UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA PAULA FERNANDES

Efeitos de TGF- β 1 em células-tronco pulpare

**BAURU
2015**

ANA PAULA FERNANDES

Efeitos de TGF- β 1 em células-tronco pulpare

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira

Versão Corrigida

BAURU

2015

F391e Fernandes, Ana Paula
 Efeitos de TGF- β 1 em células-tronco pulpares / Ana
 Paula Fernandes. – Bauru, 2015.
 115 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de
Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Dados Curriculares

Ana Paula Fernandes

Nascimento	17 de Abril de 1984
Naturalidade	Jaú – SP
Filiação	Romildo Fernandes Siomara Elisabete Fini
2004 - 2007	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
2008 - 2010	Especialização em Odontopediatria pelo Hospital de Anomalias Craniofaciais de Bauru – HRAC – USP
2010 - 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Mestrado, Área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
2013 - 2014	Professora substituta, Departamento de Clínica e Cirurgia, Disciplina Odontopediatria na Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG
2012 - 2015	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Doutorado, Área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

*"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos".*

Marcel Proust

*D*edicatória

“Teus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.”

Dedico minha tese de doutorado e toda a minha vida aos meus pais **Romildo** e **Siomara**, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pelo amor incondicional e por fazerem o possível e o impossível para que eu pudesse estudar, acreditando na minha capacidade, no meu potencial e nos meus sonhos.

A vocês, eu dedico meu amor eterno, o resultado dos meus esforços, meus estudos, lutas, felicidades e todas as conquistas da minha vida.....

Amo vocês!!!

*“A família não nasce pronta, constrói-se aos poucos,
E é o melhor laboratório do amor e da presença de Deus.”*

Autor Desconhecido

Agradecimento Especial

À professora **Vivien Thiemy Sakai** por ser uma verdadeira mestre no período em que estive em Alfenas. Pude aprender muito com você Vivien, não só como ser uma melhor professora, mas como ser uma pesquisadora. Obrigada por todos os ensinamentos e pelas oportunidades. Jamais chegaria aqui sem sua ajuda!! Obrigada mais uma vez!

E meu agradecimento mais que especial a **Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira**, pelo apoio incondicional durante todo o meu doutorado, depositando sua total confiança e acreditando que eu era capaz. Obrigada por tornar todos esses anos mais leves e tranquilos com sua orientação e conselhos. Digo sempre que você é nossa verdadeira “mãe” aqui na Fob, pois ao mesmo tempo em que sabe nos elogiar e nos motivar, também, sabiamente, nos corrige e nos ajuda a sermos melhores sempre. Você é meu exemplo de luta, de sucesso e de pessoa, obrigada por iluminar meus dias, minha conquista é mais do que sua!!!! Obrigada, Obrigada e Obrigada!!!!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** pela sua presença em todos os momentos da minha vida, me dando paz, saúde, força e conforto nos momentos difíceis. A Ele também agradeço por ter me abençoado com pais tão maravilhosos e dedicados, meus exemplos de honestidade, força e dignidade.

Agradeço também ao meu irmão **João Paulo** pela sua presença e dedicação. A minha cunhada **Gabi**, pela amizade, compreensão e conversas.

Ao meu namorado, **Fred**, que dividiu comigo os dias dessa jornada, me apoiando e principalmente tendo muita paciência nos momentos difíceis e de total ausência minha. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial, na minha capacidade e na minha garra, me ajudando a ver “além do que os olhos podem ver” e sempre me fazendo acreditar que há uma luz no fim do túnel. Obrigada pelo seu amor e principalmente pela sua amizade.

Aos meus queridos amigos: **Elaine Marangoni, Raquel e Thiago, Ricardo Nicola, Michele e Rodrigo Diman, Liz Dini, Fernanda Miyahara, Bruna Centurion, Carol Ortigosa, Mônica Garcia e Vanessa Tessarolli** por sempre torcerem pelo meu sucesso e minhas conquistas.

Aos meus amigos especiais: **Lidiane, Leandro Araújo, Marina Junqueira, Eliana Rodrigues Rosselli, Nádia Teixeira Marques: “Nadets”, Fabrícia Goulart, Michele Fernandes, Marielle Pereira e Vivien Sakai** que estiveram comigo nessa jornada. Obrigada pelo convívio, pelo apoio, conversas e conselhos.

À minha querida amiga **Paulinha**, pela verdadeira amizade construída, obrigada por tornar esta etapa mais prazerosa dividindo comigo minhas angústias, preocupações e desabafos. Vou levar você pra sempre comigo.

Aos meus colegas de laboratório da Unifal: **Fábio Colombo, Juliana, “Dudinha”, Rayssa, Amanda Ribas, Daniela Vieira e Simone Lamartine** por tornarem meus dias no laboratório tão alegres e divertidos.... por me acolherem e cederem um cantinho no laboratório e principalmente na rotina de vocês. Obrigada por me fazerem sentir tão em casa quando estava lá com vocês. Ao Fábio pela paciência em ensinar “a dentista” como você dizia, a ser mais bióloga.... Obrigada por todo apoio, por todos os ensinamentos e também pelas suas piadas horrorosas, mas que me faziam rir. Sinto muita falta do convívio diário com vocês!

Aos meus colegas do laboratório de Farmácia da FOB: **Carol Morandini, Bella e Tiago Dionísio**, por me ajudarem nos meus primeiros passos na vida de cultura celular. Obrigada por todo o tempo dedicado e por todos os ensinamentos. Em especial ao professor **Carlos Ferreira dos**

Santos, pela confiança e por permitir que eu desenvolvesse minha primeira pesquisa com células em seu laboratório, fazendo me sentir o mais a vontade possível.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação: **Luciana Vitor, Karina Laskos, Bianca Mello, Fernanda Veronese, Tati Kobayashi, Natalino, Priscilla Gonçalves, Gabriela Oliveira e Máisa Jordão** pelo incentivo durante todo esse período.

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.”

Vinícius de Moraes

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas, por todo o apoio e amizade enquanto estive em Alfenas. Obrigada por abrirem as portas nesse momento em que estive longe de casa e da minha família. Em especial, o meu muito obrigada, ao professor **Edmêr Silvestre Pereira Júnior** e **Ana Beatriz da Silveira Moretti**, aos professores **Marcos José Marques** e **Luiz Cosme Cotta Malaquias** da biologia, professoras **Marília Pereira** e **Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão** da bioquímica, professora **Elisângela Monteiro Pereira** e **Marisa Ionta**, professora **Francisca Isabel Ruela**, professor **Carlos Eduardo Carlitos** e **João Adolfo Hanemann**. Toda ajuda de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Às funcionárias da odontopediatria da Unifal: **Luzia**, **Mônica** e **Sônia** e ao **Gabriel Moraes** técnico do departamento de bioquímica por toda ajuda.

Aos **alunos da Unifal**, meus primeiros alunos, em que tive a honra e a oportunidade de lecionar a área que mais gosto em minha vida, odontopediatria. Muitos se tornaram verdadeiros amigos que guardarei pra sempre em meu coração. Nunca esquecerei o carinho com que foi recebida por vocês. Obrigada.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da FOB – USP, por serem verdadeiros mestres e amigos.

Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva, sempre dedicada, atenta e pronta a ensinar.

Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado pelo seu total apoio e incentivo ao meu doutorado e à minha pesquisa, sem isso jamais conseguiria tamanha experiência, maturidade e os resultados obtidos, você foi essencial para minha conquista, muito obrigada.

Profa. Dra. Daniela Rios exemplo de dedicação e esforço. Obrigada por todos os ensinamentos.

Prof. Thiago Cruvinel da Silva por todo seu apoio e auxílio.

Aos **Professores Ruy César Abdo Camargo** e **José Eduardo de Oliveira Lima** que, com suas enormes experiências só enriqueceram meu caminhar.

Meu muito obrigado aos funcionários do Departamento de Odontopediatria: **Lia, Liliam, Estela, Lou, Evandro** e **Alexandre** por toda ajuda, doação e boas intenções.

As minhas mais que queridas professoras do Centrinho, verdadeiras mães e responsáveis por tudo o que sei sobre clínica de odontopediatria: **Marcinha, Bia, Cleidinha, Gisele** e **Lucimara**. Minha saudade de vocês é constante e eterna, obrigada por tudo.

Aos meus amigos do centrinho que, mesmo distante eu sei que o carinho e a amizade sempre permanecerão: **Helize Ane, Thaieny, Marcos** e **Biazinha**.

As minhas queridas amigas, auxiliares do centrinho, **Ana Maria** e **Cleusa** fundamentais em toda minha especialização em odontopediatria. Vocês se tornaram verdadeiras amigas, meu carinho por vocês é enorme!!!

Aos **funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB- USP por todas as orientações dadas.

Ao **Daniel Selmo (Bonné)**, por todo cuidado com a formatação e impressão dessa tese.

À agência **CAPES/CNPq** pelo financiamento do meu projeto.

À **banca examinadora**, pelo aceite do convite, presença e contribuição para a correção e finalização dessa tese.

Muito Obrigada!!!

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
Nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

Esopo

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos de diferentes concentrações do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) em células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), com relação à viabilidade, proliferação, migração e diferenciação celular. As SHED foram mantidas em meio de cultura MEM α + soro fetal bovino (FBS) 10% + penicilina e estreptomicina 1% e tratadas com TGF- β 1 na concentração de 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL. Após 1, 3, 5 e 7 dias, foram avaliadas a viabilidade celular pelo método MTT e a proliferação pelo método SRB. Após 24 h de tratamento com TGF- β 1, foi realizado um ensaio de migração celular por meio de insertos com poros de 8 μ m. Para a avaliação da diferenciação celular de SHED em odontoblastos foram analisados por meio da RT-PCR os marcadores DSPP e DMP-1, após tratamento com TGF- β 1 nas diferentes concentrações por 14 dias. Os resultados foram submetidos à ANOVA seguido do teste de Tukey. Em relação à viabilidade celular, as diferentes concentrações de TGF- β 1 não tiveram efeito citotóxico sobre SHED. As células tratadas com diferentes concentrações de TGF- β 1 apresentaram maiores taxas de proliferação que as do controle negativo (MEM α + 10% de FBS) a partir do 3º dia ($p=0,000$). Observou-se maiores taxas de migração em direção aos meios contendo TGF- β 1, mas sem diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações utilizadas, entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de TGF- β 1 com o controle positivo ($p=0,000$), controle negativo ($p=0,000$) e entre o controle positivo e negativo ($p=0,002$). A expressão de DMP-1 foi observada de forma crescente nas doses de 1,0 e 5,0 ng/mL de TGF- β 1 ao longo do período (1, 7 e 14 dias) e na dose de 10,0 ng/mL a marcação foi mais intensa desde o primeiro dia do estímulo. Em relação à expressão de DSPP, o grupo tratado com 10,0 ng/mL apresentou marcação após 14 dias de tratamento. Sendo assim, este estudo permite concluir que as diferentes concentrações de TGF- β 1 estimularam a proliferação e migração celular, sem efeito citotóxico sobre as células ao longo do período do estudo. Em relação à diferenciação celular a concentração 10,0 ng/mL de TGF- β 1 estimulou a expressão de DMP-1 e DSPP.

Palavras-chave: odontoblastos, células-tronco, fator de crescimento transformador beta.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) in stem cells derived from the pulp of human exfoliated deciduous teeth (SHED) regarding to cell viability, proliferation, migration and differentiation. SHED were maintained in MEM α culture medium + 10% fetal bovine serum (FBS) + 1% penicillin and streptomycin, and treated with TGF- β 1 at the following concentrations of 1.0; 5.0 and 10.0 ng/mL. After 1, 3, 5 and 7 days, cell viability was assessed by MTT assay and proliferation by the SRB method. After 24h of TGF- β 1 treatment, cell migration assay was carried out using inserts of 8 μ m pore size. To evaluate SHED differentiation into odontoblasts, DMP-1 and DSPP markers were analyzed by RT-PCR, after treatment at different concentrations of TGF- β 1 for 14 days. The results were submitted by ANOVA and Tukey test. With respect to cell viability, the different TGF- β 1 concentrations did not have cytotoxic effect on SHED. The cells treated by different TGF- β 1 concentrations showed higher proliferation rates than those of the negative control (MEM α + 10% FBS) after the third day ($p = 0.000$). Higher rates of migration towards the media containing TGF- β 1 were observed, but there were no statistically significant differences among the concentrations. All different TGF- β 1 concentrations showed statistically significant differences with the positive control ($p=0.000$) and negative control ($p=0.000$). Statistically significant differences were observed between positive and negative control ($p=0.002$). DMP-1 expression was observed incrementally at TGF- β 1 concentrations of 1.0 and 5.0 ng/mL at 1, 7, and 14 days and the concentration of 10.0 ng/mL was more intense from day one of the stimulus. DSPP expression was more intense after 14 days of treatment with the concentration of 10.0 ng/mL. Thus, this study concluded that different TGF- β 1 concentrations stimulated cell proliferation and migration, without cytotoxic effect on the cells throughout the study period. From the perspective of cell differentiation, TGF- β 1 concentration of 10.0 ng/mL was capable of stimulating DMP-1 and DSPP expression.

Key-words: odontoblasts, stem cells, transforming growth factor beta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figuras

- Figura 1** – Meio de cultura MEMa utilizado para o cultivo de SHED após suplementação com 10% FBS e 1% penicilina e estreptomicina 59
- Figura 2** – Aspecto das SHED visualizadas em microscópio invertido. 59
- Figura 3** – Reagente colorimétrico de MTT utilizado para o ensaio de viabilidade de SHED 63
- Figura 4** – Reagente DMSO utilizado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no ensaio de viabilidade de SHED 63
- Figura 5** – Aspecto da placa de 96 poços após metabolização do reagente MTT pelas SHED e adição do reagente DMSO para leitura em espectrofotômetro no ensaio de viabilidade de SHED 63
- Figura 6** – Aparelho de Espectrofotômetro utilizado para as leituras das absorbâncias nos ensaios de viabilidade, proliferação e migração de SHED 63
- Figura 7** – Insertos com poros de 8 μ m utilizados no ensaio de migração de SHED 67
- Figura 8** – Insertos posicionados sobre os poços na placa de 24 poços no ensaio de migração de SHED 67
-
-

Figura 9 – Fluorescência emitida após adição de 50 µL de Cell Tracker TM Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 20 µM por poço, durante o ensaio de migração de SHED	69
Figura 10 - Viabilidade de SHED tratadas com diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 1, 3, 5 e 7 dias e avaliadas pela técnica do MTT.....	76
Figura 11 – Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 1, 3, 5 e 7 dias e avaliadas pela técnica SRB.....	78
Figura 12 – Comparação das taxas de migração de SHED em direção ao meio de cultura sem FBS (barras à esquerda) ou suplementado com 10% de FBS (barras à direita) contendo diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ou aos meios de cultura utilizados como controle positivo (20% de FBS) ou controle negativo (sem FBS)	79
Figura 13 – Comparação dos níveis de expressão do gene constitutivo GAPDH: 683 pb (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e dos marcadores de células odontoblásticas DSPP: 181 pb e DMP-1: 213 pb em SHED por meio de RT-PCR, após estímulo com diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL), não tratadas (controle negativo) e controle positivo (odontoblasto) após 1, 7 e 14 dias	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g	Grama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
nm	Nanometro
µM	Micromolar
x g	Força gravitacional ou RCF (força centrífuga relativa)
Akt	Proteína quinase B
BMMSC	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
BMPs	Proteína morfogenética óssea
cDNA	DNA complementar
CD-31	Antígeno de superfície
DNase	Enzima desoxirribonuclease
DFSC	Células-tronco do folículo dentário
DMP-1	Proteína 1 da matriz dentinária
DPSC	Células-tronco de dentes permanentes
DSP	Sialoproteína de dentina
DSPP	Sialofosfoproteína de dentina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ESC	Células-tronco embrionárias
FBS	Soro fetal bovino
IDPSC	Células-tronco de dentes permanentes imaturos

<i>In vitro</i>	No laboratório
<i>In vivo</i>	No ser humano
LED	Light emitting diode
MEMα	Meio essencial mínimo alfa
MSC	Células-tronco mesenquimais
MTT	Teste colorimétrico de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico
OPN	Osteopontina
pb	Pares de base
PDLSC	Células-tronco de ligamento periodontal dentário
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Enzima ribonuclease
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SHED	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
SCAP	Células-tronco da papila apical dentária
SRB	Teste colorimétrico de Sulforrodamina B
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)	29
2.2	Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1)	42
2.3	Marcadores de diferenciação odontoblástica	48
3	PROPOSIÇÃO	53
4	METODOLOGIA	57
4.1	Cultura de Células	59
4.2	Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- β 1)	61
4.3	Ensaio de Viabilidade Celular – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).....	61
4.4	Ensaio de Proliferação Celular – SRB (Sulforrodamina B)	65
4.5	Ensaio de Migração Celular	65
4.6	Avaliação da Diferenciação Celular por RT-PCR	71
4.7	Análise Estatística	72
5	RESULTADOS.....	73
5.1	Ensaio de Viabilidade Celular – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).....	75

5.2	Ensaio de Proliferação Celular – SRB (Sulforrodamina B).....	76
5.3	Ensaio de Migração Celular	78
5.4	Avaliação da Diferenciação Celular por RT-PCR	79
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO	107
	APÊNDICE.....	111

FOB - USP

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A odontologia clínica tem utilizado abordagens regenerativas para o tratamento de tecidos dentários e, com o advento da engenharia tecidual, a mesma vem avançando na utilização da regeneração como princípio adicional ao tratamento dentário. A engenharia de tecidos (ET) no ramo da odontologia surgiu com o intuito de reparar estruturas dentárias perdidas e, talvez, substituir até mesmo por completo toda a estrutura dentária. Embora haja ainda grandes obstáculos a superar antes que tais estratégias avancem para a prática clínica e sejam utilizadas rotineiramente, as evidências sugerem que a substituição de tecidos dentários perdidos terá um lugar importante no futuro da odontologia.

