Daniela Franco Bueno

Uso de Células Tronco Adultas para Estudo da
Etiopatogenia das Fissuras Lábio Palatinas e
Bioengenharia de Tecidos

São Paulo

2007

Daniela Franco Bueno

Uso de Células Tronco Adultas para Estudo da
Etiopatogenia das Fissuras Lábio Palatinas e
Bioengenharia de Tecidos

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências, na Área de Genética e Biologia
Evolutiva.

Orientador(a): Maria Rita dos Santos
Passos Bueno

São Paulo

2007

Bueno, Daniela Franco
Uso das Células Tronco Adultas para
Estudo da Etiopatogenia das Fissuras Lábio
Palatinas e Bioengenharia de Tecidos, 116 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

1. Fissuras Lábio Palatinas 2. Células
tronco adultas
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

A todos os pacientes portadores de
Fissuras Lábio Palatinas e
Malformações Crânio Faciais.

Agradecimentos

A DEUS, por ter me concedido uma família maravilhosa, bons amigos e o dom de trabalhar com pacientes portadores de malformações crânio faciais.

Aos meus amados pais, Daise e Francisco, por todo amor e todo apoio que me deram para que eu pudesse realizar esta tese.

À minha querida irmã, Fernanda, pela presença constante durante o desenvolvimento desta tese e por sempre levar minha sobrinha Beatriz ao meu encontro nos momentos de finalização deste trabalho, para que eu pudesse me alegrar nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Dra. Maria Rita Passos Bueno, com quem compartilhei durante a realização do meu doutorado seus profundos conhecimentos na área de genética humana, pelas oportunidades dispensadas, por ser uma grande orientadora e amiga. Muito obrigada, Rita, por guiar meus passos no árduo estudo de genética do desenvolvimento crânio facial, ontem, hoje e sempre.

À Dra. Lucy Dalva Lopes e ao Dr. Cássio Raposo do Amaral (“in memoriam”) por terem me transmitido seus conhecimentos profundos em reabilitação estética e funcional em pacientes portadores de deformidades craniofaciais e por terem me ensinado que precisamos de muito estudo, dedicação e persistência para proporcionar a estes pacientes uma correta reabilitação. Também pelo incentivo que me deram para que eu estudasse os mecanismos etiológicos das fissuras lábio palatinas.

À Dra. Mayana Zatz, Dra. Mariz Vainzof e Dra. Célia Koiffmann pelo apoio, incentivo e ensinamentos, foi um imenso prazer poder conviver com vocês.

À Dra. Irina Kerkis por me transmitir seus conhecimentos em células tronco e por sempre me ajudar no planejamento e execução dos meus experimentos, pela sua alegria, determinação e amizade.

À Dra. Marília T. Martins grande amiga e incentivadora desde o dia que ingressei no doutorado, sempre esteve presente. Obrigada pelo incentivo, pela amizade, pelos risos e por tudo que sempre fez por mim! Obrigada também por ter topado ser colaboradora neste projeto e ter realizado todos os cortes histológicos.

Ao Dr. Sergio Verjovski e Eduardo Reis do Instituto de Química pela colaboração na interpretação dos dados das lâminas de “*microarray*”.

À Marta Canovas pela ajuda na execução das imunofluorescências e pela amizade.

À Dra. Maristher Fabretti dos Santos Pinto, por ceder seu consultório odontológico para que eu pudesse realizar a exodontia dos dentes decíduos de pacientes envolvidos nesta pesquisa e principalmente por ser uma grande amiga, por sempre me dar bons conselhos, e por sempre manter sua energia positiva e a de todos à sua volta.

Ao André Mendonça pela ajuda com o experimento dos ratos e por fornecer a gordura de lipoaspiração para realização de parte do projeto.

A todos os funcionários, médicos, dentistas, psicólogos e fonoaudiólogos do Hospital SOBRAPAR, por toda ajuda na seleção dos pacientes e coleta do material para que eu pudesse realizar esta tese, especialmente a Dra. Ana Beatriz Almeida, Dr. Celso Buzzo, Dr. Cássio Eduardo Raposo do Amaral, Dra. Vera Raposo do Amaral e Marly .

A todos os amigos do “labrita”, do “labgenética” e “labcelulastronco”, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas boas risadas, pelo aprendizado....Vocês todos são e sempre serão pessoas muito especiais em minha vida.

À Dra. Andréa Setié, por ser um exemplo de pesquisadora e por me transmitir seus conhecimentos em biologia molecular e estar sempre presente para discutir meus projetos, minhas idéias e sempre com a maior paciência.

Ao Carlos Maranduba, Cibele Mazzoti, Eder Zucconi, Erica Kague, Flávia Errera, Lúcia Armelin Correa, Oscar T. Suzuki e Roberto Fanganiello, não consigo me lembrar de um segundo sequer que precisei de vocês e não fui atendida no mesmo momento. Vocês sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias, de tristezas e de conquistas, por este motivo seus nomes estão em ordem alfabética e vocês resumem esta frase: “Em nenhuma época da vida teremos dificuldade em alcançar os objetivos desejados se tivermos ao nosso lado pessoas amigas”. Muito Obrigada!

À Aline e Erica Yeh , obrigada por cuidarem das células e por me ajudarem nos experimentos, nos momentos de finalização do meu doutorado, saibam que sempre podem contar comigo.

À Patricia Adachi Ricardo, obrigada pela ajuda com a extração do DNA de parafina.

À Camila e ao Gerson, muito obrigada por me ajudarem com os ratos, a formatação da tese e figuras. Foi muito bom poder contar com vocês, quero que saibam que se tornaram meus amigos e podem sempre contar comigo.

À Constância Gotto por ser uma segunda mãe nestes anos de doutorado, sempre preocupada, rezando por mim...Muito Obrigada!, você sempre será uma pessoa especial.

Aos funcionários do Instituto de Biociências e do Centro de Estudos do Genoma Humano pela atenção dispensada a mim, especialmente ao Seu Valter, ao Roberto, a Vanessa, a Camila, a Kátia, a Marta e a Kelly, muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Gilberto Xavier e seus alunos por disponibilizarem a infra-estrutura de seu laboratório

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Índice

Resumo _____	1
Abstract _____	2
Capítulo I - Introdução e objetivos _____	3
Capítulo II - Material e Métodos _____	26
Capítulo III - Caracterização de linhagens de células tronco de polpas de dentes decíduos, de gordura de lipoaspiração e de osso medular " <i>in vitro</i> " e sua aplicação em modelos " <i>in vivo</i> " _____	37
Capítulo IV - Isolation and vitro and in vivo characterization of mesenchymal cells from lip muscle of patients with cleft lip and palate(CLP) _____	69
Capítulo V - Comparação do perfil de expressão gênica de células tronco adultas de pacientes portadores de Fissuras lábio palatinas e de indivíduos controles _____	90
Capítulo VI - Discussão e Conclusões _____	102
Capítulo VII - Referências Bibliográficas _____	105
Anexo I. VIII.1 _____	112
Anexo II A _____	113
Anexo II.B _____	114
Anexo II.B(1) _____	115
Anexo II C _____	116

Resumo

As fissuras lábio palatinas (FLP) são as malformações faciais mais comuns presentes ao nascimento e correspondem a cerca de 25% de todos os defeitos congênitos. Sua incidência é alta, de aproximadamente 1/700 nascimentos e varia entre os diferentes grupos étnicos. Elas representam um problema relevante de saúde, pois os portadores necessitam para sua reabilitação estética e funcional de uma equipe multidisciplinar, do nascimento e geralmente, até a vida adulta, o que exige um alto custo econômico.

A etiologia das FLP não síndrômicas ainda é controversa na literatura, apesar de existirem esforços mundiais para identificar os fatores que causam esta patologia.

Nosso trabalho consistiu do estabelecimento e caracterização de 23 linhagens de células tronco adultas (CTA) obtidas de polpa de dentes decíduos (11 indivíduos, sendo 5 controles, 5 portadores de FLP não síndrômica e 1 portador da síndrome de Van der Woude), do músculo orbicular do lábio (5 indivíduos portadores de FLP), do osso medular (2 indivíduos portadores de FLP) e de gordura de lipoaspiração (5 controles), com o objetivo de utilizá-las para ajudar a elucidar os mecanismos etiológicos de origem genética das fissuras lábio palatinas não síndrômicas; bem como para utilizá-las para bioengenharia dos tecidos alterados nesta patologia, especialmente o tecido ósseo.

Demonstramos que os protocolos que utilizamos são facilmente reproduzidos e que as diferentes linhagens CTA obtidas tem plasticidade para diferenciação osteogênica “*in vitro*”, e que as CTA obtidas de polpa de dente e de músculo orbicular do lábio têm plasticidade para se diferenciar “*in vitro*” em tecido ósseo, muscular, condrogênico e adipogênico. Além disso, em nossos experimentos, demonstramos que estas CTA tem capacidade de regenerar grandes defeitos ósseos em ratos Wistar não imunossuprimidos, nos quais não observamos clinicamente nenhum tipo de rejeição destas células humanas.

Utilizamos uma metodologia inédita para estudar a etiopatogenia das FLP, que consistiu da obtenção de RNA das CTA de indivíduos portadores de FLP e de controles para posterior hibridação em lâminas de “microarray” e comparação do perfil de expressão gênica das mesmas. Observamos neste estudo preliminar que 367 genes estão diferencialmente expressos nas amostras, sendo todos mais expressos nas amostras dos portadores de FLP e sugerimos que esta é uma estratégia promissora para estudo da etiopatogenia das FLP.

Concluimos que a realização de estudos das CTA de afetados por FLP e de controles são importantes não só para utilização das mesmas em bioengenharia de tecidos, mas também para estudo da etiopatogenia das fissuras.

Abstract

Clefts involving the lip and palate (CLP) or palate only (CP) represent the most frequent facial malformation during birth and correspond to approximately 25% of all congenital defects. The incidence of this problem is high; corresponding to approximately 1:700 births, but is different among the ethnic groups.

Clefts represent a major health problem due to the requirement of a multidisciplinary team to deal with the esthetical and functional rehabilitation needs of these patients from birth to, in some cases, adult life, resulting in a high treatment cost.

There still many controversies about the ethiology of non-syndromic CLP, even though there are researchers all over the world trying to identify the factors causing this pathology.

Our work consisted to establish and characterize 23 adult stem cells (ASC) lineages obtained from falling teeth dental pulp (5 controls, 5 non-syndromic CLP patients and 1 Van der Woude syndrome patient), *orbicular oris* muscle (5 non-syndromic CLP patients), bone marrow (2 non-syndromic CLP patients) and adipose tissue (5 controls). The objectives were to use these lineages to help elucidate the genetic mechanisms involved in the development of non-syndromic CLP, as well as, to bioengineer tissues affected by this pathology, mainly bone tissue.

The protocols we used are easily reproducible and we demonstrate that our different ASC lineages have *in vitro* plasticity to osteogenic differentiation, as well as, the lineages obtained from dental pulp and *orbicular oris* muscle have osteogenic, muscular, chondrogenic and adipogenic plasticity. Further more our experiments demonstrate that these ASC lineages have the capacity to regenerate major bone defects in non-immunocompromised Wistar rats, which did not develop any kind of rejection against these human cells.

We have used a new methodology to study the molecular mechanisms involved in CLP, which consisted in comparing the mRNA expression profile of ASC from non-syndromic CLP patients and controls, using microarrays. We observed that 367 genes were differently expressed between the two groups and all these genes have a higher expression in samples from non-syndromic CLP patients, thus suggesting that this is a promising strategy to study the molecular mechanisms involved in CLP.

In conclusion, studies involving ASC from non-syndromic CLP patients and controls are important not only to tissue bioengineering, but also to elucidate the molecular mechanisms involved in CLP.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

I. Considerações gerais

As fissuras lábio/ palatinas (FLP) são as malformações faciais mais comuns presentes ao nascimento e correspondem à cerca de 25% de todos os defeitos congênitos (Slavkin, 1992). Sua incidência é alta, de aproximadamente 0.5 a 2:1000 nascimentos e varia entre os diferentes grupos étnicos (Fraser, 1970; Vanderas, 1987; Tolarova & Cervenka, 1998; Gorlin *et al.*, 2002). Cerca de 350 síndromes apresentam FLP como parte de seu fenótipo (Gorlin *et al.*, 2002) .

As FLP representam um problema relevante de saúde, pois os portadores necessitam para sua reabilitação estética e funcional de uma equipe multidisciplinar (médicos, dentistas, fonoaudiólogos, geneticistas, psicólogos, nutricionistas entre outros), do nascimento e geralmente até a vida adulta, o que exige um alto custo econômico (Gunther, 1995; Bueno & Lopes, 2003).

A etiologia das FLP ainda é controversa na literatura e o modelo de herança mais aceito para as formas não sindrômicas é o multifatorial. Apesar de existirem esforços mundiais para identificar os fatores que causam as fissuras, para que um dia medidas preventivas eficazes possam ser adotadas, são poucos os genes ou fatores de riscos identificados como de susceptibilidade as FLPs não sindrômicas. Assim sendo, estudos de novas estratégias metodológicas, como a utilização de células tronco adultas de pacientes portadores de FLP, poderão ajudar a elucidar os mecanismos etiológicos de origem genética envolvidos nesta patologia. Os estudos do uso das células tronco adultas em bioengenharia de tecidos também poderão trazer novas perspectivas para melhorar as técnicas de reabilitação estética e funcional na face e oclusão dentária destes pacientes num futuro próximo.

No Brasil, há vários centros de atendimento a portadores de fissuras que visam o tratamento desta malformação e à integração destes pacientes na sociedade. O Laboratório de Genética do Desenvolvimento Humano, integrante do Centro de Estudos do Genoma Humano, IB-USP, tem se dedicado à área de pesquisa em genética de fissuras lábio-palatinas desde 1995 e com o presente trabalho iniciamos as pesquisas com células tronco adultas de pacientes portadores de FLP não sindrômicos para estudar sua etiopatogenia, bem como sua utilização em bioengenharia de tecidos a ser aplicada nos portadores de FLP. Além disto também estudamos células tronco adultas de indivíduos não portadores de doenças genéticas ou sistêmicas, também com a

finalidade de utilizá-las como controles para estudo de etiopatogenia e como fontes alogênicas de células para reabilitação de portadores de malformações crânio faciais. Para a realização dos estudos genéticos e bioengenharia de tecidos contamos com o apoio de várias entidades, como o Centro de Reabilitação das Deformidades Faciais, São Paulo; a SOBRAPAR, Campinas; o Hospital Menino Jesus de São Paulo; a Faculdade de Odontologia e o Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; entre outros centros e serviços de fissuras.

II. Incidência /prevalência

As populações caucasóides da Europa e América do Norte têm sido extensivamente caracterizadas em relação a incidência das FL/P, a qual é estimada em 1:700 a cada 1:1000 nascimentos (Fraser, 1970; Cooper M. E. *et al.*, 2006). As populações africanas da América apresentam as mais baixas frequências, ou seja, 0,5:1000 nascimentos (Croen *et al.*, 1998), sendo semelhantes às encontradas em negros africanos (1:2.500 nascimentos) (Fraser 1970; Owens *et al.*, 1985). No Brasil a prevalência tem sido estimada em torno de 1:650 nascimentos (Nagem-Filho *et al.*, 1968; Souza *et al.*, 1987; Loffredo *et al.*, 2001).

III. Embriologia

As FLP ocorrem em função de distúrbios durante o desenvolvimento embriológico normal; portanto a seguir serão descritos resumidamente os principais eventos embriológicos da formação facial, pois com este conhecimento facilita a compreensão dos mecanismos que levam ao aparecimento das FLP.

O desenvolvimento da face se inicia na quarta semana da embriogenese ,com a migração das células da crista neural que combinadas com mesoderma e epitélio estabelecem os primórdios da face (Estágio 10 para embriões humanos, O’Rahilly, 1972). Aproximadamente aos 24 dias de gestação (Estágio 11 para embriões Humanos, Yoon *et al.*, 2000), a boca primitiva ou estomoideu é unido pelo cérebro anterior e pelos arcos mandibulares (primeiro arco faringeal). No estágio 12 para embriões humanos (aproximadamente 26 dias de gestação), surgem as cinco proeminências faciais em torno do estomodeu, ou boca primitiva, sendo uma frontonasal, duas maxilares e duas mandibulares (Figura I.A). Estas proeminências faciais resultam da proliferação das células da crista neural (células ectodérmicas) que migram para as regiões da face e da cabeça, onde atuam como mesênquima (ectomesênquima). Portanto as células da crista

neural formarão todo o esqueleto e tecidos conjuntivos da face: ossos, cartilagens, tecidos conjuntivo e os tecidos dos dentes, exceto o esmalte (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994).

Ao final da quarta, início da quinta semana de gestação, espessamentos ovalados se desenvolvem de cada lado no ectoderma da proeminência frontonasal e são denominados placódios nasais. Em seguida, ocorre uma rápida proliferação celular de ectomesênquima em torno dos placódios, formando as proeminências nasais laterais e mediais (Figura I.B). Por morte celular seletiva e proliferação dos tecidos, as fossetas ou fossas nasais são formadas e alojam os placódios nasais (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994; Yoon *et al.*, 2000). Ainda na quarta semana de gestação, as proeminências mandibulares fundem-se e o sulco entre elas desaparece antes do final da quinta semana, dando origem à mandíbula, ao lábio inferior à porção interior da face (Figura I.E).

Por volta da quinta e da sexta semana, ocorre uma grande expansão das proeminências e até o final da sexta semana, o maxilar e a mandíbula primitivos são estruturas sólidas. Os lábios e as gengivas começam a se desenvolver quando a lâmina labiogengival cresce para dentro do mesênquima subjacente, e, ao passo que esta lâmina se degenera, forma-se o sulco labial entre o lábio e a gengiva. O que resta desta lâmina posiciona-se na linha média, formando o freio labial mediano (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994).

Entre a sexta e a sétima semana, as proeminências maxilares crescem rapidamente por proliferação do ectomesênquima, unem-se às proeminências nasais mediais, sendo somente separadas pelo sulco nasolacrimal. Ao fundirem-se umas com as outras, formam o segmento intermaxilar do maxilar superior, que originará à porção média do lábio superior (filtro nasolabial) (Figura I.C e I.E) e à porção pré-maxilar da maxila (Figura I.D) (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994; Senders *et al.*, 2003).

De forma geral, a proeminência frontonasal forma a testa; o dorso e a ponta do nariz e as asas do nariz são derivadas das proeminências nasais laterais. As proeminências maxilares formam a região superior das bochechas e a maior parte do lábio superior.

O palato, por outro lado, origina-se em duas partes: o palato primário e o secundário. Apesar de seu desenvolvimento iniciar-se logo na quinta semana, a fusão de

suas partes só se completa por volta da décima segunda semana (Moore & Persaud, 1994). O palato primário, ou processo palatino mediano (Figura II.A), desenvolve-se no final da quinta semana a partir da porção mais interna do segmento intermaxilar da maxila. Este segmento, formado pelo encontro das proeminências nasais mediais, forma uma massa cuneiforme de mesênquima entre as proeminências maxilares em desenvolvimento. O palato primário torna-se, então, a parte pré-maxilar da maxila que aloja os dentes incisivos (Figuras II.A e B).

O palato secundário, compreende pelo menos 90% dos palatos duro e mole, ou seja toda porção posterior ao forame incisivo (Figuras II.B). Ele desenvolve-se entre a sétima e a oitava semana a partir de duas projeções mesodérmicas horizontais das superfícies internas das proeminências maxilares, chamadas de processos palatinos laterais. Inicialmente, os processos palatinos são direcionados para baixo, em cada lado da língua (Figura II.C). À medida que os maxilares se desenvolvem, a língua se desloca para baixo do espaço entre os processos palatinos laterais, os quais crescem e movem-se em posição horizontal superior à língua e fundem-se na linha média (Figura II.D). Esses processos fundem-se ao palato primário, ao septo nasal e lateralmente às proeminências mandibulares, reduzindo o tamanho da boca. A fusão começa por volta da nona semana e se completa na décima segunda (Figuras II.E, F e B) (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994).

No momento em que o osso membranoso desenvolve-se no palato primário, formando a parte pré-maxilar da maxila, porções dos ossos maxilares e palatino direcionam-se para dentro dos processos palatinos laterais, formando o palato duro. As porções posteriores dos processos palatinos laterais não se ossificam, mas se estendem para trás do septo nasal e se fundem para constituir o palato mole e a úvula, que é a última porção do palato a se formar. A rafe palatina indica a linha de fusão dos processos palatinos. O fechamento do palato secundário depende de forças intrínsecas nos processos palatinos e do deslocamento da língua do espaço entre os processos palatinos, devido ao padrão de crescimento da cabeça (Gorlin *et al.*, 1990; Ten Cate, 1994; Moore & Persaud, 1994).

Desta forma, podemos concluir que o tempo e posicionamento exato das proeminências faciais durante o desenvolvimento embrionário são críticos para que ocorra o fechamento normal do lábio e do palato (Moore & Persaud, 1994).

Fatores genéticos e ambientais que inibam a migração das células derivadas da crista neural ou que impeçam a proliferação do mesênquima, podem tornar inadequado ou impossível o contato entre as proeminências. O epitélio que recobre o mesênquima pode não sofrer apoptose e a fusão não ocorrer. Qualquer mudança na posição dos placódios nasais, na direção do crescimento das proeminências maxilares e do segmento intermaxilar, e a falta de união das proeminências maxilares às nasais mediais, pode distender o epitélio bucal e este ao romper-se, o que resultaria em uma fissura labial. Uma fissura palatina pode resultar da falha no crescimento das proeminências maxilares, inibindo a elevação dos processos palatinos e gerando um crescimento defeituoso destes, seja pela falta de fusão ou por uma ruptura após a fusão inicial (Jiang *et al.*, 2006; Kerrigan *et al.*, 2000; Gurley *et al.*, 2004, Moore & Persaud, 1994).

INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

Figura I (A,B,C,D,E): Imagens da cabeça de fetos em desenvolvimento para ilustrar o desenvolvimento da face (www.embryoimages.com).

INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

Figura II (A,B,C,D,E,F): Imagens do desenvolvimento do palato (www.embryoimages.com).

IV. Classificação das FLP

Existem várias classificações estruturais para as FLP, no entanto a mais utilizada foi descrita pela primeira vez em 1958 (Kernahan and Stark, 1958) e adota o forame incisivo como ponto anatômico referencial para classificação. Desta forma são consideradas FLP incompletas ou pré forame incisivo, quando afetam o lábio, o osso alveolar da maxila e o palato primário até forame incisivo podendo ser uni ou bilaterais. São consideradas FLP completas ou transforame incisivo aquelas que afetam o lábio, o osso alveolar, palato primário passando pelo forame incisivo e afetando o palato secundário podendo ser uni ou bilateral (Gorlin *et al.*, 1990; Lettieri, 1993; Moore & Persaud, 1994).

Ainda adotando o forame incisivo como referencia para classificação, são consideradas fissuras palatinas isoladas ou pós forame incisivo, aquelas que afetam apenas o palato secundário podendo ser incompletas ou completas quando além do palato secundário também atingem a úvula (Gorlin *et al.*, 1990; Lettieri, 1993; Moore & Persaud, 1994).

Estruturalmente as fissuras labiais isoladas são consideradas incompletas quando não atingem a asa do nariz e completas quando atingem a asa do nariz podendo ser uni ou bilaterais

Há várias evidências que sugerem que a etiologia das FLP é diferente das FP isoladas (Fraser, 1970; Ferguson, 1988; Gorlin *et al.*, 1990; Moore & Persaud, 1994). Por exemplo, o tempo embriológico em que ocorre o fechamento do palato posterior é diferente do tempo em que ocorre a formação do lábio (Fraser, 1970; Ferguson, 1988; Moore & Persaud, 1994). Ainda, estudos em famílias de portadores de fissuras mostram que irmãos de pacientes com FLP, em geral, têm uma frequência aumentada somente da ocorrência de FLP, e que o mesmo ocorre onde a família é afetada por FP isolada (Fraser & Baxter, 1954; Woolf *et al.*, 1963; Fogh-Andersen, 1967; Fraser, 1970). Apesar da FP e FLP não serem comumente encontradas em uma mesma família há exceções. A ocorrência de FLP e FP pode ser observada em uma mesma família de afetados pela síndrome de Van der Woude (Van der Woude, 1954) e nos casos decorrentes de mutações no gene *MSX1* (Vastardis *et al.*, 1996; Boogaard *et al.*, 2000).

INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

Fissura lábio-palatina bilateral completa

Fissura lábio-palatina unilateral completa

FIGURA III: Ilustração da classificação estrutural das fissuras labiais (A) e das fissuras palatinas (B) (Saap *et al.*, 2000); indivíduo portador de fissura lábio palatina bilateral (C); indivíduo portador de fissura lábio palatina unilateral (D).

Os geneticistas em geral classificam as FLP em síndrômicas, quando o indivíduo afetado apresenta outras anomalias físicas ou de desenvolvimento e, não síndrômicas, quando elas são a única alteração clínica do paciente (Murray, 1995). Aproximadamente 70% dos casos de FLP são não síndrômicas e os 30% restantes representam os casos de FLP síndrômicas, os quais podem ser decorrentes de anomalias cromossômicas, alterações gênicas, exposição a teratógenos e causas ainda não estabelecidas (Gorlin *et al.*, 2002; Jugessur & Murrey, 2005; Krapels *et al.*, 2006).

Os estudos das formas síndrômicas das FLP tem possibilitado a identificação de genes envolvidos em sua etiologia. Exemplos incluem a localização dos genes associados a FP associada ao cromossomo X (gene *TBX22*) (Braybrook *et al.*, 2001), a síndrome de Van der Woude em 1q32 (gene *IRF6*) (Kondo *et al.*, 2002), a síndrome da Displasia Ectodérmica associada a FL/P (CLPED1) (gene *PVRL1*) (Suzuki *et al.*, 2000) e a síndrome EEC tipo 3 (gene *TP63*) (Celli *et al.*, 1999). No entanto o entendimento da etiologia das formas de fissuras não síndrômicas ainda é escasso e no presente estudo nos restringiremos apenas ao estudo destas formas.

VI. Etiologia das FLPs não síndrômicas

VI.1. Fatores genéticos

Gorlin *et al.* (2001) realizaram um estudo retrospectivo dos casos de gêmeos com FLP publicados e observaram uma concordância em monozigóticos de 36% e em dizigóticos de 4,7%. Christensen & Fogh-Andersen (1993) revisaram os estudos de gêmeos com FLP da população da Dinamarca durante o período de 1970-1999 e observaram uma concordância de 70% entre monozigóticos e de 10% em gêmeos dizigóticos, com um índice de herdabilidade para FLP em torno de 70%. Estes dados indicam que os fatores genéticos desempenham um importante papel na etiologia das FLP, mas a concordância inferior a 100%, nos casos de gêmeos monozigóticos, sugere que os eventos genéticos sozinhos não são responsáveis pela ocorrência de FL/P, e a presença de fatores ambientais associados aos genéticos são importantes para o desenvolvimento das fissuras.

Apesar da grande maioria dos casos de FLP ser isolado, a recorrência familiar é observada em 20-30% dos casos (Gorlin *et al.*, 1990; Murray 1995; Wyszynski *et al.*, 1996), favorecendo mais uma vez a importância de fatores genéticos na etiologia das FLPs não síndrômicas.

VI.2. Modelos de herança para FLP não síndrômicas

Análise de segregação em famílias de afetados com FLP tem sido realizada em diversos grupos populacionais, entretanto, os modelos de herança obtidos diferem nestes estudos. Esta discrepância pode ser devido à heterogeneidade destas condições, bem como da diversidade amostral (localização geográfica e racial) e dos métodos empregados.

Em 1942, Fogh-Andersen foi o primeiro investigador a obter dados de famílias com fissuras não síndrômicas da Dinamarca e a avaliar os modelos de herança observados nessas famílias. Ele concluiu que a segregação de FLP era mais compatível com um modelo de herança autossômica dominante com penetrância reduzida (revisado por Gorlin *et al.*, 2001). Por outro lado, um modelo de herança compatível com a herança autossômica recessiva em orientais e na população indígena da Venezuela também foi observado (Chung *et al.*, 1986; Ballew *et al.*, 1993)

Entretanto, esses modelos foram fortemente rejeitados por alguns autores em favor da interação entre vários locos. Neste modelo oligogênico, de 3 a 14 locos podem estar atuando em conjunto para o aparecimento das FLP, apresentando um efeito aditivo ou de interação epistática (Farral & Holder, 1992; Mitchell & Risch, 1992; Mitchell & Christensen, 1996; Schliekelman & Slatkin, 2002).

O modelo multifatorial com limiar tem sido o mais aceito por vários pesquisadores (Fogh Andersen, 1967; Carter, 1976; Fraser, 1976; Chung *et al.*, 1986; Mitchel & Risch 1992; Prescott *et al.*, 2000; Gorlin *et al.*, 2000), apesar de ter sido inconclusivo em algumas populações (Bear, 1976; Melnick *et al.*, 1980; Marazita *et al.*, 1984). Neste modelo a ocorrência das fissuras depende de um grande número de genes, cada um com pequenos efeitos aditivos associados a fatores ambientais. O acúmulo desses fatores genéticos e ambientais de risco é tolerado pelo embrião até certo ponto, quando atinge um limiar, depois do qual a característica torna-se aparente.

VI.3. Identificação de genes associados às FLP não síndrômicas

Atualmente existe um grande esforço dos pesquisadores na identificação de genes que contribuem para o desenvolvimento das formas não síndrômicas de FLP. Várias abordagens têm sido utilizadas na tentativa de se identificar estes genes, tais como: análise de ligação genética (Murray, 1995; Wyszynski *et al.*, 1996; Pezzetti *et al.*, 1998; Risch, 2000; Marazita *et al.*, 2002, 2004); de pares de irmãos (Prescott *et al.*,

2000); de associação (Passos- Bueno et al, 2004; Vieira *et al*, 2006; Krapels *et al.*, 2006).

Os estudos de associação têm a vantagem sobre os de ligação ou de pares de irmãos por utilizarem pacientes afetados, casos isolados ou familiares, não havendo necessidade de incluir parentes afetados (Risch, 2000).

O protótipo da abordagem de associação é o estudo caso-controle, que se baseia na determinação da frequência de um alelo em uma população de afetados comparada com a de uma população controle. A presença de tal alelo em uma porcentagem maior de pacientes do que de controles (após a realização de testes estatísticos que determinem o nível de significância dos resultados, qui-quadrado) é conhecida como associação (ou associação positiva). Nesse caso o alelo em questão passa a ser considerado um alelo de risco (revisado por Passos-Bueno & Moreira, livro genômica).

O estudo de associação é uma ferramenta poderosa para a identificação de alelos de risco associados às FLP. No entanto, os resultados dos estudos de associação devem ser interpretados com cuidado, pois a detecção de associação positiva entre determinado alelo e uma doença pode ser atribuída, ainda, a pelo menos a duas situações: a) o alelo em questão está mapeado numa região muito próxima ao alelo que efetivamente predispõem à doença; b) efeito de estratificação da população: a população é composta por mais de um grupo étnico, cada um com diferentes frequências alélicas, e as amostras de afetados e controles utilizadas no estudo não apresentam a mesma constituição étnica. Portanto, deve-se proceder com rigor a seleção de controles. Evitar a estratificação nem sempre é simples, particularmente em populações miscigenadas, como a Brasileira.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para contornar o problema de estratificação, o mais utilizado, é o teste do desequilíbrio de transmissão (TDT). O TDT clássico depende da genotipagem de trios compostos pelo paciente e por seus pais para os locos de interesse. Ele avalia com que frequência a mutação, ou alelo marcador em estudo, é transmitida dos pais para os filhos afetados, portanto considera apenas os trios em que pelo menos um dos pais é heterozigoto. Os alelos que sejam transmitidos em uma frequência maior que 50% podem representar fatores de risco para manifestação da doença.

Os genes a serem analisados nos estudos de associação para as FLP não sindrômicas costumam ser selecionados com base em algumas premissas como:

a) encontram-se mapeados em regiões cromossômicas candidatas à FLP (candidatos posicionais); b) codificam proteínas que parecem funcionalmente relacionadas à patogênese da doença (candidatos funcionais); c) através da observação de modelos animais Knockouts que possuem o fenótipo de FLP (Proetzel *et al.*, 1995).

Há muitos genes candidatos para as FLP no entanto os resultados observados na literatura são controversos. Vários genes já foram estudados na população brasileira no entanto apenas o BCL3 mostrou evidência de associação com a doença (Gaspar *et al.*, 1999; Gaspar *et al.*, 2002; Passos-Bueno *et al.*, 2004; Gaspar *et al.*, 2004). Por outro lado, Viera *et al.* (2005) demonstraram em um estudo que envolve amostras da população brasileira que mutações de ponto nos genes candidatos para as FLP (FOXE1, GLI2, MSX2, SKI, SATB2 e SPRy2) parecem contribuir para o aparecimento de cerca de 6% dos casos de FLP não sindrômica. Exemplos de alguns outros genes selecionados para estudo em humanos estão apresentados na tabela V 3.1

Tabela VII.1: Genes e regiões cromossômicas envolvidos no desenvolvimento da cabeça e em particular do lábio e palato, considerados candidatos.

Gene	Localização cromossômica	Possível Função	Motivo de Seleção	Doença	Modelo Animal	Estudos em Humanos (Referências)
MTHFR	1p36.3	<i>5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase</i>	Via do metabolismo do folato e homocisteína	NSFL/P; NSFP	-	L+ (Prescott <i>et al.</i> , 2000) A+ (Tolarova <i>et al.</i> , 1998; Mills <i>et al.</i> , 1999; Martinelli <i>et al.</i> , 2001a; Prescott <i>et al.</i> , 2002; Gaspar <i>et al.</i> , 2002) A- (Gaspar <i>et al.</i> , 1999; Shaw <i>et al.</i> , 1998; Shaw <i>et al.</i> , 1999; Wyszynski e Diehl 2000; Blanton <i>et al.</i> , 2000; Beaty <i>et al.</i> , 2002; Passos-Bueno <i>et al.</i> , 2004).
TGFβ2	1q41	<i>Transforming growth factor β2</i> ;	Expressão	NSFL/P	-	A + (Tanabe <i>et al.</i> , 2000) A - (Lidral <i>et al.</i> , 1997)
-	1q32	-	Estudos de Ligação	SVW; NSFL/P		L - (Vintiner <i>et al.</i> , 1993; Wong <i>et al.</i> , 2000; Martinelli <i>et al.</i> , 2001b; Houdayer <i>et al.</i> , 1999) L+ (Martinelli <i>et al.</i> , 2002)
TGFα	2p13	<i>Transforming growth factor α</i> ; Fator de Sinalização	Expressão	NSFL/P/NSFP	-	L+ (Pezzetti <i>et al.</i> , 1998; Prescott <i>et al.</i> , 2000) L- (Hecht <i>et al.</i> , 1991; Vintiner <i>et al.</i> , 1992; Field <i>et al.</i> , 1994; Wyszynski <i>et al.</i> , 1997; Wong <i>et al.</i> , 2000) A+ (Ardinger <i>et al.</i> , 1989; Tanabe <i>et al.</i> , 2000; Chenevix-Trench <i>et al.</i> , 1991; 1992; Hecht <i>et al.</i> , 1991b; Holder <i>et al.</i> , 1992; Stoll <i>et al.</i> , 1993; Sassani <i>et al.</i> , 1993; Feng <i>et al.</i> , 1994; Jara <i>et al.</i> , 1995; Pezzetti <i>et al.</i> , 1998; Shiang <i>et al.</i> , 1993; Mitchell, 1997; Shaw <i>et al.</i> , 1996a; Romitti <i>et al.</i> , 1999; Beaty <i>et al.</i> , 2002) A- (Hecht <i>et al.</i> , 1991b; Chenevix-Trench <i>et al.</i> , 1992; Holder <i>et al.</i> , 1992; Stoll <i>et al.</i> , 1993; Vintiner <i>et al.</i> , 1992; Field <i>et al.</i> , 1994; Shaw <i>et al.</i> , 1996b; Wyszynski <i>et al.</i> , 1997; Scapoli <i>et al.</i> , 1998; Lidral <i>et al.</i> , 1997; Beaty <i>et al.</i> , 2001)
TP63	3q27	TP3 homólogo do regulador de ciclo celular p53	-	Síndrome EEC3	-	TM (Celli <i>et al.</i> , 1999; Ianakiev <i>et al.</i> , 2000)
MSX1	4p16.1	Homeodomínio (HOX-Segmento muscular)	Expressão/ modelo animal	NSFL/P; NSFP; Hypodontia A-D	Knockout	A + (Blanco <i>et al.</i> , 2001; Lidral <i>et al.</i> , 1998; Romitt <i>et al.</i> , 1999; Beaty <i>et al.</i> , 2001, 2002) A – (Lidral <i>et al.</i> , 1997; Mitchell <i>et al.</i> , 2001; Scapoli <i>et al.</i> , 2002) L - (Prescott <i>et al.</i> , 2000; Wong <i>et al.</i> , 2000) TM (Van den Boogaard <i>et al.</i> , 2000; Vastardis <i>et al.</i> , 1996)
-	4q25-q31.3	-	Aberração cromossômica	-	-	L- (Wong <i>et al.</i> , 2000) A+ (Beiraghi <i>et al.</i> , 1994; Mitchell <i>et al.</i> , 1995; Pierpont <i>et al.</i> , 1995; Martinelli <i>et al.</i> , 1998)
-	6p23-p25	-	Aberração cromossômica	-	-	L+ (Carinci <i>et al.</i> , 1995; Scapoli <i>et al.</i> , 1997; Prescott <i>et al.</i> , 2000) L- (Van Dyke <i>et al.</i> , 1980; Watanabe <i>et al.</i> , 1984; Hecht <i>et al.</i> , 1993; Vintiner <i>et al.</i> , 1993; Blanton <i>et al.</i> , 1996). A+ (Scapoli <i>et al.</i> , 1997; Marazita <i>et al.</i> , 2002b)

END1	6p24-p23	<i>Endothelin 1</i> ; Fator de sinalização, Transdução de sinal	Função Biológica	NSFL/P	Knockout	L - (Pezzetti <i>et al.</i> , 2000; Wong <i>et al.</i> , 2000;)
SHH	7q36	<i>Sonic hedgehog</i> , Fator de sinalização; Diferenciação e proliferação celular	Modelo animal	NSFL/P	Knockout	TM (Orioli <i>et al.</i> , 2002)
PVLR1	11q23	Molécula de adesão celular Nectina 1	Função Biológica	Síndrome CLPE1; NSFL/P	Expressão	TM (Suzuki <i>et al.</i> , 2000)
TGFβ3	14q24	<i>Transforming growth factor β3</i> ; Sinal de transdução, Sinalização celular, Embriogênese e morfogênese	Expressão/ modelo animal	NSFL/P/NSFP	Knockout	L- (Prescott <i>et al.</i> , 2000) A + (Lidral <i>et al.</i> , 1998; Maestri <i>et al.</i> , 1997; Romitti <i>et al.</i> , 1999; Sato <i>et al.</i> , 2001; Beaty <i>et al.</i> , 2002) A – (Lidral <i>et al.</i> , 1997; Mitchell <i>et al.</i> , 2001; Tanabe <i>et al.</i> , 2000; Beaty <i>et al.</i> , 2001; Scapoli <i>et al.</i> , 2002)
RARA	17q21	<i>retinoic acid receptor alpha</i> ; Fator de sinalização	Teratogênese	NSFL/P	Transgene	L- (Vintier <i>et al.</i> , 1993; Shaw <i>et al.</i> , 1993; Prescott <i>et al.</i> , 2000) A+ (Chenevix-Trench <i>et al.</i> , 1992; Maestri <i>et al.</i> , 1997; Marazita <i>et al.</i> , 2002b) A- (Vintiner <i>et al.</i> , 1993; Shaw <i>et al.</i> , 1993; Mitchell <i>et al.</i> , 1994; Scapoli <i>et al.</i> , 2002)
BCL3	19q13	<i>B-cell leukemia/lymphoma-3</i>	Função Biológica	NSFL/P	-	L+ (Stein <i>et al.</i> , 1995; Wyszynski <i>et al.</i> , 1997; Martinelli <i>et al.</i> , 1998) L - (Wong <i>et al.</i> , 2000; Prescott <i>et al.</i> , 2000; Gaspar <i>et al.</i> , 2002) A+ (Stein <i>et al.</i> , 1995; Amos <i>et al.</i> , 1996; Wyszynski <i>et al.</i> , 1997; Maestri <i>et al.</i> , 1997; Martinelli <i>et al.</i> , 1998; Beaty <i>et al.</i> , 2002; Gaspar <i>et al.</i> , 2002; Marazita <i>et al.</i> , 2002b) A- (Beaty <i>et al.</i> , 2001)
GABRβ3	15q11-q13	<i>β3 subunit of the γ-aminobutyric acid receptor</i> ; via de sinalização	Função Biológica	NSFL/P	Knockout	A+ (Scapoli <i>et al.</i> , 2002) A – (Tanabe <i>et al.</i> , 2000)
TBX22	Xq21	Fator de Transcrição Tbox	-	Síndrome FP associada a Ankioglossia-X	-	TM (Braybrook <i>et al.</i> , 2001) L+ (Prescott <i>et al.</i> , 2000)

L= Ligação; A= Associação; TM= Triagem de Mutações; NSFL/P= Fissura labial/ palatina não síndrômica; NSFP= Fissura Palatina não síndrômica; + = positivo; - = negativo

VI.4. Fatores ambientais

Algumas drogas específicas são conhecidas por possuírem um efeito teratogênico no desenvolvimento facial tanto em humanos como em animais (Lammer *et al.*, 1985).

Muitos fatores ambientais vem sendo amplamente estudados e embora alguns estudos demonstrem resultados contraditórios a maioria tem observado que o uso materno de por exemplo: anticonvulsivantes, álcool, tabagismo, utilização de ácido retinóico e deficiência materna de vitaminas, incluindo o ácido fólico podem predispor o aparecimento das fissuras lábio palatinas (Wyszynski & Beaty, 1996; Shaw *et al.*, 1996; Houdayer & Bahuau, 1998; Lammer *et al.* 1985; Hanson & Smith, 1975; Deam *et al.*, 2002; Krapels *et al.*, 2004; Krapels *et al.*, 2006).

VII. Nova estratégia para o estudo das FLPs (uso de células tronco adultas de portadores de FLP não síndrômica)

Há um número crescente de exemplos em que se encontra associação de SNPs funcionais em regiões promotoras de genes associadas a doenças complexas (Borovecki *et al.*, 2005; Baron *et al.*, 2006; Hu *et al.*; 2006). Estes SNPs alteram o padrão de expressão gênica do gene correspondente e portanto, este grupo de alterações genéticas tem potencial de serem detectadas por análise de expressão gênica em tecidos específicos. De fato, recentemente, tem-se identificado genes candidatos por meio da análise do perfil de expressão gênica em pacientes com autismo (Baron *et al.*, 2006; Hu *et al.*; 2006).

As FLP são decorrentes de erros que ocorrem durante a embriogênese, o que dificulta a obtenção de tecidos ideais para serem estudados por meio desta estratégia. Com o intuito, de verificarmos se o perfil de expressão gênica está alterado nas FLP, optamos em estudar células tronco adultas de pacientes com FLP, pois estas correspondem ao tipo celular mais indiferenciado e mais próximas da fase embrionária, e ainda, são de fácil obtenção.

As células tronco adultas têm a propriedade de se auto- renovar e de se diferenciar em um ou mais tecidos especializados quando induzidas “*in vitro*” ou “*in vivo*”. Elas podem ser obtidas dos mais diversos tecidos como medula óssea (Caplan, 1991), tecido adiposo (Zuk, *et al.* 2002, 2001), polpa de dente (Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2006), músculo esquelético (Mastrogiacomo *et al.*, 2005) entre outros. Sabe-se que as células tronco obtidas de tecidos de um indivíduo afetado por uma determinada doença genética

conterá alterações gênicas que desencadearão uma série de alterações genômicas, que lhe conferirão o determinado fenótipo.

Então no presente estudo utilizaremos uma nova estratégia para o estudo da etiologia das FLP, que é a obtenção de RNA de células tronco de pacientes portadores de FLP não sindrômicas e de indivíduos controles para posterior hibridação em laminas de microarray. Esta nova estratégia parece ser um modelo viável para o estudo das vias de regulação gênica nesta patologia e poderá no futuro ajudar a estabelecer uma relação genótipo/fenótipo (Capítulo V).

Além disto, nas FLPs há um comprometimento de tecido ósseo e muscular e dada a plasticidade das células tronco, será possível estudar os processos de diferenciação óssea e muscular neste grupo de pacientes.

Assim sendo, estamos propondo no presente estudo, a análise do perfil de expressão gênica em fissurados como uma nova estratégia para identificarmos genes candidatos para esta malformação (Capítulo V).

VIII. Tratamento das FLPs

Os portadores de FLP necessitam de reabilitação estética e funcional que deve ser realizada por uma equipe multidisciplinar (médicos, dentistas, fonoaudiólogos, geneticistas, psicólogos, nutricionistas entre outros) e se inicia ao nascimento e geralmente se estende até a vida adulta (Gunther, 1995; Bueno & Lopes, 2003).

Há diversos protocolos na literatura que utilizam diferentes aparelhos ortopédicos funcionais/ortodônticos para o alinhamento das arcadas dentárias, bem como diferentes técnicas e tempos cirúrgicos para correção labial (queiloplastia), para correção do palato (palatoplastia) e para realização de enxertos ósseos alveolares. O tratamento selecionado para as FLP são estabelecidos de acordo com a equipe multidisciplinar envolvida na reabilitação (Bueno & Lopes, 2003).

Em todos os casos de FLP pré ou transforame incisivo, o osso alveolar da maxila (estrutura óssea que abriga os germes dentários) sofre uma quebra de continuidade ou ruptura. Na maioria dos casos, a porção do osso alveolar que é atingida pela ruptura se localiza entre o canino e o incisivo lateral. Esta ruptura no osso alveolar pode afetar a lamina dental e gerar uma série de alterações nos dentes que se localizam nesta região de quebra de continuidade do osso alveolar, como por exemplo alterações de número (agenesias de incisivos laterais são observadas em cerca de 30% dos casos), da posição (normalmente os incisivos laterais erupcionam-se palatinamente na linha da

fissura) e formato. Portanto mesmo com a realização da queiloplastia e da palatoplastia, o paciente portador de FLP para sua completa reabilitação estética e funcional necessita da realização de enxertos ósseos para corrigir a malformação do osso alveolar. A realização destes enxertos proporciona: estabilidade ao arco maxilar, fecham as fístulas oronasais e fissuras anteriores do palato (quando existirem), provem suporte para o correto posicionamento do dente que se localiza na região da fissura, bem como serve de suporte ósseo para realização de implantes dentários quando ocorre agenesia do dente na região da fenda.

A técnica de enxerto ósseo mais utilizada atualmente nos portadores de FLP é o enxerto ósseo secundário. Este é realizado após o alinhamento das arcadas dentárias e quando há formação de 2/3 da raiz do dente, o que indica que o dente está pronto para erupção. Para a realização do enxerto secundário, remove-se o osso da região doadora e coloca-se na fenda alveolar (Nwoku *et al*, 2005). O osso mais frequentemente utilizado para os enxertos ósseos alveolares secundários em pacientes portadores de FLP é o osso medular da crista ilíaca. As equipes multidisciplinares que utilizam esta técnica têm obtido bons resultados estéticos e funcionais, entretanto observa-se a reabsorção do enxerto em aproximadamente 10% dos casos (Kawamoto & Zwiebel, 1985), sendo necessária uma nova intervenção cirúrgica.

Em contraste, outros grupos utilizam os aparelhos ortopédicos funcionais para alinhamento das arcadas dentárias, associados à realização da queiloplastia e palatoplastia e realizam enxertos ósseos alveolares primários (de 8-12 meses de idade do paciente). O osso utilizado para este enxerto é normalmente obtido de uma das costelas do recém nascido. Estes autores demonstram que o enxerto ósseo primário mantém uma relação favorável dos segmentos maxilares desde o início de seu crescimento e diminuem a necessidade da realização de expansão palatal, do uso de enxertos ósseos secundários e também diminuem a ocorrência de fistula nasal e a necessidade da realização de cirurgias ortognáticas (Rosenstein & Dado, 2005).

