
49. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, van Oosteron AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80.
 50. Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005 Jun;68(2):89-101.
 51. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32(11):1066-73.
 52. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 2006b;324(2):225-36.
 53. Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* 1993;274(3):429-37.
 54. Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T. Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 2005;19(3):371-8.
 55. Iinuma Y, Suzuki M, Yokoyama M, Tanaka-Nakamura Y, Ohtaishi N. Daily incremental lines in sika deer (*Cervus nippon*) dentine. *J Vet Med Sci.* 2002;64(9):791-5.
 56. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004;83(8):590-5.
 57. Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, Lv Q, Nair LS, Doty SB, Laurencin CT. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(32):11099-104.
 58. Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri SH, Piryaee A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2008;32(10):1183-92.
-

59. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K, Miyazawa K. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 16):3759-68.
 60. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73(7):751-62.
 61. Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol.* 1993;38(9):769-77.
 62. Kawasaki K, Tanaka S, Ishikawa T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat.* 1977 Apr;123(Pt 2):427-36.
 63. Kawasaki K. On the configuration of incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat.* 1975;119(1):61-6.
 64. Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I. Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet.* 1998;22(4):374-85.
 65. Kim GD, Kim GJ, Seok JH, Chung HM, Chee KM, Rhee GS. Differentiation of endothelial cells derived from mouse embryoid bodies: A possible in vitro vasculogenesis model. *Toxicol Lett.* 2008;180(3):166-73.
 66. Larmas M. Pre-odontoblasts, odontoblasts, or "odontocytes". *J Dent Res.* 2008;87(3):198.
 67. Levenberg S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotech.* 2005;16(5):516-23.
 68. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4391-6.
 69. Liu J, Jin T, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2005;41(7):232-8.
 70. Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 May;211(2):279-86.
-

-
71. Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*. 1988;103(Suppl): 155-69.
 72. Marti HH. Angiogenesis--a self-adapting principle in hypoxia. *EXS*. 2005;(94):163-80.
 73. Masatomi Y, Nakagawa Y, Kanamoto Y, Sobue S, Ooshima T. Effects of serum phosphate level on formation of incisor dentine in hypophosphatemic mice. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(4):182-7.
 74. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*. 1999;18(15):4261-9.
 75. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res*. 2000;79(8):1596-603.
 76. Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, Paterson H, Karasarides M, Marais R, Bird D, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(1):33-44.
 77. Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(1):29-37.
 78. Melero-Martin JM, Zhan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007;109(11):4761-8.
 79. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
 80. Monsonego E, Baumbach WR, Lavelin I, Gertler A, Hurwitz S, Pines M. Generation of growth hormone binding protein by avian growth plate chondrocytes is dependent on cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;135(1):1-10.
 81. Montesano R, Orci L, Vassalli P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol*. 1983;97(5 Pt 1):1648-52.
-

82. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996;12(6):865-8.
 83. Mukherjee A, Rotwein P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 5):716-26.
 84. Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood.* 2005;105(5):1992-9.
 85. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-90.
 86. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 2005;31(10):711-8.
 87. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2003;21(9):1025-32.
 88. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 1998;12(13):2048-60.
 89. Nör JE, Christensen JB, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999;154(2):375-84.
 90. Nör JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle V, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res.* 2000;37(3):209-18.
 91. Nör JE, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, Addison CL, Mooney DJ, Polverini PJ. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest.* 2001;81(4):453-63.
 92. Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent.* 2006;31(6):633-42.
 93. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-71.
 94. Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;315(1-2):51-60.
 95. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
-

-
96. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis - a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*. 2006;44(5):265-74.
 97. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone*. 2002;30(2):377-85.
 98. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:352-66.
 99. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008;34(4):421-6.
 100. Priam F, Ronco V, Locker M, Bourd K, Bonnefoix M, Duchêne T, Bitard J, Wurtz T, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A. New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. *Arch Oral Biol*. 2005;50(2):271-7.
 101. Qi JH, Matsumoto T, Huang K, Olausson K, Christofferson R, Claesson-Welsh L. Phosphoinositide 3 kinase is critical for survival, mitogenesis and migration but not for differentiation of endothelial cells. *Angiogenesis*. 1999;3:371-80.
 102. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006;11:818-29.
 103. Roberts-Clarck DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000;45(11):1013-6.
 104. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*. 2002;16(20):2684-98.
 105. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*. 2004;30(4):205-8.
 106. Sánchez AR, Rogers RS 3rd, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int J Dermatol*. 2004;43(10):709-15.
 107. Santini A, Ivanovic V. The quantification of tertiary dentine formation in response to materials commonly placed in deep cavities in general practice in the UK. *Prim Dent Care*. 1996;3(1):14-22.
-

108. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 1997;89(6):981-90.
 109. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-6.
 110. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):191-9.
 111. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(14):696-704.
 112. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90(12):1243-50.
 113. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007;13(2):151-7.
 114. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):425-37.
 115. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci*. 1998;106 Suppl 1:179-84.
 116. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*. 2002;36(4):223-32.
 117. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ*. 2003;67(6):678-89.
 118. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2127-34.
-

-
119. Song W, Sun Q, Dong Z, Spencer DM, Núñez G, Nör JE. Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. *Gene Ther.* 2005;12(4):320-9.
 120. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, Morrison WA, Messer HM, Thompson EW, Abberton KM. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol 2000.* 2006;41:88-108.
 121. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-78.
 122. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):550-63.
 123. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997;67(2):111-23.
 124. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992 Dec;37(12):1045-55.
 125. Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol.* 1991;114(2):373-84.
 126. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Dent.* 2000;28(2):77-92.
 127. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38(3):314-20.
 128. Väkevä L, Mackie E, Kantomaa T, Thesleff I. Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice. *Anat Rec.* 1990; 228(1):69-76.
 129. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60(2):203-12.
 130. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood.* 1996;88(9):3424-31.
-

131. Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the three-dimensional culture of dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006;39(6):477-83.
 132. Wang L, Dutta SK, Kojima T, Xu X, Khosravi-Far R, Ekker SC, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS ONE*. 2007;2(11):e1161.
 133. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*. 1995 Apr;17(3-4):229-44.
 134. Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2005;181(2):80-8.
 135. Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem*. 2001;276(27):25520-31.
 136. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*. 1994;15(4):439-61.
 137. Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Gräber S, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation*. 2007;75(1):12-23.
 138. Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TC, Masuda Y, Sutherland WH, Schoen FJ, Mayer JE, Bischoff J. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H480-7.
 139. Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K, Liu Z. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2395-406.
 140. Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T, Takakura N. Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood*. 2003;101(5):1801-9.
 141. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):359-72.
-

-
142. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002;81(10):695-700.
 143. 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. *Biol Cell*. 2007 Aug;99(8):465-74.
 144. Zhang W, Frank Walboomers X, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006;27(33):5658-68.
 145. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006;27(33):5658-6.
 146. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):945-57.
 147. Zhang Y, Furumura M, Morita E. Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF 121 and VEGF 165. *Growth Factors*. 2008;26(3):125-31.
-