



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**EVOLUTIVA**

**Caracterização e diferenciação neural**  
***in vitro* de células-tronco de polpa de**  
**dente decíduo humano**

**Karla de Oliveira Pelegrino**

São Paulo-SP

2009

**Karla de Oliveira Pelegrino**

**Caracterização e diferenciação neural  
*in vitro* de células-tronco de polpa de  
dente decíduo humano**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Bociências da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências, na área de Biologia/Genética

Orientadora: Prof. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

São Paulo, Junho de 2009

Pelegrino, Karla de Oliveira

**Caracterização e diferenciação neural *in vitro* de células-tronco de polpa de dente decíduo humano/** Karla de Oliveira Pelegrino; orientadora Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi.

São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Área de concentração: Biologia/Genética

Descritores: Células-tronco de polpa de dente decíduo; caracterização; diferenciação neural; efeito terapêutico

*A minha família, com amor e carinho*

*“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas.”*

*João Guimarães Rosa*

## AGRADECIMENTOS

---

À professora Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi, pelo acolhimento em seu laboratório, pela confiança em mim depositada na realização desse projeto e pela valiosa orientação, que certamente ultrapassou aquilo que se pode ensinar numa bancada.

A toda equipe do laboratório: Ana Cláudia, Bruno, Cynthia, Érica, Fabiano, Fernanda, Gustavo, Joana e Raquel. Em particular, gostaria de agradecer a Ana (Anita) Fraga pela ajuda no cultivo de células-tronco embrionárias humanas e pelos tantos momentos partilhados.

A prof. Dra. Irina Kerkis, pela ajuda inicial no cultivo de células-tronco de polpa de dente decíduo. A Dra, Silvia Nadaline, pelo fornecimento das polpas de dente decíduo utilizadas neste trabalho. A prof. Dra. Luciana Haddad, pelos anticorpos, pela atenção e pelas inúmeras e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Stevens Rehen, pela colaboração nos experimentos envolvendo co-cultura com células-tronco embrionárias humanas. A toda a equipe do LANDIC, que muito bem me recebeu e, em especial, ao doutorando Daniel Cadilhe. Também agradeço à Dra. Tânia Spohr, pela recepção no Rio, pela amizade e pelos comentários valiosos.

A Dra. Luciana Marti, do Hospital Albert Einstein, pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo e por todas as discussões sobre células-tronco mesenquimais.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Cassola e ao doutorando João Luís Souza, pelos experimentos de eletrofisiologia e por toda a discussão pertinente e de inestimável valor, meu muito obrigado. Ao prof. Dr. Paulo Otto, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao prof. Dr. Gilberto Xavier, pelos ensaios *in vivo*, pela atenção e pela amizade. Ao doutorando Vinícius Bassaneze, do Incor, pelo auxílio com os experimentos de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*.

As equipes dos laboratórios das professoras Dra. Ângela Morgante, Dra Regina Mingroni Netto e do Centro de Estudos do Genoma Humano.

A toda equipe do departamento de Genética e Biologia Evolutiva, técnicos, secretárias e docentes, por toda a assistência indispensável à conclusão desse projeto.

A minha família, pelo apoio irrestrito, pelo amor e por me ensinarem que o valor da vida reside nas pessoas que temos ao lado. Ao Rafael, meu amigo, meu companheiro, meu cúmplice, por me tornar uma pessoa melhor e mais feliz.

Agradecimento especial à mestrandia Jéssica Camargo por todas as discussões referentes a esse projeto, pelo apoio inestimável e pela amizade que perpassa o tempo, à distância e as atribulações. Agradeço a Jenifer Lopes, com quem dividi a casa e a vida, pelos tantos momentos inesquecíveis e pela amizade. Agradeço também ao pessoal

da casa da tia Marina, pela acolhida, pela amizade e por ter tornado minha estadia em São Paulo mais alegre.

Aos meus amigos de Minas Gerais e de São Paulo, que não poderei nomear individualmente. Obrigado por fazerem parte da minha vida e pelo apoio, essencial na realização desse projeto.

Esse projeto teve o apoio financeiro da FAPESP.



# SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Células-tronco: definição e origens.....	2
1.2 Células-tronco de polpa de dente decíduo.....	3
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Obtenção e cultivo de IDPSCs .....	11
3.1.1 Extração de IDPSCs.....	11
3.1.2 Cultura de IDPSCs.....	12
3.2 Cultura de CTEs.....	13
3.2.1 Cultura de células de fibroblasto para uso como <i>feeder</i> .....	14
3.3 Caracterização da origem das IDPSCs por citometria de fluxo....	14
3.4 Cariótipo.....	16
3.5 Detecção de marcadores comuns a CTEs.....	16
3.5.1 Marcadores de superfície.....	16
3.5.2 Imunofluorescência para detecção de OCT-4.....	17
3.5.3 Detecção de genes comumente expresso em CTEs.....	18
3.5.3a Extração de RNA.....	18
3.5.3b Transcrição reversa.....	18
3.5.3c Reação da polimerização em cadeia (PCR).....	18
3.6 Diferenciação adipogênica <i>in vitro</i> .....	21

3.7	Diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> .....	22
3.8	Diferenciação neural <i>in vitro</i> .....	22
3.8.1	Diferenciação neural espontânea.....	22
3.8.2	Diferenciação neural induzida com ácido retinóico.....	23
3.8.3	Diferenciação neural induzida com FGF- 2 e dbcAMP .....	24
3.9	Detecção de marcadores de linhagem neural.....	24
3.10	Medidas de eletrofisiologia.....	26
3.11	Indução da diferenciação neural de CTEs <i>in vitro</i> .....	27
3.12	Ensaio de co-cultura em poços separados por membrana.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Isolamento e cultura de IDPSC .....	30
4.2	Confirmação da origem das células.....	30
4.3	Cariótipo das IDPSCs.....	31
4.4	Detecção de marcadores comumente expressos em CTEs.....	32
4.4.1	Detecção de antígenos de superfície celular.....	32
4.4.2	Detecção de genes comumente expressos em CTEs.....	33
4.4.3	Imunofluorescência para detecção de OCT-4.....	33
4.5	Diferenciações adipogênica e osteogênica <i>in vitro</i> .....	33
4.6	Diferenciação neural <i>in vitro</i> .....	34
4.6.1	Morfologia neural.....	34
4.6.2	Detecção de marcadores neurais: IDPSCs indiferenciadas expressam marcadores neurais.....	36
4.6.3	Medidas de eletrofisiologia: IDPSCs indiferenciadas apresentam corrente para sódio e potássio e são capazes de disparar potencial de ação.....	37
4.7	Ensaio de co-cultura com CTEs humanas.....	37
5	DISCUSSÃO.....	61
5.1	Caracterização das IDPSCs.....	62
5.2	Diferenciação neural <i>in vitro</i> .....	63

5.2.1 Ser ou não ser um neurônio.....	63
5.2.2 Morfologia e marcadores.....	65
5.2.3 Avaliação da resposta funcional por medidas de eletrofisiologia.....	69
5.3 Indução da diferenciação neural de CTEs <i>in vitro</i> .....	73
6 CONCLUSÕES.....	78
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	102

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Células de polpa de dente decíduo após três semanas do início da derivação da cultura e na terceira passagem celular.....	30
<b>Figura 2:</b> Cariótipo de células-tronco de polpa de dente decíduo.....	32
<b>Figura 3:</b> PCR semi-quantitativa para genes tipicamente expressos em CTEs.....	42
<b>Figura 4:</b> Detecção protéica, por imunofluorescência, do marcador OCT-4 em IDPSC indiferenciadas.....	43
<b>Figura 5:</b> Diferenciação adipogênica.....	44
<b>Figura 6:</b> Diferenciação osteogênica.....	45
<b>Figura 7:</b> Diferenciação neural espontânea de IDPSCs .....	47
<b>Figura 8:</b> Tratamento indutor da diferenciação neural de IDPSC com RA.....	48
<b>Figura 9:</b> Diferenciação neural de CTEs humanas com RA.....	49
<b>Figura 10:</b> Tratamento indutor da diferenciação neural das IDPSCs com FGF-2 e dbcAMP .....	50
<b>Figura 11:</b> IDPSCs tratadas com meio indutor composto de 500µM de dbcAMP e 20ng/ml de FGF -2 por 21 dias, posteriormente tratadas com tripsina e transferidas para placa tratada com 0,1% de gelatina.....	51
<b>Figura 12:</b> Imunofluorescência usando marcadores neurais βIII-TUBULINA e NESTINA para IDPSCs indiferenciadas e após tratamento com RA e CTEs humanas diferenciadas com RA.....	52
<b>Figura 13:</b> Imunofluorescência para MAP-2.....	52

<b>Figura 14:</b> Imunofluorescência usando marcadores neurais $\beta$ III-TUBULINA e GFAP para IDPSCs tratadas com dbcAMP e FGF- 2.....	53
<b>Figura 15:</b> Medidas de eletrofisiologia para as IDPSCs indiferenciadas.....	54
<b>Figura 16:</b> Medidas de eletrofisiologia para IDPSCs após tratamento com RA.....	55
<b>Figura 17:</b> Diferenciação neural de CTEs humanas induzida por IDPSCs.....	56
<b>Figura 18:</b> Meio mTESR inibe a indução da diferenciação das CTEs.....	57
<b>Figura 19:</b> Estruturas neurais organizadas em forma de rosetas expressam o marcador neural NESTINA.....	57
<b>Figura 20:</b> Imunofluorescência para detecção de marcadores neurais em CTEs diferenciadas para neurônios após co-cultura com IDPSCs.....	58
<b>Figura 21:</b> Comparação da quantidade de estruturas neurais formadas após cultivo das CTEs humanas sobre células de prepúcio humano e sobre IDPSCs.....	59
<b>Figura 22:</b> Ensaio de co-cultura usando placas Transwell.....	60