A realização de enxertos autógenos, obtidos das mais diferentes fontes (costelas, calvária, tíbia, crista ilíaca entre outros) é o método mais utilizado nos enxertos ósseos primários e secundários nos portadores de FLP. Eles são considerados vantajosos uma vez que evitam complicações de rejeição imunológica e fornecem células que podem começar o processo regenerativo (Ishaug-Riley *et al*, 1997). No entanto, eles também apresentam algumas desvantagens como: morbidade da área doadora, reabsorção pós-

operatória, (Mark *et al.*, 1990) e complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (Younger & Chapman, 1989).

IX. Perspectivas futuras para o tratamento de fissuras lábio palatinas (bioengenharia de tecidos)

A bioengenharia de tecidos é definida como uma área interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e de ciências biológicas. Ela contribui para o desenvolvimento de substitutos biológicos para diversos tecidos no intuito de restaurá-los, mantê-los ou de aumentar sua função (Barrilleaux *et al.*, 2006). Estes tecidos substitutos podem ser gerados *in situ*, quando se colocam materiais e/ ou células precursoras na região que deve ser regenerada e eles usam os próprios mecanismos de reparo de tecidos dos pacientes para induzir a regeneração do tecido afetado (Choi *et al.*, 2005) ou *ex vivo* quando se usam implantes ou dispositivos extracorporais, que podem ou não conter células (Alhadlaq *et al.*, 2004).

Para engenharia de tecido ósseo é necessária uma grande quantidade de células e a utilização de um molde ou matriz confeccionados de Biomateriais que simulem o defeito ósseo (“*scaffold*”) e permitam que as células tenham a possibilidade de se aderirem e então de se proliferarem e diferenciarem para regenerar o tecido (Freed *et al.*, 2006).

Muitos materiais tem sido utilizados para confecção dos *scaffolds* para bioengenharia de tecido ósseo como: materiais sintéticos (polyesters derivados de α -hidroxiácidos e outros polímeros) (Stark *et al.*, 1998); a associação de cerâmicas com fosfato de cálcio e moléculas bioativas (Stark *et al.*, 1998; Hutmacher, 2000); uso de polímeros naturais como: colágenos, proteoglicanas, glicosaminoglicanas, elastinas e hidroxiapatita (Christer *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998; Lee & Lee, 2001; Farrel *et al.*, 2006).

Entre os polímeros naturais o colágeno vem sendo amplamente estudado (Farrel *et al.*, 2006; Sung-chul *et al.*, 2000). O interesse especial dos pesquisadores neste tipo de polímero se dá pelo fato de que ele possui alta biocompatibilidade (Lee & Lee, 2001) e também pela contribuição que ele pode dar para o entendimento da formação do tecido ósseo (Ahmad *et al.*, 1998) e doenças relacionadas com a interrupção dos processos normais de biomineralização que ocorrem *in vivo* (Clark *et al.*, 1999).

O uso de células tronco em bioengenharia de tecidos ósseos tem se demonstrado muito promissor, pois elas mantêm a capacidade de se auto-renovar, permanecendo

indiferenciadas por períodos prolongados e também possuem a capacidade de se diferenciar em um ou mais tipos celulares quando submetidas a indução (Caplan, 1991).

IX.1. Células tronco embrionárias

As células tronco embrionárias (ES) são células totipotentes, obtidas da massa interna do blastocisto, que podem se propagar indiferenciadas indefinidamente e podem se diferenciar em todas as linhagens celulares “*in vivo*” e “*in vitro*” quando induzidas (Reyes, M *et al*, 2001 catarine verfaille). No entanto, alguns problemas para a utilização das ES em terapêutica tem sido levantados na literatura, como por exemplo a formação de teratomas (Winkler *et al.*, 2005) e a rejeição imunológica (Swijnenburg *et al.*, 2005).

Embora as ES venham sendo isoladas de humanos, seu uso em pesquisa bem como em terapêutica tem inúmeras considerações éticas. No Brasil em 2005 foi aprovada a lei nº 11.105 que permite a utilização de embriões inviáveis ou de embriões congelados a mais de três anos, para a pesquisa com células tronco embrionárias (Anexo I. VIII.1).

IX.2. Células tronco adultas

As células tronco adultas são células que tem a propriedade de se auto- renovar e de se diferenciar em um ou mais tecidos especializados quando induzidas “*in vitro*” ou “*in vivo*”. Elas podem ser obtidas dos mais diversos tecidos como medula óssea (Caplan,1991), tecido adiposo (Zuk *et al* 2002,2001), polpa de dente (Miura *et al.*, 2003), músculo (Mastrogiacomo *et al*, 2005) entre outros.

O uso de células tronco adultas, em bioengenharia de tecidos, para reconstrução óssea vem sendo uma área de crescimento ativo.

Com o intuito de desenvolver novas técnicas para regeneração do tecido ósseo, estas células estão sendo usadas em ensaio pré-clínicos (Caplan *et al.*, 2005) e clínicos (Muschler *et al.*, 2003).

A possibilidade de se isolar, cultivar e manipular células tronco a partir de diversos tecidos mesenquimais e utilizá-las no futuro para reabilitação óssea dos pacientes portadores de fissuras lábio palatinas (nos enxertos ósseos primário e secundários), fez com que nós nos propusemos a isolar células tronco de diferentes

tecidos e demonstrar sua plasticidade “*in vitro*” e “*in vivo*” (Capítulo III e Capítulo IV).

IX.3. Células tronco embrionárias X células tronco adultas

Os benefícios de se utilizar células tronco adultas ao invés de se utilizar células tronco embrionárias para reabilitação de tecidos ósseos em pacientes portadores de fissuras lábio palatinas, incluem a imunocompatibilidade das células autólogas, a disponibilidade das mesmas nos mais diversos tecidos e facilidade para se induzir sua diferenciação.

IX.4. Reconstrução de tecidos ósseos craniofaciais

Para a reconstrução de tecidos ósseos craniofaciais é necessária a validação das técnicas de bioengenharia de tecidos em modelos animais, antes de sua aplicação em humanos.

Vários modelos animais de defeitos ósseos tem sido estudados para avaliar o potencial de materiais e candidatos biológicos para promoção de regeneração do tecido ósseo (Nunamaker D M, 1998; Krebsbach *et al.*, 1998; Mankani *et al.*, 2006). Estes modelos tem ajudado a elucidar os mecanismos de integração endosseos (fenômeno de osteocondução) e/ou os mecanismos de remodelação óssea (fenômeno de osteoindução).

Muitos fatores afetam a escolha do modelo animal para pesquisa de reparação óssea como:

- a) biologia e anatomia do modelo animal;
- b) a idade do animal, que pode afetar seu metabolismo ósseo;
- c) o potencial de cura espontânea do defeito induzido no modelo animal.

Estudos do metabolismo ósseo associados à idade em humanos e em animais têm demonstrado uma redução no crescimento e remodelação óssea em idades mais avançadas (Riggs *et al.* 1991; Wronski *et al.*, 1989); portanto, o sucesso da bioengenharia de tecido é fortemente dependente da idade do indivíduo receptor do enxerto, do tipo de scaffold escolhido, bem como do número de células mesenquimais plaqueadas no scaffold e sua capacidade de gerar osteoblastos e criar potencialmente grandes volumes de tecidos ósseos (Caplan, 2005)

Para o estudo de bioengenharia de tecidos ósseos craniofaciais “*in vivo*” o modelo mais utilizado na literatura é a reconstrução de defeitos críticos criados em

calotas cranianas de ratos (Schmitz *et al.*, 1986; Schmitz *et al.*, 1990), que não se regeneram espontaneamente durante a vida do animal (Schmitz & Hollinger, 1986).

Os tamanhos dos defeitos críticos variam de acordo com as espécies de ratos utilizadas no experimento (Schmitz *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 1998; Winn *et al.*, 1999); Para ratos wistar um defeito de 5mm de diametro sem a remoção do perióstee é considerado um defeito crítico (Bosch *et al.*, 1998).

A remoção ou não do perióstee é um fator determinante no estabelecimento de defeitos críticos, pois sabe-se que o perióstee exerce um papel importante na regeneração óssea. Narang na Laskin (1976) demonstraram que o perióstee remanescente no sitio da osteotomia exerce um papel fundamental na determinação da dimensão dos defeitos críticos. Eles demonstraram que defeitos de 12mm na fíbula de ratos (Holtzman Albino) não eram considerados defeitos críticos se o perióstee fosse mantido enquanto que com a remoção do perióstee defeitos de 6mm eram considerados defeitos críticos. Além disto, dados mais recentes demonstraram que o perióstee contém uma fonte de células tronco mesenquimais que podem induzir a diferenciação osteogênica e promover reparos espontâneos em ossos longos (Bari *et al.*, 2006).

A escolha da calvária como região ideal para se simular grandes perdas ósseas craniofaciais deve-se ao fato de ela ser composta por osso membranoso, ter um suplemento sanguíneo relativamente limitado e estas propriedades biológicas lhe conferirem poucas propriedades para se regenerar espontaneamente (Schmitz *et al.*, 1986), além disto é uma área anatomicamente livre de *stress* mecânico e existe uma estabilidade relativa das estruturas que circundam o defeito crítico, as quais incluem margens calvariais intactas , a base da duramater e os músculos temporais e frontais acima, que criam um processo de desenvolvimento no qual é possível estudar as interações entre o novo osso reconstruído e o osso “*in situ*” (Mahesh *et al.*, 2006).

Alguns estudos tem sido feitos na literatura utilizando diferentes “scaffolds” e células tronco adultas obtidas de diferentes tecidos para fechar defeitos críticos em calotas cranianas de modelos animais (Krebsbach *et al.*, 1998; Mankani *et al.*, 2006), no entanto como temos o objetivo de utilizar no futuro a bioengenharia de tecido para realização de enxertos ósseos alveolares primários e secundários, em pacientes portadores de FLP observamos que existe a necessidade de se estudar novas estratégias de bioengenharia de tecidos.

X. Objetivos principais

1. Verificar a possibilidade de se estabelecer de forma reproduzível linhagens de células tronco a partir de osso trabecular, polpa de dentes decíduos e gordura de lipoaspiração, bem como verificar a plasticidade destas linhagens para diferenciação osteogênica “in vitro”

2. Verificar se células troncas humanas derivadas de Polpa de dentes decíduos têm plasticidade para se diferenciar em tecido muscular, ósseo e adipogênico “in vitro” , bem como sua capacidade de regenerar grandes defeitos cranianos “in vivo”

3. Verificar se é possível isolar células tronco de músculo orbicular do lábio de pacientes portadores de Fissuras Lábio Palatinas e se em modelos animais elas podem gerar osso.

4. Verificar se o perfil de expressão gênica de células tronco de pacientes com fissuras lábio palatinas difere daquele de indivíduos normais.

CAPÍTULO II - MATERIAL e MÉTODOS

II.1. Pacientes e considerações éticas

Nossa amostra total é constituída por:

- 11 polpas de dentes decíduos obtidas, por mim (cirurgiã dentista) em 2 consultórios odontológicos, gentilmente cedidos pelas cirurgiãs dentistas Prof. Dra Lucy Dalva Lopes e pela Me. Maristher Fabretti dos Santos Pinto;

- 5 amostras de Músculo esquelético do lábio obtidas durante a cirurgia de queiloplastia de portadores de FLP e 2 amostras de osso medular, obtidas da crista ilíaca de pacientes portadores de FLP, cedidas pelos cirurgiões plásticos do hospital SOBRAPAR, Campinas, Brasil;

- 5 amostras de gordura de lipoaspiração obtidas a partir de cirurgias estéticas de abdômen e cedidas pelo cirurgião plástico André de Mendonça.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 037/2005) e seguimos as devidas recomendações. Todos os pacientes e/ou responsáveis assinaram o termo de consentimento aceitando a participação nesta pesquisa (Anexo II.A, II.B e IIC).

II.2. Estabelecimento das linhagens celulares

Para o estabelecimento de todas as linhagens celulares, o meio controle utilizado foi:

DMEM F12 (Invitrogen), 2mM l-glutamina, 100 U/ml streptomycin sulfate (Invitrogen), 1% non-essential aminoacids (Invitrogen) e 15% de soro fetal bovino (Hyclone).

II.2.1. Polpa dentária e músculo esquelético

As polpas de dentes decíduos foram obtidas de 5 indivíduos controles que não apresentavam nenhuma doença sistêmica ou genética, 5 pacientes portadores de FLP não síndrômica e 1 paciente portador de FLP síndrômica (síndrome de Van der Woude), com idades entre 5-8 anos. Todas as polpas foram lavadas com PBS (phosphate-buffered saline, 0,01M; pH = 7,4) suplementado com 4% de antibiótico (100 units/ml penicillin e 100µg/ml streptomycin; Invitrogen), para remover possíveis contaminações e células sanguíneas.

Os tecidos de músculo orbicular do lábio foram obtidos de 4 pacientes portadores de FLP e 1 paciente portador de FLP síndrômica (síndrome de Van der Woude), com idades de aproximadamente 3 meses, durante a cirurgia da queiloplastia. Após a remoção cuidadosa do tecido conjuntivo que circundava o músculo esquelético, os tecidos foram lavados extensivamente em PBS (phosphate-buffered saline, 0,01M; pH = 7,4) suplementado com 4% de antibiótico (100 units/ml penicillin e 100µg/ml streptomycin; Invitrogen), para remover possíveis contaminações e células sanguíneas.

Os procedimentos utilizados para o estabelecimento das linhagens celulares provenientes do músculo orbicular do lábio e de polpas dentárias foram os mesmos:

Ambos foram digeridos em solução de tripsina 0,25% (TrypLe, Invitrogen) por uma hora a 37°C e depois foram transferidos para placas de petri de 35-mm (Corning, NY) com o meio controle. As culturas foram mantidas nestas condições por 2 semanas e depois foram tripsinizadas (0,25% de solução de tripsina, TrypLe, Invitrogen), e plaqueadas 10^4 células em garrafas de 25 cm². Todas as culturas foram mantidas em semiconfluência para prevenir a diferenciação das células.

II.2.2. Osso medular

Foram coletadas 2 pequenas amostras de osso medular de 2 pacientes portadores de FLP não síndrômica, com idades de 9 anos, que seriam descartadas no momento da cirurgia de enxerto ósseo secundário, pois toda região da fissura alveolar que receberia o enxerto já havia sido preenchida.

O osso medular foi lavado 3 vezes com PBS (Sterile phosphate-buffered saline, Invitrogen) para remover possíveis contaminações e células sanguíneas; depois foi triturado em partículas menores que foram digeridas em 0,075% de collagenase (tipo I; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em PBS por 1 hora a 37 °C com agitação. A collagenase foi inativada com DMEM e 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1400 RPM, o pellet foi ressuspensionado em 3 ml do meio de cultura controle e transferido para placas de 35-mm, onde foram mantidos por 2 semanas, quando as células foram tripsinizadas e 10 células foram transferidas para garrafas de 25 cm². A cultura foi mantida em semiconfluência para prevenir a diferenciação espontânea das células e durante 5 dias o meio foi trocado diariamente.

II.2.3. Gordura de lipoaspiração

Obtivemos 500ml de gordura de lipoaspiração de 5 pacientes que foram submetidos a cirurgia estética de abdômen e utilizamos o protocolo descrito por ZUK et al 2001 para separar as células tronco a partir de tecido adiposo, no entanto não utilizamos o mesmo meio de cultura que a referida autora para plaquear as células (utilizamos o meio controle previamente descrito).

Os 500ml de tecido adiposo obtidos foram lavados com PBS suplementado com 4% de antibiótico (100 units/ml penicillin e 100µg/ml streptomycin; Invitrogen) por 3 vezes, transferidos para um recipiente estéril no qual adicionou-se 300ml de collagenase 0,075% e foi incubado a 37 °C em um shaker por 30 minutos. Após inativação da collagenase com DMEM e 10% de soro fetal bovino, o infranadante foi distribuído em tubos de 50ml que foram centrifugados por 5 minutos para se obter um precipitado de células (*processed lipoaspirate*, PLA). Estes pellets de PLA foram filtrados com filtros de 70µm e 10^4 células foram transferidas para garrafas de 25 cm² com meio controle. A cultura foi mantida em semiconfluência para prevenir a diferenciação espontânea das células e durante 5 dias o meio foi trocado diariamente.

II.2.4. Congelamento e descongelamento das células:

Após a tripsinização as células são ressuspensas em meio contendo 40% de soro fetal bovino, 50% DMEM e 10% de dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, ST Louis, MO) e 5×10^5 células/ml foram colocadas em criotubos, a temperatura foi sendo diminuída gradativamente, um grau por minuto até uma temperatura de -70°C. Após 24 horas as células foram transferidas para o nitrogênio líquido.

Para descongelar as células, os criotubos foram colocados em banho-maria e mantidos por 2 minutos e depois foi adicionado 20% de Soro fetal bovino e 80% de DMEM, no segundo dia este meio foi substituído pelo meio controle previamente descrito.

II.3. Caracterização das linhagens de células tronco

II.3.1- Citometria de fluxo

Com o intuito de caracterizar as células tronco com relação ao imunofenótipo conduzimos experimentos de citometria de fluxo. Neste processo as células são alinhadas em um microcapilar e analisadas uma a uma por um feixe de laser capaz de

detectar a fluorescência emitida pelas células. Os sinais gerados são interpretados por um sistema computacional que os transforma em dados para posterior análise.

Todas as linhagens obtidas foram cultivadas até a obtenção do número ideal de células para a leitura de 10.000 eventos para cada anticorpo utilizado. Neste ponto, elas foram removidas da superfície da placa de cultivo utilizando tripsina (TrypLe, Invitrogen) e lavadas com PBS 1x. Logo em seguida as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos com os seguintes anticorpos primários: CD29, CD34, CD45, SH2, SH3 and SH4 (Becton Dickinson). Após lavagem com PBS 1x as células marcadas com anticorpo primário não conjugado foram incubadas com o anticorpo secundário “goat anti-mouse-PE” (Guava Technologies) por 15 minutos a 4°C. Por fim, a suspensão celular foi lavada com PBS 1x e a leitura das amostras foi realizada no citometro de fluxo EasyCyte (Guava Technologies). Amostras controles foram incubadas com PBS ao invés de anticorpo primário ou apenas com o anticorpo secundário. Todos os dados gerados foram analisados com o uso do software Guava ExpressPlus (Guava Technologies). A utilização dos anticorpos foi realizada segundo recomendações dos fabricantes.

II.4. Demonstração da plasticidade das células tronco para diferenciação nas diversas linhagens celulares

II.4.1. Diferenciação Osteogênica

Protocolo utilizado para induzir as diferenciações osteogênicas “in vitro” :

O meio utilizado é composto por DMEM-LG (Invitrogen) com 10^{-7} M dexamethasone (Sigma) e 50µM de ascorbic acid-2 phosphate (Sigma) e aos 9 dias acrescenta-se 2µM de b-glycerophosphate (Sigma) para induzir a mineralização. Aos 21 dias, realiza-se a coloração de Von Kossa. O meio controle para diferenciação osteogênica é composto por DMEM-LG (Invitrogen) com 1% de 5mM ascorbic acid-2 phosphate e aos 21 dias também deve ser realizada a coloração de Von Kossa. Estes protocolos foram repetidos em triplicatas para cada linhagem que selecionamos para indução.

II.4.1.A. Coloração de Von Kossa

- a) Lavam-se as placas com solução Tyrode's
- b) Fixam-se as culturas com 10% de Buffered formalin phosphate por 30 minutos

- c) Lava-se com água destilada
- d) Adicionam-se 2% de nitrato de prata em cada placa até cobrir toda superfície e deixa no escuro por 10 minutos
- e) Lava 3 vezes em água destilada
- f) Expõem-se as células a luz ultravioleta por 15 minutos
- g) Lava mais duas vezes com água destilada
- h) Coloca-se etanol 100% e o remove depois de um minuto

II.4.2. Diferenciação miogênica

O meio de cultura para indução miogênica é composto por DMEM High-Glycose (Invitrogen), 10% de soro fetal Bovino (Hyclone) e 5% de Soro de cavalo (Gibco), suplementado com 0,1 μ M de dexamethasone (Sigma), 50 μ M de hydrocortisone (Sigma), 1% de antibiótico (100 units/ml penicillin e 100 μ g/ml streptomycin; Invitrogen). As células são cultivadas neste meio por 60 dias e depois se realiza a imunofluorescência com anticorpos específicos para fibras musculares.

II.4.2.A. Imunofluorescência

Os anticorpos primários utilizados na imunofluorescência das células induzidas à diferenciação miogênica foram: Monoclonal anti- α -sarcomeric actin clone 5C5 (developed in mouse, Sigma); monoclonal Anti-myosin skeleta (developed in rabbit; Sigma); monoclonal anti-nebulin clone NB2 (developed in mouse, Sigma); monoclonal anti-titin clone T11 (developed in mouse, Sigma).

Os anticorpos secundários utilizados foram CY3 (CyDye fluorolink, CyTM3 labelled goat anti-mouse) e FITC (labelled goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, CA,USA) .

O protocolo utilizado para realização da imunofluorescência é descrito a seguir:

- a) Fixa-se as células com paraformoldeido 4%, por uma hora a 4 °C
- b) Lava-se 2 vezes com TBS (0,15M NaCl ; 20mM Tris-HCL pH 7,4 ; 0,05% de Tween 20)
- c) Adiona-se Triton X100 - 0,1% até cobrir a superfície da lamínula por 10 minutos
- d) Lava-se 02 vezes, cada lavagem com duração de 5-10 minutos com TBS (temperatura ambiente) e adiciona-se BSA (Bovine serum albumin, 25ml de PBS e 1,25g de BSA) até cobrir a superfície por 30 minutos a temperatura ambiente

f) Adiciona-se o anticorpo primário de acordo com as recomendações do fabricante e incuba-se a temperatura ambiente por 1 hora.

g) Lava-se 03 vezes com TBS, cada lavagem por 5-10 minutos, a temperatura ambiente.

h) Adiciona-se o anticorpo secundário de acordo com as recomendações do fabricante por 1 hora a temperatura ambiente, no escuro.

i) Lava-se 03 vezes com TBS, cada lavagem por 5-10 minutos.

j) Lava-se rapidamente com água destilada para remover todo sal remanescente.

II.4.3. Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, 250.000 células foram transferidas para tubos falcon de 15ml e centrifugadas a 500Xg por 5 minutos na presença de meio condrogênico, que consiste de : DMEM-HG suplementado com 1% de linoleic acid (ITS-Premix, BD, USA), 10⁻⁵ M de dexamethasone, 100mM de sodium pyruvate, 5mM ascorbic acid-2 phosphate e 10ng/ml TGFβ1 (R&D System). Após a centrifugação observa-se a formação de um pellet esférico. No dia 21 o pellet é fixado de acordo com o protocolo previamente descrito por Donald Lennon (Cell-based therapies and tissue engineering; may 31-3 june, 2005). As amostras são fixadas para obtenção de cortes histológicos de 3μm, que foram corados com azul de toluidina .

II.4.4. Diferenciação adipogênica

O meio utilizado para indução adipogênica consiste de DMEM-HG suplementados com 10% de soro fetal bovino (Hyclone), 1μM dexamethasone (Sigma), 100μM indomethacin (Sigma), 500μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma) e 10μg/ml insulin (Sigma) no qual a cultura é mantida por 14 dias quando se realiza a coloração com *oil red* (Sigma), para identificar células com deposição de gordura.

II.5. Extração de RNA

O RNA total foi isolado a partir de linfócitos de sangue periférico com o uso de TRIZOL TM (Invitrogen), adaptado para a extração de RNA de células em cultura. Sua qualidade foi verificada por meio de eletroforese (100 volts por 60 minutos) em gel de agarose (0,6% de agarose, 2% de brometo de etídeo diluídos em tampão 1X TBE) e

foram visualizados com o uso de luz ultravioleta e fotografados. A concentração de RNA foi medida no Nanodrop.

II.6. RT-PCR

O estudo da expressão de alguns genes envolvidos nos processos de diferenciação das células tronco foi realizado por análise de cDNA. Para isto, realizou-se a reação de transcrição reversa seguida por amplificação do produto por reação em cadeia da polimerase, utilizando-se o Kit “SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq” (Invitrogen). Os primers empregados para amplificação do cDNA estão listados na Tabela II.6, e foram desenhados em diferentes exons, garantindo que, o que foi amplificado é referente ao RNAm e não a algum possível DNA genômico contaminante. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese (130 volts durante 40 minutos) em gel de agarose (2,5% de agarose diluída em tampão 1xTBE), junto com um marcador molecular - ϕ x 174 RFDNA/ Hae III fragments, (Invitrogen) e corados com solução de brometo de etídeo. Em seguida foram visualizados e fotografados com auxílio de luz ultravioleta.