A engenharia de tecidos corresponde a uma ciência multidisciplinar que agrega conhecimentos de biologia, engenharia e ciências clínicas para o desenvolvimento de novos tecidos e órgãos (NÖR, 2006), constituindo uma promessa como um método para reparar defeitos congênitos e/ou tecidos doentes (WU et al., 2004; MELERO-MARTIN et al., 2007; DEMARCO et al., 2011). 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 das estratégias da ET é semear essas células em uma matriz biodegradável com propriedades mecânicas desejáveis e, em seguida, com o estímulo do crescimento celular e diferenciação *in vitro*, implantá-las *in vivo* para permitir uma remodelação e maturação em um tecido totalmente funcional (WU et al., 2004).

As células indiferenciadas são geralmente células-tronco, que apresentam diferentes graus de potência e plasticidade, bem como capacidade de auto-renovação e diferenciação em multi-linhagens celulares. Existem duas categorias básicas de células-tronco classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação: células-tronco embrionárias (ESC) e células-tronco mesenquimais (MSC). As células-tronco pós-natais isoladas a partir do tecido dentário são caracterizadas em cinco tipos: células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC), células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) e dentes permanentes imaturos (IDPSC), células-tronco de ligamento periodontal dentário (PDLSC); células-tronco da papila apical dentária (SCAP) e células-tronco de folículo dentário (DFSC) (DEMARCO et al., 2011).

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 (CORDEIRO et al., 2008; SAKAI et al., 2010; DEMARCO et al., 2011; SAKAI et al., 2011; TELLES et al., 2011).

A polpa dentária é um tecido mesenquimal altamente especializado e caracterizado pela presença de odontoblastos e pelo fato de estar cercada por um tecido mineralizado. Danos à polpa por irritantes químicos, térmicos, mecânicos ou microbianos ativam vários tipos de resposta inflamatória envolvendo o complexo vascular, linfático e reações locais (DEMARCO et al., 2011). Portanto, é necessária, na engenharia de tecido pulpar, a escolha de células adequadas com potencialidade para a diferenciação em diversos tipos celulares característicos da polpa, especialmente odontoblastos. Além disso, estudos têm destacado o importante papel dos fatores de crescimento na angiogênese, no recrutamento de células progenitoras, na proliferação e diferenciação celular e finalmente na mineralização de tecidos dentários (LAURENT et al., 2012). Isto porque fatores de crescimento são importantes na sinalização para diferenciação de odontoblastos 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 (SMITH et al., 2003; MURRAY et al., 2007). Acredita-se que, 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).

Dentre os fatores de crescimento liberados pela dentina, os candidatos mais prováveis são o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). O TGF- β é um regulador multifuncional de uma variedade de funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, síntese de matriz e resposta imune (HE et al., 2008). Este fator de crescimento também tem sido bastante relacionado como um mediador chave na diferenciação de odontoblastos e mineralização dentinária.

A ideia de poder formar dentina, o maior tecido mineralizado do dente, proporcionaria benefícios clínicos imensos na odontologia (CORDEIRO et al., 2008), pois a cárie dentária continua sendo a doença infecciosa mais prevalente em humanos, afetando tanto países industrializados como em desenvolvimento e causando prejuízos à saúde e qualidade de vida

das pessoas de todas as idades (PETERSEN et al., 2005; TELLES et al., 2011). Além disso, o trauma dentário é bastante comum entre crianças e adolescentes (CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2011). Assim, tanto a cárie dentária como o trauma podem conduzir à necrose do tecido pulpar e infecção, situações clínicas, as quais o dente será submetido a técnicas endodônticas não regenerativas, deixando como sequela um dente desvitalizado e enfraquecido (DEMARCO et al., 2011). Assim, a engenharia de tecido pulpar pode ser o primeiro passo para a regeneração da dentina em dentes desvitalizados, bem como uma alternativa ao tratamento endodôntico convencional (TELLES et al., 2011; MOONEY et al., 1996).

Diante do exposto, relatos na literatura com células-tronco pós-natais, derivadas tanto de DSPC quanto de SHED, têm permitido novas possibilidades no ramo da engenharia tecidual tornando-se promessas no desenvolvimento de tecidos de substituição que possam reparar tecidos dentários perdidos ou danificados, e, até mesmo, substituir por completo toda a estrutura dentária. Ademais, o estabelecimento de modelos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo* adequados têm possibilitado avaliar mediadores envolvidos na proliferação e viabilidade celular, bem como na expressão de marcadores de odontoblastos e produção de tecido mineralizado semelhante à dentina. Contudo, não foram encontrados relatos na literatura sobre o envolvimento de fatores de crescimento do tipo TGF- β 1 na proliferação de SHED e diferenciação em odontoblastos de dentes decíduos.

FOB - USP

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura procurou conceitos e estudos relacionados à engenharia de tecido pulpar envolvendo a utilização de SHED e o TGF- β 1, com o intuito de investigar o desenvolvimento de ferramentas moleculares e alternativas terapêuticas viáveis para a regeneração do tecidos pulpar e dentinário. Estudos com SHED demonstraram extensa capacidade de proliferação e diferenciação multipotencial, sendo uma fonte ideal para reparar estruturas dentárias danificadas, induzir regeneração óssea e possivelmente tratar tecidos neurais danificados ou doenças degenerativas (MIURA et al., 2003; MORSCZECK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2008; SEO et al., 2008; YAMAZA et al., 2010; WANG et al., 2012; MA et al., 2012). Quando devidamente estimuladas, as SHED produziram tecido mineralizado e foram capazes de se diferenciar em odontoblastos (CASAGRANDE et al., 2010; SAKAI et al., 2010). O TGF- β 1 tem sido fortemente relacionado com a diferenciação odontoblástica tanto *in vitro* como *in vivo*, com o aumento na atividade de fosfatase alcalina e proliferação em células pulpares e células-tronco pulpares (NIE et al., 2006; ZHANG et al., 2008; HE et al., 2008; LI et al., 2011; FAREA et al., 2014). Portanto, nesta revisão de literatura buscamos os efeitos comprovados das ações do TGF- β 1 sobre outras células-tronco pulpares, bem como culturas com células pulpares que pudessem ser correlacionadas com as SHED. A compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação de SHED em odontoblastos é de extrema importância para a tradução clínica de estratégias guiadas para a regeneração biológica do complexo dentino-pulpar.

2.1 Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)

A identificação de células-tronco capazes de regenerar estruturas dentárias organizadas tem gerado particular interesse no uso potencial de terapias com células-tronco pós-natais para tratar os danos causados por cárie dentária, trauma, doença periodontal, câncer e outras doenças degenerativas.

Células-tronco são caracterizadas pela sua habilidade em se dividirem em mais células-tronco, o que é chamado de auto-renovação, e por darem origem a diferentes tipos de células maduras, ou seja, a multipotência. Essas características são as que diferem as mesmas

de células progenitoras restritas ou células diferenciadas, que apresentam um menor potencial de desenvolvimento e uma reduzida capacidade de proliferação. Enquanto o uso de ESC é limitado por questões éticas, MSC constituem a linha celular mais favorável para engenharia tecidual. Células-tronco pós-natais têm sido isoladas de diversos tecidos incluindo o cérebro, pele, folículo capilar, músculo esquelético, tecido ósseo e tecido dental (VOLPONI et al., 2010).

A polpa dentária apresenta uma sub-população de células com características fenotípicas de células-tronco, demonstrada por sua habilidade em se diferenciar em uma variedade de tipos celulares, incluindo células neurais, adipócitos e odontoblastos (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003). Evidências recentes sugerem a possível utilidade do uso de células-tronco pulpares no reparo ósseo, em cartilagem, células neurais, adipócitos e até mesmo no próprio tecido pulpar (SEO et al., 2008; KOYAMA et al., 2009; HARA et al., 2011; FAREA et al., 2014; CHEN et al 2014). Além disso, muitos estudos também têm sugerido a utilização dessas células em medicina regenerativa e em doenças imunológicas (NAKAMURA et al., 2009; YAMAZA et al., 2010; WANG et al., 2012).

Gronthos et al. (2002) identificaram populações de células-tronco pós-natais na polpa de dentes permanentes capazes em se diferenciar em odontoblastos e adipócitos e, formar um complexo dentina-polpa quando transplantados *in vivo*, dando início à utilização de um novo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas tanto *in vitro* como *in vivo*.

SHED foram isoladas pelo grupo de Songtao Shi da polpa de um dente decíduo esfoliado (MIURA et al., 2003), usando a mesma técnica de isolamento utilizada para DPSC (GRONTHOS et al., 2002). Em seu trabalho, Miura et al. (2003) mostraram que a ocorrência natural da esfoliação de um dente decíduo é similar, de certa forma, ao cordão umbilical, contendo células-tronco que oferecem um recurso único para aplicação clínica em potencial. Os autores comprovam que as SHED quando comparadas com células-tronco da medula óssea e com as DPSC apresentaram maior índice de proliferação celular e maior duplicação da população de células. Além disso, foi encontrado tecido mineralizado em cultura de SHED após 4 semanas e verificada sua habilidade na diferenciação em odontoblastos *in vivo*. Porém, os autores afirmam que as mesmas não apresentaram capacidade em formar por completo um complexo dentinopulpar como as DPSC *in vivo*, e apresentaram ação distinta quanto à diferenciação odontogênica e indução osteogênica quando comparada com as DPSC.

Descobertas recentes têm fortalecido o uso de SHED em engenharia tecidual (MIURA et al., 2003; CORDEIRO et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2010, SAKAI et al., 2010, DEMARCO et al., 2011; TELLES et al., 2011), principalmente por apresentarem certas vantagens em relação às DPSC como: maior índice de proliferação e duplicação celular, fácil expansão *in vitro* antes do seu reimplante e obtenção a partir de um tecido que é "descartável" e de fácil acesso em pacientes jovens, ou seja, de dentes decíduos esfoliados (CORDEIRO et al., 2008). Além disso, podem ser utilizadas na engenharia de tecido pulpar em pacientes jovens que, sofreram necrose pulpar em incisivos permanentes com rizogênese incompleta como consequência do trauma (NÖR 2006), permitindo a conclusão do desenvolvimento radicular vertical e lateral e melhorando o prognóstico a longo prazo destes dentes.

Shi et al. (2005), por meio de uma revisão de estudos, mostraram a identificação, caracterização e a aplicação potencial de MSC derivadas de tecidos dentais humanos. A investigação mostrou que populações de MSC foram identificadas na polpa dentária de DPSC, em SHED e em PDLSC por sua capacidade de gerar células clonogênicas em cultura. A expansão *ex vivo* mostrou que DPSC, SHED e PDLSC expressam uma variedade heterogênea de marcadores associados à MSC, dentina, osso, músculo liso, tecido neural e endotélio. Os autores, então, concluíram que os tecidos dentários apresentam uma população de MSC distinta, com potencial de células-tronco para regenerar tecidos dentários humanos *in vivo*, embora, ainda haja muitas barreiras a serem superadas como identificar os fatores indutores capazes em ajudar a integração dessas células no meio ambiente circundante, para a reconstrução de sistemas de órgãos complexos funcionais.

Cordeiro et al. (2008) investigaram as características morfológicas do tecido formado quando SHED foram semeadas em matriz biodegradável em fatias de dentes e implantadas subcutaneamente em camundongos imunodeprimidos. Para isso, foram estabelecidos três grupos compostos de fatias de dente com SHED, fatias de dentes com SHED e com células microvasculares endoteliais dérmicas humanas (HDMEC) ou apenas as fatias sem células. Os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento significativo de células revestindo a pré-dentina nos grupos de SHED e SHED+HDMEC, sem diferença estatística entre os grupos, mas com diferença para o grupo sem células semeadas. Em relação à diferenciação em odontoblastos, foi realizada a análise imuno-histoquímica para DSP (sialoproteína de dentina), um dos marcadores mais aceitáveis para a diferenciação em odontoblastos, e a imunorreatividade no grupo de SHED+HDMEC foi mais intensa que no grupo apenas com SHED, mas ambos os grupos apresentaram DSP. Quanto à análise das características

morfológicas do tecido formado, esses dois grupos apresentaram um tecido semelhante ao de uma polpa normal e com aumento na densidade de microvasos quando comparados com o grupo sem células. Assim, os autores concluíram que as SHED constituem uma fonte viável de células-tronco com aplicabilidade significativa tanto na engenharia de tecidos bucais, como para engenharias mais amplas de outros tecidos do corpo.

Seo et al. (2008) avaliaram se a regeneração óssea mediada por SHED pode ser utilizada para fins terapêuticos, utilizando SHED para reparar defeitos de tamanho crítico na calota craniana de camundongos imunocomprometidos. Para isso, foi realizado um defeito na calota craniana e transplantado para o local SHED, células-tronco mesenquimais de medula óssea ou hidroxiapatita/fosfato tricálcio, e a área foi avaliada após 8 semanas ou 6 meses após o transplante. Os resultados mostraram que, as SHED foram capazes de reparar os defeitos com formação óssea substancial após 8 semanas e, após 6 meses, mantiveram a continuidade óssea e houve reparação craniana completa. No entanto, a osteogênese mediada por SHED não recrutou elementos da medula hematopoiética, que são comumente vistos na regeneração óssea mediada por células-tronco da medula óssea. Porém, as SHED em cultura demonstraram uma série de receptores associados à osteogênese, tais como fator de crescimento transformador beta I e II, fator de crescimento de fibroblasto I e III, e de crescimento vascular endotelial I, implicando no seu potencial abrangente de diferenciação. Com esses resultados os autores concluíram que, as SHED podem ser um bom recurso a ser utilizado em regenerações ósseas orofaciais.

Koyama et al. (2009) avaliaram o potencial de diferenciação de DPSC e de SHED, estimulando-as com proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2). Os grupos estimulados com BMP-2 apresentaram produção de fosfatase alcalina e secretaram osteocalcina no meio de cultura. Para diferenciação adipogênica avaliada por RT-PCR, tanto SHED quanto DPSC apresentaram potencial para expressar duas transcrições específicas de adipócitos, PPARgamma2 e LPL *in vitro*, assim como as células-tronco mesenquimais da medula óssea. Assim, Koyama et al. concluíram que as células-tronco isoladas a partir da polpa de dentes humanos e expandidas *in vitro* se diferenciam em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, sendo, além de um recurso muito acessível, capazes de fornecer número suficiente de células para aplicações clínicas potenciais.

Morsczeck et al. (2010) avaliaram se SHED e DFSC apresentavam o mesmo potencial de diferenciação em células neurais. SHED e DFSC foram cultivadas em quatro tipos de meio

de substituição de soros (SRM), e a morfologia celular, proliferação e os padrões de expressão de genes antes e depois da diferenciação foram analisados. Em um meio de cultura padrão, SHED e DFSC apresentaram morfologias celulares e padrões de expressão gênica semelhantes para marcadores de células-tronco conhecidas. No entanto, apenas SHED expressou o marcador de células-tronco neural Pax6. Em meios de cultura SRMs, SHED e DFSC apresentaram diferentes padrões de expressão de marcadores de células neurais. Assim, os autores chegaram à conclusão que tanto SHED quanto DFSC apresentam capacidade em se diferenciar em células-neurais, mas não apresentam o mesmo potencial de diferenciação.