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> As seqüências dos iniciadores com suas respectivas temperaturas de anelamento .....	20
<b>Tabela 2:</b> Resultados de citometria de fluxo para caracterização da origem mesenquimal das células.....	41
<b>Tabela 3:</b> Detecção de marcadores de superfície celular de células pluripotentes em IDPSCs.....	41
<b>Tabela 4:</b> Pluripotencialidade das IDPSCs .....	46
<b>Tabela 5:</b> Diferenciação neural de célula-tronco de polpa de dente.....	67
<b>Tabela 6:</b> Atividade de canais dependentes de voltagem em MSCs indiferenciadas de diferentes origens.....	70

---

## LISTA DE ABREVIações:

---

**BSA-** Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)

**CTE:** célula-tronco embrionária

**dbcAMP:** Di-butiril AMP cíclico (*N<sup>6</sup>,2-O-Dibutyryladenosine 3, 5-cyclic monophosphate*)

**DPSC:** Célula-tronco de polpa de dente (*Dental pulp stem cell*)

**EB:** Corpos embrióides (do inglês *embryonic bodies*)

**FBS:** Soro fetal bovino

**FGF-2:** Fator de crescimento do fibroblasto tipo 2 (*Fibroblast growth factor type II*)

**IDPSC:** célula-tronco de polpa de dente decíduo imatura (*Immature dental pulp stem cell*)

**LIF:** leukemia inhibitory factor

**MSC:** Célula-tronco mesenquimal

**NGF:** Fator de crescimento do nervo (*Nerve growth factor*)

**PBS:** Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)

**RA:** Ácido retinóico (*Retinoic acid*)

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

**VGSC:** Canal de sódio dependente de voltagem (*Voltage gated sodium channel*)

**GFAP:** *Glial fibrillary acidic protein*

**NeuN:** antígeno nuclear neuronal

**NF-M:** Neurofilamento M, usado como marcador de neurônio maduro

**MAP2:** Proteína associada a microtúbulo, encontrada em neurônios

**NSE:** Enolase específica de neurônio; enzima associada com células neuronais

**SHED:** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth

**Tau:** Proteína associada ao microtúbulo, componente essencial do axônio

**$\beta$ III-TUBULINA:** Proteína do citoesqueleto reconhecida pelo anticorpo TUJ1



## RESUMO:

---

A polpa do dente contém uma população de células-tronco multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares distintas, *in vitro* e *in vivo*. Estas células possuem origem mesenquimal e, acredita-se que sejam derivadas da crista neural. Elas podem ser induzidas a se diferenciar em células de osso, cartilagem, músculo liso e esquelético. Há trabalhos também que descrevem a diferenciação neural destas células, com base principalmente em caracterizações morfológica e protéica.

Contudo, um número crescente de dados sugere que a diferenciação neural de células de origem mesenquimal, pode, na verdade, ser um artefato de cultura. Neste contexto, se torna de grande importância introduzir nos estudos medidas de eletrofisiologia que possam confirmar a identidade neural destas células.

Nosso objetivo foi isolar e caracterizar células-tronco de polpa de dente decíduo humano (IDPSC), verificando se as mesmas poderiam configurar um bom modelo para estudo da diferenciação neural *in vitro*. No presente trabalho, nós descrevemos uma população de IDPSCs indiferenciadas capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos *in vitro*.

Quando tratadas com ácido retinóico as IDPSC exibiram morfologia semelhante à de células neurais, além de apresentar expressão de proteínas neurais e disparar potencial de ação. Porém, curiosamente, as células sem tratamento também expressam esses marcadores e apresentam resposta eletrofisiológica, limitando a interpretação acerca do valor que o tratamento

teria na promoção da diferenciação neural e, conseqüentemente, restringindo a utilização das mesmas como modelo de estudo da diferenciação neural *in vitro*.

Apesar de a questão acerca da capacidade das IDPSCs em se diferenciar para neurônios permanecer não respondida, as IDPSCs foram capazes de direcionar a diferenciação neural de células-tronco embrionárias em ensaios de co-cultura. Estes resultados reforçam trabalhos prévios que mostram que as células-tronco de polpa de dente podem ser boas candidatas para terapia celular.

Palavras-chave: Células-tronco de polpa de dente decíduo; caracterização; diferenciação neural

## ABSTRACT:

---

Post-natal stem cells have been isolated from a multiple source of tissues, as bone marrow, brain, skin, hair follicle and muscle. Many works have shown that these cells exhibit plasticity higher than the first believed and are able to transdifferentiate into cells from other germ layer origin.

From dental pulp tissue is possible to isolate a population of multipotent stem cell which have mesenchymal origin and are supposed to be derived from neural crest. They can be induced to differentiate into mesodermal cell types, like chondrocyte, osteocyte and adipocyte. It has been also reported that they are able to transdifferentiate into neural cells.

However, increasing data suggests that neural transdifferentiation of cells from mesenchymal origin, actually, may be an artifact of culture, due to cellular stress, for example. In front of this, it becomes of great importance to show that the expected differentiated cells exhibit functional responses, by the investigation of electrophysiological properties.

Here we describe a population of undifferentiated human dental pulp stem cell that can be induced to differentiate into adipocytes and osteocytes *in vitro*. When treated with retinoic acid they showed neural cell like morphology, expressed neural markers and were able to fire action potentials. However, curiously, undifferentiated cells also exhibited the same responses, limiting the interpretation of neural treatment effect and, therefore, restricting the use of IDPSCs as a model for neural differentiation *in vitro*.

Although the question of whether or not DPSC are able to become a neuron remains unsolved, these cells were able to direct neural

differentiation of embryonic stem cells in co-culture assays. These findings in conjunction with previous works which shows DPSCs can exercise neuroprotective and neurotrophic effects indicate they may be a feasible candidate for cellular therapy.

**Keywords:** Dental pulp stem cells; characterization; neural differentiation

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Células-tronco: definição e origens

Células-tronco são células indiferenciadas, que não possuem ainda as características específicas de células de um tecido maduro, sendo dotadas de grande capacidade de auto-renovação e diferenciação para múltiplas linhagens quando estimuladas corretamente (Barry, 2003; Hoffman e Carpenter, 2006).

Elas podem ser classificadas em três tipos: embrionárias, germinativas ou somáticas. Células-tronco embrionárias, por exemplo, são encontradas na massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto (Thomson *et al.*, 1998), enquanto células-tronco somáticas são encontradas em tecidos já desenvolvidos do feto, ou do recém nascido, juvenil ou adulto (Serakinci E Keith, 2006; Geuna *et al.*, 2001). Já as células-tronco germinativas vão dar origem aos gametas (Johnson *et al.*, 2003).

Outra forma de caracterização de tais células é pelo seu potencial de dar origem a um ou mais tipos de progênie especializada (Krabbe *et al.*, 2005). As células-tronco podem apresentar estados diferentes de potencialidade, incluindo a totipotencialidade do zigoto, a pluripotencialidade de uma célula-tronco embrionária, a multipotencialidade de células-tronco fetais ou de tecido adulto e a unipotencialidade de um tipo celular específico, como das células-tronco da epiderme (Krabbe, 2005; Serakinci e Keith, 2006).

Células-tronco adultas estão presentes na maioria dos tecidos, sendo responsáveis pela reposição das células destes ao longo de toda vida. Elas se dividem promovendo a manutenção de seu número, ao mesmo tempo em que dão origem a células comprometidas em se diferenciar em células de tecidos e órgãos específicos (Serakinci e Keith, 2006). Células-tronco adultas já foram isoladas de várias fontes, incluindo sistema nervoso central, medula óssea, tecido neural, pele, retina e polpa dental (Harada *et al.*, 1999; Fuchs e Segre, 2000; Bianco *et al.*, 2001; Blau *et al.*, 2001; Gronthos *et al.*, 2000, Gronthos *et al.*, 2002).

Acreditava-se que estes tipos celulares se diferenciavam preferencialmente para células maduras do tecido do qual se originaram, por estarem já determinadas a isso, não sendo capazes de gerar células derivadas de outro folheto embrionário (Wagers and Weissman, 2004). Estudos têm mostrado, entretanto, que ao menos uma pequena parcela destas pode originar células de diferentes linhagens embrionárias (Wagers and Weissman, 2004; Serakinci, 2006).

## **1.2 Células-tronco de polpa de dente decíduo:**

Recentemente observou-se que a polpa do dente contém uma população de células-tronco multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares distintas *in vitro*, como odontoblastos e adipócitos (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2007), além de serem capazes de se diferenciar para odontoblastos e direcionar a formação de um complexo

semelhante à dentina quando transplantadas para camundongos imunocomprometidos (Gronthos *et al.*, 2002).

Gronthos e colaboradores (2000) foram os primeiros a isolar e expandir células progenitoras odontogênicas de uma população de polpa de dente humano *in vitro* de adultos entre 19 e 29 anos, verificando que elas eram capazes de autorenovação e diferenciação, *in vitro* e *in vivo*, designando-as de DPSC (do inglês *Dental Pulp Stem Cell*- células-tronco de polpa de dente de leite). Trabalhos prévios já tinham sido conduzidos com relação ao potencial odontogênico das células de polpa (Couple *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 1995; Kuo *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1992), sem, contudo se chegar a uma população de células tronco.