Tabela II.6 - Primers utilizados na reação de PCR

Gene	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
cfos	CTGACTGATACACTCCAAGCGG	TTGGCAATCTCGGTCTGCA
osteonectina	ACTGGCTCAAGAACGTCCTGGT	TCATGGATCTTCTTCACCCGC
LPL	CCGTGGCAACTCTATCTTTGGT	GCCATACAGGATGGCAGTGAA
PPAR γ 2	GCGATCTTGACAGGAAAGACA	GGGGGTGATGTGTTTGAAC
Aggrecan 1	GAGGAGATGGAGGGTGAGG	GTAGAGCTGGCCCGTGGT
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATT CAT G

II.7. Real time PCR

O desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real permite a realização de uma análise quantitativa de produtos de PCR. Ou seja, diferentemente da PCR tradicional em que a análise baseia-se principalmente na presença, ausência e tamanho de bandas, este método permite que se estime o número de cópias inicial de moléculas molde em uma amostra. O sistema permite a detecção e quantificação de uma fluorescência repórter

utilizada na reação de PCR. O sinal fluorescente aumenta em proporção direta à quantidade de produto da reação, que por sua vez é diretamente proporcional à quantidade de DNA molde inicial. Existem vários métodos de incorporação e detecção da fluorescência, e nós utilizaremos o sistema SYBR green, que é um corante de DNA que se incorpora entre as duas hélices e só então emite sinal fluorescente.

Após a obtenção do cDNA a partir de 4 µg de do RNA total utilizando a transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen), a reação de PCR em tempo real foi realizada com o reagente SYBR Green, no 7500 Real Time PCR System e analisada com o software 7500 System SDS software v1.2 (Applied Biosystems). O RNAm alvo foi normalizado pelo controle endógeno SDHA (succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein). Cada amostra foi analisada em triplicata e a quantificação relativa da expressão gênica foi normalizada pela média de Hek293T, segundo o método comparativo CT (Cycle Threshold; User Bulletin 2; Applied Biosystems). A amplificação foi realizada seguindo as condições: 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos por 40 ciclos. As reações foram realizadas para volume total de 25 µL, como segue na tabela II.7. Os primers utilizados para Real Time-PCR foram listados na tabela II.6.

Tabela II.7- Mistura dos reagentes para PCR em tempo real utilizando-se SYBR green.

<i>Reagentes</i>	<i>Volume (µL)</i>
SYBR Green (Applied Biosystem)	12,5
Primer F (6 µM)	2,5
Primer R (6 µM)	2,5
cDNA	1
H ₂ O	6,5
Total	25

II.8. Separação magnética de células – SuperMACS

Para realizar-se a separação de populações definidas de células-tronco foi utilizado o equipamento SuperMACSII (Miltenyi Biotec) que permite uma pureza de 99% das células isoladas.

Para utilizar esta tecnologia:

a) Marcam-se as células com o anticorpo primário (de acordo com a população que se quer isolar), por 30 minutos a 4°C.

- b) Lavam-se as células com PBS 1x estéril
- c) Marca-se as células com o anticorpo secundário que contém esferas magnéticas (“*rat anti-mouse IgG1 microbeads*” – Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C.
- d) Lavam-se novamente as células com PBS 1x estéril
- e) Submetem-se as células marcadas à coluna LS (Miltenyi Biotec) envolta por um campo magnético. Neste estágio, as células contendo o antígeno (anticorpo primário) e portando as esferas magnéticas ficam retidas na coluna, enquanto as células negativas para o antígeno são coletadas.
- f) Remove-se a coluna do campo magnético e as células contendo o antígeno são eluídas da coluna e coletadas.

Todo o processo de separação das células foi realizado em um sistema fechado e estéril, permitindo a infusão *in vivo* das células isoladas. A utilização da coluna bem como a concentração dos anticorpos foram realizadas seguindo as recomendações dos fabricantes.

II.9. Modelo animal

O modelo animal escolhido para testar a plasticidade de diferenciação “*in vivo*” das células tronco em osso, foi o modelo de defeito crítico de 5X8mm em calotas cranianas de ratos wistar.

Selecionamos para o experimento ratos wistar de 4 meses de idade e 9 meses de idade com peso de 320-420 gramas .

Obtivemos a aprovação do comitê de ética animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (0,3 ml/100gr de peso do animal) com uma combinação de Ketamina hydrochloride (5%) e xylazine (2%). A cabeça dos animais foi fixada em um cefalostato durante os procedimentos cirúrgicos e dois defeitos simétricos de 5x8mm foram realizados nas regiões parietais da calota craniana. Para a abertura dos defeitos utilizamos brocas esféricas e motor de baixa rotação. Os animais foram submetidos a eutanásia por inalação de CO₂.

II.9.A. Preparação histológica

As regiões parietais que foram submetidas ao estudo foram removidas e fixadas em formol 10% por 24 horas, depois foram descalcificadas em ácido fórmico 5% por 48 horas e embebidas em parafina. Foram obtidos cortes de 5µm e corados com

hematoxilina e eosina. A preparação histológica foi realizada em colaboração com a Dra Marília T. Martins, da faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

II.10. “MicroArrays”

Os experimentos foram conduzidos com o uso do sistema “CodeLinkTM Expression Bioarray”, da Amersham Biosciences, atual G.E. Healthcare, utilizando lamina de oligoarrays CodeLink contendo 55.000 sondas (55K) . Os sinais do CodeLink Expression Bioarray foram produzidos com a hibridização de targets de RNA complementar (cRNAs) marcados com biotina a probes de oligonucleotídeos de DNA aderidos a uma matriz gelatinosa de poli(acrilamida). A isto, seguiu-se uma marcação do cRNA com CyTM5 – Streptavidin e a lâmina ficou pronta para a detecção dos sinais.

Em linhas gerais o procedimento é o seguinte: após a preparação do RNA total faz-se a síntese das primeiras fitas de cDNA, das segundas fitas de cDNA e purifica-se este cDNA. A seguir faz-se a transcrição *in vitro* acoplada à marcação com biotina, gerando, a partir do cDNA dupla fita, o cRNA marcado com biotina. De acordo com o protocolo, este método faz uma amplificação de aproximadamente 1000 a 5000 vezes do mRNA inicial. Este cRNA é então purificado, fragmentado e hibridizado overnight (por 18 a 24 horas) aos oligonucleotídeos contidos nas lâminas. Isto é feito com o uso de um shaker com temperatura e agitação controlada. O processamento que se segue à hibridização inclui uma lavagem estridente, para a remoção de moléculas de target que não se ligaram ou que se ligaram de forma não específica, uma etapa de marcação com CyTM 5 – Streptavidin e uma série de lavagens não estridentes, para remover a estreptavidina que não se ligou. As lâminas são então secadas por uma centrifugação rápida e escaneadas.

Os resultados obtidos com as hibridações dos RNAs dos pacientes e controles foram analisados com o uso dos programas “CodeLink Expression Analysis software”, da Amersham Biosciences e “Significance Analysis of Microarrays - SAM”, programa disponível gratuitamente no sítio da Universidade de Stanford (www.stat.stanford.edu). Para esta etapa contamos com a colaboração da equipe do Dr Sérgio Verjovsk-Almeida e Eduardo Reis do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

**CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS
TRONCO DE POLPAS DE DENTES DECÍDUOS, DE GORDURA DE
LIPOASPIRAÇÃO E DE OSSO MEDULAR *IN VITRO* E SUA APLICAÇÃO EM
MODELOS *IN VIVO***

Este capítulo será dividido em duas partes:

III.1. Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco a partir de diversos tecidos (artigo 1);

III.2. Aplicação de células de polpa dentária em modelos *in vivo*, com foco para diferenciação óssea, bem como sua plasticidade para diferenciação em tecido ósseo, muscular e adipogênico “*in vitro*” (artigo 2). Esta etapa foi realizada em colaboração com André de Mendonça, orientado do Prof. Nivaldo Alonso, do Depto. de Cirurgia Plástica, Faculdade de Medicina USP. Este trabalho também constará da tese de André de Mendonça. O artigo incluído foi recentemente submetido à publicação.

**Capítulo III.1 - Estabelecimento e caracterização de linhagens de células
tronco a partir de diversos tecidos**

Resumo

O potencial terapêutico para uso de células tronco adultas (CTA) em bioengenharia de tecidos e terapia gênica é enorme. Com o interesse de utilizar as células tronco adultas na reconstrução óssea dos pacientes portadores de fissuras lábio palatinas e malformações cranio faciais, bem como utilizar estas CTA para estudos da etiopatogenia das Fissuras lábio palatinas; neste trabalho isolamos e caracterizamos 23 linhagens de células tronco adultas (CTA). Estas foram obtidas de polpa de dentes decíduos (11 linhagens, sendo 5 de indivíduos controles, 5 de portadores de FLP não síndrômica e 1 de portador de síndrome de Van der Woude); osso medular (2 linhagens, sendo de 2 indivíduos portadores de FLP não síndrômica) e de gordura de lipoaspiração (5 linhagens de indivíduos controles). Após verificarmos que estas células são positivas para 4 marcadores de células mesenquimais (SH2,SH3,SH4 e CD29), demonstramos a plasticidade destas células para diferenciação óssea “in vitro” .

A reprodutibilidade dos nossos protocolos para o estabelecimento destas linhagens, bem como a demonstração da plasticidade das mesmas para diferenciação osteogênica nos permitirão utilizar estas linhagens, no futuro, em bioengenharia de tecido ósseo para os pacientes portadores de FLP e outras deformidades craniofaciais

Abstract

The therapeutic potential involved in the use of adult stem cell (ASC) for tissue bioengineering and cellular therapy is tremendous. In this study we have isolated and characterize 23 lineages of ASC with the following objectives: elucidate the molecular mechanisms of clefts involving the lip and palate (CLP) and perform bone reconstruction in patients with CLP and other craniofacial malformations.

These ASC lineages where obtained from falling teeth dental pulp (5 controls, 5 non-syndomic CLP patients and 1 Van der Woude syndrome patient), bone marrow (2 non-syndomic CLP patients) and adipose tissue (5 controls). We demonstrate that these cells are positive for 4 mesenchymal markers (SH2, SH3, SH4 and CD29) and they can undergo differentiation to bone tissue in vitro.

The reproductibility of our protocols to establish these cell lines, as well as, the demonstration of their plasticity to bone differentiation will allow their use in tissue bioengineering to treat patients with CLP and other craniofacial malformations.

Introdução

O potencial terapêutico para o uso de células tronco em bioengenharia de tecidos e terapia gênica é enorme. Conceitualmente existem dois tipos de células tronco que podem ser potencialmente utilizadas com finalidades terapêuticas: as células tronco embrionárias (CTE) e as células tronco adultas (CTA). Embora teoricamente CTE pareçam ser muito promissoras devido a sua totipotência, na prática seu uso é limitado por apresentarem potenciais problemas de regulação celular e por considerações éticas. Em contraste, CTA são pluripotentes, e não tem considerações éticas relacionadas a seu uso, portanto estratégias para engenharia de tecidos esqueléticos tem mantido o foco no uso destas células (Zuk et al., 2001; Sylvester e Longaker 2004; Krebsbach e Robey, 2002).

Atualmente as células tronco obtidas da medula óssea tem se mostrado promissoras, especialmente no que diz respeito a neoformação óssea, pois são uma excelente fonte de células osteoprogenitoras (Owen, 1988; Friedenstein, 1990, 1995; Velleman and MacFarland, 1999; Caplan, 2005; Mahesh et al., 2006); porém o processo de coleta da medula óssea para posterior isolamento das células tronco é bastante invasivo. A presença de células tronco mesenquimais com bom potencial para diferenciação osteogênica, vem sendo demonstrada também em outros tecidos como : cordão umbilical (Rogers *et al.*, 2004), osso trabecular (Noth *et al.*, 2002), tecido adiposo (Pittenger *et al.*, 1999; Zuk *et al.*, 2001), polpa de dente (Miura *et al.*, 2003) e músculo esquelético (Mastrogiacomo *et al.*, 2005), entre outros tecidos.

Com o interesse de utilizar células tronco obtidas de polpa de dente, osso medular e tecido adiposo, na reconstrução óssea nos pacientes portadores de fissuras lábio palatinas e malformações craniofaciais, bem como utilizar estas células para estudos da etiopatogenia das Fissuras lábio palatinas, nossos objetivos neste trabalho foram:

a) Isolar e caracterizar as populações de células tronco obtidas de polpa de dente, osso medular e tecido adiposo;

b) Demonstrar “*in vitro*” a plasticidade das células obtidas de polpas de dentes decíduos, de gordura de lipoaspiração e de osso medular para a diferenciação osteogênica.

Material e Métodos

Pacientes e considerações éticas

Todos os tecidos utilizados para estabelecimento das linhagens de células tronco, só foram obtidos após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Nos casos de menores de 18 anos os termos foram assinados pelos pais ou responsáveis pelos pacientes.

Foram utilizadas neste estudo 11 amostras de polpas de dentes decíduos, 2 amostras de osso medular e 5 amostras de gordura de lipoaspiração.

As polpas de dentes decíduos foram obtidas de 5 pacientes controles que não apresentavam nenhuma doença sistêmica ou genética de 5 pacientes portadores de FLP não síndrômica e de 1 paciente portador de FLP síndrômica (síndrome de Van der Woude), com idades entre 5-8 anos.

A gordura de lipoaspiração (500ml) foi obtida de 5 pacientes que foram submetidos a cirurgia estética de abdômen.

Estabelecimento das linhagens celulares

Para o estabelecimento de todas as linhagens celulares o meio controle utilizado foi: DMEM F12(Invitrogen), 2mM l-glutamina, 100 U/ml streptomycin sulfate (Invitrogen), 1% non-essential aminoacids (Invitrogen) e 15% de soro fetal bovino (Hyclone).

Após a obtenção das polpas dentárias, elas foram lavadas com PBS (*phosphate-buffered saline*, 0,01M; ph = 7,4) suplementado com 4% de antibiótico (*100 units/ml penicillin e 100µg/ml streptomycin*; Invitrogen), para remover possíveis contaminações e células sanguíneas, depois foram digeridos em solução de tripsina 0,25% (TrypLe, Invitrogen) por uma hora a 37°C e transferidos para placas de petri de 35-mm (corning, NY) com o meio controle. As culturas foram mantidas nestas condições por 2 semanas, quando então foram tripsinizadas (0,25% de solução de tripsina, TrypLe, Invitrogen), e plaqueadas 10^4 células em garrafas de 25 cm². Todas as culturas foram mantidas em semi- confluência para prevenir a diferenciação das células.

As amostras de osso medular foram lavadas por 3 vezes com PBS (*Sterile phosphate-buffered saline*, Invitrogen) para remover possíveis contaminações e células sanguíneas; depois foram trituradas em partículas menores que foram digeridas em 0,075% de collagenase (tipo I; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em PBS por 1 hora a 37

°C com agitação. A collagenase foi inativada com DMEM e 10% de soro fetal bovino. Depois foram centrifugadas por 5 minutos a 1400 RPM, o pellet foi ressuspensionado em 3 ml do meio de cultura controle e transferido para placas de 35-mm, onde foram mantidos por 2 semanas, quando as células foram tripsinizadas e 10^4 células foram transferidas para garrafas de 25 cm². A cultura foi mantida em semiconfluência para prevenir a diferenciação espontânea das células e durante 5 dias o meio foi trocado diariamente.

Para estabelecimento de linhagens de células tronco a partir de tecido adiposo utilizamos o protocolo previamente descrito por Zuk *et al* (2001).

Citometria de fluxo

As células foram cultivadas em meio controle 72 horas antes da análise. Caracterizamos o fenótipo das células usando 6 anticorpos para citometria de fluxo: 4 específicos para células tronco mesenquimais SH2,SH3,SH4 e CD29 (Becton Dickinson) e 2 específicos para células Hematopoiéticas, CD 45 e CD34 (Becton Dickinson). Para detectar os antígenos de superfície as células foram tripsinizadas com Tryple (Invitrogen), lavadas com Phosphate-buffered saline (PBS) e incubadas a 4 °C por 30 minutos com os anticorpos previamente descritos. Depois foram lavadas com PBS e os anticorpos primários não conjugados foram incubados com o anticorpo secundário anti-mouse-PE (Guava Technologies) a 4 °C por 15 minutos. Após outra lavagem com PBS, 10000 células quantificadas foram adquiridas usando EasyCyte flow cytometry (Guava Technologies). Amostras controles foram incubadas com PBS ao invés do anticorpo primário ou somente com o anticorpo secundário anti-mouse-PE. Todos os dados gerados foram analisados no software guava Express Plus (Guava Technologies).

Protocolo de congelamento e descongelamento das células

Todas as linhagens obtidas foram caracterizadas pela citometria de fluxo antes de serem congeladas.

Após a trisinação as células foram resuspendidas em meio contendo 40% de soro fetal bovino, 50% DMEM e 10% de dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, ST Louis, MO) e 5×10^5 cell/ml foram colocadas em cada criotubo, a temperatura foi sendo diminuída gradativamente, um grau por minuto até uma temperatura de $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 24 horas as células foram transferidas para o nitrogênio líquido.

Para descongelar as células os criotubos foram colocados em banho Maria e mantidos por 2 minutos e depois foi adicionado 20% de Soro fetal bovino e 80% de DMEM. No segundo dia passamos a utilizar o meio controle.

Diferenciações osteogênicas “*in vitro*”

Selecionamos 2 linhagens celulares obtidas de polpa dentária (uma de um paciente portador de FLP e outra de um paciente controle); uma linhagem celular obtida do osso medular e uma linhagem celular obtida de gordura de lipoaspiração para induzir à diferenciação osteogênica “*in vitro*”.

Os procedimentos utilizados para indução osteogênica foram os mesmos nas 4 linhagens: Contamos as células e plaqueamos 5×10^3 células por cm^2 em placas de 35mm (placas de 6 *wells*). Utilizamos o meio: DMEM-LG com 10^{-7} M dexamethasone e 50:μM de ascorbic acid-2 phosphate e aos 9 dias acrescentamos 2:μM de b-glycerophosphate para induzir a mineralização. Aos 21 dias realizamos a coloração de Von Kossa. Como controle utilizamos o meio: DMEM-LG com 1% de 5mM ascorbic acid-2 phosphate e aos 21 dias também deve ser realizada a coloração de Van Kossa. Os dois protocolos foram repetidos em triplicatas para cada linhagem que selecionamos para indução.

Coloração de Van Kossa

Para realizar a coloração de Van Kossa, lavamos cada placa com solução Tyrode's, fixamos as culturas com 10% de “Buffered formalin phosphate” por 30 minutos, lavamos com água destilada, adicionamos 2% de nitrato de prata em cada placa e deixamos no escuro por 10 minutos, lavamos 3 vezes em água destilada e depois as células foram expostas a luz ultravioleta por 15 minutos, lavamos mais duas vezes com água destilada, colocamos etanol 100% e o removemos depois de um minuto.

Extração de RNA

O Rna total das 4 linhagens submetidas a diferenciação foram obtidos no momento 0 (Células indiferenciadas), aos 9 dias após a indução da diferenciação e aos 21 dias após a indução.

A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por meio de eletroforese (100 volts por 60 minutos) em gel de agarose (0,6% de agarose, 2% de brometo de etídeo diluídos

em tampão 1X TBE) e foram visualizados com o uso de luz ultravioleta. O gel foi fotografado. Eles foram quantificados com *nanodrop*.

RT-PCR

O estudo da expressão de alguns genes envolvidos no processo de diferenciação osteogenica (c-fos; osteonectina) das células tronco foi realizada por análise de cDNA. Para isto, realizou-se a reação de transcrição reversa seguida por amplificação do produto por reação em cadeia da polimerase, utilizando-se o Kit “SuperScript One- Step RT-PCR with Platinum Taq” (Invitrogen). Os primers utilizados estão na Tabela 1 e foram desenhados em diferentes *exons*, garantindo que, o que foi amplificado é referente ao RNAm e não a algum possível DNA genômico contaminante. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese (130 volts durante 40 minutos) em gel de agarose (2,5% de agarose diluída em tampão 1XTBE), junto com um marcador molecular – 100bp DNA Ladder (Promega) e corados com solução de brometo de etídeo. Em seguida foram visualizados e fotografados com auxílio de luz ultravioleta.

Tabela 1- Primers utilizados nas reações de RT-PCR

Gene	Forward <i>Primer</i> (5' → 3')	Reverse <i>Primer</i> (5' → 3')	Annealing (°C)
c-fos	CTGACTGATACACTCCAAGCGG	TTGGCAATCTCGGTCTGCA	58
osteonectina	ACTGGCTCAAGAACGTCCTGGT	TCATGGATCTTCTTCACCCGC	60

Resultados

As células obtidas a partir de 11 polpas dentárias, de 2 fragmentos de osso medular e de gordura de lipoaspiração de 5 indivíduos apresentaram morfologia semelhante a de fibroblastos (Figura 1).

Observamos que as linhagens celulares obtidas dos diferentes tecidos apresentaram uma expressão semelhante ($95\% \pm 3$) dos marcadores mesenquimais (CD29, SH2, SH3 e SH4) ; já os marcadores hematopoiéticos não apresentaram expressão (Figura 2).

A plasticidade para diferenciação osteogênica “in vitro” foi observada nas 4 linhagens derivadas dos 3 diferentes tecidos em estudo, após terem sido submetidas a indução (Figura 3 e 4).

Observamos amplificação dos 2 transcritos testados relacionados com diferenciação óssea tanto nas células indiferenciadas como após diferenciação osteogênica .

Figura 1 – Morfologia das células tronco adultas, semelhante a fibroblastos

Figura 2- Exemplos de alguns gráficos de Citometria de fluxo: **2A)** Controle sem marcar do CD45; **2B)** Marcação negativa para CD45; **2C)** Controle negativo do CD29; **2D)** 92,4% das células positivas para CD 29; **2E)** Controle sem marcar; **2F)** Controle marcado com anticorpo secundário; **2G)** 92,74% das células positivas para SH2

Figura 3 - Mudança na morfologia celular : 9 dias após a indução para diferenciação osteogênica observa-se a morfologia de osteoblastos.

Figura 4 – Coloração de Von Kossa 21 dias após a diferenciação osteogênica das células tronco adultas. **A)** Culturas controles: não observamos a formação de nódulos de mineralização **B)** Culturas experimentais: observamos como indicado pelas setas a formação de nódulos de mineralização

Discussão

O estabelecimento e caracterização das 11 linhagens de células tronco de polpa de dente, das 5 linhagens obtidas de gordura de lipoaspiração e das 2 linhagens de osso medular, demonstraram que os protocolos que utilizamos para estabelecer estas linhagens é altamente passível de reprodução como já havia sido descrito na literatura. (Zuk *et al.*, 2001; Noth U. *et al.*, 2002; Kerkis *et al.*, 2006;).

Demonstramos a plasticidade para diferenciação osteogênica “in vitro” de todas as linhagens selecionadas para indução, pela observação da mudança de morfologia celular e após a realização da coloração de Van Kossa observamos a deposição de nódulos de mineralização.

A expressão basal dos genes envolvidos na diferenciação osteogênica (Cfos, Osteopontina) também foram observadas por outros autores (Zuk *et al.*, 2002; Caplan *et al.*, 2004). Para verificar as diferenças quantitativas da expressão basal destes genes entre as diferentes linhagens, bem como diferenças na expressão gênica em tempos diferentes após a indução para diferenciação osteogênica, no futuro realizaremos experimentos de PCR quantitativo.

Atualmente sabe-se que as células tronco obtidas a partir da polpa de dente possuem alta qualidade para diferenciação em osso e que seu uso para pesquisa e terapias com células tronco incluindo enxertos autólogos e engenharia de tecidos é muito promissor, pois além de possuírem alta qualidade são de fácil obtenção (Miura *et al.*, 2003; Laino *et al.*, 2006). Sabe-se também que o osso medular é o mais utilizado em enxertos ósseos autólogos na região craniofacial por possuir uma grande quantidade de células tronco “in vivo” (Nwoku *et al.*, 2005). Além disso as células tronco obtidas de aspirado de medula óssea tem se mostrado muito promissoras para reconstrução de tecidos ósseos (Owen, 1988; Friedenstein, 1990, 1995; Velleman e MacFarland, 1999; Caplan, 2005), no entanto o processo para sua coleta é doloroso e invasivo.