Arora, Arora e Munshi (2009) fizeram uma revisão de literatura acerca dos estudos atuais com células-tronco, como as SHED. Na revisão os autores defendem que, células-tronco derivadas do próprio dente são uma excelente alternativa de obtenção de células-tronco para outros tecidos e que, dentre as diversas possibilidades de obtenção das mesmas, as SHED apresentam uma forma de obtenção mais simples e conveniente, com pouco ou nenhum trauma, além de reduzidas chances de rejeição. Por último, concluíram que as pessoas têm diferentes oportunidades em diferentes fases da sua vida para armazenar essas células valiosas em bancos apropriados, porém a melhor oportunidade de obtê-las é quando o paciente ainda é criança, jovem e saudável e suas células são mais fortes e proliferativas, ficando sob responsabilidade do profissional da odontologia em obtê-las o mais cedo possível, e quanto mais jovens forem seus pacientes.

Nakamura et al. (2009) compararam 3 tipos de células-tronco: SHED, DPSC e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSC) quanto à capacidade de proliferação e expressão de marcadores celulares, bem como o perfil de expressão de genes múltiplos entre SHED e DPSC. Os autores encontraram entre SHED e DPSC morfologia fibroblástica semelhante às de BMMSC. Através da análise de imunofluorescência, foi possível detectar a presença de STRO-1 nos três tipos de células-tronco, sendo um antígeno de superfície celular encontrado em uma subpopulação de células da medula óssea e que, quando presente, está relacionado com o alto potencial de crescimento e diferenciação de células-tronco esqueléticas e populações formadoras de colônia fibroblástica. Em relação à proliferação celular, as SHED foram as que apresentaram o maior índice quando comparadas com as outras células-tronco do estudo. Em relação à comparação da expressão de genes múltiplos entre SHED e DPSC, foram encontrados 4.386 genes diferentes de um total de 41.078 genes entre esses dois tipos celulares. Devido à proliferação celular de SHED ter sido superior ao das células-tronco de dentes permanentes, foi realizado uma análise dos genes da

matriz extracelular e de diversas citocinas entre SHED e DPSC envolvidas nas vias de proliferação celular que pudessem justificar esse alto índice. Os resultados mostraram maior expressão em SHED de fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento conectivo tecidual (CTGF), fator de crescimento neural (NGF) e proteína óssea morfogenética (BMP). Assim, os autores concluíram que a alta taxa de proliferação de SHED em relação às demais células-tronco do estudo pode ser uma vantagem para a prática clínica, bem como a abundância de fatores de crescimento e da matriz extracelular deve ser favorável para o seu uso em engenharia tecidual e medicina regenerativa.

Chadipiralla et al. (2010) examinaram os efeitos do ácido retinóico (RA) e dexametasona (Dex) sobre a proliferação e diferenciação osteogênica de SHED e PDLSC e compararam as características osteogênicas entre essas duas células-tronco em tratamento com RA. Para isso, tanto SHED quanto PDLSC foram cultivadas com meio de cultura sem soro fetal bovino ou condicionado com RA ou Dex durante 21 dias. Após o período do estudo, os autores observaram que a proliferação de SHED e PDLSC foi significativamente inibida tanto por RA quanto por Dex. RA regulou a expressão gênica e a atividade da fosfatase alcalina em SHED e PDLSC. As influências do RA na diferenciação osteogênica de SHED e PDLSC foram significativamente mais fortes do que da Dex. Assim, os autores defendem a importância desse estudo na regeneração óssea *in vivo*, utilizando SHED ou PDLSC e ainda, que RA é um indutor eficaz de diferenciação osteogênica para ambas as células-tronco utilizadas no estudo. Porém, a proliferação de células significativamente maior de PDLSC com maior deposição de cálcio, após 3 semanas de cultura, sugere que PDLSC é uma fonte de células-tronco osteogênica melhor que SHED.

Yamaza et al. (2010) caracterizaram, *in vitro*, as propriedades de células-tronco de SHED em relação às BMMSC, através da citometria de fluxo, indução de diferenciação, atividade da telomerase e análise de Western blot para avaliar a diferenciação multipotente de SHED. Também foi feita implantação, *in vivo*, de SHED para avaliar a capacidade de regeneração do tecido e o transplante sistêmico de SHED em camundongos para tratar o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Os resultados obtidos demonstraram que as SHED foram capazes em se diferenciar em células osteogênicas e adipogênicas, expressando moléculas de superfície mesenquimais, como: STRO-1, CD146, CD166, entre outros, além de ativar várias vias de sinalização, incluindo TGF- β . Quanto às propriedades imunorreguladoras de SHED em comparação com BMMSC, as SHED apresentaram um efeito significativo sobre a

inibição das células T helper 17 (Th17) *in vitro*. Além disso, o transplante de SHED foi capaz de reverter efetivamente os distúrbios associados ao LES em camundongos. Desta forma, os autores concluíram que SHED possuem propriedades de células-tronco semelhantes às de BMMSC, incluindo diferenciação osteo/odontogênica e adipogênica *in vitro*, sendo uma fonte de células-tronco mesenquimais acessível e viável para o tratamento de doenças imunológicas, como LES.

Sakai et al. (2010) testaram se as SHED podiam se diferenciar em odontoblastos e células endoteliais. 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 à odontoblastos, as quais tiveram imunomarcagem positiva com o anticorpo DMP-1. O início do processo de mineralização *in vitro* 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 32 dias de indução. Além disso, VEGF intensificou a organização das SHED em estruturas tubulares, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados 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 após o 1º 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 sanguíneos quando implantadas em camundongos, mas a presença de sangue no seu interior não pôde ser observada após 21 dias de implante. Assim, os autores concluíram que SHED parece ser ideal para a engenharia de tecido pulpar, pois podem se diferenciar tanto em odontoblastos como em células endoteliais, ambos importantes para o sucesso da engenharia tecidual.

Casagrande et al. (2010) avaliaram a necessidade de BMPs derivadas da dentina na diferenciação de SHED em odontoblastos, justificando que foi comprovado que SHED pode se diferenciar em odontoblastos, mas os sinais morfogênicos da dentina envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos. SHED cultivadas com fatias de dentes, tratadas ou não com EDTA por 1 minuto, e matrizes de ácido láctico Poli-L (PLLA) durante 28 dias apresentaram marcadores de diferenciação odontoblástica aos 14 dias de cultura. Em culturas

com fatias de dente e matrizes de PLLA, em que as proteínas dentinárias foram desnaturadas, não houve a presença desses marcadores. Culturas de SHED estimuladas com BMP-2 mostraram alta expressão para DSPP, DMP-1 e MEPE (fosfoglicoproteína da matriz extracelular), marcadores de diferenciação odontoblástica, enquanto que o estímulo com BMP-7 apresentou fraca marcação para os mesmos. Além disso, o autor investigou o efeito da dentina na proliferação de SHED por 28 dias, cultivando SHED em fatia de dente + matriz, somente na matriz (sem fatia de dente) ou em fatia dente + matriz previamente desproteínizada com 5,25% de NaOCl ou EDTA. Os autores observaram que, houve maior proliferação de SHED somente na matriz sem dentina quando comparada com os demais grupos, seguido pela matriz tratadas com NaOCl, depois a tratada com EDTA e a sem tratamento algum. Assim, os autores concluem que a presença da dentina foi essencial para a expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica, mostrando seu total envolvimento nesse processo e que BMP-2 foi suficiente para induzir a diferenciação de SHED em odontoblastos.

Lu et al. (2011) investigaram o efeito do fator de células-tronco na proliferação e diferenciação osteogênica de SHED. Para isso, cultivaram as SHED na presença do fator de células-tronco com 3,0 ou 10,0 $\mu\text{mol/L}$, e a proliferação foi avaliada através do método de MTT. A influência do fator de células-tronco sobre a atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada utilizando o kit de ALP enquanto que, a expressão do RNAm de osteocalcina e sialoproteína óssea das células tratadas foi examinada por RT-PCR. Os resultados obtidos demonstraram que, tanto a concentração de 3,0 como a de 10,0 $\mu\text{mol/L}$ do fator de células-tronco promoveram proliferação de SHED. Além disso, ocorreu um estímulo da ALP, sendo a concentração de 10,0 $\mu\text{mol/L}$ a mais evidente e houve expressão de RNAm de sialoproteína óssea e osteocalcina, demonstrando que o fator de células-tronco pode promover proliferação e diferenciação osteogênica em SHED, tendo um papel importante na promoção da regeneração dentária.

Em 2011, Telles et al. fizeram uma síntese abrangente sobre pesquisas atuais com SHED, descrevendo os esforços da engenharia tecidual com o uso de SHED no intuito de substituir polpas com inflamação irreversível ou necrose devido à cárie por um tecido funcional e saudável. Os autores definiram a importância da engenharia de tecido pulpar como um primeiro passo para a obtenção da regeneração dentinária em dentes necrosados, bem como uma alternativa para o tratamento endodôntico convencional com a vantagem de restaurar a vitalidade dos dentes. Consequentemente, a identificação de células adequadas,

matrizes condutoras e a compreensão da sinalização morfogênética são de extrema importância para regenerar tecidos perdidos. Concluíram que, atualmente, presenciamos uma nova era da odontologia restauradora que vem se beneficiando da atividade biológica dos tecidos dentais para a cura e regeneração de tecidos.

Hara et al. (2011) compararam SHED com BMMSC através da análise do DNA, PCR e imunofluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que SHED e BMMSC apresentam o mesmo fenótipo de células-tronco mesenquimais, pois apresentaram mais de 90% de positividade para todos os marcadores de linhagem mesenquimal. A comparação entre os DNA mostrou que, dos 41.078 genes, a expressão de 2.753 em SHED foram diferentes quando comparados com os de BMMSC. Através da análise de PCR, os autores encontraram que a expressão de genes relacionados com a via de sinalização do receptor BMP (BMP-2, BMP-4, MAPK10 e PRKAR2B), que tem um papel crucial na diferenciação osteogênica e odontoblástica de SHED, foi maior em SHED que em BMMSC. Esse resultado foi confirmado pela análise de imunofluorescência em que SHED apresentou maiores níveis de expressão de BMP-4. Assim, Hara et al. concluem que SHED pode ser útil na regeneração de tecidos, incluindo osso, tecido pulpar e tecido dentinário devido às suas características e ao seu envolvimento na via de sinalização do receptor BMP.

Demarco et al. (2011) fizeram uma revisão da literatura analisando os esforços para se regenerar o tecido pulpar baseados nos princípios da engenharia tecidual. Além de avanços significativos na odontologia, tais princípios podem trazer benefícios em outras áreas da medicina. Com os avanços obtidos a engenharia de tecido pulpar, mesmo com sua complexidade, não é uma meta inalcançável. Nesta revisão, os autores abrangeram, além das SHED, DPSC, SCAP e PDLSC, a sinalização de moléculas morfogênicas, destacando a grande importância dos fatores de crescimento no controle da atividade de células-tronco e seu papel fundamental na formação e reparação de dentina e polpa. Em relação às SHED, destacam principalmente o fato de apresentarem células clonogênicas altamente proliferativas e sua capacidade em se diferenciar em diversos tipos de células, incluindo células neurais, adipócitos e odontoblastos, bem como a expressão de STRO-1 e CD146, dois marcadores encontrados também em células-tronco mesenquimais, e DPSC. Contudo, os estudos avaliados demonstram que SHED ainda apresenta maior taxa proliferativa, que as demais células-tronco derivadas de tecidos dentários.

Lee et al. (2011) realizaram uma comparação entre DPSC obtidas de dentes supranumerários com as SHED, quanto a taxa de proliferação celular, expressão de antígenos de superfície, capacidade de diferenciação e migração celular. Os resultados obtidos em relação à taxa de proliferação celular demonstraram que, a mesma foi ligeiramente menor em DPSC quando comparada com SHED. Os antígenos de superfície foram praticamente idênticos entre ambos, assim como os resultados do ensaio de migração celular e a avaliação da capacidade de diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Porém, o crescimento celular após congelamento por 2 anos apresentou diferença entre as duas categorias de células-tronco, sendo que o crescimento de DPSC dobrou com o tempo enquanto que a de SHED permaneceu inalterada. Assim, os autores chegam à conclusão que, embora ambas as categorias celulares apresentem ótimas propriedades de células-tronco mesenquimais, as células-tronco de dentes supranumerários ainda estão em desvantagem em relação às SHED devido à alteração do seu crescimento celular durante armazenamento em longo prazo, mostrando sua fraqueza na manutenção da integridade celular durante este processo, porém são fontes de acesso não invasivo para obtenção de células-tronco.

Em 2012, Li et al. analisaram a influência do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) na diferenciação osteogênica de SHED. Para isso, analisaram se FGF altera a taxa de proliferação, mineralização e diferenciação de SHED. Os resultados obtidos mostraram que FGF não altera a taxa de proliferação celular, mas houve a diminuição da expressão de alguns marcadores celulares de células-tronco, como o STRO-1. Em relação à mineralização, os grupos tratados com FGF tiveram uma redução da formação de nódulos de mineralização. Em relação à diferenciação osteogênica, os autores analisaram proteínas (ERK1/2, p38, and JNK) da família MAP-Kinase que estão relacionadas no processo de formação óssea e observaram que altas doses de FGF ativaram ERK1/2, mas não p38 e JNK. Tal ativação influenciou na deficiência de mineralização de SHED. Em contraste a inibição de p38 diminuiu a diferenciação osteogênica de SHED. Assim, o FGF inibiu a diferenciação osteogênica em SHED via ativação ERK1/2.

Wang et al. (2012) fizeram também uma comparação entre as características de SHED e DPSC com o intuito de certificar a importância de SHED na engenharia tecidual. Os autores analisaram, então, os antígenos de superfície celular e proliferação através da medição dos ciclos celulares, taxas de crescimento, eficiência Ki67 e unidades formadoras de colônias (CFUs). A avaliação de diferenciação celular foi realizada *in vitro* através do vermelho de Alizarina, óleo vermelho O e RT-PCR. A capacidade de mineralização foi examinada *in vivo*,

através da implantação de osso bovino cerâmico (CBB) no subcutâneo de camundongos imunocomprometidos, durante 8 semanas. As SHED mostraram uma taxa de proliferação e capacidade de diferenciação mais elevada em comparação com DPSC *in vitro*. Os resultados do transplante, *in vivo*, sugeriram que SHED tem uma maior capacidade de mineralização do que DPSC. Os níveis de expressão de RNAm para citocinas inflamatórias, incluindo a metaloproteinase de matriz-1 (MMP1), inibidores teciduais de metaloproteinase-1 (TIMP1), metaloproteinase-2 da matriz (MMP2), inibidores teciduais da metaloproteinase-2 (TIMP2) e interleucina-6 (IL-6) foram mais elevadas em SHED. Além disso, os níveis de expressão de colágeno I (Col I) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em SHED foram significativamente maiores do que em DPSC. Assim, nesse trabalho os autores concluíram que SHED pode representar uma fonte alternativa adequada, acessível e com potencial para a medicina regenerativa e aplicações terapêuticas.

Ma et al. (2012) quiseram comprovar se SHED isolada a partir de tecido pulpar de dente decíduo congelado por mais de 2 anos (25-30 meses) apresentavam as mesmas propriedades de células-tronco recém-isoladas, avaliando sua capacidade clonogênica, expressão de marcadores celulares, autorrenovação, multipotência, capacidade regenerativa *in vivo* e imunomoduladora *in vitro*. No estudo, os autores comprovaram que é possível isolar SHED a partir de tecido pulpar decíduo congelado com mais de 2 anos de criopreservação e que as células apresentaram propriedades superiores às MSC em relação à autorrenovação, multipotência, capacidade regenerativa *in vivo* com formação de osso e dentina e função imunomodulatória *in vitro*. Além disso, o transplante dessas SHED mostrou eficácia terapêutica tanto em distúrbio esqueléticos quanto imunológicos em camundongos com lúpus sistêmico eritematoso e em defeitos ósseos na calvária de camundongos imunocomprometidos. Assim, Ma et al. sugerem que a criopreservação do tecido pulpar de dentes decíduos traz grandes vantagens na terapia imune e óssea com células-tronco para a engenharia de tecidos na medicina regenerativa.

Coyac et al. (2013) testaram o uso de uma matriz de colágeno hidrogel densa na mineralização e diferenciação celular de SHED. As SHED foram semeadas sobre a matriz e foi avaliada sua viabilidade, morfologia, atividade metabólica e capacidade de mineralização. Além disso, foi medida a atividade da fosfatase alcalina com a produção de proteínas ALPL (atividade de fosfatase alcalina tecido não específica), DMP-1 e OPN (osteopontina) por SHED cultivadas em meio osteogênico para demonstrar diferenciação osteo/odontogênica. Os resultados mostraram que SHED se mantiveram viáveis ao longo do estudo na matriz. Houve

a produção das proteínas ALP, DMP-1 e OPN, revelando diferenciação osteo/odontogênica ao longo do tempo da cultura de SHED sobre a matriz de colágeno. Assim, as SHED mostraram um comportamento semelhante ao encontrado às linhas de células de roedores a respeito da diferenciação celular, mas com o adicional importante de poderem ser utilizadas em pacientes para reparos clínicos ósseos e dentários.