Também se verificou que tais células mantinham uma alta taxa de proliferação mesmo após subcultura extensiva e que compartilhavam diversos marcadores com células derivadas da medula óssea, como CD146;  $\alpha$ -actina de músculo liso; fosfatase alcalina; colágeno tipo I, osteonectina; osteopontina; osteocalcina; colágeno tipo III e fator de crescimento do fibroblasto II. Não houve detecção de marcadores hematopoéticos (CD14; CD45; CD34) (Gronthos *et al.*, 2000).

Posteriormente, foram realizados experimentos com células-tronco provenientes da polpa de dente decíduo humano esfoliado, obtidos de crianças de seis a dez anos, sendo tais células designadas SHED (*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) (Miura *et al.*, 2003). Segundo os autores deste trabalho, há diferenças significantes entre a biologia de dentes decíduos daqueles permanentes, utilizados nos trabalhos anteriores (Gronthos *et al.*, 2000 e Gronthos *et al.*, 2002), que estão refletidas no cultivo



de células de polpa do dente provenientes destas duas fontes. Eles defendem que as SHED aparentemente representam uma população de células multipotentes que se encontram num estágio de maior imaturidade que aquele verificado para as DPSCs.

Ambas as linhagens, DPSC e SHED, expressam marcadores de células neurais (Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003), o que pode estar relacionado à origem mesenquimal, derivada da crista neural, que se acredita que tais células possuam. A crista neural tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, originando uma variedade de tipos celulares, como células neurais, pigmentares, de músculo liso, tecido cartilaginoso craniofacial e osso (LaBonne e Bronner-Fraser, 1999; Erickson e Reedy, 1998). Em um trabalho recente, Sophie Thomas e colaboradores (2008) isolaram células de crista neural de embriões humanos e verificaram que as mesmas apresentam morfologia semelhante à de fibroblasto, o que também se verifica para as células-tronco da polpa, e que apresentam marcadores de células-tronco embrionárias.

Mais recentemente, Kerkis e colaboradores (2007) conseguiram isolar uma população de células-tronco derivadas da polpa de dente decíduo que expressam os marcadores OCT4, SSEA-3; SSEA-4; bem como os marcadores de células-tronco mesenquimais SH-2, SH-3 e SH-4 (Benvenuti *et al.*, 2006; Krabbe *et al.*, 2005). Os autores deste trabalho argumentam que a diferença de pureza da população encontrada entre as SHED e estas células, e o grau de maturidade que as duas linhagens apresentam leva-os a acreditar que não se trata das mesmas células. Esta nova população de células foi designada IDPSC (*Immature Dental Pulp Stem Cell*). As IDPSCs

são capazes de se diferenciar *in vitro* para cartilagem, músculo liso e esquelético e osso quando devidamente estimuladas (Kerkis *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos investigaram a capacidade destas células em se diferenciar em células neurais (Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2007; Arthur *et al.*, 2008). Porém, na maioria destes a caracterização das células após tratamento indutor foi feita com base na morfologia e expressão de proteínas neurais, assim como a maioria dos trabalhos envolvidos na diferenciação neural de células tronco mesenquimais (Raff, 2003).

Contudo, um número crescente de dados sugere que a transdiferenciação de células de origem mesenquimal pode, na verdade, ser um artefato de cultura, causado, por exemplo, por estresse celular e que, apesar de exibirem morfologia e proteínas típicas do trato neural, a transformação celular não ocorreu de fato (Bertani *et al.*, 2005; Croft e Przyborsky, 2006). Nesse contexto, tornam-se necessários experimentos adicionais que possam esclarecer a identidade das células supostamente diferenciadas para o trato neural, como os experimentos de eletrofisiologia celular.

Neste trabalho nós descrevemos uma população de células-tronco de polpa de dente decíduo (IDPSCs) indiferenciadas que expressam genes relacionados a importantes características de células-tronco embrionárias, como *OCT-4* e *NANOG* (Pesce e Scholer, 2001; Chambers *et al.*, 2003). Contudo, nossos dados sugerem que tais marcadores não devem conferir pluripotência as IDPSCs.

Estas células foram capazes de se diferenciar para adipócitos e osteócitos *in vitro*. Não obstante, quando tratadas com ácido retinóico (RA), as IDPSCs exibiram morfologia semelhante à de células neurais, apresentaram expressão dos marcadores neurais NESTINA e  $\beta$ III-TUBULINA e foram capazes de disparar potencial de ação.

Estes resultados, entretanto, devem ser interpretados com cautela, uma vez que as células indiferenciadas também expressam tais marcadores e foram igualmente capazes de disparar potencial de ação, comprometendo a interpretação acerca da efetividade do tratamento em promover a diferenciação neural. Esses achados dificultam o emprego destas células para estudo da diferenciação neural *in vitro*, uma vez que as células indiferenciadas já apresentam características de células excitáveis.

Esses resultados, contudo, não comprometem o emprego dessas células para terapia celular. Observamos que quando cultivadas em co-cultura com células-tronco embrionárias (CTEs) humanas, as IDPSCs foram capazes de induzir a diferenciação neural destas últimas.

A capacidade neurogênica das IDPSCs vai de encontro ao observado por Huang e colaboradores (2008). Ao implantar DPSC de Rhesus indiferenciadas na região do hipocampo de camundongos os autores verificaram que tais células eram capazes de promover uma modulação do microambiente do transplante, levando à migração e maturação de células-tronco neurais endógenas. Tais resultados colocam as IDPSCs como candidatas ao uso para terapia celular, com enfoque para reparos no sistema nervoso e reforçam a necessidade de prosseguir os estudos com tais células.

# **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

A capacidade de diferenciação neural de células-tronco mesenquimais (MSCs) e, dentre elas, de células da polpa de dente decíduo, é uma área atraente, porém controversa e com vários pontos ainda não elucidados, de forma que o objetivo do presente trabalho foi estabelecer linhagens células-tronco de polpa de dente decíduo e verificar se as mesmas poderiam se configurar como um bom modelo *in vitro* de diferenciação neural.

### **2.2 Específicos:**

- I. Estabelecer a cultura de linhagens de células-tronco de polpa de dentes decíduos humanos e promover sua caracterização;
- II. Testar protocolos de indução da diferenciação neural, verificando se as células são capazes de se diferenciar, exibindo morfologia, proteínas e resposta funcional, típicas do trato neural;
- III. Verificar se as células-tronco de polpa de dente decíduo são capazes de induzir a diferenciação neural de outros tipos celulares.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1 Obtenção e cultivo de IDPSCs.**

##### **3.1.1 Extração de IDPSCs:**

Dentes decíduos de crianças de 5-6 anos foram extraídos e usados com o consentimento dos responsáveis pelos pacientes, no consultório da Dra. Silvia Nadalini e em conformidade com o Comitê de Ética em pesquisas com seres humanos, do Instituto de Biociências, USP-SP (protocolo nº026/2004).

A polpa dos dentes foi isolada gentilmente, pela remoção da parte apical do dente com bisturi, sendo posteriormente lavada duas vezes em solução salina de fosfato estéril (PBS, 0,01M, pH 7.4), suplementada com os antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/ mL).

A polpa foi então transferida sem dissociação para uma placa de petri de 35cm<sup>2</sup> de diâmetro (Corning, NY) em meio DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's Medium/ Ham's F12, 1:1; Invitrogen) suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2mM de glutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen).

A polpa foi aberta para exposição do cerne com uso de agulha de seringa hipodérmica e a placa foi mantida sem manuseio por cerca de três semanas. Decorrido este tempo, as células já haviam tomado cerca de 50% da placa e o meio foi trocado até que a confluência de 70% fosse atingida.

Conseguimos estabelecer duas linhagens, que foram denominadas PDL1 e PDL2.

Além dos objetivos iniciais, as células de polpa foram utilizadas como camada de *feeder* de células-tronco embrionárias. Para tanto, após atingirem 70% de confluência na garrafa, foram irradiadas durante 10 minutos, com uma intensidade de 40Gy , no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

### **3.1.2 Cultura de IDPSCs:**

Cerca de  $10^5$  células/ml foram semeadas em garrafas de cultura celular de  $25\text{cm}^2$  e incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  e alta umidade. A cultura foi mantida na garrafa até atingir a confluência de, no máximo, 70% para evitar a ocorrência de diferenciação. A troca de meio se deu a cada 48 horas. O meio utilizado, neste caso, apresentou a mesma composição daquele já descrito acima. Para as passagens, as células foram lavadas em PBS e tratadas com solução de tripsina/EDTA 0,05% (Invitrogen), em seguida, houve adição de meio com soro, para inativação da enzima em questão. As células foram então centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Para congelamento, após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio composto por DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 20% de FBS (Hyclone) e 10% de DMSO (Sigma) e mantidas em freezer a  $70^\circ\text{C}$  negativos ou em tanque de nitrogênio líquido.



Para descongelamento, as células foram colocadas em banho-maria à 37°C até que descongelassem, sendo em seguida transferidas para tubos previamente preparados com o meio de cultura das células indiferenciadas aquecido a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e semeadas em placas ou garrafas de cultura aderentes (Corning).