Quanto as células de gordura de lipoaspiração também são consideradas como uma boa fonte de obtenção de células tronco para utilização em terapias para regeneração de tecido ósseos (Zuk *et al.*, 2001; 2002).

Nossos dados reproduziram os dados observados na literatura demonstrando que as células tronco obtidas de polpa de dentes decíduos, de osso medular e de gordura de lipoaspiração tem um grande potencial para diferenciação osteogênica. Contudo, não sabemos ainda, se estas células procedentes de diferentes tecidos tem a mesma capacidade regenerativa *in vivo*.

Os benefícios de se utilizar as células tronco obtidas destes tecidos ao invés de se utilizar células tronco embrionárias para bioengenharia de tecido ósseo incluem : a imunocompatibilidade das células autólogas, a disponibilidade das mesmas, a facilidade para se induzir sua diferenciação, bem como a possibilidade de serem utilizadas para estudar a etiopatogenia das FLP e de outras doenças genéticas.

Conclusões

A reprodutibilidade dos nossos protocolos para o estabelecimento das linhagens de células tronco de polpa de dentes decíduos, de osso medular e de gordura de lipoaspiração, nos permitirão coletar estes tecidos de pacientes portadores de FLP e de controles para estabelecer as linhagens de células tronco e estudar a etiopatogenia desta deformidade, bem como utilizá-las no futuro em bioengenharia de tecido ósseo para os pacientes portadores de FLP e de outras deformidades crânio faciais.

Referências

1. Caplan, A. I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. Tissue Eng 11(7-8): 1198-211. 2005.
2. Friedenstein, A. J. Marrow stromal fibroblasts. Calcif Tissue Int 56 Suppl 1: S17. 1995.
3. Friedenstein, A. J., N. V. Latzinik, et al. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. Bone Miner 18(3): 199-213. 1992.
4. Kerkis, I., Kerkis, A. *et al.* Isolation and Characterization of a population of immature Dental Pulp Stem Cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. Accept to publication in Cell Tissues Organs. 2006.
5. Krebsbach, P. H., M. H. Mankani, et al. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. Transplantation 66(10): 1272-8. 1998.
6. Laino, G., F. Carinci, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. J Craniofac Surg 17(3): 511-5. 2006.
7. Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov, et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. Stem Cells 24(9): 2140-9. 2006.
8. Mastrogiacomo, M., A. R. Derubeis, et al. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. J Cell Physiol 204(2): 594-603. 2005.
9. Miura, M., S. Gronthos, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5807-12. 2003.
10. Noth, U., A. M. Osyczka, et al. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res 20(5): 1060-9. 2002.
11. Nwoku, A. L., A. Al Atel, et al. Retrospective analysis of secondary alveolar cleft grafts using iliac of chin bone. J Craniofac Surg 16(5): 864-8. 2005.
12. Owen, M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl 10: 63-76. 1988.
13. Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411): 143-7. 1999.

14. Rogers, I. and R. F. Casper Umbilical cord blood stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 18(6): 893-908. 2004.
15. Sylvester, K. G. and M. T. Longaker Stem cells: review and update. Arch Surg 139(1): 93-9. 2004.
16. Velleman, S. G. and D. C. McFarland Influence of fibroblast growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor beta on satellite cell type I collagen expression and localization during differentiation. Cytobios 100(394): 101-10. 1999.
17. Zuk, P. A. Stem cell research has only just begun. Science 293(5528): 211-2. 2001.
18. Zuk, P. A., M. Zhu, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13(12): 4279-95. 2002.

III.2 – Use of dental pulp stem cells to correct large cranial defects in rat model

André de Mendonça, M.D *

Daniela F. Bueno, DDS, MSc*

Irina Kerkis , BSc;PhD

Marília Trierveiler. Martins,DDS, PhD

Alexandre Kerkis,BSC, PhD

Roberto D. Fanganiello BSc

Humberto Cerruti, DDS

Nivaldo Alonso, MD, PhD

Maria Rita Passos Bueno, BSc PhD

*** The first two authors contributed equally to this work**

FINANCIAL DISCLOSURE

This study was support by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

Abstract

Background: This study was addressed to evaluate the capacity of human dental pulp stem cells (hDPSC), isolated from deciduous teeth, to reconstruct large-sized cranial bone defects in non-immunocompromised (NIC) rats. To our knowledge, these cells were not used before in similar experiments.

Methods: We performed two symmetrical full-thickness cranial defects (5x8 mm) on each parietal region in 12 NIC rats. In 10, the left side (ls) had only collagen membrane (CM) and the right side (rs) had CM and hDPSC. In 2, the rs had CM only and the ls was empty (controls). Cells were used after *in vitro* characterizing as mesenchymal cells (MC). Animals were euthanized at 7, 20, 30 and 60 days postoperatively and cranial tissue samples were taken for histological analysis. Origin of the new bone was confirmed by molecular analysis.

Results: The hDPSC lineage presented fibroblast-like appearance, were positive for the 4 MC markers tested and presented plasticity. We observed bone formation by 1 month after surgery in both sides, but a more mature bone was observed in the rs. Human DNA was PCR amplified only at the rs, thus demonstrating that this bone was of human origin. The use of cells from a different species in NIC rats did not cause graft rejection.

Conclusion: These findings suggest that hDPSC is an additional cell resource for correcting large cranial defects in rats and that even in cross species did not cause graft rejection, suggesting that this is a promising model for reconstruction of human large cranial defects in plastic surgery.

Key words: human dental pulp stem cells, adipogenic differentiation, cranial defect, non-immunocompromised rats

Introduction

Reconstruction of cranial defects is a challenge in plastic surgery as they are a relatively common complication that can arise secondary to trauma, surgery, and infection, neoplastic or congenital malformations such as Aplasia Cutis (AC). AC is a rare condition and the most severe forms are characterized by absence of the bone and skin cranial layers.¹⁻³ Large cranial defects, as it is frequently observed in AC, are associated with high morbidity and mortality in the neonatal period. Therefore, treatment of large bone deficiencies in these cases is not only to improve cosmetic appearance but mostly important to reestablish the rigid protection of the underlying brain.^{4,5}

Transfer of bone autograft remains the current method for reconstruction of cranial bone loss, however, it is inadequate for large defects and implies in several risks, including donor site morbidity, graft or flap failure, rejection or infection.^{6,7} Development of more effective methods for calvaria reconstruction, particularly for large defects, will certainly have major implications for the repair of cranial defects in AC or in those caused by other environmental or even genetic causes.

Use of mesenchymal stem cells (MSC) for bone reconstruction techniques has been an active growing area that can facilitate bone healing in difficult circumstances, and it is possible that their use in the near future will replace conventional therapeutic modalities for the repair of large cranial defects.

MSC have self-renewing properties and are able to differentiate into one or many different specialized cell types under controlled *in vitro* conditions. They can be obtained from many tissues such as bone marrow,⁸ dental pulp,⁹ adipose tissue¹⁰ and others.¹¹ Several studies have shown the efficiency of bone marrow MSC application in the closure of critical size defects in murine calvarium.^{12,13} However, MSC from other tissues have not yet been tested in similar studies. Human dental pulp stem cells (hDPSC) are of great interest to be used in these protocols as they can be relatively easily be isolated and expanded in culture; they also have shown *in vitro* and *in vivo* multipotential plasticity.^{8,9,15,16} Furthermore, these cells seem to have immunosuppressive activity that could have potential clinical applications in allogeneic *in vivo* stem cell transplantation particularly for calcified tissue reconstruction.¹⁷

To verify the potential application of hDPSC for bone reconstruction of large cranial defects, the undifferentiated hDPSC were obtained and characterized using MSC markers. Their *in vitro* differentiation potential was addressed by production of

osteoblasts and other cell types. Further, we evaluated if undifferentiated hDPSC growing on a collagen membrane (CM) are able to reconstruct large-sized cranial bone defects created in non-immunocompromised (NIC) rats.

Material and Methods

Subjects and human dental pulp culture

A 6-year-old healthy patient was enrolled in this study upon signed informed consent by their parents in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of Institute of Biosciences, University of Sao Paulo. The dental pulp was extracted from normal non-exfoliated deciduous tooth under local anesthetic. The dental pulp stem cells were obtained from the dental pulp as previously described¹⁶. The growing culture of hDPSC was maintained in DMEM/F12 (Dulbecco's-modified Eagle's medium/Ham's F12, 1:1, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Washington), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 2 mM nonessential amino acids. The cells were maintained semi-confluent in order to prevent the differentiation, and were passed every 4-5 days with the medium refreshed daily. The hDPSC were incubated at 37°C in a 5% CO₂ and high humidity environment.

Characterization of pulp mesenchymal cells

The following antibodies against cell surface molecules and their respective isotype controls were used for flow cytometry analysis: monoclonal anti-human, CD29, CD45 conjugated with FITC, CD34 (all from BD-Pharmigen, San Diego, CA) and SH2 (CD105) (Serotec, Oxford, UK). Antibodies against SH3 and SH4 were from Case Western Reserve University Cleveland, Ohio, USA. About 10⁶ cells were incubated with primary antibody for 30 minutes at 4°C for 30 minutes, washed in PBS + 2% FBS and 1 µM sodium azide (buffer) followed by addition of secondary anti-mouse-PE - conjugated antibody according to manufacturer's instructions (Becton Dickinson, NJ, USA; Guava Technologies, CA, USA). Control samples were incubated with PBS instead of primary antibody and only with secondary antibody. Flow cytometry analysis was performed on Guava® EasyCyte™ with the Guava ExpressPlus software (Guava Technologies, CA, USA).

The cells were *in vitro* submitted in triplicate to osteogenic, adipogenic and myogenic differentiation according to the routine protocols^{18,19,20,21}. The Von Kossa staining method was used at the 21st day after induction of osteogenic differentiation of hDPSC. The cells induced to adipogenic differentiation were stained at day 12 with oil red-O²⁰. To characterize myogenic differentiation, 60 days after induction, 3 antibodies (Sigma-Aldrich) were used: monoclonal anti- α -sarcomeric actin clone 5C5, monoclonal anti-titin clone T11, anti-myosin (skeletal) developed in rabbit (data not shown). The secondary antibody was goat anti mouse (CY3) and goat anti rabbit (FITC) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Respective negative controls were also performed (data not shown).

Transplantation procedure

The 10⁶ undifferentiated DPSC were seeded onto collagen membrane carrier (8mm X 5mm) in 6-well plate each of Ø35-mm (Corning, NY, USA). The wells were supplemented with 2,5 ml of the aforementioned culture medium and the cells were incubated approximately 24 hours at 37°C in 5% CO₂ before transplantation.

Animals

Four-month-old male Wistar rats (body weight 320-420 gm each) were used. The experimental protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee at São Paulo University.

Surgery

The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection (0,3 ml/100 gr body weight) with a combination of ketamina hydrochloride (5%) and xylazine (2%).

The head's rat was positioned in a cephalostat during the operation procedure. A midline skin incision was performed from the nasofrontal area to the external occipital protuberance. The skin and underlying tissues, including the periosteum and the *temporalis* muscles were reflected laterally to exposure the full extent of the calvaria. Two symmetrical full-thickness cranial defects of 5x8mm size were carried out on each parietal region of all animals (Figure 1), using a drill with micromotor under constant irrigation with sterile physiologic solution to prevent overheating of the bone. The cranial defect of 5x8 mm has previously been defined as a critical size defect.²²

A total of 12 non-immunocompromised (NIC) animals were used. In two animals, the left side (ls) had only the cranial defect and the right side (rs) the calvarial defect was filled in with the collagen membrane (CM). In the remaining 10 NIC animals, ls defect was filled with CM only and rs defect was filled in with CM and undifferentiated hDPSC.

The flap of each animal was closed with nylon 4 sutures (Ethicon, SP, Brazil). The animals were euthanized from 7 days (1), 20 days (3), 30 days (3) and 60 days (3) after surgery with inhaled CO².

Histological preparation

Samples were obtained after the 7th, 20th, 30th and 60th post-surgery days for histological analysis. The studied tissue samples were fixed in 10% formalin for 24 hours, decalcified in 5% formic acid for 48 hours, and paraffin-embedded. The 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined under light microscope Axiovert 200 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Analysis of the origin of the new bone

Tissues were scrapped from histological section slides for DNA extraction. Materials were obtained from the left (only membrane) and right (membrane + cells) critical calvarium defects of rats at two months after transplantation. DNA was extracted according to the tissue protocol of QIAamp DNA Mini KIT (Qiagen, Germany). For amplification of the human DNA, PCR reactions were performed with the exon 8 of COL18A1, as previously reported.²³ Specific rat primer was used for amplification of rat DNA (GAPDH gene). We have performed two rounds of PCR of 35 and 30 cycles, respectively.

Results

Characterization of pulp stem cells

We isolated the population of hDPSC, which were mainly (96% $\pm$ 3%) positive for the four MSC markers tested (SH2, SH3, SH4 and CD29 antigens) and negative for hematopoietic cell lineage markers (CD34 and CD45). Microscopically these cells showed typical fibroblast-like MSC morphology (data not shown) and under appropriate conditions they differentiate into osteoblasts, myoblasts and adipocytes (Figure 2).

Transplantation

We have evaluated the bone healing process at the cranial defects by histological analysis in 7th, 20^{ty}, 30^{ty} and 60^{ty} days post surgery. None of the animals died of infection or any other complication of the surgery or transplantation process.

At 7 days post-surgery, at ls where only the CM was used, the gap was filled by loose connective tissue showing diffuse and intense chronic inflammatory infiltrate rich in foam macrophages and remnants of the collagen present were still present. The same scenario was observed regarding the group where the membrane was placed together with hDPSCs (rs), but the presence of lymphocytes was reduced and no signs of CM were seen (Figure 3A). At 20 days post-surgery, in both sides, the defect area showed a mixture of immature cortical bone and granulation tissue; but, the bone was slightly more mature in the rs, with some lamellae formation and more inconspicuous granulation tissue (data not shown). At 1 moth post-surgery, the regeneration process was more advanced and the defect area was totally filled by new bone, which was partially immature and lamellar. The newly formed bone was fused to the remnant bone. In the ls wound it was still possible to notice granulation tissue, while in the rs, which contains the hDPSC, the bone formation appears to be denser and more mature (Figure 3B). The cranial defect was healed at 60 days post-surgery (Figure 3C).

The cranial defect of 5x8mm in control animals did not heal spontaneously during the experimental period.

Origin on the new bone

DNA amplification using human specific primers were successful only with DNA derived from the right cranial defect; while, in the material derived from the left cranial defect, positive DNA amplification was only obtained with the use of the rat specific primers (Figure 4).

Discussion

We showed that hDPSC used in the present study express MSC markers and can successfully differentiate into osteoblasts and skeletal muscle cells. We also demonstrated adipogenic differentiation of these cells, which was not reported previously for hDPSC^{9,14,16}. We were able to differentiate hDPSC of 3 other unrelated individuals in these 3 cell types (data not shown), thus reinforcing that the protocol that we used¹⁶ is highly reproducible.

Our results demonstrated that hDPSC with CM closed the calvaria critical-size defects with formation of a lamellar bone, with union of the new bone with the adjacent calvarium in the non-immunocompromised rats, very efficiently. To our surprise, the defect was also healed with the use of collagen membrane only; however, the ossification process seems to be delayed as compared to the use of collagen membrane and cells (Figure 3). Although it is recognized that the collagenous components of bone are osteoconductive, studies had demonstrated inadequate bone regeneration when collagen membrane is used alone as a bone graft substitute.²⁴

Mankani et al.²⁵ conducted a similar study to ours, but with human bone marrow stem cells (hBMSCs) and hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) in immunocompromised mice. The cranial defects induced in both studies were comparable, but contrary to our study, the critical defect closure when the HA/TCP was used alone lasted longer, 96 weeks after transplantation instead of four weeks with collagen membrane only.

Krebsbach et al.²⁶ demonstrated that murine hBMSCs were capable of closing critical-sized murine calvarial defects when placed in conjunction with a collagen carrier after 2 weeks after transplantation. However, these transplants failed to form a union with the adjacent mouse skull, which was attributed to interference by the periosteum which was not removed. It has been suggested that collagen membranes associated with hBMSCs are inappropriate for optimum neo bone formation, as these cells also require a mineral matrix, a BMP-expressing non mineral matrix, or production of BMP-2 by genetically engineered cells.²⁵ However, our results contradict these previous data, as we obtained a very efficient healing bone process with the use of collagen membrane and hDPSC. Therefore, our data support the hypothesis that collagen membranes are a good scaffold and they can represent advantages in relation to HA/TCP as they facilitate cell adhesion and bone forming cells into the defect site. Indeed, hydroxyapatite granules are slow to be reabsorbed and could be surrounded by a connective tissue capsule that may affect cell migration and velocity of new bone forming into the defect site as well the graft stability²⁷. We cannot exclude the possibility that the success of the healing process that we obtained is related to the type of the collagen membrane used²⁸. Collagen membranes are also technically easier to place into a bone defect than are the HA/TCP particles.

It is still possible that the type of the mesenchymal cell used interferes in the bone regeneration processes. Although both hDPSC and human bone marrow stem cells

(BMSC) have high plasticity *in vitro* or *in vivo*, it has yet not been compared if they present any *in vivo* difference in proliferation or differentiation properties.

In our experiments we used rats without any protocol for immunosuppression and interestingly we did not observe any clinical symptoms of human cell reaction in our experimental animals. The demonstration that the new bone formed in our experimental rats was of human origin further adds evidence that the animals did not reject the human pulp stem cells. Therefore, our data shows for the first time that the transplantation of human adult stem cells in other species does not interfere in the healing process. It will be important to address if these human cells does not trigger the immunological system of the recipients. It has already been shown that MSC do not induce T-cell alloreactivity and display an immunoregulatory capacity by suppressing T-cell responses *in vitro* and *in vivo* animal models.^{17,29,30} These results thus have important future implications in terms of allogeneic stem cells therapy.

Therefore we are showing for the first time that the use of hDPSC is a promising strategy for bone tissue regeneration *in vivo* and their use might provide an option to repair large cranial bone defects as we observed in Aplasia Cutis or innumeros other conditions.

Conclusion

Our data suggest that hDPSCs together with CM correct large calvarium critical-size defects in NIC rats and can be used as an alternative source to bone marrow isolated MSC. Furthermore, our results indicate that hDPSC apparently do not stimulate allogeneic graft rejection. Remarkably, these cells can differentiate efficiently into adipocytes and skeletal muscle cells. These two types of cell differentiation together with bone formation are the essential elements for complete tissue reconstruction of different cranial facial defects. The hDPSCs have several advantages when compared to MSC derived from other sources: the method for their isolation is not invasive, since they are obtained from naturally exfoliated teeth. Hence, the hDPSC appear as a potential source of stem cells to be used in plastic surgery.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Dr Gilberto Xavier to allow us the use of his laboratorial facilities, Dr. Felipe T Salles and Dr Bechara Kachar for reading the manuscript, Dr. Mariz Vainzof for the muscle antibodies, Mrs. Constância Urbani for secretarial assistance, and the following colleagues for assistance: Gerson Shigeru Kobayashi, Eder Zucconi, Carlos Maranduba, Marta Canovas, Ana Paula Veras Sobral.

Figure legends

Figure 1. Cranial defects (5 X 8 mm) induced in the parietal cranial bones in the rat.

Figure 2. *In vitro* differentiation of hDPSC. A) Von Kossa staining revealed calcified extracellular matrix (arrows) in hDPSC cultured in osteogenic medium for 21 days. B) Oil Red O staining of hDPSC cultured in adipogenic medium (arrow-headed). Inset in higher magnification showed accumulation of lipid-filled droplets within the differentiated hDPSC. The cells cultured in control osteogenic and adipogenic mediums remained von Kossa and Oil Red O negative, respectively (data not shown). Myogenic differentiation observed in hDPSC: immunofluorescence revealed (C) Titin and (D) Actin positive cells at 60 days after induction of differentiation. Arrows (C) and DAPI (blue), DNA-binding dye (D) staining indicate nuclei (N) in multinucleated muscle fibers. Bars = 50µm

Figure 3. Histological analysis of the healing in the cranial defect at 7 (A,B), 30 (C,D) and 60 (E,F) days post-surgery. A, C and E represent the side where CM only was applied, while B, D and F represent the side where CM + hDPSCs were used. A: critical defect filled by connective tissue and chronic inflammatory infiltrate (100X in the original); A': same as before at higher magnification (250X); B: side treated by hDPSCs presenting reduced inflammatory infiltrate (100X); B': same section at higher magnification (250X); C, D: intense deposition of new bone in both sides but where hDPSCs were applied the granulation tissue was reduced and the new bone was more mature (100X); C', D': same as before at higher magnification (250X); E, F: cranial defect completely healed in both sides, showing advanced degree of bone maturation (100x); E', F': same as before at 250X.

Figure 4. Gel eletrophoresis of PCR products generated through PCR amplification of DNA extracted from both cranial defects from a rat at 60 days after surgery. 1) ϕ HAE III (Invitrogen); 2- 4: PCR products after amplification with Gapdh rat specific primers, where 2 = rat DNA as control of the reaction; 3= DNA from the cranial defect with CM only; 4 = DNA from the cranial defect with CM + hDPSC; 5 = negative control for the PCR reaction; 6-9: PCR products after amplification with COL18A1 human specific primers; DNA sample as referred in 4 to 6.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

References

1. Leboucq, N., P. Montoya Y Martinez, *et al.* Aplasia cutis congenita of the scalp with large underlying skull defect: a case report. *Neuroradiology*, 36: 480, 1994.
2. Ross, D. A., S. W. Laurie, *et al.* Aplasia cutis congenita: failed conservative treatment. *Plast Reconstr Surg*, 95: 124, 1995.
3. Donati, V., S. Arena, *et al.* Reparation of a severe case of aplasia cutis congenita with engineered skin. *Biol Neonate*, 80: 273, 2001.
4. Beumer, J., 3rd, D. N. Firtell, *et al.* Current concepts in cranioplasty. *J Prosthet Dent*, 42: 67, 1979.
5. Dahlin, C., A. Linde, *et al.* Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*, 81: 672, 1988.
6. Manson, P. N., W. A. Crawley, *et al.* Frontal cranioplasty: risk factors and choice of cranial vault reconstructive material. *Plast Reconstr Surg*, 77: 888, 1986.
7. Dahlin, C., P. Alberius, *et al.* Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg*, 74: 487, 1991.
8. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9: 641, 1991.
9. Gronthos, S., M. Mankani, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13625, 2000.
10. Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13: 4279, 2002.
11. Caplan, A.I.. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*, 11: 1198, 2005.
12. Dennis, J. E. e A. I. Caplan. Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implantol*, 19: 106; discussion: 136, 1993.
13. Kuznetsov, S. A., P. H. Krebsbach, *et al.* Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*, 12: 1335, 1997.
14. Shi, S. e S. Gronthos. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18: 696, 2003.
15. Yamada, Y., A. Fujimoto, *et al.* Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials*, 27: 3766, 2006.
16. Kerkis, I., Kerkis, A. *et al.* Isolation and Characterization of a population of immature Dental Pulp Stem Cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. Accept to publication in *Cell Tissues Organs*, 2006.
17. Pierdomenico, L., L. Bonsi, *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80: 836, 2005.
18. Laino, G., F. Carinci, *et al.* In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*, 17: 511, 2006.
19. Laino, G., R. D'aquino, *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 20: 1394, 2005.
20. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. In: *Handbook of Stem Cells*, Academic Press, 2: 299, 2004.
21. Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211, 2001.

22. Schmitz, J. P. e J. O. Hollinger. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 205: 299, 1986.
23. Suzuki, M.K., Passos-Bueno, M.R., et al. Molecular analysis of collagen XVIII reveals novel mutations, presence of a third isoform, and possible genetic heterogeneity in Knobloch syndrome. *Am J Hum Genet*. 71(6):1320, 2002.
24. Kuboki, Y., M. Sasaki, *et al.* Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci*, 106: 197, 1998.
25. Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov, *et al.* In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*, 24: 2140, 2006.
26. Krebsbach, P. H., M. H. Mankani, *et al.* Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*, 66: 1272, 1998.
27. Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxiapatite and tricalcium phosphate as bone substitutes. *J Ortho Res*, 3: 301,1985.
28. Goissis, G., Maginador, S. V. S and Martins V. C. A. Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: In Vitro and In Vivo study. *Artificial Organs*, 27: 437, 2003.
29. Zhao, R.C., Liao, L., Han, Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *J Lab Clin Med*. 143(5):284, 2004.
30. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Hoffman, R., et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 30(1):42, 2002.