Bento et al. (2013) estimularam SHED com VEGF em meio indutor de crescimento endotelial (EGM-2MV) para analisar as vias de sinalização envolvidas na regulação da diferenciação endotelial em SHED. Esse estímulo, *in vitro*, ocasionou uma diferenciação de células com receptores VEGFR-2 e CD-31 positivas em SHED. Então, os autores semearam SHED com o receptor VEGDR-1 silenciado em fatias de dentes com matriz e transplantaram em camundongos imunodeficientes, observando uma redução de vasos sanguíneos com CD-31 positivo em humanos quando comparado com os controles. Os pesquisadores também encontraram que a exposição de SHED ao meio indutor com VEGF induziu potente ativação das vias de sinalização ERK e AKt, ao mesmo tempo que inibiu a fosforilação de STAT3. Notavelmente, a inibição genética ou química da sinalização ERK restaurou a fosforilação de STAT3 e inibiu a diferenciação de SHED em células endoteliais. Assim os autores concluem que, a via de sinalização VEGF/MEK1/ERK é um regulador chave da diferenciação endotelial em SHED.

Chen et al. (2014) avaliaram o potencial condrogênico de SHED. Para isso, avaliaram a capacidade na diferenciação odonto/osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*, utilizando meios indutores apropriados. Para a avaliação condrogênica foi utilizado meio indutor de diferenciação condrogênica associado a 10,0 ng/mL TGF- β 3 e 10,0 ng/mL de bFGF. As SHED também foram semeadas em matriz fosfato tricálcio beta (β -TCP) e transplantadas subcutaneamente no dorso de camundongos, em um espaço dérmico criado por dissecação a partir de uma única incisão na linha média dorsal e avaliados 2, 4 e 8 semanas após esse transplante. Os resultados da pesquisa mostraram que SHED possui capacidade de diferenciação odonto/osteogênica, adipogênica e condrogênica. O transplante de SHED, *in vivo*, mostrou que as mesmas são capazes de gerar tecido semelhante à cartilagem no dorso de camundongos. Assim, os autores concluíram que SHED apresenta capacidade de diferenciação condrogênica tanto *in vitro* como em modelos *in vivo* e, ainda, sugerem o potencial das mesmas em engenharia de tecido cartilaginoso.

Daltoé et al. (2014) fizeram uma revisão sistemática acerca de estudos, *in vivo*, de 2000 a 2012 que utilizaram tanto DPSC quanto SHED para reparar ou regenerar tecidos não dentários. De acordo com os artigos incluídos, os autores chegaram à conclusão que, em metade deles, as células-tronco eram isoladas a partir de tecido humano e, em todos os estudos as células foram transplantadas para animais de outras espécies, como porcos, ratos e camundongos. Oito estudos do total de 14 investigaram reparação óssea e associaram células-tronco com matrizes, fatores de crescimento ou proteínas recombinantes. No caso das SHED, foi visto que elas apresentam capacidade em se diferenciar em células neurais, adipócitos, osteoblastos e odontoblastos com maior plasticidade que as DPSC. Porém, embora todos os estudos tenham obtido sucesso com o uso desses dois tipos de células-tronco na reparação ou regeneração de tecidos não dentários, ainda não é possível estabelecer o apropriado manejo clínico da técnica.

Farea et al. (2014) investigaram o efeitos da matriz de Quitosan e TGF- β 1 na proliferação e diferenciação osteogênica de SHED. Neste estudo, a proliferação celular foi avaliada quantitativamente pelo método PrestoBlue, e a fixação das células na matriz de Quitosan foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para análise da diferenciação osteogênica, foi avaliada a atividade de fosfatase alcalina e a expressão de genes/proteínas fosfatase alcalina (ALP), colágeno I (COL I), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCN) por RT-PCR e Western blot. Os resultados mostraram que, as SHED permaneceram viáveis e fixas na estrutura de Quitosan e TGF- β 1 aumentou significativamente a atividade proliferativa de SHED no Quitosan. Além disso, houve um aumento na diferenciação osteogênica, evidenciada pela elevada atividade de fosfatase alcalina e deposição de mineral, bem como a expressão dos genes/proteínas ALP, COL I, BSP e OCN. Assim, os autores concluíram que a combinação de Quitosan e TGF- β 1 aumenta a proliferação e diferenciação osteogênica de SHED, podendo em conjunto beneficiar a reparação óssea *in vivo*.

Liu et al. (2015) investigaram a ação do ácido acetilsalicílico (ASA) na diferenciação osteogênica e imunomodulação de SHED. Para isso, os autores estimularam SHED com diversas concentrações de ASA (10,0, 50,0 e 200,0 μ g/mL) e realizaram ensaio de proliferação e diferenciação celular *in vitro*. Em seguida, implantaram no dorso de camundongos imunocomprometidos uma mistura de SHED com fosfato de cálcio hidroxiapatita/tricálcio, para avaliação histológica de formação óssea bem como, realizaram um ensaio de apoptose de linfócitos T. Além disso, injetaram em camundongos com colite

aguda SHED estimuladas com 10,0 µg/mL de ASA e após 10 dias avaliaram a atividade histológica e proliferação celular por MTT. Os autores encontraram que ASA foi capaz de melhorar significativamente a diferenciação osteogênica e imunomodulação em SHED *in vitro*, além disso, regulou a transcriptase reversa da cascata telomerase (TERT)/Wnt/ β -catenina, levando à melhora da regeneração óssea mediada por SHED. O ácido acetilsalicílico também estimulou a sinalização TERT/ FASL, levando uma melhoria da apoptose de células T mediada por SHED e melhorando fenótipos da doença colite induzida em camundongos. Assim, os autores concluem que o tratamento com ASA é uma abordagem prática para melhorar terapias celulares com SHED.

Tu et al. (2015) testaram os efeitos da clorexidina em SHED. Para isso as SHED foram tratadas com diversas concentrações de clorexidina (0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%) por 10 segundos. Além disso, analisaram o efeito do tempo dessa substância em SHED com 0,01% de clorexidina por 10 segundos, 1 minuto e 5 minutos. A proliferação celular foi feita pelo método de MTT e um ensaio de replicação autônoma foi feito para avaliar o potencial de mineralização. Os autores encontraram que, diferentes concentrações de clorexidina apresentaram efeitos citotóxicos em SHED dose e tempo dependentes, além da inibição de 50% da proliferação celular com a concentração de 0,01% da substância. Os resultados também demonstraram que, a proliferação e mineralização de SHED foram inibidas em graus diferentes com as concentrações utilizadas. Desta forma, os autores concluem que a clorexidina pode inibir o potencial de proliferação e mineralização de SHED de forma dose dependente.

2.2 Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1)

Os fatores de crescimento transformadores beta (TGF- β s) são um grupo de proteínas reguladoras que participam de uma variedade de funções celulares, dentre elas: proliferação celular, diferenciação, apoptose, síntese de matriz e resposta imune. O TGF- β apresenta 3 isoformas denominadas de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 e têm sido relacionados como mediadores-chave na diferenciação de odontoblastos e mineralização da dentina. Estudos com camundongos deficientes de TGF- β e com super expressão do mesmo demonstraram a importância desse fator de crescimento na mineralização da dentina (D'SOUZA et al., 1998; THYAGARAJAN et al., 2001).

Em dentes humanos, os odontoblastos expressam as 3 isoformas dos TGF- β s. No entanto, somente o TGF- β 1 permanece sequestrado no interior da matriz de dentina (CASSIDY et al., 1997). Além disso, durante a formação dentária, o TGF- β 1 é o primeiro a ser altamente expresso no epitélio, mostrando sua importância durante a formação do dente (ZHANG et al., 2008). Estudos comprovaram que o TGF- β 1 pode induzir diretamente a diferenciação de odontoblastos e regular a secreção de componentes da matriz no complexo dentina-polpa (DOBIE et al., 2002). Por sua vez, odontoblastos diferenciados são capazes de secretar e depositar TGF- β 1 dentro da matriz de dentina e responder a agressões de forma autócrina (CASSIDY et al., 1997, HE et al., 2004). Sendo assim, o TGF- β 1 parece ser um bom candidato para induzir a proliferação, migração e diferenciação de SHED em odontoblastos.

Bègue-Kirn et al. (1994) estudaram os efeitos do TGF- β 1, BMP-2 e fator de crescimento de insulina (IGF-1) imobilizados em papilas dentais isoladas de camundongos e observaram que, TGF- β 1 associado com Heparina foi capaz de estimular a diferenciação das papilas dentais em células odontoblásticas em cultura enquanto que, quando utilizado sozinho intensificou a produção de matriz extracelular, mas não ocorreu diferenciação. A BMP-2 quando associada com IGF-1 *in vitro*, promoveu a iniciação e a propagação da diferenciação em odontoblastos. O mesmo não ocorreu quando utilizado sozinho ou associado à Heparina. Desta forma, os autores concluíram que os mecanismos envolvidos na diferenciação de odontoblastos são muito mais complexos, envolvendo interações sinérgicas com outros fatores de crescimento (IGF, FGF), sendo necessários maiores estudos e o uso de tecnologias moleculares combinadas com recombinações de tecidos apropriados, para tentar elucidar a rede molecular envolvida no controle de diferenciação de odontoblastos.

Tziafas et al. (1998) provaram que a utilização de TGF- β 1 exógeno em exposições pulpares mecânicas em cachorros induziram o potencial dentinogênico. Para isso, os autores, após a exposição pulpar mecânica colocaram, intrapulparmente, filtros Millipore embebidos com uma solução contendo 100,0 ng/mL de TGF- β 1 a partir de plaquetas humanas por 42 dias. Após esse período, o dispositivo com o filtro embebido com TGF- β 1 foi consistentemente rodeado por uma zona espessa de matriz tubular revestida com células polarizadas colunares altas. Assim, a atividade da matriz de dentina pode, pelo menos em parte, ser atribuído ao TGF- β 1.

Melin et al. (2000) observaram que quando o TGF- β 1, na concentração de 20,0 ng/mL, foi aplicado em fatias de dentes *in vitro*, através de um tubo colado sobre a dentina ocorreu um aumento da proliferação das células na camada sub-odontoblástica e na camada subjacente à polpa. Além disso, TGF- β 1 induziu a produção de colágeno I pela zona odontoblástica, sub-odontoblástica e pelas células da polpa. A partir desses resultados, foi possível observar o envolvimento direto desse fator de crescimento na regulação da proliferação celular, migração e produção de matriz extracelular na dentina e polpa humana, o que, provavelmente, deve ocorrer durante um processo de reparo após injúria dos tecidos dentários.

Unterbrink et al. (2002) estimularam células odontoblásticas de camundongos com 5,0 ng/mL de TGF- β 1 e avaliaram os efeitos desse fator de crescimento sobre duas proteínas da matriz dentinária, DSPP e DMP-1. Os resultados desse estudo mostraram que a presença dessa concentração de TGF- β 1 diminuiu a expressão desses dois marcadores de dentina *in vitro* e o mesmo não ocorreu na sua ausência. Assim, TGF- β 1 pareceu ser um regulador crítico de transição da matriz de pré-dentina não mineralizada em matriz mineralizada, através do controle da transcrição dessas duas proteínas chave da dentina. Assim, a via de transdução de sinal de TGF- β 1, além da ativação da formação óssea, também afeta a dentinogênese.

Farges et al. (2003) comprovaram o envolvimento do TGF- β 1 na resposta imune da polpa dentária após injúria. Para isso, estimularam as células trans-dentinalmente usando fatias de dentes com 20,0 ng/mL de TGF- β 1 por 3-4 dias e, através da análise imuno-histoquímica, analisaram os efeitos do TGF- β 1. O TGF- β 1 induziu um acúmulo de células HLA-DR positivas tanto na camada odontoblástica como na sub-odontoblástica. Juntamente com essa expressão, as células expressaram o fator XIII e CD68, dois marcadores de células dendríticas imaturas, bem como o receptor TGF β rII específico do TGF- β 1. A análise destes dados sugere que, o TGF- β 1 liberado durante uma injúria dentária está envolvido com a resposta imune local e pode ser utilizado como uma estratégia terapêutica para modular a resposta imune e favorecer o reparo de polpa inflamada, com o acúmulo de células dendríticas na periferia da polpa, minimizando ainda mais o risco de ocorrência de novas infecções.

He et al. (2004) estimularam células odontoblásticas de camundongos (MDPC-23) com 10,0 μ g/mL de TGF- β 1 e observaram a expressão de RNAm para proteínas Smads, identificadas como mediadores da sinalização intracelular de TGF- β , bem como o papel das mesmas na transcrição do gene DSPP. As células MDPC-23 expressaram as proteínas Smad2,

Smad3 e Smad4. O estímulo com TGF- β 1 também inibiu a atividade de DSPP, ao mesmo tempo em que a super expressão da proteína Smad3 intensificou esse efeito inibitório do TGF- β 1. Assim, os autores concluíram que Smad3 está envolvido na expressão do gene DSPP mediada por TGF- β 1 em células odontoblásticas de camundongos, tendo, então, participação na dentinogênese.

Nie et al. (2006), ao investigar os efeitos de TGF- β 1 na concentração de 5,0 ng/mL sobre células pulpares em cultura, observaram um aumento significativo da proliferação celular e da atividade da fosfatase alcalina. Quando TGF- β 1 foi utilizado na cultura de órgão, as células pulpares se diferenciaram em odontoblastos e houve a formação do complexo dentina-polpa e produção de proteínas (DSPP, DMP-1) relativas à dentina após 2 semanas de cultura. Assim, os autores concluíram que TGF- β 1 é um importante fator regulador na diferenciação de odontoblastos durante o desenvolvimento dentário e reparo pulpar.

Yongchaitrakul e Pavasant (2007) investigaram a regulação do fator de crescimento neural (NGF) mediada por TGF- β 1 (1,0 ng/mL) sobre células pulpares, bem como as vias de sinalização envolvidas. NGF tem sido detectado em tecidos pulpares após a injúria e relacionado à diferenciação odontoblástica e ao reparo do tecido pulpar. Os resultados do estudo mostraram que TGF- β 1 induziu a produção de RNAm de NGF e expressão de proteínas através da fosforilação da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK) p38 e quinase c-Jun N-terminal (JNK). Assim, TGF- β 1 regula o NGF, desempenhando papel fundamental durante o reparo pulpar e diferenciação de odontoblastos.

Zhang et al. (2008) avaliaram diversas concentrações de TGF- β 1 (0, 20,0 ou 400,0 ng) na formação de dentina terciária associado a fosfato de cálcio com microesferas de poli ácido co-glicólico láctico (PLGA) como agentes capeadores pulpares em incisivos de cabra. Os autores observaram formação de dentina terciária após 12 semanas em todos os grupos, exceto no grupo controle (0 ng de TGF- β 1). Além disso, histologicamente, o uso de 400,0 ng de TGF- β 1 foi capaz de estimular células-tronco pulpares residentes a se diferenciar em odontoblastos e induzir a formação de dentina terciária. Assim, os autores vislumbraram a possibilidade do uso desse componente para terapia pulpar vital.

Liu et al. (2007) observaram expressão de genes da família do TGF- β , diferenciação odontoblástica e mineralização de DPSC em cultura, após estímulo com extrato de dentina (DE) e suplemento de mineralização (MS). Este estudo identificou genes relacionados à família de TGF- β durante a mineralização de DPSC antes não conhecidos, expandindo o

conhecimento molecular para o uso em processos de reparação. Os autores observaram que na família do TGF- β ocorreu uma regulação positiva do receptor do tipo II, endoglin, e fator de crescimento/diferenciação 5, e isso foi coordenado com a regulação negativa da ativina A, TGF- β 2 e TGF- β 1.

He et al. (2008) observaram que 5,0 ng/mL de TGF- β 1 ou TGF- β 1 combinado com 20,0 ng/mL de FGF-2 estimularam a diferenciação DPSC em odontoblastos *in vitro*, enquanto que apenas FGF-2 aumentou significativamente a proliferação celular e regulou positivamente os efeitos do TGF- β 1 sob a diferenciação odontoblástica, como indicado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina e expressão dos marcadores DSPP e DMP-1. Assim, o FGF-2 atuou essencialmente sobre a proliferação celular, enquanto TGF- β 1 e TGF- β 1+FGF-2 estimularam a diferenciação de DPSC em odontoblastos. Este estudo, portanto, fornece um progresso interessante na engenharia tecidual acerca da diferenciação odontoblástica de DPSC induzida por esses dois fatores de crescimento.

Howard et al. (2010) verificaram que DPSC migraram em direção a TGF- β 1 na concentração de 10,0 ng/mL, e que essa migração foi de 131,2% a mais quando comparado ao grupo controle contendo apenas o meio de cultura. Assim, os autores definiram o TGF- β 1 como promotor importante na migração de DPSC, podendo mediar o processo de regeneração do complexo dentina-polpa após a lesão dentária e fazer parte da terapia endodôntica regenerativa.