### **3.2 Cultura de CTEs:**

Para obtenção de RNA, usado como controle, e protocolos de diferenciação neural, utilizamos as CTEs humanas HuES9, de Harvard (Cowan *et al.*, 2004). As células foram mantidas em meio DMEM-Knockout suplementado com 10% de Knock-out Serum Replacement (Invitrogen); com os antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/ mL); 2mM de Gluta-MAX (Invitrogen); 0,1mM de aminoácidos não essenciais; 0,1% de β-mercaptoetanol; 10% de Plasmanate (Plasma protein fraction human- 5% USP) e 10ng/ml de FGF (Fibroblast Growth Factor- R&D System). As células permaneceram em estufa a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e alta umidade, tendo sido cultivadas sobre células de fibroblasto embrionário murino, fibroblasto humano de prepúcio ou sobre camada de células-tronco de polpa de dente decíduo irradiadas.

O meio das células foi trocado diariamente. Para passagens, as células foram removidas manualmente com o auxílio de ponteira de 200µL, sendo as colônias divididas em diversas porções.

Para congelamento, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio composto por 90% de soro fetal bovino

(Hyclone) e 10% de DMSO. Sendo então estocadas em freezer -70° C até sua transferência para tanques de nitrogênio líquido. Para descongelamento, as células foram colocadas em banho-maria a 37°C até que descongelassem, sendo em seguida transferidas para tubos previamente preparados com o meio de cultura das células indiferenciadas aquecido a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e semeadas sobre nova camada de fibroblasto.

### **3.2.1 Cultura de células de fibroblasto para uso como *feeder*:**

Foram empregadas células de fibroblasto fetal murino CF-1 (Chemicon). As células foram mantidas em meio DMEM com 15% de FBS (Hyclone), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen). O meio foi trocado a cada dois dias.

Para uso como camada de *feeder* de células-tronco embrionárias, após atingirem 70% de confluência na garrafa, os fibroblastos foram irradiados durante 10 minutos, com uma intensidade de 40Gy , no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

### **3.3 Caracterização da origem das IDPSCs por análise de citometria de fluxo:**

Para verificar a origem das IDPSCs indiferenciadas e confirmar a origem mesenquimal das mesmas, foram realizadas análises de citometria de fluxo. Cerca de 10<sup>6</sup> células/ml, na quarta passagem, foram fixadas com paraformaldeído 4% e incubadas com anticorpos primários conjugados com secundários por uma hora e 30 minutos no gelo e ausência de luz.

Posteriormente foram lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspensas em PBS para a leitura.

Os anticorpos monoclonais empregados foram: anti- HLA-DR, anti-CD14 (receptor de lipopolissacarídeo e marcador de linhagem hematopoiética)-FITC, anti-CD29 ( $\beta$ -integrina)-PE, anti-CD31 (marcador endothelial)-PE, anti-CD44 (receptor de ácido hialurônico)-PE, anti-CD73(ecto 5`nucleotidase)-PE, anti-CD90 (pertencente à família das imunoglobulinas)-APC, anti-CD 106 (pertencente à família das imunoglobulinas)-FITC, anti-CD117 (receptor de fator de crescimento)-APC, anti-CD166 (ALCAM-1- activated leucocyte cell adhesion molecule-1)-PE, , anti-HLA-DR (Molécula do complexo principal de histocompatibilidade, da classe II) (conjugado com PercPC ) da BD Pharmigen; anti-IgG1 (conjugado com PercP), anti-CD34 (antígeno de célula progenitora hematopoiética)-PE, anti-CD45 (antígeno comum de leucócito)-PerCP da BD Biosciences; anti-CD133 da Milteny Biotec; anti-CD105 (receptor de TGF  $\beta$  tipo III)-PE (Chemicon) e anti-mouse conjugado com FITC (Chemicon). Para controle negativo foram empregados anticorpos anti-IgG1 (conjugado com FITC), anti-IgG1 (conjugado com APC) e anti-IgG1 (conjugado com PE), anti-IgG2a (conjugado com FITC).

As análises foram realizadas com o equipamento FACSAria (Fluorescence-Activated Cell Sorter) e BD FACSDiva software no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, juntamente com a pesquisadora Dra. Luciana Marti. Ao menos 30.000 eventos foram analisados para cada marcação.

### **3.4 Cariótipo das IDPSCs:**

Para este experimento as células utilizadas (PDL1 e PDL2) estavam na décima segunda passagem. Cerca de  $4 \times 10^5$  células/mL foram tratadas com  $10^{-6}$ M de colchicina adicionada ao meio de cultura das células indiferenciadas, por cerca de uma hora. Decorrido este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen) e em seguida, houve a adição de solução de tripsina/EDTA 0,05% (Invitrogen).

As células foram coletadas, submetidas à centrifugação a 1000 rotações por minuto, no tempo de 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes em solução de KCl 0,075M. Posteriormente, houve adição de fixador (solução composta por ácido acético e metanol numa proporção de 3:1). Novamente as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 500µL de solução fixadora e algumas gotas dessa solução foram semeadas em lamínas umedecidas com água.

Após secagem, as lamínas foram coradas com solução de Giemsa. As imagens foram obtidas com um microscópio Axioplan Axiophot 2 (Zeiss) e analisadas com o programa Ikaros, Karyotyping System no laboratório da professora Dra. Ângela Morgante (Depto. de Genética e Biologia Evolutiva-IB-USP).

### **3.5 Detecção de marcadores comuns a CTEs**

#### **3.5.1 Marcadores de superfície**

Para a análise de marcadores relacionados à pluripotencialidade celular, empregamos os anticorpos para TRA-1-60; TRA-1-81; SSEA-4 e SSEA-1 (Chemicon, diluição 1:30). O protocolo do experimento de citometria de fluxo foi o mesmo já descrito acima. As células se encontravam na oitava passagem.

As análises foram realizadas com o equipamento FACSAria (Fluorescence-Activated Cell Sorter) e BD FACSDiva software no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, juntamente com a pesquisadora Dra. Luciana Marti. Ao menos 10.000 eventos foram analisados para cada marcação.

### **3.5.2 Imunofluorescência para detecção de OCT-4**

As IDPSCs indiferenciadas foram semeadas em lamínulas de 13mm de diâmetro (Knittel) e fixadas em solução de 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose, pH 7,2., por 10 minutos. Foram então lavadas duas vezes em PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Sigma) por 5 minutos. Após bloqueio por trinta minutos com 3% de BSA (Sigma), houve incubação com anticorpo primário para OCT-4 (Chemicon) por uma hora a temperatura ambiente (diluição 1:30), seguida de três lavagens em PBS e adição do anticorpo secundário (diluição de 1:200), conjugado com Cy3 (Sigma), durante 30 minutos. Após lavagem com PBS, as células foram montadas em solução de Vectashield. As imagens de imunofluorescência foram obtidas com um microscópio Axioplan- Axiophot 2 (Zeiss) e analisadas com o programa Isis 3 (Meta Systems- *in situ* imaging system), no laboratório da

professora Dra. Ângela Morgante (Depto. de Genética e Biologia Evolutiva-IB-USP).

### **3.5.3 Detecção de genes comumente expressos em CTEs**

#### **3.5.3 a Extração de RNA:**

O RNA de células de polpa de dente decíduo e de CTEs humanas indiferenciadas foi extraído com emprego do kit RNeasy mini kit (Qiagen) e isolado conforme o protocolo do fabricante, ou com o emprego do reagente TRIzol (Invitrogen). Como alguns dos iniciadores empregados estão numa mesma região exônica, fizemos tratamento com DNase I Rnase free (Ambion) para impedir a amplificação de fragmentos de DNA que eventualmente pudessem contaminar a amostra.

#### **3.5.3 b Transcrição reversa:**

Para transcrição reversa foi utilizado 1µg de RNA, 200U/µL de M-MLV (Invitrogen); 50ng de Randon primers (Invitrogen); 10mM de dNTP (Invitrogen); 40U/µL de Rnase out (Invitrogen); 4 µl tampão First Strand 5X (Invitrogen); 1 µL DTT 0,1M (Invitrogen) para um total de 20µl de reação.

#### **3.5.3 c Reação da polimerização em cadeia (PCR):**

Para 10uL de reação empregamos 1X PCR buffer 10X (Invitrogen), 0,5U da enzima Taq polimerase (Invitrogen), 25- 100ng de cDNA, 5pmol de cada iniciador, 1mM de dNTP.

A ciclagem para amplificação foi de 94°C por 3 minutos, seguida de ciclos de 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para

cada dupla de iniciadores por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Ao fim destes ciclos, a temperatura permaneceu em 72°C, por 5 minutos. O número de ciclos foi estabelecido por PCR semi-quantitativo para cada um dos pares de iniciadores empregados. As seqüências dos iniciadores com suas respectivas temperaturas de anelamento se encontram na tabela 1.

Os iniciadores ao lado dos quais está escrito Yamanaka, foram retirados do trabalho de Yamanaka *et al.*, 2007. A inscrição T60 indica que reação de *Touch-down* com temperatura de anelamento diminuindo a partir de 65°C (14 ciclos) até atingir 60°C, permanecendo nesta temperatura até o restante da ciclagem.

Após o término da reação, os tubos foram mantidos a 4°C até a aplicação das amostras em gel de agarose 1%. Para visualização, o gel foi banhado em solução de brometo de etídio.