**CAPÍTULO IV - ISOLATION AND IN VITRO AND IN VIVO
CHARACTERIZATION OF MESENCHYMAL CELLS FROM LIP MUSCLE
OF PATIENTS WITH CLEFT LIP AND PALATE (CLP)**

Abstract

Clefts involving the lip and palate (CLP) or palate only (CP) represent a group of congenital diseases of high impact in medical health as they require complex long term treatment and have life long implications for affected individuals. They represent a complex phenotype and reflect a breakdown in the normal mechanisms involved during early embryonic development of the face. The clinical manifestations of these defects are diverse, ranging from isolated clefts of the lip to complete bilateral clefts of the lip, alveolus and palate. The closure of alveolar clefts is a major component of the rehabilitation of patients with complete CLP and has assumed an essential position in the reconstruction of cleft deformity. The employment of bone marrow stem cells (BMSC) for bone reconstruction has been actively explored in pre-clinical and clinical research and has shown good results. However, the current process of isolation of autologous BMSC is invasive and painful. In attempt to provide an alternative source of osteoprogenitor cells especially for the young patients with CLP, we directed our study into the muscle derived stem cells (MDSC) of *orbicular oris* muscle from CLP patients that is regularly discarded during cheiloplasty. We showed that stem cells from lip skeletal muscle are an approachable “niche” of stromal stem cells, and it is a source of osteoblasts upon proper induction, as well as of others tissues that can be used for bone regeneration, transplantation, and tissue based clinical therapies in patients with cleft lip and palate. Also, our study demonstrated that MDSC lead to neo bone formation when transplanted with collagen membrane to critical bone calvarial defects of non-immunocompromised rats, thus suggesting that MDSC from *orbicular oris* muscle represent a good source of stem cells that can be used in alveolar bone graft in the near future.

Introduction

Clefts involving the lip and or palate (CLP) or isolated clefts of the palate (CP) represent the congenital disease with one of the highest impact in medical health as they require complex long term treatment and have lifelong implications for those individuals unfortunate enough to be affected. They represent a complex phenotype and reflect a breakdown in the normal mechanisms involved during early embryonic development of the face. The clinical manifestations of these defects are diverse, ranging from isolated clefts of the lip to complete bilateral clefts of the lip, alveolus and palate. The incidence of CLP, of 1:800 to 1:1000 births, is reasonably uniform in Caucasian population (reviewed in, Gorlin *et al.*, 2001).

The closure of alveolar clefts is an integral component of a comprehensive rehabilitation of patients with complete CLP and has assumed an essential position in the reconstruction of cleft deformity. Secondary bone grafting represents the most popular approach for the child born with complete CLP (Nwoku *et al.*, 2005). However, some groups have alternatively used primary (early) alveolar bone grafting, and have demonstrated good results too (Rosenstein *et al.*, 2005). Sources of bone graft are numerous and include ribs, calvarium, tibia, iliac crest, and mandibular bone (Nwoku *et al.*, 2005). Donor site morbidity is an important factor in deciding the site for harvesting cancellous bone. Allogenic or xenogenic materials can eliminate this concern but not the risk of disease transmission.

Use of tissue-engineered osteogenic material (TEOM) comprising autologous mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) in bone augmentation procedures have been suggested as alternative promising approach to replace autologous bone grafts, as they seem to offer results with minimal donor site morbidity (Keese *et al.*, 1995). More recently, Hibi *et al.* (2006) have reported the successful use of TEOM in a case of alveolar cleft osteoplasty.

Adult stem cells (ASC) can be obtained from different sources, for example, bone-marrow (Caplan, 1991); dental pulp (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2006), adipose (Zuk *et al.*, 2001); muscle tissue (Jankowski *et al.*, 2002).

The employment of bone marrow stem cells (BMSC) for bone reconstruction has been actively explored in pre-clinical and clinical research. (Caplan, 2005; Mankani *et al.*, 2006; Hibi *et al.*, 2006). This source of SC showed a good clinical result, however process of isolation of autologous BMSC is invasive and painful. In an attempt to provide an alternative source of osteoprogenitor cells than BMSC, especially for the

young patients with CLP, we directed our study into the muscle-derived stem cells (MDSC).

Recent data suggest that the postnatal muscle compartment which is composed by muscle satellite cells (MSC) and MDSC, can be considered an alternative source of multipotential cells capable to differentiate into hematopoietic, osteogenic, adipogenic, chondrogenic, skeletal myogenic and other myogenic lineages (Jankowski *et al.*, 2002; Hwang, J.H. *et al.*, 2004; Alessandri *et al.*, 2004; Mastrogiacomo *et al.*, 2005).

Orbicular oris muscle (OOM) of the lips of CLP patients is regularly discarded during cheiloplasty. This tissue can be a source of autologous SC, which can be easily isolated and used in these patients for bone healing or/and for reconstruction of other appropriate craniofacial tissues. Therefore, the main goal of our study were to isolate MDSC from human OOM of the patients with CLP; characterize the SC markers expression profile of isolated cells and their ability to differentiate into various cell types, such as skeletal muscle, chondrocytes, adipocytes and osteocytes in vitro. Furthermore, we also verify the capacity of normal, no genetically modified, MDSC for bone healing in vivo using Wistar non-immunosuppressed rats.

Material and Methods

Isolation of MDSC from hLSM of the patients with CLP

Orbicular oris muscle fragments (OOMF) discarded during surgical procedures of cheiloplasty in SOBRAPAR Hospital, Campinas, Brazil were used to obtain MDSC from 5 children in average at 3 months of age with CLP.

The patients were enrolled in this study upon signed informed consent by their parents in accordance to the guidelines of the Ethical Committee of Institute of Biosciences at São Paulo University. We included only donors who do not present systemic diseases or/and oral infections.

Connective tissue surrounding the specimens was carefully removed, the samples of OOMF were washed extensively with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (0,01 M, ph=7,4) supplemented with 4% antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Invitrogen), to remove contaminating debris and red blood cells and then digested in a trypsin solution (TrypLe, Invitrogen) for 1h at 37 °C. Once digested, the tissue was transferred (with minimal dissection) into 35-mm Petri dishes (Corning, NY) with D-MEM F12 (Dulbecco's – modified Eagle's medium/ Ham's F12; Invitrogen)

supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Washington), 2mM l-glutamine, 2mM non essential amino acids (Invitrogen) and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). The growing culture of MDSC was maintained under these conditions for 2 weeks, and then the cells were washed twice in PBS, dissociated in a 0,25% a trypsin solution (TrypLe, Invitrogen), and seeded at 10^4 cells per 25 cm² flask. The culture was maintained semi-confluent in order to prevent the differentiation of the cells, and MDSC were passes every 4-5 days with the medium refreshed daily. For freezing, cells were resuspended in a medium containing 40%FBS, 50% DMEM and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, St Louis, MO) at 5×10^5 cells/ml, and the temperature was slowly and gradually decreased at the rate of 1 °C per minute until a final temperature of – 70 °C was reached. Thereafter, cells were transferred to liquid nitrogen. For thawing cryo-vials with MDSC, they were placed into a 37 °C water bath for 2 minutes and thereafter washed twice with 20% FBS, 80% DMEM and placed into culture. Early passage MDSC, were grown in DMEM supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Washington), 2mM l-glutamine, 2mM non essential amino acids (Invitrogen) and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). All cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ and high humidity environment.

Flow Cytometry

To detect surface antigens, these cells were harvested with TrypLe (Invitrogen), washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated at 4 °C for 30 minutes with the following anti-human antibodies: CD29, CD34, CD45-FITC, CD105 (SH2) (all Becton Dickinson, NJ, USA), SH3 and SH4 antibodies were from Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, U.S.A. After wash with PBS, unconjugated primary antibodies were incubated with anti-mouse-PE secondary antibody (Guava Technologies) for additional 15 minutes at 4 °C. Finally cell suspension was washed with PBS and 10^4 labeled cells were acquired using EasyCyte flow cytometry (Guava Technologies). Control samples were incubated with PBS instead of primary antibody followed by incubation with anti-mouse-PE secondary antibody. All plots generated were analyzed in Guava ExpressPlus software (Guava Technologies).

In vitro differentiation of MDSC

One of lineage MDSC were induced to osteogenic, miogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. All the experiments have been done in triplicates. For osteogenic differentiation MDSC exposure to osteogenic medium containing DMEM-LG with 10^{-7} M dexamethasone and 50 μ M ascorbic acid-2 phosphate. At day 9 B-glycerophosphate was added to induce mineralization and at 21 day von Kossa staining was performed.

To induce Miogenic differentiation the cells were cultured in the medium DMEM_HG with 10% supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Washington), 5% horse serum (Sigma), 0.1 μ M dexamethasone, 50 μ M hydrocortisone, 1% antibiotic (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin; Invitrogen) for 60 days. Differentiated MDSC were stained with a monoclonal anti- α -sarcomeric actin, clone 5C5 (developed in mouse, Sigma); monoclonal anti-myosin skeletal (developed in rabbit, Sigma); monoclonal anti-titin clone T11 (developed in mouse sigma). The secondary antibody was CyTM3 labelled goat anti mouse (CyDye fluorolink), and fluorescein isothiocyanate (FITC) (labelled goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The protocol to immunofluorescence stained was previously described by Fujiwara, K. & Pollard (1976). Immunofluorescence stained samples are examined under a confocal microscope (Advanced Imaging Microscopy Release 3.5, Carl Zeiss, Jena Germany).

To induce adipogenic differentiation, the cells were seeded into 6-well plates (Corning) at a density of 2×10^5 cells/well in the medium consisting of DMEM-HG supplemented with 10% FBS (Hyclone), 1 μ M dexamethasone, 100 M indomethacin, 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and 10 μ g/ml insulin and at 14 day after induction to adipogenic differentiation Oil Red-O (Sigma) staining was used to identify lipid-laden fat cells. (Caplan *et al.*, 2005).

For chondrogenic differentiation 2.5×10^5 cells were transferred to a 15 centrifuge tube in the chondrogenic medium that consists of DMEM-HG supplemented with 1% linoleic acid (ITS-Premix, BD, USA), 1×10^{-5} M dexamethasone, 1% 100mM sodium pyruvate, 1% 5mM ascorbic acid-2 phosphate and 10ng/ml TGFB1 (R&D Systems) and centrifuge at 500Xg for 5 min in order to form cell pellets. At day 1 a roughly spherical pellets were formed in each tube. On days 14 and 21 the pellets were fix according to pellet fixation protocol as previously describe (Donald Lennon, 2005). Sections were obtained for histological assessment. Tissue samples were fixed in 10%

formalin for 24 hours, and paraffin-embedded. For morphological study, 3 µm sections, stained with toluidine blue were examined under light microscope Axiovert II (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

Expression of specific genes during differentiation of MDSC to osteogenic (cfos, osteonectin), adipogenic (LPL, PPAR γ 2) and chondrogenic lineages (Aggrecan 1) were also analysed by RT-PCR. Total cellular RNA was isolated from non-induced MDSC cells, at 9 day of induction to osteogenic differentiation, at 15 day of induction to adipogenic differentiation, and at 21 day of induction to chondrogenic differentiation, using TRIzol (Life technologies). After DNase treatment, complementary DNA (cDNA) was obtained by RT-PCR of 2µg of total RNA (super script II, Invitrogen, life and technologies). PCR amplification was performed using primers that were designed to the relevant sequences from GenBank and were synthesized by Invitrogen and were listed in Table 1. PCR reactions were amplified using primers designed to amplify SDHA as a control for assessing PCR efficiency and for subsequent analysis by agarose gel electrophoresis .

Table1 – Primers used to PCR amplification

Gene	Forward <i>Primer</i> (5' → 3')	Reverse <i>Primer</i> (5' → 3')
cfos	CTGACTGATACTCCAAGCGG	TTGGCAATCTCGGTCTGCA
osteonectina	ACTGGCTCAAGAACGTCCTGGT	TCATGGATCTTCTTCACCCGC
LPL	CCGTGGCAACTCTATCTTTGGT	GCCATACAGGATGGCAGTGAA
PPAR γ 2	GCGATCTTGACAGGAAAGACA	GGGGGTGATGTGTTTGA ACT
Aggrecan 1	GAGGAGATGGAGGGTGAGG	G TAGAGCTGGCCCGTGGT
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATT CAT G

Quantitative real-time PCR

Complementary DNA (cDNA) was produced from 4 µg of extracted total RNA using Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed using approximately 200ng of cDNA and SYBR Green PCR master mix in a ABI Prism 7100 system (Applied Biosystems). The PCR conditions were: 94°C for 15 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds for 40 cycles.

Samples from undifferentiated MDSC, MBSC 9 day after induction for osteogenic differentiation, 15 day after adipogenic differentiation and 21 day after chondrogenic were run in triplicates, and the threshold suggested by the instrument software was used to calculate Ct. To normalize the readings we used Ct values from succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) as internal controls in each run, obtaining a delta Ct value for each tested gene (C-fos, Osteonectin, LPL, PPAR γ 2, Aggrecan 1). Primers used were previously described in Table 1.

Karyotype analysis

G-banding chromosome was performed according to standard protocol. At least 100 metaphase spreads were counted for each MDSC culture and band pattern were analyzed for 100 metaphases according to the “International System for Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN) on a Zeiss II microscope (Carl Zeiss, Germany)

Animal model to evaluate the use of undifferentiated MDSC from CLP patients for bone healing

The protocol of animal use in present study was approved by the Animal Research Ethics Committee at Biosciences Institute of Sao Paulo University. 6 Wistar rats (nine-month-old male, body weight 320-420 gm each) were used.

The head of the rats were positioned in a cephalostat during the operation procedure. A midline skin incision was performed from the nasofrontal area to the external occipital protuberance. The skin and underlying tissues, including the periosteum and the temporalis muscles were reflected laterally to exposure the full extent of the calvaria. Two symmetrical full-thickness cranial defects of 5x8mm size were carried out on each parietal region of all animals (Fig. 1), using a drill with micromotor under constant irrigation with sterile physiologic solution to prevent overheating of the bone.

A total of 6 non-immunosuppressed (NIS) animals were used. They received CM only on the left side (LS) while CM with undifferentiated MDSC were placed on the right side (RS). The flap of each animal was closed with nylon 4 sutures (Ethicon, São Paulo, Brazil). The animals were euthanized 20 days or 30 days.

MDSC cells transplantation procedure

A total of 10^6 of undifferentiated human MDSC of one previous characterized lineage were seeded onto collagen membrane carrier (8mm X 5mm) (Oral medica, São Paulo, Brasil) each placed in 35mm plate (6-plate well, Corning). The wells were supplemented with 2,5ml of medium used for undifferentiated MDSC, which were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 hour prior to the transplant in order to allow their adhesion to collagen membrane.

Histological preparation

Sections from the 20th and 30th post-surgery day were obtained for histological assessment. Tissue samples were fixed in 10% formalin for 24 hours, decalcified in 5% formic acid for 48 hours, and paraffin-embedded. For morphological study, 5 µm sections, stained with hematoxylin and eosin (HE) were examined under light microscope axio vert II (Carl Zeiss, Germany).

Analysis of the origin of the new bone

Tissues were scrapped from histological section slides for DNA extraction. Materials were obtained from the left (only membrane) and right (membrane + cells) critical calvarium defects of rats at 20 days after transplantation. DNA was extracted according to the tissue protocol of QIAamp DNA Mini KIT (Qiagen, Germany). For amplification of the human DNA, PCR reactions were performed with primers of EH10 (table 2). We have performed PCR of 35 cycles.

Table 2- Primers sequences of EH10

Gene	Forward <i>Primer</i> (5' → 3')	Reverse <i>Primer</i> (5' → 3')	Annealing (°C)
EH10	CGGGGTACCGGAGTGTAGGGCCAGAAACA	GGAAGATCTACTGCTTCCTTTGGTCGTGA	60°C

Results

Isolation and SC markers expression profile of MDSC from hLSM in vitro

We isolated a population of MDSC from OOMF of the patients with CLP, which showed homogeneous and fibroblast-like morphology.

Flow cytometric analysis showed that the cells reacted positively with the SC antigens tested - SH2, SH3, SH4, CD29 (95% $\pm$ 5), at passages 1 and 2, respectively and were negative for hematopoietic SC markers, including CD34 and CD45 (Fig. 2). We observed in two cell lineages that MDSC maintained undifferentiated phenotype during 18 successive passages and did not present any signs of spontaneous differentiation during ex vivo expansion under aforementioned appropriate culture condition. They observed a normal Karyotype in passage one and in passage 18 (Fig. 3).

In vitro differentiation of MDSC cells to several mesenchymal lineages

Osteogenic differentiation

When the characterized lineage of MDSC was submitted in triplicate to differentiation protocols, all of them differentiate into osteoblasts, myoblasts, chondroblasts and fat cells (Fig. 4-7).

RT-PCR and Real time PCR

We observed a basal expression of all the genes tested (c-fos, osteonectin, PPAR γ 2, aggrecan1) in undifferentiated cells, except for LPL which showed no expression. Quantitative RT_PCR experiments showed that these 4 genes were up-regulated in differentiated cells (Fig. 8).

Transplantation

Histological examination of the cranial defect at 20 days post surgery revealed intense deposition of new bone at the RS, where MDSC + CM were applied.

At 20 days post-surgery, the gap was filled by woven bone intermixed with granulation tissue. In the side where only the CM was applied the defect was filled by loose connective tissue showing chronic inflammatory infiltrate intermingled by remnants of the membrane (Fig. 9).

At 30 days post-surgery findings were similar but granulation tissue was reduced while bone was in a more mature status with some lamellae formation in the RS. In the

side with only membrane, it was possible to notice the beginning of bone neoformation close to the attached to the remnant bone at the periphery of defect (Fig. 9).

None of the animals died of infection or any other complication of the surgery or transplantation process. Calvaria defect of 5x8mm in control animals did not heal spontaneously during the experimental period, confirming that it also represents a critical size defect in these animals (Mendonça & Bueno, 2007).

Origin of the new bone

DNA amplification using human specific primers were successful only with DNA derived from the right cranial defect (CM+ MDSC); while, in the material derived from the left cranial defect (CM) it was negative (Fig. 9).

Figure 1: Cranial defects (5 X 8 mm) induced in both parietal bones of the rat

Figure 2: Examples of the flow cytometric analysis. A: SH2 – negative control; B: anti mouse –PE negative control; C: SH2 – 93% positive; D: CD29 negative control; E: CD29 – 93% positive; F: CD 45 negative control; G: CD45 expressing total negativity

Figure 3: Karyotype analysis on the 18th passage

Figure 4: Chondrogenic differentiation. A –C: toluidine blue staining in paraffin-embedded cell culture

Figure 5: Von Kossa staining revealing calcified extracellular matrix in MDSC

Figure 6: Myogenic differentiation observed in MDSC: by means immunofluorescence. A: actin; B: myosin; C: actin + myosin + DAPI blue; D: titin

Figure 7: Oil red O staining of MDSC cultured in adipogenic medium

Figure 8: Real-Time PCR. 1: c-fos; 2: osteonectin; 3: aggrecan I; 4: PPAR γ 2; 5: LPL

Figure 9: A-D: histological analysis of bone regeneration in the critical defect at 20 (A-C) and 30 (D) days post-surgery. A-C: side treated with MDSC + CM revealing intense new bone formation in different magnifications. A'-C': side where only the CM was applied, showing mostly inflammatory infiltrate and only inconspicuous bone deposition (C'); D: at 30 days post surgery the side treated with MDSC + CM showed more mature bone with some lamellae formation (arrow head); E: DNA amplification with human specific primers - 1) negative control, 2) MDSC + CM, 3) CM, 4 and 5) human DNA control

Discussion

Autogenous bone graft is regarded as the gold standard for rehabilitation of patients with cleft lip and palate since it can provide the three necessary elements for bone regeneration: scaffolding for osteoconduction, inductive agents for osteoinduction, and the progenitor cells for osteogenesis. However, the availability of autograft is limited and the procedure to harvest the bone graft is associated with possible donor site morbidity (Fonseca *et al.*, 2000; Horswell & Henderson, 2003). Therefore, methods that can ameliorate this procedure are of utmost importance and tissue engineering using stem cells is a very promising strategy. It is important to explore alternative sources of stem cells with high plasticity but that are also easily obtained with low morbidity.

We are reporting here for the first time the establishment of a lineage of adult stem cells from the orbicular oris muscle of cleft lip and palate patients, which were positive for all the 4 MSC markers tested and present a similar morphology of cells derived from dental pulp or adipose tissue.

Upon culture expansion, we were successful in differentiating them in 4 distinct lineage-specific cell types: osteogenic, miogenic, adipogenic and chondrogenic. These cells upon differentiation were easily morphologically distinguished and the results of histochemistry and RT-PCR were in accordance with their differentiation state. Therefore, these cells were morphologically and functionally comparable to mesenchymal stem cells isolated from other tissues (bone marrow, deciduous pulp, fat and skeletal muscle of others homes (Caplan 1991; Miura *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2001; Kerkis *et al.*, 2006).

The MDSC did not differentiate spontaneously during culture expansion and maintained a normal Karyotype at passage 18, thus suggesting that they stably replicate. Furthermore, we demonstrated that MDSC with collagen membrane formed a lamellar bone in non-immunosuppressed rats. This is a very promising result, as the bone reconstruction using MDSC was only successful with the use of genetically engineered cells expressing growth factors (Peng e Huard, 2004). It was interesting that the healing process in the RS was much more pronounced than in the LS, which had only CM. The impact of the SC in the healing process was not so evident in our previous report, in which we used hDPSC with CM (Mendonça & Bueno *et al.*, 2007). It is possible that these differences are due to the age of the animals, as those included in the present report are much older. It will be important to evaluate if age or the source of the SC is affecting the healing process.

In summary, we suggest that the use of MDSC in alveolar bone graft can be a good alternative choice to be used in rehabilitation of complete cleft lip and palate because these cells can be easily obtained with non invasive method (the muscle fragments were discarded during the queiloplasty), and can be used in surgeries as primary or secondary bone grafts.

Conclusion

We showed that stem cells from lip skeletal muscle are an approachable “niche” of stromal stem cells, and it is source of osteoblasts, as well as of others tissues that can be used for bone regeneration, transplantation, and tissue based clinical therapies in patients with cleft lip and palate. Our study demonstrated too that when MDSC together with CM lead to quick bone formation in critical sized of non-immunosuppressed rats.

References

1. Alessandri, G., S. Pagano, *et al.* Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* 364(9448): 1872-83. 2004.
2. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5): 641-50. 1991.
3. Caplan, A. I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11(7-8): 1198-211. 2005.
4. Donald Lennon Cell-based therapies and tissue engineering may 31, 2005-june 3. 2005.
5. da Fonseca, M. A. Long-term oral and craniofacial complications following pediatric bone marrow transplantation. *Pediatr Dent* 22(1): 57-62. 2000.
6. Fujiwara, K. & Pollard, T.D. Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells. *J. Cell Biol.* 71, 848-875. 1976.
7. Gorlin, RJ *et al.* Cleft Lip and palate. In: *Syndromes of the head and neck*. New York: Oxford University Press, p.850-60, 2001.
8. Gronthos, S., M. Mankani, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13625-30. 2000.
9. Hibi, H., Y. Yamada, *et al.* Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35(6): 551-5. 2006.
10. Horswell, B. B. and J. M. Henderson Secondary osteoplasty of the alveolar cleft defect. *J Oral Maxillofac Surg* 61(9): 1082-90. 2003.
11. Hwang, J.H. *et al.*, *Molecules and Cells* 17(1):57-61) 2004
12. Jankowski, R.J., Deasy, B.M. and Huard, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy*, 9:642-647. 2002.
13. Keese, E. and R. Schmelzle New findings concerning early bone grafting procedures in patients with cleft lip and palate. *J Craniomaxillofac Surg* 23(5): 296-301. 1995.