Li et al. (2011) observaram que, quando células pulpares de camundongos foram estimuladas com 6,0 ng/mL de TGF- β 1 houve um aumento na mineralização e na atividade da fosfatase alcalina, porém, a proliferação celular não aumentou significativamente. Após 7 dias de cultura das células, sobre filtros Milipore com TGF- β 1, foi possível observar células polarizadas e houve a expressão de sialoproteína de dentina (DSP), osteopontina (OPN) e colágeno I (Col I). Após 7 dias do transplante *in vivo* houve a formação de uma camada colunar de odontoblastos na superfície do filtro, e a dentina tubular expressou DSP após 3 meses do transplante. Assim, TGF- β 1 combinado com o filtro possibilitou a diferenciação das células em odontoblastos e formação de dentina.

Lin et al. (2011) observaram um declínio da atividade da fosfatase alcalina em células pulpares humanas estimuladas com 5,0 ou 10,0 ng/mL de TGF- β 1, após 5 dias de cultura. Os autores também avaliaram vias de sinalização relacionadas com essa queda da atividade da fosfatase e observaram um declínio também da expressão do fator de transcrição Runx-2,

transcrição esta importante para diferenciação osteoblástica e mineralização óssea. Concluíram que, estes eventos podem ser importantes em algumas fases de reparação e diferenciação pulpar, sendo necessários mais estudos para esclarecer a atividade funcional de TGF- β 1 e a atividade da fosfatase alcalina em células pulpares.

Kim et al. (2012) realizaram uma revisão de literatura acerca do envolvimento de fatores de crescimento, dentre eles o TGF- β , nas diversas atividades celulares de células pulpares, incluindo as células-tronco isoladas desse tecido e destacaram os achados mais importantes. Em particular, sobre a ação do TGF- β , os autores resumiram que sua ação é altamente variável e dependente do tipo celular ou tecido envolvido, regulando, dentre a vasta gama de atividades celulares, a migração, proliferação, diferenciação e síntese de matriz extra-celular (MASSAGUÉ et al., 2000; MOSES et al., 1996; MELIN et al., 2000). Esse fator de crescimento em cultura de polpa dentária aumentou a proliferação e a produção de matriz extra-celular (MELIN et al., 2000) e promoveu a diferenciação odontoblástica no mesmo tipo de cultura celular (HE et al., 2008). Além disso, TGF- β é quimiotático para as células *in vitro* (HOWARD et al., 2010) e desempenha um papel importante na resposta imune durante a injúria pulpar (WAHL, 1999; FARGES et al., 2003).

Arany et al. (2014) investigaram a ativação de TGF- β 1 endógeno através de laser de baixa potência não ionizante com células pulpares de camundongos. Os autores encontraram que o TGF- β 1 ativado foi capaz de diferenciar as células-tronco dentárias *in vitro*. Além disso, ao realizarem um modelo de estudo *in vivo* com capeamento pulpar em dentes de camundongos, os autores verificaram que o laser de baixa potência aumentou a regeneração da dentina e o mesmo não ocorreu em camundongos deficientes do receptor II de TGF- β ou em camundongos que receberam um inibidor do receptor I de TGF- β . Assim, os autores concluem o papel fundamental desse fator de crescimento na mediação da regeneração do tecido dental induzida pelo laser de baixa potência.

Ding et al. (2015) exploraram a viabilidade de DPSC para terapias imunes, investigando suas propriedades imunológicas. Para isso DPSC e células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e cultivadas e, em seguida os autores realizaram ensaios de proliferação de linfócitos, detecção de citocinas, migração, neutralização e citometria de fluxo para examinar as características imunológicas de DPSC *in vitro*. Os autores encontraram que DPSCs não conseguiram estimular a proliferação das células T alogênicas e suprimiram a proliferação das células T, dos linfócitos B e a reação de linfócitos mistos. Além disso, o

anticorpo monoclonal contra o fator de crescimento TGF- β 1 restaurou a proliferação das células T inibidas por DPSC, além de aumentarem a população de células T reguladoras e diminuíram significativamente as células T-17 helper nas células mononucleares do sangue periférico cultivadas com DPSC. Sendo assim, os autores concluem que DPSCs têm baixas propriedades imunológicas, inibem a proliferação de linfócitos, regulam a produção de citocinas *in vitro* e, a secreção de TGF- β 1 pode estar envolvida nestes eventos.

2.3 Marcadores de diferenciação odontoblástica

A diferenciação de odontoblastos e mineralização da dentina envolve não apenas a participação de fatores de crescimento, receptores e componentes da matriz extracelular para a sinalização celular, mas também um mecanismo regulatório complexo para esses eventos de sinalização (LIU et al., 2007). Durante o desenvolvimento dentário, BMP-2 medeia a expressão do gene sialofosfoproteína da dentina (DSPP) e a diferenciação de odontoblastos (IOHARA et al., 2004; CHEN et al., 2008).

DSPP é uma proteína não colágena altamente fosforilada que é clivada imediatamente após sua secreção em duas proteínas filhas, sialoproteína de dentina (DSP) e fosfoproteína de dentina (DPP). DSPP é altamente expressa em odontoblastos, embora também possa ser encontrada em níveis mais baixos em osteoblastos.

A proteína 1 da matriz dentinária (DMP-1) é expressa através da diferenciação de odontoblastos durante seu desenvolvimento e regula a mineralização de dentina através da nucleação de cristais de hidroxiapatita e de sua alta afinidade a fibrilas de colágeno. A expressão de DSPP e DMP-1 em odontoblastos funcionais em estágios iniciais da odontogênese é consistente com a hipótese de que ambas desempenham papel importante na mineralização da dentina e, portanto, são amplamente utilizadas como marcadores de diferenciação para células odontoblásticas (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; ALLIOT-LICHT et al., 2005; LIU et al., 2007; CASAGRANDE et al., 2010).

Assim para esta revisão de literatura procuramos buscar relatos que utilizaram esses dois marcadores para confirmar a diferenciação odontoblástica em cultura de células pulpares ou de células-tronco ou que, ainda, envolvessem o TGF- β 1 e esses marcadores.

Thyagarajan et al. (2001) estudaram camundongos geneticamente modificados com super expressão de TGF- β 1 e sua ação sobre os odontoblastos. Esses camundongos apresentaram dentes com reduzida mineralização, dentina defeituosa e elevada ramificação dos túbulos dentinários. Além disso, a expressão de DSPP foi regulada negativamente nos dentes desses camundongos, mostrando uma evidência *in vivo* de que esse fator de crescimento é crucial para a expressão de DSPP e, portanto, para a mineralização de dentina. Assim, estes resultados forneceram pela primeira vez na literatura a prova experimental direta de que a diminuição da expressão do gene DSPP, junto com outras alterações celulares em odontoblastos, pode resultar em problemas dentários hereditários humanos como a dentinogênese imperfeita II e displasia de dentina, mostrando sua relação direta com a dentina e com células odontoblásticas.

Unterbrink et al. (2002) demonstraram também que essas duas proteínas, DSPP e DMP-1, envolvidas na conversão da pré-dentina em dentina, tiveram sua expressão diminuída em odontoblastos de camundongos na presença do TGF- β 1 na concentração de 5 ng/mL. Esse resultado demonstrou a importância do TGF- β 1 como mediador da expressão de DSPP e DMP-1, ambos necessários para a mineralização dentária normal e, portanto, utilizados como marcadores para a diferenciação odontoblástica.

Miura et al. (2003) observaram a expressão de DSPP e sialoproteína óssea (BSP) após a indução da diferenciação de SHED em tecido mineralizado por 4 semanas, utilizando um meio indutor de mineralização. Tais resultados indicaram que SHED possui a capacidade em se diferenciar em odontoblastos *in vitro*.

He et al. (2004) estimularam células odontoblásticas de camundongo com TGF- β 1 na concentração de 10,0 μ g/mL e esse estímulo também diminuiu a expressão da proteína DSPP *in vitro*, resultado bastante semelhante ao de Unterbrink et al. (2002).

Iohara et al. (2004), ao fazerem uma comparação entre uma cultura de pellet tridimensional com uma cultura de monocamada de células pulpares caninas, após estímulo com BMP-2, também confirmaram a diferenciação celular dessas células pulpares com a expressão de DSPP e DMP-1 e, só após essa expressão, puderam concluir o direcionamento da diferenciação celular em odontoblastos mediada por BMP-2.

Diferentemente de Unterbrink et al. (2002) e He et al. (2004), Nie et al. (2006), ao realizarem cultura tridimensional com células pulpares humanas, encontraram expressão das

proteínas DSPP e DMP-1 quando estimuladas com 5,0 ng/mL de TGF- β 1. Além disso, observaram aumento da proliferação celular e da atividade da fosfatase alcalina *in vitro*. A expressão dessas duas proteínas relativas à dentina só apareceu após o tratamento com TGF- β 1, enquanto que não houve expressão das mesmas nas células sem tratamento, indicando a ocorrência da diferenciação celular.

He et al. (2008) observaram diferenciação de DPSC analisando também a expressão de DSPP e DMP-1, após o estímulo das mesmas com TGF- β 1 ou TGF- β 1 combinado com FGF-2, mostrando que essas duas proteínas são amplamente utilizadas para confirmar a diferenciação em odontoblastos e secreção de matriz extracelular.

Sakai et al. (2010), para testar a diferenciação de SHED em odontoblastos, também analisaram a presença dos marcadores DSPP e DMP-1, sendo que padrões semelhantes de expressão foram observados nos controles positivos, isto é, odontoblastos humanos recuperados de dentes ou fatias de dentes recém-extraídos contendo polpa.

Hara et al. (2011), quando estimularam SHED ou BMMSC com BMP-2 também observaram a expressão de proteínas marcadoras, dentre elas a DSPP, e sendo essa expressão maior em SHED relacionaram a participação da via de sinalização do receptor BMP na diferenciação odontoblástica.

Em 2012, Abd-Elmeguid testaram o envolvimento de DMP-1 em polpas inflamadas e compararam com polpas saudáveis *in vitro*. Os resultados encontrados mostraram que DMP-1 foi encontrado somente nas polpas inflamadas. Além disso, áreas de calcificação também apresentaram DMP-1 através da análise de imuno-histoquímica, sugerindo seu possível envolvimento na inflamação da polpa e calcificação patológica. Assim, esse estudo comprova que além de marcador para diferenciação odontoblástica, DMP-1 está relacionada à mineralização de tecidos dentários e participa no desenvolvimento de alterações inflamatórias na polpa dental.

Coyac et al. (2013) analisaram a produção de proteínas (ALPL, DMP-1 e OPN) por SHED em cultura para verificar diferenciação osteo/odontogênica. Através da cultura de SHED sobre uma matriz de colágeno hidrogel com meio osteogênico verificaram a produção dessas proteínas, concluindo a capacidade de SHED na diferenciação celular e seu uso potencial em engenharia tecidual para pacientes que necessitem de reparos clínicos ósseos e dentários.

Conde et al. (2015) investigaram a influência da matriz de ácido poli-L-láctico (PLLA), baseando-se em dois tamanhos de poros da mesma, na proliferação e diferenciação celular de DPSC. As matrizes foram preparadas em fatias de dentes com 1 mm de espessura e então as DPSC semeadas sobre as matrizes. Os autores encontraram proliferação celular semelhante em ambas as matrizes avaliadas, exceto no período de 14 dias, em que houve maior proliferação celular na matriz com poros maiores. Após 21 dias, independente dos poros das matrizes, as DPSC expressaram os marcadores para diferenciação odontoblástica DMP-1, DSPP e MEPE. Sendo assim, os autores concluem que, as duas matrizes avaliadas com diferentes poros permitiram proliferação e diferenciação em odontoblastos.

AbdulQader et al. (2015) analisaram os efeitos três matrizes diferentes de hidroxiapatita (HA) a beta fosfato tricálcico (β -TCP) rários de fosfato de cálcio bifásico (BCP): BCP20, BCP50 e BCP80, na proliferação e diferenciação de odontoblastos para regeneração do tecido dentinário em células pulpare humanas. A proliferação celular foi avaliada através do método do MTT por 1, 3, 5 e 7 dias, foi feito também um ensaio da atividade da fosfatase alcalina e a diferenciação celular foi avaliada através dos marcadores COL1A1, BSP, DSPP e DMP-1. Os resultados mostraram que, a alta alcalinidade, mais cálcio e fosfato de íons liberados que foram exibidos por BCP20 diminuiu a viabilidade das células da polpa dentária humana quando comparado com as matrizes BCP50 e BCP80. No entanto, as células de cultura com BCP20 expressaram elevada atividade de fosfatase alcalina e elevado nível de BSP, DMP-1 e DSPP em comparação com as células cultivadas com BCP50 e BCP80. Os autores concluem, então, que a matriz BCP20 pode direcionar a diferenciação de células pulpare humanas para a regeneração do tecido dentinário.

Turrioni et al. (2014) avaliaram os efeitos da irradiação de LED infravermelho (850 nm) na expressão e síntese de proteínas da matriz de dentina por SHED. Após 24 horas do cultivo de SHED, o meio de cultura foi substituído por meio indutor de diferenciação osteogênica, e as células foram irradiadas com luz LED com densidade de energia: 0 (controle), 2 ou 4 J/cm². As SHED irradiadas foram, então, avaliadas quanto à atividade de fosfatase alcalina (ALP), produção de proteínas totais (TP), e a síntese de colágeno. Além disso, foi avaliada a expressão de ALP, Col I, DSPP e DMP-1 por PCR em tempo real. Os autores encontraram aumento da atividade de ALP e da síntese de colágeno, bem como expressão do gene de DSPP e ALP em ambas densidades de energia utilizadas, quando comparadas com as células não-irradiadas. A densidade de energia de 4 J/cm² também aumentou a expressão dos genes Col I e DMP-1. Assim, os autores concluem que a irradiação

LED infravermelho foi bioestimulante em SHED, por aumentar a expressão e a síntese de proteínas relacionadas com a formação de tecido mineralizado, apresentando melhores resultados com a dose de 4 J/cm². Os autores ainda sugerem que, essa irradiação na câmara pulpar possa ser usada de forma coadjuvante na aplicação clínica para melhora da cicatrização do tecido local.

FOB - USP

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, os efeitos de diferentes concentrações de TGF- β 1 em SHED, com relação à:

- Viabilidade
 - Proliferação
 - Migração
 - e Diferenciação celular.
-
-

FOB - USP

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Cultura de Células

SHED fornecidas pelo Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti (Instituto de Ciência e Tecnologia, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, SP, Brasil) e obtidas após aprovação pelo CEP da instituição (protocolo número 46420) (Anexo), 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) (**Figura 1**). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ e divididas numa proporção de 1:3 quando atingiram 80% de confluência. O meio foi trocado a cada dois dias. Para todos os experimentos, foram utilizadas SHED nas passagens de 5 a 10 (**Figura 2**).

Figura 1 – Meio de cultura MEM α utilizado para o cultivo de SHED após suplementação com 10% de FBS e 1% de Penicilina e Estreptomicina.

Figura 2 – Aspecto das SHED visualizadas em microscópio invertido.

4.2 Fator de Crescimento Transformador Beta 1

O fator de crescimento recombinante TGF- β 1 (Life Technologies – Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec Ltda) foi reconstituído em ácido cítrico 0,1 mg/mL e diluído em albumina sérica bovina (BSA) 0,1%, de acordo com as recomendações do fabricante, e armazenado em alíquotas na concentração de 1 μ g/mL. A partir dessas alíquotas, TGF- β 1 foi diluído em meio de cultura MEM α nas diversas concentrações utilizadas em nosso estudo: 1,0 ng/mL, 5,0 ng/mL e 10,0 ng/mL.

4.3 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

A viabilidade celular, após o estímulo com 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL de TGF- β 1, foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do MTT em SHED semeadas em placas de 96 poços nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. Para cada grupo, $2,5 \times 10^3$ células por poço foram semeadas em triplicata, utilizando 200 μ L de meio de cultura MEM α suplementado com 10% de FBS. Como controle negativo e positivo, as SHED foram mantidas em meio de cultura MEM α suplementado com 10% e 20% de FBS, respectivamente (HOWARD et al., 2010; FAREA et al., 2014). Todos os meios foram trocados a cada dois dias.

Após cada período experimental, os meios foram removidos e 200 μ L de solução de MTT (**Figura 3**) a 0,5 mg/mL de MEM α suplementado com 1% de FBS foram adicionados em cada poço. As placas foram envoltas por papel alumínio, sob o abrigo da luz, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 200 rcf, 18°C por 7 minutos e, então, o meio contendo MTT foi aspirado e adicionado 200 μ L de DMSO (Dimetil Sulfóxido - Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA) (**Figura 4 e 5**) por poço. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 560 nm (CHENG et al., 2014; TSAI et al., 2014) (**Figura 6**).