Tabela 1: As sequências dos iniciadores com suas respectivas temperaturas de anelamento

<b>Iniciador</b>	<b>Sentido (5'-3')</b>	<b>Anti-sentido (5'-3')</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
OCT-4 (Yamanaka)	CAC CAT GGC GGG ACA CCT GGC TTC AG	ACC TCA GTT TGA ATG CAT GGG AGA GC	68
C-MYC (Yamanaka)	CAC CAT GCC CCT CAA CGT TAG CTT CAC CAA	TCA CGC ACA AGA GTT CCG TAG CTG TTC AAG	69
LIN 28	ATG GGC TCC GTG TCC AAC	ATT GTG GCT CAA TTC TGT GC	T 60
NANOG	ACT AAC ATG AGT GTG GAT CCA GC	TCA GTT TCA CTC ATC TTC ACA CG	T60



### 3.6 Diferenciação adipogênica *in vitro*:

Foram semeadas cerca  $2,5 \times 10^4$  células numa placa de seis poços tratada para adesão. Dois meios de cultura foram testados. O primeiro meio indutor testado (meio A) era composto por DMEM Low glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultlab); 0,5mM de IBMX (isobutyl-methylxantina) (Sigma); 1 $\mu$ M de dexametasona (Sigma); 10 $\mu$ M de insulina (Sigma); 200 $\mu$ M de indometacina (Sigma); 100U/mL de penicilina; 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina (Invitrogen), e 5 $\mu$ M de rosiglitazone. Esse último foi obtido a partir do medicamento Avandia. O comprimido foi triturado e diluído em etanol 100%.

O segundo meio indutor utilizado (meio B) era composto DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultlab), 0,5 mM de IBMX (isobutilmetilxantina), 0,5  $\mu$ M de hidrocortisona e 60  $\mu$ M de indometacina (Sigma), 100U/mL de penicilina e 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina (Gibco).

A troca de meio se deu a cada 4 dias. Após cerca de 21 dias em cultura, as células foram fixadas por 20 minutos com uma solução composta de 4% paraformaldeído (Sigma) e 4% de sacarose em solução salina de fosfato (PBS), com o PH ajustado para 7,2.

Em seguida foi adicionada solução de óleo vermelho (Oil red-Sigma) por 5 minutos e a placa foi lavada com água destilada diversas vezes (cerca de sete vezes) para remoção do excesso de corante. As imagens foram adquiridas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F.

### **3.7 Diferenciação osteogênica *in vitro*:**

Cerca de  $5 \times 10^4$  células/mL foram semeadas em placas petri de 35mm tratadas para adesão. O meio de diferenciação era composto por DMEM Hi ou Low glicose (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone);  $0,1 \mu\text{M}$  de dexametasona;  $50 \mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico e  $10\text{mM}$  de  $\beta$ -glicerofosfato. As células foram mantidas nesse meio por até 60 dias. O meio foi trocado a cada 4 dias.

Para revelação as células foram fixadas em 4% paraformaldeído (Sigma) e 4% de sacarose em PBS, com o Ph ajustado para 7,2; e em seguida coradas com 2% de Alizarina Vermelha (Alizarin red-Sigma) em água miliQ. Para retirar o excesso de corante, as células foram lavadas diversas vezes. As imagens foram adquiridas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F.

### **3.8 Diferenciação neural *in vitro*:**

**3.8.1 Diferenciação neural espontânea:** após as células terem atingido 70% da confluência da garrafa, houve substituição do meio DMEM/F12 por DMEM Knock-Out /20% KSR (Knock-out Serum Replacement, Invitrogen) e a cultura foi mantida nessas condições por sete dias. Após isso, as células foram dissociadas em solução de tripsina/EDTA 0,05% (Invitrogen) e transferidas para placas de Petri de  $35\text{cm}^2$ , em meio Neurobasal suplementado com B27 para que se desse a diferenciação neural, conforme protocolo descrito por Kerkis *et al.*, 2007. As células foram mantidas nestas condições por até 60 dias.

### **3.8.2 Diferenciação neural induzida com ácido retinóico (RA):**

Cerca de  $10^5$  células/ml foram semeadas em placas de petri de 35mm recobertas com agarose 0,6%, para evitar a adesão celular, em meio neurobasal suplementado com B27 e 100U/mL de penicilina e 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina (Gibco), 2mM de glutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais. Após 48 horas, houve a formação de agregados celulares em forma de esfera. Nesse estágio houve adição de  $10^{-7}$ M de RA (Sigma) e as células permaneceram mais dois dias nestas condições. Essas estruturas foram então transferidas para placas de seis poços recobertas com 0,1% de gelatina tipo A (gelatina de pele de porco-Sigma) na presença de meio cuja composição está descrita acima, porém sem RA. As células foram mantidas por até seis semanas nessas condições.

As células indiferenciadas e tratadas foram então encaminhadas para experimentos de imunofluorescência, com anticorpos específicos para NESTINA e BIII-TUBULINA. As células tratadas também foram marcadas com o anticorpo MAP-2 ab, específico para neurônios maduros (Sigma). Além disso, foram feitas medidas de eletrofisiologia comparativas entre as células indiferenciadas e diferenciadas. As imagens de campo claro foram obtidas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F. Quanto às imagens de imunofluorescência, os detalhes da obtenção estão descritos no tópico ***Imunofluorescência, em Material e Métodos.***

Para diferenciação neural das CTEs, usadas como controle deste experimento, as colônias foram cortadas manualmente com uso de agulha de seringa hipodérmica. Posteriormente, os pedaços foram transferidos para placas de petri de 35mm recobertas com agarose 0,6% e o restante da diferenciação se completou conforme o descrito acima para as IDPSCs.

### **3.8.3 Diferenciação neural induzida com FGF- 2 e dibutilil AMP cíclico (dbcAMP):**

Cerca de  $5 \times 10^4$  células/ml foram semeadas em placas de petri de 35 mm tratadas para adesão, houve então a adição de meio neurobasal suplementado com 20ng/ml de FGF-2 (RD systems) e 500  $\mu$ M de dibutilil AMP cíclico ( $N^6,2'$ -O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt - Sigma). O meio foi trocado a cada quatro dias. Ao final de um mês as células foram fixadas e marcadas com anticorpos para NESTINA, e  $\beta$ III- TUBULINA e GFAP.

As imagens foram obtidas com um microscópio Axioplan -Axiophot 2 (Zeiss) e analisadas com o programa Isis 3 (Meta Systems- *in situ imaging system*) no laboratório da professora Dra. Ângela Morgante (Depto. de Genética e Biologia Evolutiva- IB-USP). Os detalhes do protocolo utilizado estão descritos no tópico *Imunofluorescência*, em Material e Métodos.

### **3.9 Detecção de marcadores de linhagem neural:**

O protocolo para imunofluorescência para células tratadas com adição de FGF2 e dbcAMP foi realizado conforme se segue:

Células IDPSCs indiferenciadas e após tratamento foram semeadas em lamínulas de 13mm de diâmetro (Knittel) e fixadas em solução de 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose, pH 7,2, por 10 minutos. Foram então lavadas três vezes em PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Sigma) por 5 minutos.

Após bloqueio por uma hora com 3% de Albumina de Soro Bovino (BSA-Sigma), houve incubação com anticorpo primário por duas horas, a temperatura

ambiente em solução de BSA 0,1%, seguida de três lavagens em PBS e adição do anticorpo secundário (Cy3, Amersham; diluição de 1:200), por uma hora a temperatura ambiente. Subseqüentemente, as laminas foram lavadas em PBS e montadas em solução de Vectashield (Vector labs). Os anticorpos monoclonais para humano utilizados foram para NESTINA, BIII-TUBULINA (TUJ1) e GFAP (diluição 1:200), da Sigma.

As imagens de imunofluorescência foram obtidas com um microscópio Axioplan -Axiophot 2 (Zeiss) e analisadas com o programa Isis 3 (Meta Systems- *in situ* imaging system), no laboratório da professora Dra. Ângela Morgante (Depto. de Genética e Biologia Evolutiva- IB-USP).

Quanto à imunofluorescência realizada para experimentos de diferenciação celular com RA, o protocolo empregado foi o que se segue abaixo:

Células de polpa de dente decíduo indiferenciadas e diferenciadas foram semeadas em lamínulas de 13mm de diâmetro (Knittel) e fixadas em solução de 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose, pH 7,2., por 10 minutos. Foram então lavadas três vezes em PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Sigma) por 5 minutos.

Após bloqueio por uma hora com 5% de Albumina de Soro Bovino (BSA- Sigma), houve incubação com anticorpo primário *over night* a temperatura ambiente em solução de BSA 0,1%, seguida de três lavagens em PBS e adição do anticorpo secundário (diluição de 1:200), conjugado com Alexa Red (Molecular Probes, Eugene, OR), durante duas horas. Após lavagem com PBS, as células foram marcadas com DAPI e montadas em solução de Tissue Tek (Sakura Finetek Europe). Os anticorpos primários utilizados foram contra MAP-2ab (Sigma, St. Louis;

1:200); NESTINA (Chemicon, mouse IgG, 1:100) e BIII-TUBULINA (Sigma, St. Louis, MO; mouse IgG2b, 1:200). As imagens foram obtidas por meio de um microscópio de fluorescência Nikon, Eclipse T300.

### **3.10 Medidas de eletrofisiologia:**

Para este experimento, IDPSCs indiferenciadas na nona passagem e células na terceira semana de tratamento indutor da diferenciação neural com RA foram utilizadas. As medidas foram realizadas pela técnica de *patch clamp*, na configuração *whole cell*, modo *voltage clamp*, a temperatura ambiente. Este procedimento permite que se varie rapidamente o potencial de membrana, mantendo-o em um valor programado no tempo enquanto se medem as correntes que passam pelas populações de canais iônicos disponíveis na membrana.