14. Kerkis, I., Kerkis, A. *et al.* Isolation and Characterization of a population of immature Dental Pulp Stem Cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. Accept to publication in Cell Tissues Organs, 2006.
15. Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov, et al.. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. Stem Cells 24(9): 2140-9. 2006.
16. Mastrogiacomo, M., Derrubeis, A.R., Cancedda, R. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. J.Cell.Physiol. 204(2):594-603. 2005.
17. Miura, M., S. Gronthos, et al.. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5807-12. 2003.
18. Nwoku, A. L., A. Al Atel, et al. Retrospective analysis of secondary alveolar cleft grafts using iliac of chin bone. J Craniofac Surg 16(5): 864-8. 2005.
19. Peng, H., Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. Trans Immun 12: 311-319. 2004
20. Rosenstein, S. W., M. Grasseschi, et al.. The Eurocleft Study: Intercenter study of treatment outcome in patients with complete cleft lip and palate. Cleft Palate Craniofac J 42(4): 453; author reply 454. 2005.
21. Zuk, P. A. Stem cell research has only just begun. Science 293(5528): 211-2. 2001.

**CAPÍTULO V - COMPARAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE CÉLULAS TRONCO ADULTAS DE PACIENTES PORTADORES DE
FISSURAS LÁBIO PALATINAS E DE INDIVÍDUOS CONTROLES**

Resumo

As fissuras lábio palatinas (FLP), são as malformações congênitas mais comuns presentes ao nascimento, têm uma incidência na população caucasóide de 1:800 a 1:1000 (revisado por Gorlin *et al*, 2001). As formas não síndrômicas das FLP, que representam 70% dos casos totais com FLP, são consideradas patologias complexas, pois são determinadas por múltiplas interações entre vários locos gênicos com variáveis ambientais adicionais envolvidas. Os pesquisadores têm investido em várias estratégias na tentativa de se descobrir genes candidatos para as FLP não síndrômicas, no entanto os resultados têm se mostrado contraditórios na literatura. Com o objetivo de utilizar uma nova metodologia para estudar a etiopatogenia das FLP, neste trabalho isolamos o RNA de células tronco (positivas para o marcador mesenquimal CD105) de 3 indivíduos portadores de FLP e de 4 controles; hibridizamos estes RNAs em laminas de microarray para verificar se existe diferença no perfil de expressão gênica entre as amostras. Observamos 367 genes diferencialmente expressos, todos mais expressos nas amostras provenientes de portadores de FLP. Embora informativos, os dados gerados pelo nosso trabalho ainda são restritos e necessitam ser complementados, no entanto nos permitem inferir que esta pode ser uma boa estratégia para se estudar a etiologia das FLP.

Abstract

Clefts involving the lip and palate (CLP) are the most frequent facial malformation during birth and have an incidence in Caucasoid population from 1:800 to 1:1000 (reviewed by Gorlin e *et al*, 2001). The non-syndromic forms represent 70% of the cases of CLP and are considered complex pathologies as they involve interaction of the environment with several *loci* genic. Researches have used many strategies trying to discover candidate genes for non-syndromic CLP but literature shows that there are contradictories results.

With the objective to utilize a new methodology to study the CLP etiopatogeny, we have isolated mRNA of stem cells (positive for the mesenchymal marker CD105) from 3 patients with non-syndromic CLP and 4 controls and performed microarrays to verify if there is a difference in gene expression between the two groups. We observed that 367 genes were differently expressed, all with higher expression in non-syndromic CLP samples. Even though, the results generated in our work are restricted and need to be complemented, they allow us to infer that the methodology we have used could be a good strategy to study the etiology of CLP.

Introdução

As fissuras lábio palatinas (FLP), com uma incidência na população caucasóide de 1:800 a 1:1000, são as malformações congênitas mais comuns (revisado por Gorlin *et al.*, 2001). As formas não síndrômicas das FLP, que representam 70% dos casos totais com FLP, são consideradas patologias complexas, pois são determinadas por múltiplas interações entre vários locos gênicos com variáveis ambientais adicionais envolvidas (Vieira *et al.*, 2005; Schliekelman & Slatkin, 2002).

Existe um grande interesse mundial de se identificar os genes que contribuem para o desenvolvimento das formas não síndrômicas de FLP. Várias abordagens têm sido utilizadas na tentativa de se identificar esses genes, tais como os estudos de ligação genética (Murray, 1995; Wyszynski *et al.*, 1996; Pezzetti *et al.*, 1998; Marazita *et al.*, 2002; Marazita *et al.*, 2004), incluindo o estudo de pares de irmãos (Prescott *et al.*, 2000) de associação entre polimorfismos em genes candidatos e FLP (Passos-Bueno 2004; Vieira, 2006; Krapels *et al.*, 2006).

Contudo, os estudos de ligação para tentar identificar regiões cromossômicas que possam conter genes candidatos para as FLP não síndrômicas apresentam a desvantagem de precisarem de famílias grandes, com vários afetados, segregando o fenótipo, ou ainda de um número elevado de pares de irmão afetados, e isto não é comum nestes casos de FLP. Os estudos de associação, apesar de não requererem famílias grandes com vários membros afetados ou de vários pares de irmãos portadores de FLP e representarem uma ferramenta promissora para a identificação de alelos de risco associados às FLP, têm demonstrado resultados inconsistentes na literatura, isto é, que não se confirmam em diferentes estudos (Tolarova *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 1999; Lidral *et al.*, 1998; Scapoli *et al.*, 2002).

Mais recentemente, uma abordagem alternativa e muito promissora para o estudo de genes envolvidos na patofisiologia de doenças complexas é a análise do perfil global de expressão gênica, sobretudo com a utilização dos microarrays (Baron *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006). Essa abordagem se baseia no princípio de que exista um conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo numa determinada condição, em relação ao conjunto de genes expressos em outra situação com a qual se deseja comparar. Esta situação, pode permitir a identificação dos fatores necessários ou responsáveis pela manifestação do fenótipo diferencial.

Assim, tendo em vista os resultados contraditórios observados na literatura com os estudos de ligação e associação genética, propomos a comparação do perfil de

expressão gênica de células tronco adultas de pacientes portadores de FLP e de células tronco adultas de indivíduos controles como uma estratégia para a identificação de genes envolvidos na etiopatogenia das FLP.

Com o intuito, de verificarmos se o perfil de expressão gênica está alterado nos portadores de FLP, optamos por estudar células tronco adultas destes pacientes, que são de fácil obtenção e correspondem ao tipo celular menos diferenciado e portanto, poderia ser mais comparável as fases do desenvolvimento embrionário. Além disto, nas FLPs há um comprometimento de tecido ósseo e muscular e dada a plasticidade das células tronco, será possível estudar os processos de diferenciação óssea e muscular neste grupo de pacientes.

Assim sendo, com o objetivo principal de identificar mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogenia das FLP, esse trabalho envolve a análise do perfil de expressão gênica de células tronco extraídas da polpa (CTP) de dentes decíduos de indivíduos portadores de FLP não síndrômica e de indivíduos controles sem fissura (capítulo III), com a metodologia de microarray. Ainda, como as células tronco extraídas do músculo (CTM) orbicular do lábio representam uma fonte importante de células com potencial de diferenciação em diversos tecidos (Capítulo IV), os quais podem ser utilizados para reabilitação dos pacientes portadores de FLP, esse trabalho objetiva também a caracterização do perfil de expressão de CTM de pacientes portadores de FLP e sua comparação com a perfil de expressão das CTP de pacientes controles não afetados pelas FLP.

Material e Métodos

Pacientes e cultura de células

As polpas de dentes foram obtidas de dentes decíduos de 4 indivíduos controles e de 4 indivíduos portadores de FLP não síndrômica (com idades entre 6-7 anos); os tecidos de músculo orbicular do lábio foram obtidos de 3 pacientes portadores de FLP não síndrômica (com idades de aproximadamente 3 meses). As técnicas utilizadas para o estabelecimento e caracterização das linhagens destas células tronco foram previamente descritos nos capítulos III e IV.

Separação magnética de células – SuperMACS

A separação de populações definidas de células-tronco (CD105 +) foram realizadas utilizando o equipamento SuperMACS II (Miltenyi Biotec). Primeiro, as células foram marcadas com o anticorpo primário CD105 (“mouse anti-human CD105” – Becton Dickinson) por 30 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas com PBS 1x estéril e marcadas com anticorpo secundário, contendo esferas magnéticas (“rat anti-mouse IgG1 microbeads” – Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C. Estas células foram novamente lavadas com PBS 1x estéril e submetidas à coluna LS (Miltenyi Biotec) envolta por um campo magnético. Logo após a realização da separação magnética das células CD105 positivas, realizamos a citometria de fluxo novamente.

Obtenção de RNA

Após a separação das células positivas para o marcador de superfície CD105, quando as culturas atingiram uma confluência de 80% nas garrafas de 25 cm², o RNA total foi isolado usando o reagente TRIZOL (Gibco BRL) e purificado com Rneasy mini-columns (Qiagen). Para verificar a qualidade do RNA, ele foi aplicado em gel de agarose 1,5% e submetido à corrida em tampão de TBE por eletroforese e sua concentração foi verificada no Nanodrop .

Experimentos de Microarray, normalização e análise estatística

Os experimentos de expressão gênica foram realizados usando o sistema CodeLink bioarray systems (GE Healthcare) de acordo com os protocolos do fabricante.

Resumidamente, a primeira fita do cDNA foi produzida usando 2 µg do RNA total de cada amostra, Superscript II reverse transcriptase e o primer T7-poly-dT. A segunda fita do cDNA foi produzida usando Rnase H e E.coli DNA polymerase I. A dupla fita de cDNA foi purificada na coluna QIAquick (Qiagen) e os cRNAs alvos marcados com biotina foram gerados por uma reação de transcrição in vitro usando T7 RNA polymerase e biotin-11-UTP (Perkin Elmer). Os cRNAs fragmentados de cada amostra foram hibridizados em laminais de oligoarrays CodeLink contendo 55.000 (55K) spots que foram mantidas overnight incubadas em um shaker a 37°C, 300rpm. Após a lavagem pós-hibridação, os alvos hibridados foram revelados pela incubação dos arrays com CY5-Streptavidin conjugadas. Os reagentes usados para a síntese e fragmentação do cRNA foram os do CodeLink expression assay Kit (GE Healthcare). O sinal de CY5-dye para os alvos hibridizados foram detectados com o uso do scanner GenePIX 4000B

(Axon Instruments) e o software CodeLink Expression Analysis (GE Healthcare) foi utilizado para se obter as intensidades dos spots para as imagens do microarray. Foram normalizados pela mediana nos arrays 53423 spots. Em todas as réplicas de CTL e CTP, 12268 spots com medidas de expressão confiáveis foram considerados válidos para as análises subsequentes. Para encontrar genes diferencialmente expressos na comparação CTM versus CTP, utilizou-se a abordagem SAM (“Significance of Microarray Analysis”) (Tusher *et al.*, 2001).

Resultados

Estabelecimento das linhagens de células tronco, separação das células CD105+ e obtenção do RNA

As células ,quando em cultura, obtidas de músculo esquelético do lábio e da polpa de dentes decíduos apresentaram uma morfologia similar a de fibroblastos. A citometria de fluxo revelou que estas células são negativas para os marcadores CD34, CD45 e positivas para CD29, SH2,SH3 e SH4 (capítulo III e IV). Em seguida, realizamos a separação das células positivas para o marcador CD105 com o SuperMCAS II e realizamos novamente a citometria de fluxo ficando com uma população homogênea, onde 99% das células foram positivas para o marcador CD105.

Os RNAs obtidos destas células mostraram boa qualidade e suas concentrações variaram de 568.76 a 824.41 ng/μl.

Infelizmente não obtivemos RNAm de células tronco derivadas de polpa de dente de pacientes com FLP com qualidade suficiente para prosseguirmos com os experimentos de hibridação no microarrays. Portanto, só iremos apresentar os resultados referentes à análise do RNAm obtido das células tronco de dente de controles e de lábio dos portadores de FLP.

Experimentos com “microarrays” normalização e análise estatística

A reprodutibilidade dos dados de expressão gênica nas lâminas de microarray foi demonstrada por uma correlação média satisfatória entre as intensidades das lâminas (0,84 +/- 0,05). Observaram-se 12268 transcritos expressos com medidas e considerados válidos para as análises subsequentes. Identificamos 367 genes diferencialmente expressos entre as amostras de CTM e CTP (false Discovery rate entre 1,4 e 2,5%) após a análise com o SAM. É interessante notar que todos estes genes têm expressão aumentada nas amostras advindas de lábio (Figura 1).

Figura 1 - Cluster mostrando os 367genes diferencialmente expressos nas amostras de pacientes em comparação com as amostras controles, identificados com o uso da abordagem SAM ($1,4 \leq \text{FDR} \leq 2,5$ - fold change = 2)

Discussão

Demonstramos previamente (capítulo III e IV) que as CTM e CTP quando em cultura apresentam as mesmas características morfológicas, expressam os mesmo marcadores imunofenotípicos em quantidades semelhantes e têm habilidade similar de se diferenciarem em diversas linhagens celulares quando induzidas “in vitro” e “in vivo”. No presente trabalho com o intuito de estudar o perfil de expressão gênica em uma população mais homogênea de células tronco obtidas de pacientes afetados por FLP e controles advindas de diferentes tecidos, realizamos a seleção das linhagens celulares pela expressão do marcador celular CD105. Os nossos resultados preliminares sugerem uma diferença estatisticamente significativa do perfil de expressão gênico de CTM de pacientes portadores de FLP e CTP de controles.

O músculo orbicular do lábio e a polpa dentária são formados a partir da proliferação e migração das células da crista neural, que darão origem às 5 proeminências faciais durante as primeiras semanas de gestação (Moore & Persaud, 1994). Apesar de estas células terem a mesma origem embrionária e serem positivas para CD105, não achamos prudente realizar uma análise comparativa mais detalhada entre elas, pois os resultados podem estar relacionados ao fato de elas serem provenientes de diferentes locais ou por uma ser proveniente de paciente com FLP e outra de um indivíduo controle. Ou seja, apesar dos perfis de expressão gênica entre células tronco adultas mesenquimais obtidas de diferentes tecidos parecem ser bastante semelhantes (Shi *et al.*, 2001; Panepucci *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006), é difícil atribuir se as diferenças aqui observadas são decorrentes do tipo celular ou associadas a etiopatogenia das fissuras.

Contudo, consideramos que estas diferenças de perfil de expressão gênicas observadas entre as amostras estudadas sugerem esta estratégia como bastante promissora para respondermos nossos objetivos propostos.

Portanto no futuro, realizaremos a hibridação de mais 4 laminas com RNAm extraído de polpa de dentes decíduos de portadores de fissura lábio palatina não síndrome para comparar com o perfis de expressão já observados neste estudo, visto que os dados gerados por estes microarrays de oligonucleotídeos apresentam alta reprodutibilidade, permitindo acurada comparação de sinais gerados pelo mesmo alvo em diferentes lâminas (Schulze & Downward, 2001; Kane *et al.*, 2000). Também pretendemos utilizar outros softwares além do SAM para analisar os resultados como por exemplo: Gene Sifter e Signal-to-noise ratio (SNR). A fim de investigar o

enriquecimento de categorias específicas do Gene Ontology (GO) entre os genes selecionados pelos softwares previamente descritos, utilizaremos o programa BINGO (The Biological Networks Gene Ontology tool), um plug-in do software Cytoscape (www.psb.ugent.be/cbd/papers/BINGO). Bem como selecionaremos outras metodologias disponíveis para validar os dados obtidos pelos softwares como por exemplo: Reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time PCR) (Bustin, 2000) entre outras.

Referências Bibliográficas

- Adams, M. D., J. M. Kelley, *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, v.252, n.5013, Jun 21, p.1651-6. 1991.
- Baron, C. A., S. Y. Liu, *et al.* Utilization of lymphoblastoid cell lines as a system for the molecular modeling of autism. *J Autism Dev Disord*, v.36, n.8, Nov, p.973-82. 2006.
- Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, v.25, n.2, Oct, p.169-93. 2000.
- Gaspar, D. A., S. R. Matioli, *et al.* Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet*, v.12, n.7, Jul, p.521-6. 2004.
- Gaspar, D. A., R. C. Pavanello, *et al.* Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. *Am J Med Genet*, n.87 v.2, Nov, p.197-9. 2002.
- Gorlin, RJ. *Syndromes of the head and neck*. New York: Oxford University Press. 1283p. 2001
- Hu, Z., Z. Zhang, *et al.* Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *J Virol*, v.80 n.3, Feb, p.1405-13. 2006..
- Jiang, R., J. O. Bush, *et al.* Development of the upper lip: Morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*, v.235, n.5, May 4, p.spc1. 2006.
- Kane, M. D., T. A. Jatkoe, *et al.* Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*, v.28 n.22, Nov 15, p.4552-7. 2000.

Krapels, I. P., G. A. Zielhuis, *et al.* Periconceptional health and lifestyle factors of both parents affect the risk of live-born children with orofacial clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, v.76, n.8, Aug, p.613-20. 2006.

Lidral, A. C., P. A. Romitti, *et al.* Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet*, v.63, n.2, Aug, p.557-68. 1998. .

Marazita, M. L., L. L. Field, *et al.* Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet*, v.71, n.2, Aug, p.349-64. 2002.

Marazita, M. L., L. L. Field, *et al.* Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey. *Am J Med Genet A*, v.126, n.2, Apr 15, p.111-22. 2004

Moore, K.L. & Persaud, T.V.N. *Embriologia Clínica*. 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 360 p. 1994.

Murray, J. C. e B. C. Schutte. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest*, v.113, n.12, Jun, p.1676-8. 2004.

Okubo, K., N. Hori, *et al.* Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet*, v.2, n.3, Nov, p.173-9. 1992.

Panepucci, R. A., J. L. Siufi, *et al.* Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.22, n.7, p.1263-78. 2004.

Passos-Bueno, M. R., D. A. Gaspar, *et al.* Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. *Cleft Palate Craniofac J*, v.41, n.4, Jul, p.387-91. 2004.

Pezzetti, F., L. Scapoli, *et al.* A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. *Genomics*, v.50, n.3, Jun 15, p.299-305. 1998.

Scapoli, L., M. Martinelli, *et al.* Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet*, v.110, n.1, Jan, p.15-20. 2002.

Schliekelman, P. e M. Slatkin. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet*, v.71, n.6, Dec, p.1369-85. 2002.

Schulze, A. and J. Downward. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol*, v.3, n.8, Aug, p.E190-5. 2001.

Shi, S., P. G. Robey, *et al.* Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*, v.29, n.6, Dec, p.532-9. 2001.

Tolarova, M. M. e J. Cervenka. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*, v.75, n.2, Jan 13, p.126-37. 1998.

Tusher, V. G., R. Tibshirani, *et al.* Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.9, Apr 24, p.5116-21. 2001.

Velculescu, V. E., L. Zhang, *et al.* Serial analysis of gene expression. *Science*, v.270, n.5235, Oct 20, p.484-7. 1995.

Vieira, A. R., J. R. Avila, *et al.* Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet*, v.1, n.6, Dec, p.e64. 2005.

Vieira, A. R. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, v.163, n.9, May 1, p.790-810. 2006.

Wyszynski, D. F., A. F. Lewanda, *et al.* Phenotypic discordance in a family with monozygotic twins and non-syndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet*, v.66, n.4, Dec 30, p.468-70. 1996.

Yamada, Y., A. Fujimoto, *et al.* Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials*, v.27, n.20, Jul p.3766-81. 2006.

CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Discussão

Este trabalho consistiu do estabelecimento e caracterização de 23 linhagens de células tronco adultas (CTA) obtidas de polpa de dentes decíduos (11), do músculo orbicular do lábio (5), de osso medular (2) e de gordura de lipoaspiração (5) com o objetivo de utilizá-las para ajudar a elucidar os mecanismos etiológicos de origem genética das fissuras lábio palatinas não sindrômicas; bem como para utilizá-las para bioengenharia de tecidos alterados nesta patologia, especialmente o tecido ósseo.

Demonstramos que os protocolos que utilizamos são facilmente reproduzidos, que todas as linhagens de CTA obtidas dos diferentes tecidos tem uma boa plasticidade para diferenciação osteogênica “*in vitro*”, como já havia sido descrito na literatura (Zuk *et al.*,2001; Noth *et al.*,2002; Miura *et al.*, 2003; Mastrogiacomo *et al.*, 2005;Kerkis *et al.*, 2006) e que estas CTA são passíveis de congelamento e descongelamento a qualquer momento, quando se realiza o protocolo de congelamento corretamente.

No que diz respeito as perspectivas de utilização das CTA em enxertos ósseos alveolares, as linhagens de polpa de dentes decíduos (PDD) e de músculo orbicular do lábio (MOL) nos chamaram muita atenção e se mostraram muito promissoras, pois para sua obtenção não necessitamos realizar nenhum processo invasivo, visto que todas as crianças tem dentes decíduos em esfoliação (aproximadamente dos 6-12 anos de idade) e que as células provenientes do músculo orbicular do lábio foram obtidas de fragmentos de tecidos regularmente descartados durante a cirurgia de queiloplastia. Além disto, em nossos estudos verificamos que estas células quando induzidas a diferenciação “*in vitro*” tem o potencial de originar várias linhagens celulares tecido específicas que também podem ser utilizadas para reabilitação de outras estruturas acometidas pelas FLP (como por exemplo, as estruturas musculares) .

A grande descoberta sobre as linhagens de CTA de polpa de dentes decíduos e do músculo orbicular do lábio é que elas são capazes de fechar defeitos críticos na calota craniana de ratos Wistar quando associadas a membranas de colágeno, sem que para isto seja necessária a realização de indução prévia para diferenciação osteogênica “*in vitro*”. Além disto, em nossos experimentos os ratos não eram imunossuprimidos e não observamos clinicamente nenhum tipo de rejeição destas células humanas.

Outros grupos (Krebsbach *et al.*,1998; Mankani *et al.*,2006) demonstraram o fechamento de defeitos críticos em ratos e camundongos utilizando células tronco

provenientes de aspirado de medula óssea utilizando diferentes materiais biológicos sintéticos como “*scaffolds*” e também obtiveram sucesso, no entanto eles utilizaram animais imunosuprimidos e a para obtenção da CTA provenientes de aspirado de medula necessita-se da realização de um procedimento invasivo.

Alguns grupos demonstraram que CTA obtidas de músculo esquelético são capazes de fechar defeitos críticos quando submetidas a engenharia genética para expressarem fatores de crescimento (Lee et al., 2000; Peng & Huard, 2004). Com a estratégia que utilizamos para estabelecer as linhagens de CTA de músculo orbicular do lábio, não precisamos realizar nenhum tipo de modificação genética para que elas fechassem o defeito crítico dos animais.

Portanto as células tronco adultas obtidas de polpa de dente e de músculo orbicular do lábio associadas à scaffolds de colágeno demonstraram ser muito promissoras para reabilitação das fissuras lábio palatinas.

Entre as linhagens estabelecidas e caracterizadas, 13 foram obtidas de indivíduos portadores de fissuras lábio palatinas o que nos proporcionou além demonstrar a grande facilidade de obtenção e uso destas células em bioengenharia de tecido, iniciar um estudo empregando uma metodologia inédita para estudar a etiopatogenia das fissuras lábio palatinas não sindrômicas, que consistiu do uso destas linhagens de CTA para avaliar as diferenças de expressão no perfil gênico de indivíduos portadores de FLP e de controles utilizando a metodologia de microarray .

Ao utilizarmos esta metodologia, observamos 96 genes diferencialmente expressos entre as amostras de FLP e de controles, todos mais expressos nas amostras dos indivíduos acometidos pelas FLP. No entanto, estes estudos preliminares não nos permitiu ainda inferir se a diferença no perfil de expressão gênica esta relacionada ao fato de que as células tronco foram obtidas de afetados por FLP não sindrômica e controles ou pelo fato de as células tronco adultas terem sido obtidas de diferentes tecidos (polpa de dentes decíduos e músculo orbicular do lábio). Na tentativa de elucidar estes dados obtidos, no futuro, realizaremos a hibridação de mais 4 lâminas de polpa de dentes decíduos de portadores de fissura lábio palatina não sindrômica para comparar com os perfis de expressão já observados neste estudo, visto que os dados gerados por estes microarrays de oligonucleotídeos apresentam alta reprodutibilidade, permitindo acurada comparação de sinais gerados pelo mesmo alvo em diferentes lâminas (Schulze & Downward , 2001; Kane *et al.*, 2000).

A engenharia de estruturas craniofaciais utilizando células tronco adultas é muito promissora devido aos grandes avanços nos estudos de biologia celular e molecular, de genética molecular, dos polímeros químicos, robótica e engenharia mecânica que junto unidos por uma equipe multidisciplinar podem promover a regeneração dos tecidos acometidos por injúrias ou alterações genéticas (Nerem, 1992; Langer and Vacanti, 1993).