Figura 3 – Reagente colorimétrico de MTT utilizado para o ensaio de viabilidade de SHED.

Figura 4 – Reagente DMSO utilizado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no ensaio de viabilidade de SHED.

Figura 5 – Aspecto da placa de 96 poços após metabolização do reagente MTT pelas SHED e adição do reagente DMSO para leitura em espectrofotômetro no ensaio de viabilidade de SHED.

Figura 6 – Aparelho de Espectrofotômetro utilizado para as leituras das absorbâncias nos ensaios de viabilidade, proliferação e migração de SHED.

4.4 Ensaio de Proliferação Celular – SRB (Sulforrodamina B)

A proliferação celular, após o estímulo com 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL de TGF- β 1 foi avaliada pelo método de SRB em SHED semeadas em placas de 96 poços nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. Para cada grupo, 1×10^4 células por poço foram semeadas em triplicata, utilizando 200 μ L de meio de cultura MEM α suplementado com 10% de FBS. Como controle negativo e positivo, as SHED foram mantidas em meio de cultura MEM α suplementado com 10% e 20% de FBS, respectivamente (HOWARD et al., 2010; FAREA et al., 2014). Todos os meios foram trocados a cada dois dias.

Após cada período experimental, as células foram fixadas por meio da adição de ácido tricloroacético gelado (concentração final de 10%) e incubadas por 1 hora a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas em água corrente por 5-6 vezes e mantidas ao ar livre para secar. A proteína celular foi, então, corada por meio da adição de SRB a 4% em ácido acético a 1% e incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. O excesso de SRB foi removido pela lavagem dos poços com ácido acético a 1%, e as placas foram deixadas para secar. Em seguida, o SRB remanescente foi solubilizado com Tris-base 10 mM não tamponado por 1 hora em temperatura ambiente e a absorbância determinada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 565 nm (KEEPERS et al., 1991; SAKAI et al., 2010)(**Figura 6**).

4.5 Ensaio de Migração Celular

Um ensaio fluorescente *in vitro* para determinar o efeito das diversas concentrações de TGF- β 1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) na migração de SHED por meio de uma membrana com poros de 8 μ m foi realizado (**Figura 7**). SHED, cultivadas por 24 horas em meio sem FBS, foram semeadas sobre insertos individuais na contagem de 5×10^4 , num volume de 200 μ L de meio de cultura por poço. Os insertos foram mantidos sobre cada poço, numa placa de 24 poços em triplicata, contendo 100 μ L de meio suplementado ou não com 10% de FBS e as diversas concentrações de TGF- β 1 para cada grupo (**Figura 8**). Como controle negativo e positivo, as SHED foram mantidas em meio de cultura MEM α suplementado com 10% e 20% de FBS, respectivamente. As células foram mantidas overnight para permitir a migração das células. Em seguida, os insertos foram removidos, e as células que migraram para os poços foram tripsinizadas, coletadas em tubo de microcentrífuga e centrifugadas a $3.835 \times g$, em

4°C por 10 minutos. Os pellets formados foram lavados com PBS e novamente centrifugados a 3.835 x g, em 4°C por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, os pellets foram transferidos para uma nova placa 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 (**Figura 9**). As placas foram, então, cobertas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 485 nm (NEIVA et al., 2009) (**Figura 6**).

Figura 7 – Insertos com poros de 8 µm utilizados no ensaio de migração de SHED.

Figura 8 – Insertos posicionados sobre os poços na placa de 24 poços no ensaio de migração de SHED.

Figura 9 – Fluorescência emitida após adição de 50 μL de Cell TrackerTM Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 20 μM por poço, durante o ensaio de migração celular de SHED.

4.6 Avaliação da Diferenciação Celular por RT-PCR

Para a avaliação da diferenciação celular foi utilizado os meios condicionados com 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL de TGF- β 1 para estimular a diferenciação de SHED. Para isto, células na contagem de 2×10^5 foram plaqueadas em placa de 6 poços com 2 mL de meio de cultura. Após sua aderência overnight, as SHED foram estimuladas com as diversas concentrações de TGF- β 1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) e mantidas nestes meios em cultura por 14 dias, os quais foram trocados a cada dois dias e coletados após 1, 7, 14 dias do estímulo para análise da expressão de dois marcadores de diferenciação de odontoblastos, DSPP e DMP-1 por RT-PCR. Como gene constitutivo foi avaliado a expressão do gene GAPDH.

Após cada período experimental, as células foram coletadas em 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em tubos de microcentrífuga para extração do RNA. Odontoblastos removidos de terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizados como controle positivo.

Para a extração de RNA, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado a cada tubo e incubado em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a $13.226 \times g$, em 4°C durante 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, e adicionado 0,5 mL de isopropanol, e então o tubo foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, o tubo foi centrifugado a $13.226 \times g$, em 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e o pellet lavado com 1 mL de álcool 75% e centrifugado a $9.469 \times g$, em 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e, então, o pellet (RNA) dissolvido em 20 μL de água livre de DNase e RNase.

A concentração de RNA foi avaliada no equipamento Nanodrop 2000C (Wilmington, DE 19810, EUA). Para a RT-PCR foram utilizados 1 μg de RNA (concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 12,5 μL de 2x Reaction Mix, 0,5 μL de SS III Taq Mix, 0,5 μL de cada primer (sense e anti-sense 10 mM) e água livre de DNase e RNase para completar um volume total de 25 μL . A diferenciação de SHED foi monitorada por meio da detecção DMP-1 (sense 5'-CAGGAGCACAGGAAAAGGAG-3', antisense 5'-CTGGTGGTATCTTGGGCACT-3'; tamanho antecipado 213 pb) e por meio da detecção de DSPP (sense 5'-AATGCTGGAGCCACAAAC-3', antisense 5'-GCTTCCTTAGTCCCATTTC-3'; tamanho antecipado 248 pb). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como

gene de referência constitutivo (sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e anti-sense 5'-CACACCTTCTTGATGTCATC-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 constituiu 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 5 µL de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese horizontal, em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL), a 60 V durante 120 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 a fotodocumentação.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica®, versão 11.0 (StatSoft Inc. Tulsa, EUA). Para a viabilidade e proliferação celular os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguidos pelo teste de Tukey. Os dados do ensaio de migração celular foram analisados pelo teste de ANOVA a um critério, seguido pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Para a diferenciação celular por RT-PCR foi feita a análise estatística descritiva para os resultados obtidos.

FOB - USP

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

No ensaio de viabilidade celular observou-se que após o 1º dia do estímulo não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de viabilidade entre os grupos tratados com TGFβ-1 e o controle positivo (20% FBS) e o negativo (10% FBS). A partir do 3º dia, as células tratadas com TGFβ-1 apresentaram valores de absorbância numericamente menores quando comparados aos dos controles positivo e negativo, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No 5º dia, não houve diferença entre os grupos. No 7º dia, observou-se diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade das células do grupo controle positivo com todos os grupos: 1,0 ng/mL de TGFβ-1 ($p=0,000$); 5,0 ng/mL de TGFβ-1 ($p=0,000$); 10,0 ng/mL de TGFβ-1 ($p=0,000$) e controle negativo ($p=0,022$) (**Figura 10**).

Ao longo do período estudado de 1, 3, 5 e 7 dias, observou-se que a dose de 1,0 ng/mL de TGFβ-1 apresentou diferença estatisticamente significativa do 1º dia para o 7º dia do estímulo ($p=0,038$). No 3º dia apresentou diferença para o 7º dia do estímulo ($p=0,007$). Na concentração de 5,0 e 10,0 ng/mL de TGFβ-1 não foi encontrado diferença ao longo do período do estudo. No grupo controle positivo houve diferença do 1º dia para o 5º dia ($p=0,001$) e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia houve diferença para o 7º dia ($p=0,000$) após o estímulo. O 5º dia apresentou diferença em relação ao 7º dia ($p=0,001$). O grupo controle negativo apresentou diferença do 1º dia para o 5º dia ($p=0,006$) e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia apresentou diferença para o 7º dia ($p=0,011$).

Figura 10: Viabilidade de SHED tratadas com diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 1, 3, 5 e 7 dias e avaliadas pela técnica do MTT.

5.2 Ensaio de Proliferação Celular – SRB (Sulforrodamina B)

No ensaio de proliferação celular observou-se que após o 1º dia do estímulo não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com as diversas concentrações de TGF-β1 e o controle positivo (20% FBS) e o negativo (10% FBS). A partir do 3º dia, as células tratadas com diferentes concentrações de TGF-β1: dose 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL apresentaram valores de absorbância maiores que os do controle negativo ($p=0,000$). Adicionalmente no 3º dia, foi observada diferença do controle negativo com o controle positivo ($p=0,001$). No 5º dia, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controle positivo e os grupos tratados com as diversas concentrações de TGF-β1: dose de 1,0 ng/mL ($p=0,002$), dose de 5,0 ng/mL ($p=0,044$), dose de 10,0 ng/mL ($p=0,022$) e o controle negativo ($p=0,000$) sendo que, o controle positivo apresentou maior taxa de proliferação que os grupos e o controle negativo. Além disso, nesse mesmo período, o controle negativo apresentou menor valor de absorbância que os grupos tratados com as diferentes concentrações de TGF-β1: dose de 1,0 ng/mL ($p=0,002$), dose de 5,0 ng/mL ($p=0,000$), dose de 10,0 ng/mL ($p=0,000$). No 7º dia do experimento, as células tratadas com

1,0 ng/mL de TGF- β 1 apresentaram menores valores de absorbância em relação ao controle positivo ($p=0,025$). As diferentes concentrações de TGF- β 1 e o controle positivo apresentaram valores de absorbância maiores que os do controle negativo: dose de 1,0 ng/mL ($p=0,008$), dose de 5,0 ng/mL ($p=0,000$), dose de 10,0 ng/mL ($p=0,000$) e controle positivo ($p=0,000$). (**Figura 11**).

Ao longo do período estudado de 1, 3, 5 e 7 dias, observou-se que a dose de 1,0 ng/mL de TGF β -1 apresentou diferença estatisticamente significativa do 1º dia para o 3º, 5º e 7º dia do estímulo ($p=0,000$). No 3º dia houve diferença para o 1º e 7º dia do estímulo ($p=0,000$). No 5º dia houve diferença para o 7º dia ($p=0,031$). Na concentração de 5,0 ng/mL houve diferença do 1º dia para o 3º, 5º e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia houve diferença para o 5º dia ($p=0,022$) e o 7º dia ($p=0,000$). No 5º dia houve diferença para o 7º dia ($p=0,000$) após o estímulo. A dose de 10,0 ng/mL de TGF β -1 apresentou diferença do 1º dia para o 3º, 5º e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia houve diferença para o 5º dia ($p=0,033$) e 7º dia ($p=0,000$). No 5º dia houve diferença para o 7º dia ($p=0,002$) após o estímulo. No grupo controle positivo houve diferença do 1º dia para o 3º ($p=0,001$), 5º e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia houve diferença para o 5º e 7º dia ($p=0,000$). O grupo controle negativo apresentou diferença do 1º dia para o 5º e 7º dia ($p=0,000$). No 3º dia para o 5º e 7º dia ($p=0,000$). O 5º dia para o 7º dia ($p=0,007$) após o estímulo.

Figura 11: Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 1, 3, 5 e 7 dias e avaliadas pela técnica SRB.

5.3 Ensaio de Migração Celular

Em relação à migração de SHED em direção ao estímulo, no período de 24 horas, observaram-se maiores taxas de migração em direção aos meios contendo TGF-β1, mas sem diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações utilizadas, entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de TGF-β1 com os controles positivo ($p=0,000$) e negativo ($p=0,000$). Além disso, para cada concentração avaliada, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas taxas de migração quando se utilizou meio contendo ou não 10% de FBS (**Figura 12**). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle positivo e negativo ($p=0,002$).

Figura 12: Comparação das taxas de migração de SHED em direção ao meio de cultura suplementado com 10% de FBS (barras à esquerda) ou sem FBS (barras à direita) contendo diferentes concentrações de TGF-β1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) e os meios de cultura utilizados como controle positivo (20% de FBS) ou controle negativo (sem FBS).

5.4 Avaliação da Diferenciação Celular por RT-PCR

Em relação à diferenciação celular de SHED após estímulo com 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL de TGF-β1 observou-se que, todas as amostras expressaram o gene constitutivo GAPDH. Em relação à expressão do gene DMP-1 observou-se que os grupos estimulados com 1,0 e 5,0 ng/mL expressaram de forma crescente e progressiva o gene ao longo do período do estudo sendo que, ao final dos 14 dias foi possível visualizar uma expressão com maior intensidade, quando comparada com o 1º e 7º dia após o estímulo com TGF-β1. O grupo estimulado com 10,0 ng/mL apresentou uma expressão mais intensa após o 1º dia do estímulo, quando comparada com os demais grupos no mesmo período e, essa expressão intensificou de forma mais discreta ao longo do período. Em relação à expressão do gene DSPP, observou-se que, o grupo estimulado com 10,0 ng/mL de TGF-β1 apresentou expressão gênica após os 14 dias do estímulo. Os demais grupos não apresentaram expressão relacionada ao gene DSPP (Figura 13).

Figura 13: Comparação dos níveis de expressão do gene constitutivo GAPDH: 683 pb (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e dos marcadores de células odontoblásticas DSPP: 181 pb e DMP-1: 213 pb em SHED por meio de RT-PCR, após estímulo com diferentes concentrações de TGF- β 1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL), não tratadas (controle negativo) e controle positivo (odontoblasto) após 1, 7 e 14 dias.

FOB - USP

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, evidências científicas mostram a capacidade das células-tronco pulpares de se diferenciar em diversos tipos celulares, entretanto, os efeitos dos fatores de crescimento na diferenciação em odontoblastos são pouco conhecidos. Considerando que a dentina contém moléculas bioativas que são capazes de estimular respostas celulares importantes na regeneração dentinária (ROBERTS-CLARK; SMITH, 2001; MURRAY; SMITH, 2002; GRAHAM et al., 2006), é essencial entender os sinais e fatores envolvidos na diferenciação celular a partir de células-tronco. A finalidade deste conhecimento é melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na regeneração da dentina, e orientar os esforços de pesquisas em engenharia de tecidos da polpa dentária.

As SHED têm sido investigadas como uma possível candidata de fonte celular para terapias regenerativas humanas (NAKAMURA et al., 2009; YAMAZA et al., 2010; MA et al., 2012; COYAC et al., 2013; FAREA et al., 2014). No entanto, este estudo é o primeiro a explorar os efeitos das diferentes concentrações de TGF- β 1, não somente na proliferação de SHED, mas também na viabilidade, migração e diferenciação celular das mesmas. Estudos comparando-as com DPSC e BMMSCs mostraram que, SHED apresenta maior capacidade proliferativa com abundância de matriz extracelular e fatores de crescimento (NAKAMURA et al., 2009; YAMAZA et al., 2010; DEMARCO et al., 2011; LEE et al. 2011; WANG et al., 2012;). Além disso, estudos atuais indicam que BMMSCs podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, enquanto que as SHED apresentam propriedades imunológicas semelhantes às BMMSCs, suprimindo a ativação de linfócitos T humanos *in vitro* (ALIPOUR et al., 2013), sendo, consideradas uma fonte alternativa viável de células para futuras aplicações clínicas e terapias de doenças sistêmicas (NAKAMURA et al., 2009; WANG et al., 2012; FAREA et al., 2014), bem como na engenharia de tecidos da polpa dentária (HARA et al., 2011; LU et al., 2011; COYAC et al., 2013).

Em contra partida, as propriedades odontogênicas do TGF- β 1 têm sido comprovadas em diversos estudos, indicando que este fator é um candidato em potencial para a regeneração do complexo dentino-pulpar (TZIAFAS et al., 1998; MELIN et al., 2000; NIE et al., 2006; ZHANG et al., 2008; LI et al., 2011; KIM et al., 2012; FAREA et al., 2014). No entanto, a concentração adequada do mesmo (ou qualquer outro fator de crescimento) capaz de

estimular a diferenciação de células-tronco pulpares ainda permanece desconhecida e de difícil determinação.

Tem sido fortemente sugerido que exposições da superfície da dentina e as moléculas acumuladas nesse tecido são capazes de fornecer os sinais necessários que determinariam certas funções celulares, como a migração e diferenciação celular (TZIAFAS, 2004). Isto porque fatores de crescimento são importantes na sinalização para diferenciação de odontoblastos 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 (SMITH et al., 2003; MURRAY et al., 2007). Acredita-se que, em caso de injúria ao tecido dentinário, estes fatores de crescimento seriam liberados e iniciariam a sinalização de regeneração do complexo dentino-pulpar (TZIAFAS et al., 2000; SMITH; LESOT, 2001; SLOAN; SMITH, 2007).