As micropipetas empregadas foram construídas a partir de capilares de borosilicato (vidro 7051, Garner Glass Co.) e apresentavam resistência de ponta entre 1,5 e 3M $\Omega$  quando preenchidas com a solução intracelular e mergulhadas na solução extracelular. A solução da micropipeta continha 10mM de NaCl; 2mM de ATP; 4,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 9mM de EGTA; 150mM de KCl e 10mM de HEPES e a solução do banho era composta por 132mM de NaCl; 1,2mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,8mM de CaCl<sub>2</sub>; 4mM de KCl; 10mM de HEPES e 5mM de glicose. As soluções empregadas não nos permitiram isolar as correntes de sódio e potássio, foram feitas medidas de corrente total das células. O protocolo consistiu em 50ms de passos despolarizantes com incrementos de 5mV, partindo de uma fixação de voltagem de -100mV.

Para as medidas um amplificador Axopatch 200B e o programa pClamp, v. 10.1, (Axon Instruments Inc) foram utilizados. Uma interface AD/DA – modelo 1322

de 16 bits, também da Axon Instruments Inc, converteu o sinal analógico em digital e vice-versa, fazendo a comunicação entre o amplificador e computador.

### **3.11 Indução da diferenciação neural de CTEs *in vitro*:**

Para uso como *feeder*, IDPSCs indiferenciadas e células de fibroblasto murino foram tratadas com 40Gy de radiação, para impedir a divisão celular. O procedimento de radiação foi realizado no Centro de Tecnologia das Radiações-IPEN. Posteriormente, cerca de  $5 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de petri de 35mm tratadas com 0,1% de gelatina em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 15% de FBS (Hyclone), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2mM de glutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais. Após a adesão, o meio foi trocado por meio de cultivo de células-tronco embrionárias, cuja composição esta descrita acima, no tópico “**Cultura de CTEs**”

Para a diferenciação neural, colônias de CTEs humanas Hues9 foram transferidas para as camadas de *feeder* previamente preparadas em meio de cultivo de CTEs. O meio foi trocado diariamente e as células permaneceram nestas condições ate que houvesse a formação de estruturas em forma de roseta nas colônias (cerca de quinze dias). Essas estruturas foram então transferidas para placas de petri de 35mm em meio Neurobasal suplementado com B27 e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), 2mM de glutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais, para que a diferenciação se completasse (cerca de quinze dias).

As células diferenciadas foram então conduzidas para experimentos de imunofluorescência, empregando os marcadores MAP-2 (Sigma), NESTINA

(Chemicon) e BIII-TUBULINA (Sigma). Conforme o descrito para a realização de imunofluorescência após o protocolo de indução neural com RA.

### **3.12 Ensaios de co-cultura em poços separados por membrana (Transwell):**

Para verificar se apenas o meio secretado pelas IDPSCs era suficiente para promover a diferenciação neural ou se havia necessidade do contato celular entre CTEs e IDPSC, foram conduzidos experimentos empregando um sistema de “transfiltro” Transwell®, da Corning, com membrana permeável de 0,4µm. Nesse sistema, as células-tronco embrionárias foram semeadas na parte inferior da placa, após tratamento da superfície com Matrigel, por 40 minutos em meio MTSR. As células foram mantidas por 48 horas nesse meio para que houvesse adesão celular.

Posteriormente, membranas contendo IDPSCs indiferenciadas irradiadas foram colocadas nos poços, sobre as CTEs previamente semeadas. Para efeito comparativo, também foram usadas membranas contendo fibroblasto de prepúcio humano (H27) e murino irradiados. O meio de cultivo foi então mudado para meio de CTEs, visto que um experimento anterior havia mostrado que mesmo quando cultivadas sobre polpas a diferenciação das CTEs foi inibida na presença de meio MTSR. Como controle, um poço foi mantido com CTEs em MTSR, onde se esperava não houvesse diferenciação e outro em meio de CTEs. O sistema foi mantido por 15 dias, para verificar se havia formação de estruturas neurais.



# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Isolamento de IDPSCs e cultura

Conseguimos isolar e estabelecer duas linhagens de células de polpa de dente decíduo, que foram então nomeadas PDL1 e PDL2. É necessário ressaltar que as polpas utilizadas eram provenientes de dentes que foram removidos cirurgicamente, por questões de tratamento ortodôntico (o dente permanente estava em vias de realizar a oclusão e o decíduo ainda não havia sido liberado naturalmente), e não por motivos de inflamações ou doenças periodontais. As células obtidas apresentaram morfologia semelhante à de fibroblasto (*fibroblast like cells*) e foram cultivadas em confluência menor que 70% na garrafa (Figura 1).

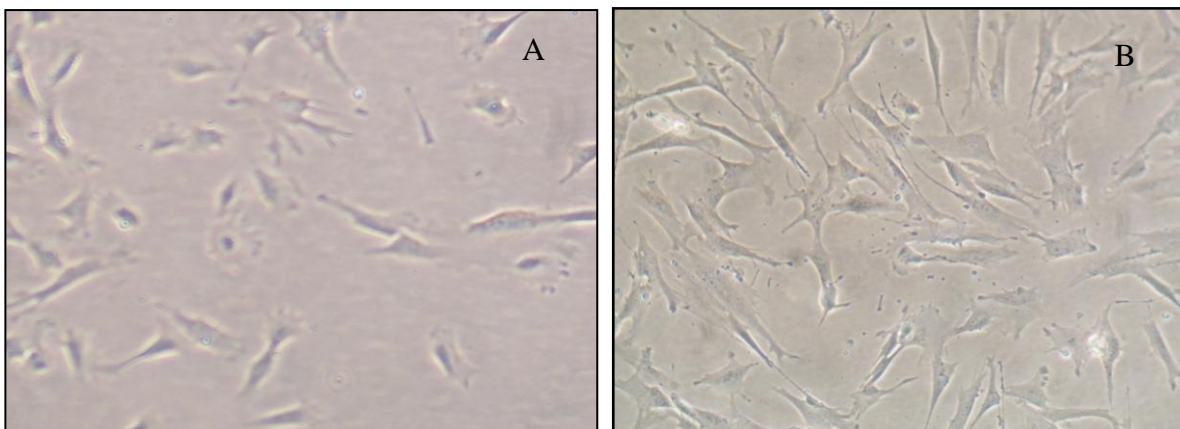


Figura 1: Células de polpa de dente decíduo após três semanas do início da derivação da cultura (A) e na terceira passagem celular (B). Aumento de 100X. As células foram fotografadas com uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F

### 4.2 Confirmação da origem das células

Através de experimentos de citometria de fluxo (Tabela 1), pudemos observar que as duas linhagens de células analisadas expressam os marcadores CD29 (precursor de integrina  $\beta 1$ ), CD44 (receptor de ácido hialurônico, relacionado à migração celular), CD73 (Ecto-5'-nucleotidase, relacionado com a proliferação

celular), CD90 (precursor de glicoproteína de membrana Thy 1), CD105 (receptor de TGF III ou precursor de endogлина, relacionado à proliferação celular) e CD166 (ALCAM-1- *activated leucocyte cell adhesion molecule-1*).

Não houve detecção de marcadores hematopoiéticos de superfície e endoteliais, como CD34 (antígeno de célula progenitora hematopoiética, expressa em progenitoras endoteliais), CD45 (antígeno comum de leucócito), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo e marcador de linhagem hematopoética), CD31 (PECAM-1, *Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor*, marcador de linhagem endotelial, também relacionado com a migração celular (Jackson *et al.*, 1997) e CD133 (precursor de prominin, também expressa na medula óssea (Yin *et al.*, 1997). Além disso, não observamos marcação para HLA-DR (Antígeno de leucócito humano), uma molécula pertencente ao complexo principal de histocompatibilidade classe II, relacionado ao sistema de rejeição de transplante (Muller *et al.*, 1983; Müller-Steinhardt *et al.*, 2000).

### **4.3 Cariótipo das IDPSCs**

Por análises numéricas do cariótipo (Figura 2), pudemos observar que ambas as linhagens são XY. Para PDL1 foram contadas 33 metáfases, das quais duas (aproximadamente 6%) se apresentaram tetraplóides. Para PDL2 foram contadas 64

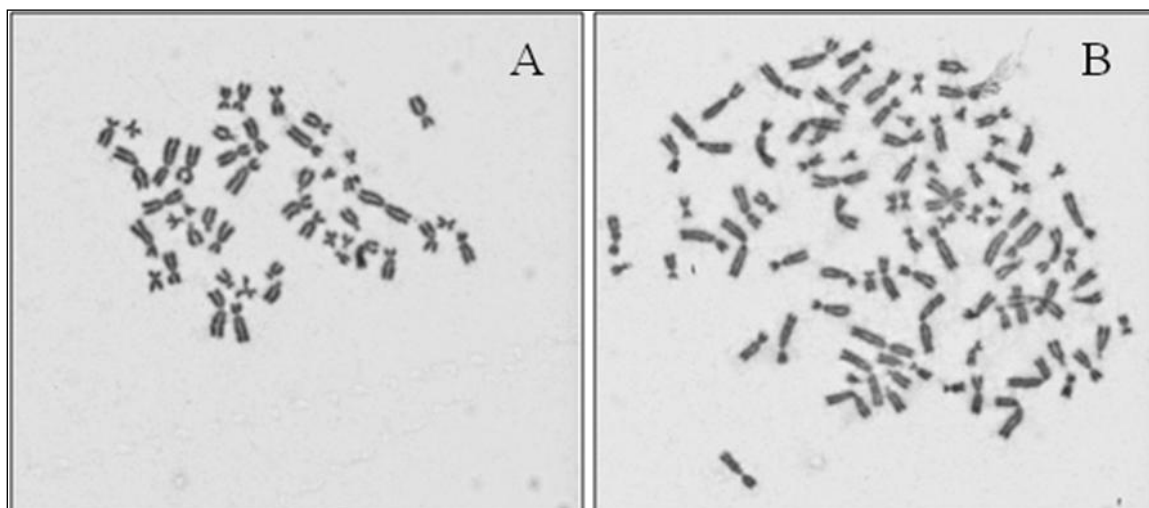


Figura 2: Em A, cariótipo de uma célula PDL2 46, XY. Em B, uma célula PDL2 tetraplóide.

metáfases, mas o mesmo foi observado quanto à tetraploidia (quatro metáfases ou aproximadamente 6% eram tetraplóides). As células analisadas estavam na passagem doze.