Este trabalho foi realizado para utilizar as CTM não só para estudo da etiopatogenia das FLP mas também para o estudo das possibilidades do uso destas células para reconstrução das estruturas ósseas acometidas pelas FLP.

Conclusões

1- Os protocolos de estabelecimento de linhagem de células tronco e indução para diferenciação osteogênica in vitro são altamente reproduzíveis.

2- As células tronco de polpa de dentes decíduos têm plasticidade para se diferenciar em tecido muscular, adiposo e osseo “in vitro”, bem como tem a capacidade de regenerar grandes defeitos cranianos em modelos animais.

3- As células isoladas a partir de músculo orbicular do lábio têm características mesenquimais, com plasticidade in vitro para diferenciação em linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas e miogênicas. Além disto, apresentam também plasticidade de gerar osso “in vivo” regenerando defeitos críticos em ratos.

4- O perfil de expressão genica de células mesenquimais CD105 provenientes de músculo orbicular do lábio de pacientes com FLP é diferente de células mesenquimais CD105 provenientes de polpa de dente de indivíduos sem FLP.

CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Introdução e discussão

1. Ahmad, I. e J. R. Hubbard. Pseudo realignment of maxillary anterior teeth with all-ceramic components. Pract Periodontics Aesthet Dent, v.10, n.7, Sep, p.851-5. 1998.
2. Alhadlaq, A. e J. J. Mao. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. Stem Cells Dev, v.13, n.4, Aug, p.436-48. 2004.
3. Ballew, C., S. J. Beckerman, *et al.* High prevalence of cleft lip among the Bari Indians of western Venezuela. Cleft Palate Craniofac J, v.30, n.4, Jul, p.411-3. 1993.
4. Barrilleaux, B., D. G. Phinney, *et al.* Review: Ex Vivo Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells. Tissue Eng, Oct 1. 2006.
5. Blanco, R., L. Jara, *et al.* [Genetic variation of MSX1 has a sexual dimorphism in non syndromic cleft palate in the Chilean population]. Rev Med Chil, v.126, n.7, Jul, p.781-7. 1998.
6. Bosch, C., B. Melsen, *et al.* Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg, v.9, n.4, Jul, p.310-6. 1998.
7. Braybrook, C., G. Warry, *et al.* Physical and transcriptional mapping of the X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) critical region. Hum Genet, v.108, n.6, Jun, p.537-45. 2001.
8. Bueno, D. F; Lopes, L. D. ; Andre, M. . Fissuras Lábio Palatinas. In: Jankielewicz, I & co autores. (Org.). 'Prótesis Buco-Maxilo-Facial. Barcelona: Quintessence, 2003, v. 1, p. 129-148.
9. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res, v.9, n.5, Sep, p.641-50. 1991.
10. Carinci, F., F. Pezzetti, *et al.* Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23. Am J Hum Genet, v.56, n.1, Jan, p.337-9. 1995.
11. Carter, C. O. Genetics of common congenital malformations in man. Proc R Soc Med, v.69, n.1, Jan, p.38-40. 1976.
12. Celli, J., P. Duijf, *et al.* Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. Cell, v.99, n.2, Oct 15, p.143-53. 1999.
13. Choi, D., H. J. Lee, *et al.* In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body. Stem Cells, v.23, n.6, Jun-Jul, p.817-27. 2005.
14. Christensen, K. e L. E. Mitchell. Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate--a Danish Registry study. Am J Hum Genet, v.58, n.1, Jan, p.182-90. 1996.
15. Chung, C. S., D. Bixler, *et al.* Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: a comparison of Danish and Japanese data. Am J Hum Genet, v.39, n.5, Nov, p.603-11. 1986.
16. Clark, R. A. Imaging in Bone Marrow Transplantation. Cancer Control, v.6, n.1, Jan, p.84-89. 1999.
17. Clementi, M., R. Tenconi, *et al.* Complex segregation analysis in a sample of consecutive newborns with cleft lip with or without cleft palate in Italy. Hum Hered, v.45, n.3, May-Jun, p.157-64. 1995.
18. Cooper, M. E., J. S. Ratay, *et al.* Asian oral-facial cleft birth prevalence. Cleft Palate Craniofac J, v.43, n.5, Sep, p.580-9. 2006.

19. Chistensen k. & Fogh Andersen P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins 1970-1990. Am J Med Genet, v.47, n.6, Nov, p.910-6, 1993.
20. Croen, L. A., G. M. Shaw, *et al.* Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. Am J Med Genet, v.79, n.1, Aug 27, p.42-7. 1998.
21. De Bari, C., F. Dell'accio, *et al.* Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. Arthritis Rheum, v.54, n.4, Apr, p.1209-21. 2006.
22. De Souza, J. M., C. M. Buchalla, *et al.* [Perinatal morbidity and mortality in maternity hospitals. III-- Congenital abnormalities in living births]. Rev Saude Publica, v.21, n.1, Feb, p.5-12. 1987.
23. Farrall, M. e S. Holder. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. Am J Hum Genet, v.50, n.2, Feb, p.270-7. 1992.
24. Farrell, E., F. J. O'brien, *et al.* A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. Tissue Eng, v.12, n.3, Mar, p.459-68. 2006.
25. Ferguson, M. W. Palate development. Development, v.103 Suppl, p.41-60. 1988.
26. Fogh-Andersen, P. Thalidomide and congenital cleft deformities. Acta Chir Scand, v.131, n.3, Mar, p.197-200. 1966.
27. Fraser, F. C. The multifactorial/threshold concept -- uses and misuses. Teratology, v.14, n.3, Dec, p.267-80. 1976.
28. Fraser, F. C. e H. Baxter. The familial distribution of congenital clefts of the lip and palate; a preliminary report. Am J Surg, v.87, n.5, May, p.656-9. 1954.
29. Fraser, F. C. e H. Pashayan. Relation of face shape to susceptibility to congenital cleft lip. A preliminary report. J Med Genet, v.7, n.2, Jun, p.112-7. 1970.
30. Gaspar, D. A., S. R. Matioli, *et al.* Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Eur J Hum Genet, v.12, n.7, Jul, p.521-6. 2004.
31. Gaspar, D. A., S. R. Matioli, *et al.* Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. Genet Epidemiol, v.23, n.4, Nov, p.364-74. 2002.
32. Gaspar, D. A., R. C. Pavanello, *et al.* Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. Am J Med Genet, v.87, n.2, Nov 19, p.197-9. 1999.
33. Goissis, G., S. V. Da Silva Maginador, *et al.* Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: in vitro and in vivo study. Artif Organs, v.27, n.5, May, p.437-43. 2003.
34. Gorlin, RJ *et al.* Cleft Lip and palate. In: *Syndromes of the head and neck*. New York: Oxford University Press, p.850-60, 2001.
35. Gronthos, S., J. Brahim, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res, v.81, n.8, Aug, p.531-5. 2002.
36. Gronthos, S., M. Mankani, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.25, Dec 5, p.13625-30. 2000.

37. Gunther, T., M. Struwe, *et al.* Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. Development, v.120, n.11, Nov, p.3119-30. 1994.
38. Gurley, J. M., M. S. Wamsley, *et al.* Alterations in apoptosis and epithelial-mesenchymal transformation in an in vitro cleft palate model. Plast Reconstr Surg, v.113, n.3, Mar, p.907-14. 2004.
39. Hanson, J. W. e D. W. Smith. U-shaped palatal defect in the Robin anomalad: developmental and clinical relevance. J Pediatr, v.87, n.1, Jul, p.30-33. 1975.
40. Hecht, J. T., P. Yang, *et al.* Complex segregation analysis of nonsyndromic cleft lip and palate. Am J Hum Genet, v.49, n.3, Sep, p.674-81. 1991.
41. Houdayer, C. e M. Bahuaui. Orofacial cleft defects: inference from nature and nurture. Ann Genet, v.41, n.2, p.89-117. 1998.
42. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, v.21, n.24, Dec, p.2529-43. 2000.
43. Ishaug-Riley, S. L., G. M. Crane, *et al.* Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. J Biomed Mater Res, v.36, n.1, Jul, p.1-8. 1997.
44. Jiang, R., J. O. Bush, *et al.* Development of the upper lip: Morphogenetic and molecular mechanisms. Dev Dyn, v.235, n.5, May 4, p.spc1. 2006.
45. Jugessur, A. e J. C. Murray. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. Curr Opin Genet Dev, v.15, n.3, Jun, p.270-8. 2005.
46. Kane, M. D., T. A. Jatkoa, *et al.* Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. Nucleic Acids Res, v.28, n.22, Nov 15, p.4552-7. 2000.
47. Kerkis, I., Kerkis, A. *et al.* Isolation and Characterization of a population of immature Dental Pulp Stem Cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. Accept to publication in Cell Tissues Organs. 2006.
48. Kernahan D. A, Satrk R. B. A new classification for celft and cleft palate. Plast Reconstr Surg v.22, n.5, Nov,p.435-41.1958.
49. Kerrigan, J. J., J. P. Mansell, *et al.* Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. J R Coll Surg Edinb, v.45, n.6, Dec, p.351-8. 2000.
50. Kondo, S., B. C. Schutte, *et al.* Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nat Genet, v.32, n.2, Oct, p.285-9. 2002.
51. Krapels, I. P., G. A. Zielhuis, *et al.* Periconceptional health and lifestyle factors of both parents affect the risk of live-born children with orofacial clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.76, n.8, Aug, p.613-20. 2006.
52. Krebsbach, P. H., M. H. Mankani, *et al.* Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. Transplantation, v.66, n.10, Nov 27, p.1272-8. 1998.
53. Lammer, E. J., D. T. Chen, *et al.* Retinoic acid embryopathy. N Engl J Med, v.313, n.14, Oct 3, p.837-41. 1985.
54. Langer, R. e J. P. Vacanti. Tissue engineering. Science, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.

55. Lee, J. Y., D. Musgrave, *et al.* Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. J Bone Joint Surg Am, v.83-A, n.7, Jul, p.1032-9. 2001.
56. Lee, Y. M., Y. J. Seol, *et al.* Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. J Biomed Mater Res, v.54, n.2, Feb, p.216-23. 2001.
57. Lidral, A. C., P. A. Romitti, *et al.* Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. Am J Hum Genet, v.63, n.2, Aug, p.557-68. 1998.
58. Lim, S. C., M. J. Lee, *et al.* Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. Pathol Int, v.50, n.8, Aug, p.594-602. 2000.
59. Loffredo, L. C., J. M. Souza, *et al.* Oral clefts and vitamin supplementation. Cleft Palate Craniofac J, v.38, n.1, Jan, p.76-83. 2001.
60. Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov, *et al.* In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. Stem Cells, v.24, n.9, Sep, p.2140-9. 2006.
61. Marazita, M. L., L. L. Field, *et al.* Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. Am J Hum Genet, v.71, n.2, Aug, p.349-64. 2002.
62. Marazita, M. L., L. L. Field, *et al.* . Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey. Am J Med Genet A, v.126, n.2, Apr 15, p.111-22. 2004.
63. Marazita, M. L., D. N. Hu, *et al.* Cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China: evidence for an autosomal major locus. Am J Hum Genet, v.51, n.3, Sep, p.648-53. 1992.
64. Marazita, M. L., M. A. Spence, *et al.* Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds. Am J Med Genet, v.19, n.1, Sep, p.9-18. 1984.
65. Mark, D. E., J. O. Hollinger, *et al.* Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone-inductive protein. Plast Reconstr Surg, v.86, n.4, Oct, p.623-30; discussion 631-2. 1990.
66. Marolt, D., A. Augst, *et al.* Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. Biomaterials, v.27, n.36, Dec, p.6138-49. 2006.
67. Mastrogiacomo, M., A. R. Derubeis, *et al.* Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. J Cell Physiol, v.204, n.2, Aug, p.594-603. 2005.
68. Mauney, J. R., V. Volloch, *et al.* Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. Tissue Eng, v.11, n.5-6, May-Jun, p.787-802. 2005.
69. Melnick, M., D. Bixler, *et al.* Cleft lip+/-cleft palate: an overview of the literature and an analysis of Danish cases born between 1941 and 1968. Am J Med Genet, v.6, n.1, p.83-97. 1980.
70. Mitchell, L. E. e N. Risch. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. Am J Hum Genet, v.51, n.2, Aug, p.323-32. 1992.
71. Miura, M., S. Gronthos, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.10, May 13, p.5807-12. 2003
72. Murray, J. C. Face facts: genes, environment, and clefts. Am J Hum Genet, v.57, n.2, Aug, p.227-32. 1995.

73. Muschler, G. F., H. Nitto, *et al.* Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. Clin Orthop Relat Res, n.407, Feb, p.102-18. 2003.
74. Nagem Filho, H. e D. R. Martins. [Teamwork in the rehabilitation of patients with lesions of lip and palate]. Estomatol Cult, v.2, n.1, Jan-Jun, p.127-32. 1968.
75. Narang, R. e D. M. Laskin. Experimental osteogenesis at fracture sites and gaps. J Oral Surg, v.34, n.3, Mar, p.225-31. 1976.
76. Nerem, R. M. Tissue engineering in the USA. Med Biol Eng Comput, v.30, n.4, Jul, p.CE8-12. 1992.
77. Nunamaker, D. M. Experimental models of fracture repair. Clin Orthop Relat Res, n.355 Suppl, Oct, p.S56-65. 1998.
78. Noth, U., A. M. Osyczka, *et al.* Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res, v.20, n.5, Sep, p.1060-9. 2002.
79. Owens, J. R., J. W. Jones, *et al.* Epidemiology of facial clefting. Arch Dis Child, v.60, n.6, Jun, p.521-4. 1985.
80. Passos-Bueno, M. R., D. A. Gaspar, *et al.* Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. Cleft Palate Craniofac J, v.41, n.4, Jul, p.387-91. 2004.
81. Passos-Bueno, M. R.; Moreira E. S. Ferramentas básicas da genética molecular Humana. In Genômica, Ed Atheneu, p.43-69, 2004.
82. Peng, H & Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. Transplant Immunology, v.12, p. 311-319. 2004
83. Pezzetti, F., L. Scapoli, *et al.* A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. Genomics, v.50, n.3, Jun 15, p.299-305. 1998.
84. Prescott, N. J., R. M. Winter, *et al.* Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. Ann Hum Genet, v.65, n.Pt 6, Nov, p.505-15. 2001.
85. Proetzel, G., S. A. Pawlowski, *et al.* Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. Nat Genet, v.11, n.4, Dec, p.409-14. 1995.
86. Ray, A. K., L. L. Field, *et al.* Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in west Bengal, India: evidence for an autosomal major locus. Am J Hum Genet, v.52, n.5, May, p.1006-11. 1993.
87. Reyes, M. e C. M. Verfaillie. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. Ann N Y Acad Sci, v.938, Jun, p.231-3; discussion 233-5. 2001.
88. Riggs, B. L. Overview of osteoporosis. West J Med, v.154, n.1, Jan, p.63-77. 1991.
89. Risch, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. Nature, v.405, n.6788, Jun 15, p.847-56. 2000.
90. Scapoli, C., A. Collins, *et al.* Combined segregation and linkage analysis of nonsyndromic orofacial cleft in two candidate regions. Ann Hum Genet, v.63, n.Pt 1, Jan, p.17-25. 1999.
91. Schliekelman, P. e M. Slatkin. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. Am J Hum Genet, v.71, n.6, Dec, p.1369-85. 2002.

92. Schmitz, J. P. e J. O. Hollinger. A simple instrument for achieving accurate alignment and pre-insertion stability with mandibular bone plates. Plast Reconstr Surg, v.78, n.6, Dec, p.822-3. 1986.
93. Schmitz, S., M. Loeffler, *et al.* Synchrony of bone marrow proliferation and maturation as the origin of cyclic haemopoiesis. Cell Tissue Kinet, v.23, n.5, Sep, p.425-42. 1990.
94. Senders, C. W., E. C. Peterson, *et al.* Development of the upper lip. Arch Facial Plast Surg, v.5, n.1, Jan-Feb, p.16-25. 2003.
95. Shaw, G. M., C. R. Wasserman, *et al.* Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. Am J Hum Genet, v.58, n.3, Mar, p.551-61. 1996.
96. Shi, S. e S. Gronthos. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res, v.18, n.4, Apr, p.696-704. 2003.
97. Slavkin, H. C. Incidence of cleft lips, palates rising. J Am Dent Assoc, v.123, n.11, Nov, p.61-5. 1992.
98. Suzuki, K., D. Hu, *et al.* Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. Nat Genet, v.25, n.4, Aug, p.427-30. 2000.
99. Swijnenburg, R. J., M. Tanaka, *et al.* Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. Circulation, v.112, n.9 Suppl, Aug 30, p.1166-72. 2005.
100. Tolarova, M. M. e J. Cervenka. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. Am J Med Genet, v.75, n.2, Jan 13, p.126-37. 1998.
101. Van Den Boogaard, M. J., M. Dorland, *et al.* MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. Nat Genet, v.24, n.4, Apr, p.342-3. 2000.
102. Van Der Woude, A. Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate. Am J Hum Genet, v.6, n.2, Jun, p.244-56. 1954.
103. Vandas, A. P. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. Cleft Palate J, v.24, n.3, Jul, p.216-25. 1987.
104. Vastardis, H., N. Karimbux, *et al.* A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. Nat Genet, v.13, n.4, Aug, p.417-21. 1996.
105. Verfaillie, C. Stem cell plasticity. Hematology, v.10 Suppl 1, p.293-6. 2005.
106. Vieira, A. R. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. Am J Epidemiol, v.163, n.9, May 1, p.790-810. 2006.
107. Winkler, J., J. Hescheler, *et al.* Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. Biochim Biophys Acta, v.1740, n.2, May 30, p.240-8. 2005.
108. Winn, S. R., J. M. Schmitt, *et al.* Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. J Biomed Mater Res, v.45, n.4, Jun 15, p.414-21. 1999.
109. Woolf, C. M., R. M. Woolf, *et al.* Genetic and Nongenetic Variables Related to Cleft Lip and Palate. Plast Reconstr Surg, v.32, Jul, p.65-74. 1963.
110. Wronski, T. J., L. M. Dann, *et al.* Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovariectomized rats. Endocrinology, v.125, n.2, Aug, p.810-6. 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

111. Wyszynski, D. F., T. H. Beaty, *et al.* Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. Cleft Palate Craniofac J, v.33, n.5, Sep, p.406-17. 1996.
112. Wyszynski, D. F., A. F. Lewanda, *et al.* Phenotypic discordance in a family with monozygotic twins and non-syndromic cleft lip and palate. Am J Med Genet, v.66, n.4, Dec 30, p.468-70. 1996.
113. Yoon, B. I., T. Inoue, *et al.* Teratological effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): induction of cleft palate in the ddY and C57BL/6 mouse. J Vet Sci, v.1, n.2, Dec, p.113-9. 2000.
114. Younger, E. M. e M. W. Chapman. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma, v.3, n.3, p.192-5. 1989.
115. Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell, v.13, n.12, Dec, p.4279-95. 2002.

ANEXO CAPÍTULO I. VIII.1 - O ARTIGO 5º DA LEI Nº 11.105, DE 2005

É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I – sejam embriões inviáveis; ou

II – sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

§ 1º Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

§ 2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

§ 3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei no 9.434, de 4 de fevereiro de 1997.

ESTUDO: “Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas”

Nomedata de nasc ____/____/____
Endereço.....n.....Complemento.....
Cidade.....UF.....CEP.....Tel(.....).....

Eu _____, RG _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, seja voluntário do estudo “Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas”, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

I) O (A) menor acima citado tem necessidade da realização do tratamento odontológico estabelecido pelo dentista (extração dentária ou tratamento endodôntico) e que desta forma a polpa de seu dente será descartada; portanto, autorizo a utilização desta polpa dentária para obtenção de células tronco. O estudo destas células será importante para esclarecer a causa das doenças genéticas em estudo.

II) Serão coletados 10 ml. de sangue ou esfregaços de mucosa bucal com uso de escova dental unitufo para obtenção de material genético. Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a) e não causará nenhum problema.

III) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

IV) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento odontológico;

V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;

VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VII) Concordo que as amostras de DNA e as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas no Centro de Estudos do Genoma Humano, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno e que sejam utilizadas em futuras pesquisas relacionadas a doença presente em minha família.

São Paulo, de de 2005

() Paciente / () Responsável

Responsáveis pelo Projeto: _____
Cirurgiã dentista Me.Daniela Franco Bueno CRO 56528 tel:3091-9910

Prof Dra Maria Rita Passos Bueno Tel: 3091-9910

ANEXO II.B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

ESTUDO: Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas de pacientes com fissuras lábio-palatinas

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Nomedata de nasc ____/____/____
Endereço.....n.....Complemento.....
Cidade.....UF.....CEP.....Tel(.....).....

Eu , RG , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____/____/____ , participe do estudo “Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas de pacientes com doenças genéticas”; esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O (A) menor acima citado(a) tem necessidade da realização de cirurgia corretiva de lábio e palato conforme estabelecido pelo cirurgião plástico e equipe e que durante o protocolo serão descartados pequenos fragmentos do lábio; portanto, autorizo que seja verificada a possibilidade de se obter células tronco a partir destes fragmentos. O estabelecimento destas linhagens celulares poderá consistir no futuro em uma importante ferramenta para terapia celular de doenças genéticas com FL/Ps ou outras malformações craniofaciais.
- II) Serão coletados 10 ml. de sangue ou esfregaços de mucosa bucal com uso de escova dental unitufo para obtenção de material genético.
- III) Essas coletas serão feitas apenas para este protocolo de pesquisa e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho(a); e os procedimentos acima listados não conferem risco ao paciente.
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento;
- V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;
- VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VII) Concordo que as amostras de DNA e as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas sob a responsabilidade do Instituto de Biociências, USP, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno.

São Paulo, de de 200

Responsável

Responsáveis pelo Projeto: _____
Me.Daniela Franco Bueno CRO 56528 tel:3091-9910

Prof Dra Maria Rita Passos Bueno Tel: 3091-9910

Anexo ILB - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(maiores de 18 anos)

ESTUDO: Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas de pacientes com fissuras lábio-palatinas

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Nomedata de nasc ____/____/____
Endereço.....n.....Complemento.....
Cidade.....UF.....CEP.....Tel(.....).....

Eu , RG nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo “Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas de pacientes com fissuras lábio-palatinas”; esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) Tenho necessidade da realização de cirurgia corretiva de lábio e palato conforme estabelecido pelo cirurgião plástico e equipe e que durante o protocolo serão descartados pequenos fragmentos do lábio; portanto, autorizo que seja verificada a possibilidade de se obter células tronco a partir destes fragmentos. O estabelecimento destas linhagens celulares poderá consistir no futuro em uma importante ferramenta para terapia celular de doenças genéticas com FL/Ps ou outras malformações craniofaciais.
- II) Serão coletados 10 ml. de sangue ou esfregaços de mucosa bucal com uso de escova dental unitufo para obtenção de material genético.
- III) Essas coletas serão feitas apenas para este protocolo de pesquisa e em nada influenciarão o meu tratamento; os procedimentos acima listados não conferem risco.
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, não interferindo no atendimento ou tratamento;
- V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que o meu nome não seja mencionado;
- VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VII) Concordo que as amostras de DNA e as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas sob a responsabilidade do Instituto de Biociências, USP, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno.

São Paulo, de de 200

Responsável

Responsáveis pelo Projeto: _____
Me.Daniela Franco Bueno CRO 56528 tel:3091-9910

Prof Dra Maria Rita Passos Bueno Tel: 3091-9910

ANEXO II.C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: “Estabelecimento de linhagens de células tronco adultas”

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Nome:..... Data de Nasc. ____/____/____

RG..... CPF.....

Profissão.....

Endereço.....No.....Complemento.....

Cidade UF CEP Tel (.....)

Eu,, portador da Cédula de identidade, RG, e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em ____ / ____ / ____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Estabelecimento de linhagens de célula tronco adultas”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) A gordura retirada após minha cirurgia de lipoaspiração será descartada; portanto, autorizo a utilização desta gordura para obtenção de células tronco .
- II) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- III) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim e nem interferirá no meu tratamento estético.
- IV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meu nome não seja mencionado.
- V) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VII) Concordo que as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas no Centro de Estudos do Genoma Humano, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno e que sejam utilizadas em futuras pesquisas.

São Paulo, de de 200

() Paciente / () Responsável

Responsáveis pelo Projeto:

Cirurgiã dentista: Daniela Franco Bueno CRO 56528 Tel:3091-9910

Prof Dra Maria Rita Passos Bueno Tel:3091-9910