Desta forma, estudos anteriores têm utilizado uma ampla variação da concentração do TGF- β 1, desde a 0,1 até a 40,0 ng/mL em modelos experimentais diversos, e com células-tronco pulpares variadas (MELIN et al., 2000; FARGES et al., 2003; NIE et al., 2006; YONGCHAITRAKUL; PAVASAN 2007; HE et al., 2008; ZHANG et al., 2008; HOWARD et al., 2010; LIN et al., 2011; LI et al., 2011; FAREA et al., 2014). No presente estudo optou-se por utilizar as concentrações 1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL, por serem concentrações utilizadas em cultura de células-tronco pulpares em estudos prévios (NIE et al., 2006; YONGCHAITRAKUL; PAVASAN 2007; HE et al., 2008; LIN et al., 2011; FAREA et al., 2014).

Em relação à viabilidade celular por meio do MTT, o presente estudo encontrou resultado semelhante ao estudo de He et al., 2008 com a concentração de 5,0 ng/mL de TGF- β 1. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre essa concentração e o controle negativo da mesma maneira que He et al., 2008. No entanto, esses autores não realizaram a comparação com outras concentrações ao longo do tempo, somente após 4 dias do estímulo e as células-tronco utilizadas foram as DPSCs.

No presente estudo foi observado que o TGF- β 1 não estimulou a viabilidade celular de SHED. Esse fator não foi citotóxico suficiente para levar a morte ou dano celular, portanto, não interferiu drasticamente na atividade da enzima mitocondrial e na respiração celular. No entanto, nenhum relato na literatura comparou diferentes doses desse fator de crescimento entre si e os controles negativo e positivo. No estudo de Li et al., 2011, os autores

investigaram a concentração de 6,0 ng/mL de TGF- β 1 em células pulpare de camundongos. No presente estudo, a diferença foi observada em relação ao controle positivo que, ao final dos 7 dias de experimento apresentou maior taxa de viabilidade quando comparada com todas as outras concentrações de TGF- β 1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) e com o controle negativo. Nie et al., 2006 quando estimularam células pulpare com 5,0 ng/mL de TGF- β 1 por 6 dias, encontraram aumento da viabilidade celular quando comparada com o grupo controle negativo após 3 e 6 dias do tratamento. Os resultados do presente estudo mostraram que a concentração de 5,0 ng/mL de TGF- β 1 apresentou diferença somente em relação ao controle positivo.

Farea et al., 2014, que realizaram um ensaio para determinar o efeito ótimo de TGF- β 1 na viabilidade de SHED, testando as concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 ng/mL, por meio do reagente de viabilidade PrestoBlue encontraram que, a dose de 10,0 ng/mL obteve o maior pico quando comparada com as demais doses de TGF- β 1 após 3 dias do estímulo, porém após esse período observou-se que houve queda dessa taxa de viabilidade celular. Se o período de avaliação fosse maior poderiam relatar com maior clareza essa queda na viabilidade. Nos resultados apresentados neste estudo, notou-se que no 3º dia a concentração de 10,0 ng/mL atingiu seu pico de viabilidade celular, porém sem diferença estatística com as demais concentrações utilizadas de TGF- β 1. Farea et al., 2014 observaram um mesmo pico de viabilidade celular para a dose de 10,0 ng/mL com diferença entre as outras doses avaliadas em seu estudo: 2,5; 5,0 e 20,0 ng/mL.

O ensaio de redução colorimétrico do MTT é utilizado como um ensaio de proliferação celular, mas que na verdade quantifica as células viáveis e sua habilidade em reduzir o sal amarelo de tetrazólio a cristais púrpuras de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Desta forma, o ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é realizada em espectrofotômetro de 540 a 570 nm em leitor de ELISA. Por este motivo designou-se tal ensaio à viabilidade das células e não a proliferação celular propriamente dita. Além disso, devido o MTT ser um reagente que é reduzido metabolicamente pelas mitocôndrias de células viáveis, essa função pode ser inibida por variações dos níveis celulares de NADH, glicose e outros fatores, gerando resultados falso-negativos, como se as células não estivessem vivas ou proliferando (HOUGHTON et al., 2007). Acreditamos, então, que a baixa viabilidade de SHED encontrada em nossos resultados possa ter sido ocasionada devido a essas variações dos níveis celulares de NADH, glicose e

outros fatores, interferindo negativamente no resultado deste estudo. Devido, então, a essas limitações, optamos por realizar também o ensaio de proliferação celular pelo método SRB. Nesse método, o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético, assim, quanto maior o número de células, maior quantidade de corante é absorvido e, após a fixação, quando as células são lisadas, o corante libertado vai gerar uma cor mais intensa e com maior absorbância (SKEHAN, 1990). Por ser um método que se baseia no princípio de que o SRB cora proteínas dentro das células, esse método independe, então, da atividade metabólica das mesmas, ao contrário do MTT, fornecendo melhor linearidade e sendo um ensaio superior ao do MTT segundo Keepers et al., 1991. Assim, no presente trabalho optou-se pela realização deste outro método a fim de alcançar um resultado mais fiel em relação à proliferação celular.

Em relação à proliferação celular verificou-se que entre as diferentes concentrações utilizadas de TGF- β 1 não houve diferença estatisticamente significativa ao final do estímulo, porém todas as concentrações apresentaram taxa de proliferação celular superior ao controle negativo e próximas ao controle positivo, com exceção da dose de 1,0 ng/mL de TGF- β 1, que apresentou menor valor de absorbância que o controle positivo aos 7 dias do estímulo. Em nosso estudo, todas as doses de TGF- β 1 utilizadas apresentaram valores de absorbância estatisticamente maiores que o controle negativo e, portanto, estimularam a proliferação de SHED a partir do 3º dia até o final do experimento. O resultado demonstrou que, além do fator de crescimento ter estimulado a proliferação de SHED, provavelmente obtivemos um resultado falso-negativo da viabilidade celular realizada pelo método do MTT, como observado por outros estudos (HOUGHTON et al., 2007). Esse ensaio é muito importante para a compreensão de mecanismos que possam estar envolvidos no estímulo da proliferação celular em SHED. Um aumento na taxa de proliferação é fundamental para que, tanto SHED como o fator de crescimento TGF- β 1, sejam considerados vantajosos para aplicações clínicas envolvendo a engenharia de tecidos.

Estes resultados corroboram com o estudo de Farea et al., 2014, que verificaram que a presença de 10,0 ng/mL de TGF- β 1 aumentou a capacidade proliferativa de SHED nos grupos em que estava presente (SHED+TGF- β 1; SHED+Quitosan+TGF- β 1), quando comparada com os grupos ausentes do fator de crescimento (SHED; SHED+Quitosan) após 7 dias. Contudo, Farea et al., 2014, não compararam os grupos com um controle positivo e

concluíram que a presença do TGF- β 1 influenciou de forma significativa a proliferação de SHED bem como, a habilidade de sobrevivência e a diferenciação osteogênica. No presente estudo a dose de 1,0 ng/mL apresentou menor valor de absorbância quando comparada com o controle positivo ao final do período. Sabe-se que, a proliferação celular antes da diferenciação final é crítica para células-tronco em engenharia e regeneração tecidual (Farea et al., 2014). Os resultados revelaram um aumento das taxas de proliferação de SHED quando tratadas com TGF- β 1, o que concorda com outros estudos (MELIN et al., 2000; NIE et al., 2006; OGAWA et al., 2010; FAREA et al., 2014). Embora esses estudos tenham realizado ensaios diversos para avaliar proliferação celular, todos verificaram que o estímulo com TGF- β 1 aumentou a taxa de proliferação quando comparado com a ausência do fator de crescimento. Melin et al., 2000 utilizou o método de BrdU (5-bromo-2'deoxiuridine) e observou aumento de proliferação da camada sub-odontoblástica e da camada abaixo da polpa na presença de 20,0 ng/mL de TGF- β 1, após 4 dias do estímulo. Ogawa et al., 2010 verificaram proliferação condrogênica melhorada por TGF- β 1 e diferenciação em medula óssea de camundongo derivadas de células-tronco mesenquimais. Assim, independente do método utilizado para avaliar o quesito proliferação celular é possível observar que em todos os casos, TGF- β 1 estimulou ou otimizou a proliferação independente da concentração e tipo celular investigado, o que corrobora com os resultados desta pesquisa.

A proliferação de células-tronco, bem como a migração dessas células progenitoras para o local da lesão é necessária para que ocorra a regeneração tecidual, por isso é de extrema importância à análise dessa ocorrência após um estímulo. Células indiferenciadas que têm a capacidade de realizar mitose, um pré-requisito para a regeneração, residem no nicho de células-tronco e necessitam também migrar para o tecido danificado para promover a regeneração tecidual (CHEN; JIN 2010) e manter a homeostasia local (GILBERT, 2003). Para isto, a migração de células progenitoras ao local de injúria, para a diferenciação em nova geração de células semelhantes à odontoblastos, é um importante evento de recrutamento celular durante a regeneração, quando a viabilidade dos odontoblastos primários é comprometida (SLOAN; SMITH 2007). Então, além da proliferação celular, outro fator importante a ser investigado é a migração dessas células para locais onde possibilitem sua ação, caso contrário à regeneração e desenvolvimento de órgãos e tecidos seria impossível (LUSTER et al., 2005). Porém, vale a pena ressaltar que esse evento é favorecido por locais que apresentem maior concentração de agentes quimioatrativos (WELF et al., 2012).

Sendo assim, foi avaliado neste estudo a capacidade de migração de SHED em direção as diferentes concentrações do fator de crescimento TGF- β 1, por meio de um ensaio utilizando o reagente Cell TrackerTM Green. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa para maior migração em direção às diferentes concentrações de TGF- β 1, quando comparada com o controle positivo e negativo. Estes resultados corroboram os trabalhos de Melin et al., 2000 e Howard et al., 2010 em que, Melin et al., observaram que a presença de TGF- β 1 (20,0 ng/mL) está diretamente relacionada com a migração de células da polpa em direção a camada sub-odontoblástica e odontoblástica em fatias de dentes. Howard et al., 2010 utilizaram um ensaio de migração bem semelhante ao deste estudo com insertos com poros de 8 μ m. Os autores observaram que houve maior migração de DPSCs em direção a 10,0 ng/mL de TGF- β 1 quando comparado ao grupo controle (apenas meio sem fator de crescimento), sugerindo que a migração de células-tronco pode ser regulada através de agentes quimiotáticos específicos, como o TGF- β 1 dentre outros, podendo mediar o processo de regeneração polpa-dentina após uma lesão e serem usados como parte da terapia regenerativa endodôntica. Contudo, diferentemente do estudo de Howard et al., 2010 observamos que, a presença ou ausência de FBS no meio não alterou de forma significativa a migração de SHED em direção às diferentes concentrações de TGF- β 1, demonstrando que as o fator de crescimento foi o responsável pelo aumento da migração celular de SHED quando comparado aos controles negativo e positivo do presente estudo, a migração de SHED em direção aos meios contendo TGF- β 1 foi maior. No estudo de Howard et al., (2010), a presença de FBS inibiu a migração de DPSCs em direção ao fator de crescimento.

Desta forma, após a observação dos efeitos de TGF- β 1 na viabilidade, proliferação e migração de SHED, avaliou-se a capacidade de SHED na diferenciação em odontoblastos. No caso da regeneração dentinária em engenharia de tecido pulpar é fundamental que essas células-tronco tenham a capacidade em se diferenciar em odontoblastos, além disso, acredita-se que fatores de crescimento possam sinalizar eventos reparadores que levam a essa diferenciação (TZIAFAS 2000; MURRAY et al., 2007). Assim, o TGF- β 1 tem sido relacionado na sinalização celular para diferenciação de odontoblastos, estimulação da secreção da matriz dentinária, desenvolvimento dentário e regeneração (NAKASHIMA; REDDI 2003; SAITO et al., 2004; IOHARA et al., 2004).

Neste estudo observou-se a expressão de RNAm para DSPP e DMP-1 ligados à diferenciação celular em odontoblastos por meio do ensaio de RT-PCR. Contudo, a expressão

dos marcadores foi distinta dependendo da concentração de TGF- β 1 utilizada e do tempo observado. Enquanto a expressão de DMP-1 foi vista em todas as concentrações do fator de crescimento utilizadas, a expressão de DSPP foi encontrada somente na dose de 10,0 ng/mL aos 14 dias. A expressão de DMP-1 foi observada de forma crescente nas doses de 1,0 e 5,0 ng/mL de TGF- β 1 ao longo do período (1, 7 e 14 dias) e na dose de 10,0 ng/mL a marcação aparece intensa ao 1, 7 e 14 dias do estímulo. A expressão desses marcadores em SHED, estimuladas com TGF- β 1, reflete que ocorreram alterações nas funções celulares e que, TGF- β 1 foi capaz de estimular diferenciação celular, o que corrobora com estudos anteriores utilizando esse fator de crescimento em células-tronco dentárias ou células pulpares (HE et al., 2004; NIE et al., 2006; YONGCHAITRAKUL; PAVASAN, 2007; ZHANG et al., 2008; LI et al., 2011; CHEN et al., 2014; FAREA et al., 2014).

O estudo realizado *in vivo* por Tziafas et al., em 1998 descreveram pela primeira vez que 100,0 ng/mL de TGF- β 1 exógeno em filtros milipore, induziram potencial dentinogênico após exposição pulpar mecânica em cachorros. Os autores observaram uma zona espessa de matriz tubular revestida com células polarizadas colunares altas ao redor do dispositivo, concordando com os resultados do presente estudo, embora o modelo de estudo tenha sido diferente e o ensaio de RT-PCR não tenha sido realizado.

Em relação à expressão de DMP-1, o presente estudo está em concordância com os estudos de Nie et al., 2006 e He et al., 2008. Nie et al., 2006 encontraram expressão desse marcador após 2 semanas, quando estimularam células pulpares com 5,0 ng/mL de TGF- β 1. Porém, não investigaram essa marcação ao longo do tempo e nem outras concentrações do fator de crescimento como neste estudo. He et al., 2008 encontraram expressão crescente de DMP-1 ao longo do tempo (7 e 14 dias), após estímulo com 5,0 ng/mL de TGF- β 1 associado a 20,0 ng/mL de FGF2, enquanto que, o mesmo não foi observado na ausência de TGF- β 1. Na concentração de 5,0 ng/mL de TGF- β 1 a expressão de DMP-1 foi observada aos 14 dias. Diferente dos resultados deste estudo, em que a expressão de DMP-1 foi observada de forma crescente ao 1, 7 e 14 dias no grupo com 5,0 ng/mL de TGF- β 1.

Em relação à expressão de DSPP após estímulo com diversas concentrações de TGF- β 1, nossos achados foram semelhantes aos estudos de He et al., 2004 e divergentes aos resultados encontrados por Nie et al., 2006 e He et al., 2008. Porém, nenhum desses trabalhos analisou diversas concentrações do fator de crescimento. No estudo de He et al., em 2004, os autores observaram uma inibição da atividade de DSPP com 10,0 μ g/mL de TGF- β 1 em

células odontoblásticas de camundongo (MDPC-23). No presente estudo as menores doses de TGF- β 1 que utilizamos (1,0 e 5,0 ng/mL) não apresentaram expressão desse marcador, o que corrobora com o estudo de He et al. (2004). Porém, as células desse trabalho não foram células-tronco humanas, além da diferente concentração do fator de crescimento utilizada.

Em contrapartida, Nie et al., em 2006 observaram expressão de DSPP com a concentração de 5,0 ng/mL de TGF- β 1 após 2 semanas, diferente do presente ensaio em que, só foi observado na concentração de 10,0 ng/mL aos 14 dias. Porém, as células utilizadas por esses autores não foram células-tronco e sim células pulpares e, embora os resultados tenham sido distintos aos nossos em relação a esse marcador, ambos encontramos envolvimento do TGF- β 1 na diferenciação celular. No estudo de He et al. 2008, os autores observaram expressão crescente de DSPP na dose de 5,0 ng/mL de TGF- β 1 associado ou não com 20,0 ng/mL de FGF2 ao longo do tempo (7 e 14 dias) e, diferentemente do nosso estudo em que, o marcador DSPP não foi observado nessa concentração.

O modelo de estudo de Chen et al., em 2014 utilizou o fator de crescimento TGF- β 3 e avaliou o potencial condrogênico de SHED, encontrando resultados que, de certa forma, estão em concordância com o presente estudo em relação a importância da compreensão desses fatores de crescimento para o futuro da odontologia e medicina regenerativa, bem como o grande potencial apresentado por SHED e a família de TGF- β s na engenharia de tecidos e reparo do tecido pulpar. Farea et al. 2014, no entanto, constataram o envolvimento de 10,0 ng/mL de TGF- β 1 associado com matriz de Quitosan na diferenciação osteogênica de SHED, sugerindo seus benefícios na reparação óssea *in vivo*.