#### **4.4 Detecção de marcadores comumente expressos em CTEs**

##### **4.4.1 Detecção de antígenos de superfície celular por citometria de fluxo**

Os dados obtidos estão sumarizados na Tabela 2. Observamos que cerca de 21% das células analisadas de ambas as linhagens expressam SSEA-1, correlacionado com a diferenciação de CTEs humanas. Quanto ao marcador SSEA-4, observamos que cerca de 74% das células da linhagem PDL1 apresentavam marcação, ao passo que para PDL2 essa taxa foi um pouco menor. Quanto à

expressão do marcador TRA-1-81, novamente, foi observado um maior número de células da linhagem PDL1, ao passo que a detecção de TRA-1-60 foi maior em células da linhagem PDL2. Vale ressaltar que ao menos 10.000 eventos foram contados para cada medida.

#### **4.4.2 Detecção de genes comumente expressos em CTEs**

Foi detectada a expressão de *NANOG*, *OCT-4*, *cMYC*, mas não de *LIN28*, como verificado na Figura 3. A expressão de *NANOG* pôde ser detectada nas IDPSCs no ciclo 32, enquanto para as CTEs no ciclo 24 já era possível se observar a expressão de tal gene. Num modo similar, o cDNA de *OCT-4* pôde ser observado primeiramente nas CTEs, no ciclo 24 e para as IDPSCs, a partir do ciclo 30.

O cDNA de *LIN28* foi detectado em CTEs, como esperado, mas não nas IDPSCs. Curiosamente, a expressão de *c-MYC* foi visualizada em ciclos menores para IDPSCs que para CTEs. *C-MYC* é um proto-oncogene relacionado à progressão do ciclo celular (Secombe *et al.*, 2004).

#### **4.4.3 Imunofluorescência para detecção de OCT-4**

A expressão protéica de OCT-4 pôde ser observada por imunofluorescência em células PDL2 e PDL1 na passagem 4. O resultado obtido para a linhagem PDL2 se encontra na Figura 4. Nota-se a sobreposição da marcação de OCT-4 com DAPI, evidenciando a expressão nuclear, como esperado.

#### **4.5 Diferenciações adipogênica e osteogênica *in vitro* (Figuras 5 e 6):**

A capacidade de auto-renovação e de se diferenciar para outros tipos celulares são duas das características que definem uma célula-tronco. Diversos

trabalhos mostram a capacidade de células-tronco mesenquimais em se diferenciar para cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo, dentre outros tipos celulares.

No presente trabalho, não detectamos diferenciação adipogênica das células quando cultivadas em meio indutor A. Porém as células espontaneamente se diferenciaram na placa usada como controle (Figura 5A). É provável que a alta confluência da cultura, neste caso, tenha levado às células à diferenciação espontânea. Mediante o fato de não conseguirmos induzir a diferenciação adipogênica com o meio A, empregamos o meio B, que continha IBMX (isobutilmetilxantina), hidrocortisona e indometacina, sendo que, neste caso, houve a diferenciação celular (Figura 5B).

Com relação à diferenciação osteogênica, notamos que após vinte um dias em condições indutoras já foi possível notar a formação de matriz extracelular rica em cálcio, evidenciada pela coloração com Alizarina Vermelha (Fig. 6D), sendo que esse processo se acentuou com maior tempo de indução, como o verificado após dois meses de indução (Fig. 6E e 6F). Para efeito comparativo, a Tabela 4 sintetiza os resultados obtidos por diferentes grupos que testaram a capacidade de diferenciação de células-tronco derivadas da polpa de dente.

## **4.6 Diferenciação neural *in vitro*:**

### **4.6.1 Morfologia neural**

Para diferenciação neural, três protocolos foram testados. O primeiro previa a retirada de soro e ausência de indutores na tentativa de repetir o protocolo descrito por Kerkis e colaboradores (2007) de diferenciação neural “espontânea”. As etapas do protocolo podem ser acompanhadas na Figura 7. Em um dos experimentos observamos após dois meses de cultivo o aparecimento de células bastante

ramificadas, aparentando ter formado neuritos (Figura 7G), entretanto esse resultado não foi reprodutível, de forma que não foi possível realizar experimentos adicionais, como o de imunofluorescência, com estas células. Em todas as demais tentativas, as células permaneceram em um estágio anterior, como o ilustrado na figura 7F.

O segundo protocolo envolveu a formação de agregados celulares em suspensão, descritos por Kerkis e colaboradores (2007) como estruturas em forma de esfera (do inglês SLS- *sphere like structures*), e o emprego de RA como indutor. Quando transferidos para placas aderentes, os agregados celulares aderiram ao substrato em 24 horas (Figura 8), e muitas células começaram a migrar a partir destas estruturas. Após 30 dias de cultivo em placas aderentes, foi possível notar a formação de uma camada de células mais achatadas e escuras sobreposta por células mais claras, arredondadas e com terminações que lembram neuritos, estas últimas, fracamente aderidas ao substrato, conforme o descrito por Schwartz *et al.*, 2003.

Essa formação, contudo, era transiente. Muitas vezes, dentro de 24 horas não se observavam mais as células claras, sendo que com a progressão do tempo de cultura apenas as células mais achatadas permaneceram na placa. É possível que por serem fracamente aderidas essas células mais claras se descolassem facilmente, de forma que não as observássemos mais, ou mesmo que perdessem a morfologia neural. Em outros casos, células que estavam em divisão ou sob estresse apresentavam morfologia semelhante à de células neurais, dificultando a interpretação dos resultados.

Em contrapartida, na diferenciação paralela com CTEs após dez dias de cultura foi possível observar células sofrendo neuritogênese pronunciada, que se acentuou com a progressão do tempo de cultura (Figura 9). Aparentemente, a

diferenciação neural de CTEs ocorre mais rapidamente e de forma mais acentuada. É necessário salientar que para a realização dos experimentos de imunofluorescência e eletrofisiologia foram empregadas as IDPSCs de morfologia mais achatada, pelas limitações técnicas descritas acima quanto à manutenção das células mais claras e arredondadas na cultura.

Num modo similar ao da indução com RA, após 21 dias de tratamento das IDPSCs com FGF e dbcAMP foi possível observar a formação previamente descrita acima (Figura 10) Após estas células serem tratadas com tripsina e transferidas para outra placa em menor confluência foi possível observar a morfologia celular decorrente do tratamento mais detalhadamente. Curiosamente as células tinham a tendência a se agregar. É possível notar em algumas células projeções que lembram neuritos (Figura 11). Entretanto, com a ausência de fatores indutores ou com progressão do tempo de cultura se tornava mais rara a presença de células com tal morfologia.

#### **4.6.2 Detecção de marcadores neurais: IDPSC indiferenciadas expressam marcadores neurais**

Tanto as CTEs humanas diferenciadas, como as IDPSCs tratadas com RA foram positivamente marcadas para NESTINA (marcador de células-tronco e progenitoras neurais e neurônios imaturos) e BIII-TUBULINA (marcador de neurônio imaturo). Porém, as células indiferenciadas de polpa de dente também exibiram claramente esse padrão de marcação, de forma que não podemos considerar a detecção destes marcadores como indício de que a célula está sofrendo diferenciação neural (Figura 12). Não obstante, as IDPSCs tratadas com RA não exibiram marcação para MAP-2ab, característico de neurônios maduros, ao passo



que neurônios gerados pela diferenciação neural de CTEs embrionárias humanas em ensaios de co-cultura foram positivamente marcados (Figura 13).

Com relação ao protocolo de indução com FGF e dbcAMP, a imunofluorescência foi conduzida com emprego dos anticorpos GFAP e  $\beta$ III-TUBULINA. A presença de GFAP foi verificada apenas em células de polpa de dente decíduo tratadas, ao passo que, como visto anteriormente,  $\beta$ III-TUBULINA foi encontrada tanto em células não tratadas como após o tratamento (Figura 14).

#### **4.6.3 Medidas de eletrofisiologia: IDPSC indiferenciadas apresentam corrente para sódio e potássio e são capazes de disparar potencial de ação:**

As medidas de eletrofisiologia foram realizadas com células indiferenciadas e após tratamento indutor com RA, a fim de verificarmos a presença de correntes para os íons sódio e potássio e a capacidade das células em disparar potencial de ação. (Figuras 15 e 16).