Contudo, este estudo é o primeiro a demonstrar a expressão de DSPP e DMP-1 em SHED após estímulo com diversas concentrações de TGF- β 1 (1,0; 5,0 e 10,0 ng/mL) ao 1, 7 e 14 dias do estímulo, demonstrando que essas células-tronco apresentaram viabilidade, proliferação, migração e diferenciação em odontoblastos após estímulo com TGF- β 1 *in vitro*. Embora as doses de TGF- β 1 utilizadas no presente trabalho não tenham estimulado a viabilidade celular em SHED, esse fator de crescimento não ocasionou morte celular e não teve efeito citotóxico sobre as células. No entanto, todas as doses de TGF- β 1 estimularam a proliferação celular quando comparadas ao controle negativo. No quesito migração celular todas as doses avaliadas do fator de crescimento causaram migração de SHED, sendo essa migração superior estatisticamente tanto ao controle negativo como ao do controle positivo, comprovando o potencial quimiotático de TGF- β 1. Além disso, todas as doses também

expressaram marcador de diferenciação em odontoblastos, porém somente a dose de 10,0 ng/mL apresentou os dois marcadores avaliados em nosso trabalho: DMP-1 e DSPP. Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que, a dose de 10,0 ng/mL de TGF- β 1 apresentou vantagens em relação às demais doses utilizadas, pois além do estímulo da proliferação e migração celular, a mesma expressou os dois marcadores de diferenciação avaliados. Contudo, mais estudos e ensaios moleculares são necessários para que possamos afirmar que, a dose de 10,0 ng/mL foi suficiente e apresentou melhor desempenho na diferenciação de SHED em odontoblastos.

Espera-se que o resultado deste estudo possa fornecer uma visão crítica para o futuro da engenharia de tecidos, sobre o uso de SHED e TGF- β 1 como ferramentas moleculares viáveis que, possam ser transportadas para a prática clínica da odontologia regenerativa, evitando tratamentos radicais e desvitalizadores em casos de cárie dentária e trauma aos tecidos pulpaes. A compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação de células-tronco é importante para guiar estratégias clínicas ligadas à regeneração biológica do complexo dentino-pulpar. A diferenciação celular é um mecanismo complexo em que, na maioria das vezes há a participação de mais de um fator de crescimento e moléculas envolvidas, sendo necessários mais estudos para que possamos determinar a concentração e os padrões ideais de TGF- β 1 para estimular a diferenciação em odontoblastos na engenharia de tecido pulpar.

FOB - USP

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho, com a utilização de diferentes técnicas, permite concluir que:

1. As diferentes concentrações de TGF- β 1 não apresentaram efeitos citotóxicos sobre SHED.
 2. As diferentes concentrações de TGF- β 1 estimularam proliferação celular sobre SHED.
 3. As diferentes concentrações de TGF- β 1 promoveram migração de SHED.
 4. As diferentes concentrações de TGF- β 1 estimularam expressão de DMP-1 e, a concentração 10,0 ng/mL de TGF- β 1 foi a única que estimulou a expressão DMP-1 e DSPP.
-
-

FOB - USP

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2012;38(1):75-80.
2. AbdulQader ST, Kannan TP, Rahman IA, Ismail H, Mahmood Z. Effect of different calcium phosphate scaffold ratios on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;49:225-33.
3. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*. 2005;321(3):391-400.
4. Alipour R, Adib M, Masoumi Karimi M, Hashemi-Beni B, Sereshki N. Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013;12(4):331-44.
5. Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014;28(238):238ra69.
6. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 2009;33(4):289-94.
7. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF β s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994;38(3):405-20.
8. Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, et al. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*. 2013;92(1):51-7.
9. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*. 2010;89(6):603-8.
10. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*. 1997;42(3):219-23.
11. Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2010;340(2):323-33.

12. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, et al. Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- κ B signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(28):19359-70.
 13. Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):219-55.
 14. Chen K, Xiong H, Xu N, Shen Y, Huang Y, Liu C. Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(8):664-72.
 15. Cheng CC, Lee YH, Lin SP, Huangfu WC, Liu IH. Cell-autonomous heparanase modulates self-renewal and migration in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2014;13;21:21.
 16. Conde CM, Demarco FF, Casagrande L, Alcazar JC, Nör JE, Tarquinio SB. Influence of Poly-L-Lactic Acid Scaffold's Pore Size on the Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Braz Dent J*. 2015;26(2):93-8.
 17. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
 18. Coyac BR, Chicatun F, Hoac B, Nelea V, Chaussain C, Nazhat SN, et al. Mineralization of dense collagen hydrogel scaffolds by human pulp cells. *J Dent Res*. 2013;92(7):648-54.
 19. Daltoé FP, Mendonça PP, Mantesso A, Deboni MC. Can SHED or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies. *Braz Oral Res*. 2014 Jan-Feb;28(1). Epub 2014 Aug 21.
 20. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. 2011;22(1):3-13.
 21. Ding G, Niu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor- β 1. *Hum Cell*. 2015;28(2):81-90.
 22. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):387-90.
 23. D'Souza RN, Cavender A, Dickinson D, Roberts A, Letterio J. TGF-beta1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(1):185-91.
-

-
-
24. Farea M, Husein A, Halim AS, Abdullah NA, Mokhtar KI, Lim CK, et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β (1) on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 2014;59(12):1400-11.
 25. Farges JC, Romeas A, Melin M, Pin JJ, Lebecque S, Lucchini M, et al. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res.* 2003;82(8):652-6.
 26. Gilbert SF. The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol.* 2003;47(7-8):467-77.
 27. 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;27(14):2865-73.
 28. Gronthos S, Mankani M, Brahimi 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.
 29. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.
 30. Hara K, Yamada Y, Nakamura S, Umemura E, Ito K, Ueda M. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. *J Endod.* 2011;37(12):1647-52.
 31. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):911-8.
 32. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2008;32(7):827-34.
 33. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods.* 2007;42(4):377-87.
 34. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod.* 2010;36(12):1963-6.
-
-

35. 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.
 36. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer*. 1991;27(7):897-900. Erratum in: *Eur J Cancer* 1991;27(12):1717.
 37. Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M, et al. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am*. 2012;56(3):563-75.
 38. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):501-6.
 39. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012;45(5):439-48.
 40. Lee S, An S, Kang TH, Kim KH, Chang NH, Kang S, et al. Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med*. 2011;6(6):689-99.
 41. Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- β 1. *Arch Oral Biol*. 2011;56(11):1221-9.
 42. Li B, Qu C, Chen C, Liu Y, Akiyama K, Yang R, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling. *Oral Dis*. 2012;18(3):285-92.
 43. Lin PS, Chang MC, Chan CP, Lee SY, Lee JJ, Tsai YL, et al. Transforming growth factor β 1 down-regulates Runx-2 and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells via ALK5/Smad2/3 signaling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(3):394-400.
 44. Liu J, Jin T, Chang S, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007;43(3-4):120-8.
 45. Liu Y, Chen C, Liu S, Liu D, Xu X, Chen X, et al. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *J Dent Res*. 2015;94(1):209-18.
-

-
-
46. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1182-90.
 47. Lu JY, Gao J, Ma DD, Chen T. Stem cell factor promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011;31(3):531-4.
 48. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS One.* 2012;7(12):e51777. Epub 2012 Dec 14.
 49. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000;103(2):295-309.
 50. Melero-Martin JM, Zhan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007;109(11):4761-8.
 51. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res.* 2000;79(9):1689-96.
 52. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.
 53. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996;12(6):865-8.
 54. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2010;14(4):433-40.
 55. Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev.* 1996;6(5):581-6.
 56. Murray PE, Smith AJ. Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care.* 2002;9(1):21-6.
 57. 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.
-
-

58. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod.* 2009;35(11):1536-42.
 59. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2003;21(9):1025-32.
 60. Neiva KG, Zhang Z, Miyazawa M, Warner KA, Karl E, Nör JE. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling, *Neoplasia.* 2009; 11(6):583-93.
 61. Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int.* 2006;30(4):295-300.
 62. Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent.* 2006;31(6):633-42.
 63. Ogawa T, Akazawa T, Tabata Y. In vitro proliferation and chondrogenic differentiation of rat bone marrow stem cells cultured with gelatin hydrogel microspheres for TGF-beta1 release. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21(5):609-21.
 64. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661-9.
 65. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6.
 66. 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.
 67. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010;89(8):791-6.
 68. Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):325-32.
 69. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008;14(5):428-34.
-

-
70. 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.
 71. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
 72. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13(2):151-7.
 73. 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.
 74. 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.
 75. Telles PD, Machado MA, Sakai VT, Nör JE. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(3):189-94.
 76. Tsai WC, Cheng JW, Chen JL, Chen CY, Chang HN, Liao YH, Lin MS, Pang JH. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. *Lasers Med Sci.* 2014;29(4):1377-84.
 77. Tu YY, Yang CY, Chen RS, Chen MH. Effects of chlorhexidine on stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Formos Med Assoc.* 2015;114(1):17-22.
 78. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida Lde F, Costa CA, Hebling J. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent.* 2014;42(10):1292-9.
 79. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):192-6.
 80. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Dent.* 2000;28(2):77-92.
 81. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38(3):314-20.
-

82. Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, Wright JT, Kulkarni AB. Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *J Biol Chem*. 2001;276(14):11016-20.
 83. Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M. TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):354-8.
 84. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010;20(12):715-22.
 85. Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(2):439-44.
 86. Wahl SM. TGF-beta in the evolution and resolution of inflammatory and immune processes. Introduction. *Microbes Infect*. 1999;1(15):1247-9.
 87. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012;57(9):1231-40.
 88. Welf ES, Ahmed S, Johnson HE, Melvin AT, Haugh JM. Migrating fibroblasts reorient directionality by a metastable, PI3K-dependent mechanism. *J Cell Biol*. 2012;197(1):105-14.
 89. Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TC, Masuda Y, Sutherland WH, et al. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H480-7.
 90. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):5.
 91. Yongchaitrakul T, Pavasant P. Transforming growth factor-beta1 up-regulates the expression of nerve growth factor through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in dental pulp cells. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(1):57-63.
-

FOB - USP

ANEXO

ANEXO

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco de dentes permanentes e deciduos

Área Temática:

Pesquisador: Bruno das Neves Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

CAAE: 02210312.1.0000.0077

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46420

Data da Relatoria: 26/05/2012

Apresentação do Projeto:

Com o advento da engenharia tecidual e busca de novas alternativas no que diz respeito ao tratamento e regeneração de tecidos perdidos, o uso de células-tronco tem ganhado espaço na ciência em geral. Mais precisamente na Odontologia, são de interesse os estudos envolvendo células-tronco adultas obtidas a partir de dentes humanos, sejam esses deciduos ou permanentes. Nesse contexto, de forma a garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade entre nosso grupo e grupos de pesquisas internacionais, o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células. Para isso, tecido pulpar humano obtido a partir de um terceiro molar extraído por razões terapêuticas serão processados para obtenção de fibroblastos por explante (grupo controle). Outros 3 tecidos pulpares obtidos da mesma forma serão processados para obtenção das células-tronco (DPSC) por digestão enzimática. E finalmente, 3 tecidos pulpares humanos serão obtidos a partir da raspagem de molares deciduos exfoliados naturalmente e processados também por digestão enzimática para o isolamento das células-tronco (SHED). As células obtidas (fibroblastos, DPSC e SHED) serão submetidas a ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica com o uso de suplementos específicos em seus meios de cultivo, bem como estimuladas a diferenciação dentinogênica com o uso de BMP-2, de modo a serem caracterizadas como células-tronco. Dessa forma, espera-se constituir um banco validado de células-tronco pulpares para a execução de futuros experimentos na área de engenharia tecidual.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células para garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade frente os grupos de pesquisas internacionais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes. Os dentes selecionados são dentes que seriam exfoliados/extraídos, tendo em vista os períodos de troca dentária (dentes deciduos) ou a necessidade terapêutica (terceiros molares inclusos). Os benefícios poderão ser observados na independência da Instituição de Pesquisa a qual o projeto está vinculado, de modo que de receptora de doações de linhagens, passaremos a doadores, técnica

dominada por poucos centros no Brasil. Além disso, o potencial de pesquisas com estes tipos celulares é altamente promissor, fazendo com que a expansão e arquivamento das linhagens permita a geração de pesquisa de alto impacto no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e está adequada para realização

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi atendido a solicitação de mudança do tópic

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as considerações anteriores, o projeto está aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA

FOB - USP

APÊNDICE

APÊNDICE

Tabela 1 – Resultado da análise estatística para o ensaio de viabilidade celular de SHED pelo método de MTT.

Grupos (doses TGF- β 1)	Tempo (dias)	Média $\pm$ DP
1,0 ng/mL	1	0,17 $\pm$ 0,04 ^a
1,0 ng/mL	3	0,13 $\pm$ 0,09 ^a
1,0 ng/mL	5	0,30 $\pm$ 0,08 ^{abcd}
1,0 ng/mL	7	0,38 $\pm$ 0,07 ^{bcd}
5,0 ng/mL	1	0,16 $\pm$ 0,03 ^a
5,0 ng/mL	3	0,22 $\pm$ 0,02 ^{abc}
5,0 ng/mL	5	0,27 $\pm$ 0,06 ^{abcd}
5,0 ng/mL	7	0,30 $\pm$ 0,11 ^{abcd}
10,0 ng/mL	1	0,14 $\pm$ 0,02 ^a
10,0 ng/mL	3	0,18 $\pm$ 0,06 ^{ab}
10,0 ng/mL	5	0,20 $\pm$ 0,06 ^{abc}
10,0 ng/mL	7	0,25 $\pm$ 0,07 ^{abcd}
C+ (20% FBS)	1	0,12 $\pm$ 0,02 ^a
C+ (20% FBS)	3	0,32 $\pm$ 0,10 ^{abcd}
C+ (20% FBS)	5	0,40 $\pm$ 0,10 ^{cd}
C+ (20% FBS)	7	0,68 $\pm$ 0,11 ^e
C- (10% FBS)	1	0,13 $\pm$ 0,04 ^a
C- (10% FBS)	3	0,21 $\pm$ 0,01 ^{abc}
C- (10% FBS)	5	0,38 $\pm$ 0,08 ^{bcd}
C- (10% FBS)	7	0,45 $\pm$ 0,06 ^d

*Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.

Tabela 2 – Resultado da análise estatística para o ensaio de proliferação celular de SHED pelo método de SRB.

Grupos (doses TGF- β 1)	Tempo (dias)	Média $\pm$ DP
1,0 ng/mL	1	0,77 $\pm$ 0,00 ^a
1,0 ng/mL	3	1,21 $\pm$ 0,10 ^{abcde}
1,0 ng/mL	5	1,35 $\pm$ 0,03 ^{def}
1,0 ng/mL	7	1,52 $\pm$ 0,03 ^{gh}
5,0 ng/mL	1	0,80 $\pm$ 0,02 ^a
5,0 ng/mL	3	1,18 $\pm$ 0,08 ^{bc}
5,0 ng/mL	5	1,39 $\pm$ 0,02 ^{fg}
5,0 ng/mL	7	1,63 $\pm$ 0,07 ^{hi}
10,0 ng/mL	1	0,83 $\pm$ 0,04 ^a
10,0 ng/mL	3	1,20 $\pm$ 0,05 ^{bcd}
10,0 ng/mL	5	1,38 $\pm$ 0,02 ^{efg}
10,0 ng/mL	7	1,59 $\pm$ 0,09 ^{hi}
C+ (20% FBS)	1	0,89 $\pm$ 0,02 ^a
C+ (20% FBS)	3	1,11 $\pm$ 0,05 ^b
C+ (20% FBS)	5	1,56 $\pm$ 0,03 ^{hi}
C+ (20% FBS)	7	1,70 $\pm$ 0,06 ⁱ
C- (10% FBS)	1	0,77 $\pm$ 0,04 ^a
C- (10% FBS)	3	0,88 $\pm$ 0,06 ^a
C- (10% FBS)	5	1,13 $\pm$ 0,04 ^b
C- (10% FBS)	7	1,33 $\pm$ 0,09 ^{cdef}

*Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos.

Tabela 3 – Resultado da análise estatística para o ensaio de migração celular de SHED.

Grupos (doses TGF-β1)	Média±DP
FBS + 1,0 ng/mL	0,05 ± 0,00 ^c
FBS + 5,0 ng/mL	0,05 ± 0,00 ^c
FBS + 10,0 ng/mL	0,05 ± 0,00 ^c
1,0 ng/mL	0,06 ± 0,00 ^c
5,0 ng/mL	0,06 ± 0,00 ^c
10,0 ng/mL	0,06 ± 0,00 ^c
C+ (20% FBS)	0,04 ± 0,00 ^b
C- (10% FBS)	0,03 ± 0,00 ^a

*Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.