Observamos que dentre as células analisadas, tanto a cultura mantida em condições controle, composta por células indiferenciadas, como a submetida ao protocolo de diferenciação neural com RA, apresentam células que exibem correntes de sódio e potássio compatíveis com o verificado para células excitáveis, e disparam potencial de ação.

#### **4.7 Ensaios de co-cultura com CTEs humanas (Figura 17)**

Com o objetivo de evitar o uso de produtos de origem animal no cultivo das CTEs humanas, decidimos testar a capacidade das IDPSC agirem como células de

suporte, equivalente a fibroblastos fetais murinos, normalmente usados no cultivo de CTEs humanas. Inesperadamente, foi notado um grande número de rosetas nas colônias de CTEs humanas cultivadas em meio de CTEs sobre camada de IDPSC irradiadas. Resolvemos então investigar a possível capacidade dessas últimas em induzir diferenciação neural das CTEs humanas.

Após cerca de sete dias de cultivo sobre as células de polpa irradiadas foi possível observar em algumas colônias de CTEs a formação de estruturas organizadas em forma colunar e concêntricas, que lembram a formação de rosetas, como o descrito no trabalho de Pankratz e colaboradores (2007), características de diferenciação neural. Com a progressão no tempo de cultivo um número maior dessas estruturas pôde ser observado. Estas formações foram então recortadas com uso de agulha de seringa hipodérmica e transferidas para outras placas em meio próprio para cultivo de células neurais para que a diferenciação se completasse. Foi possível observar uma cultura complexa e heterogênea, composta por células mais achatadas, recobertas por células de morfologia neuronal (Fig. 17 D) e também puderam ser encontradas células de morfologia semelhante as da glia (Fig. 17E). A cultura foi mantida nestas condições por até quarenta e cinco dias após a transferência.

Algo interessante a ser notado é que quando as colônias de CTEs foram cultivadas sobre as células de polpa, porém na presença de meio mTESR, a diferenciação neural foi inibida completamente (Fig. 18), o que pode ter ocorrido devido à presença de LIF (Kawasaki *et al.*, 2000) e altas concentrações de FGF-2.

A fim de elucidar a identidade das células diferenciadas, foram realizados ensaios de imunofluorescência empregando anticorpos específicos do trato neural. É possível observar uma marcação positiva para NESTINA nas estruturas neurais em

forma de rosetas, formadas após quinze dias de cultivo sobre células de polpa (Figura 19), confirmando o comprometimento destas células com a linhagem neural. Para este ensaio estas estruturas foram recortadas e semeadas em lamínulas tratadas com gelatina, para melhor visualização.

Também foram realizados ensaios de imunofluorescência com as células diferenciadas decorridos os quinze dias de transferência das rosetas formadas para placas aderentes na presença de meio próprio para cultivo neural (Figura 20). Observamos marcação positiva para NESTINA,  $\beta$ III-TUBULINA e MAP-2.

A fim de verificar se outras células humanas usadas como *feeder* poderiam exercer o mesmo efeito sobre as colônias de CTEs ou se tratava-se de uma característica particular das células de polpa, foram realizados novos experimentos empregando células de fibroblasto de prepúcio humano como *feeder*. Os dados obtidos quanto ao número de estruturas neurais formadas se encontram na Figura 21. Nota-se que quando cultivadas sobre polpas, o número de estruturas neurais observadas nas colônias de CTEs é superior ao daquelas mantidas sobre fibroblasto de prepúcio.

Empregando o teste estatístico de Fisher, para comparar o número de estruturas neurais formadas quando do cultivo sobre IDPSCs ou células de prepúcio humano, verificamos que as diferenças observadas são significantes, sendo que após doze dias de cultivo, o valor  $p$  obtido foi de 0,0022 e após 19 de 0,0002, ambos menores que 0,01.

Adicionalmente, para constatar se as células de polpa eram capazes de induzir a diferenciação neural apenas por contato ou se havia a liberação de fatores solúveis pelas mesmas responsáveis por tal evento, foram realizados experimentos em placas Transwell. Nesse sistema, as CTEs humanas foram cultivadas na parte

inferior da placa, enquanto as células usadas como *feeder* foram cultivadas sobre uma membrana de polímero, ocupando a parte superior da placa. Essa membrana possuía poros de 0,4µm de diâmetro permitindo difusão de solutos, mas não de estruturas maiores, como células. Para efeito comparativo, também foram usadas membranas contendo fibroblasto de prepúcio humano (H27) e murino irradiados. Como controle, um poço foi mantido com CTEs em mTeSR1, onde se esperava não houvesse diferenciação, e outro em meio de CTEs. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22.

Nota-se que as células cultivadas em mTESR não sofreram diferenciação, diferentemente das colônias mantidas nas demais condições, que se diferenciaram porém não em estruturas neurais. Apenas no poço onde houve co-cultivo com células de fibroblasto murino foi detectada diferenciação neural de uma única colônia. Estes resultados indicam que o contato celular é importante para que a diferenciação neural ocorra.

Tabela 2 :Resultados de citometria de fluxo para caracterização da origem mesenquimal das células

Anticorpo	Marcação	Anticorpo	Marcação
CD 14	-	CD90	+
CD 29	+	CD105	+
CD31	-	CD106	-
CD34	-	CD117	-
CD44	+	CD133	-
CD45	-	CD166	+
CD73	+	HLA-DR	-

Tabela 3: Detecção de marcadores de superfície celular de células pluripotentes em IDPSCs.

Marcador	PDL1 (%)	PDL2 (%)
SSEA-4	74,48	69,6
SSEA-1	21,3	21,1
TRA-1-81	28,1	19,3
TRA-1-60	11,7	16,3

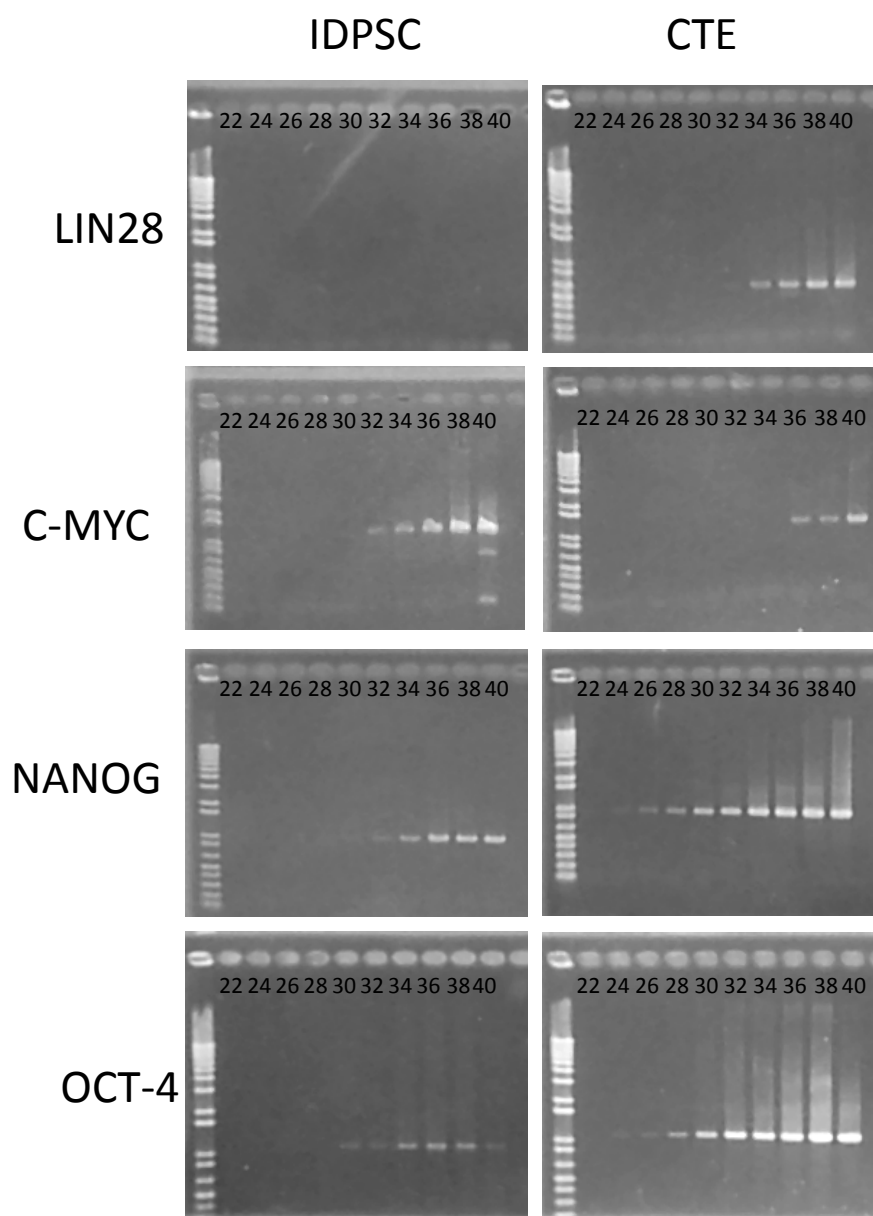


Figura 3: PCR semi-quantitativa para genes tipicamente expressos em células pluripotentes. Pode-se observar resultados comparativos para IDPSC e CTEs humanas. A expressão de LIN28 não foi detectada nas IDPSCs.

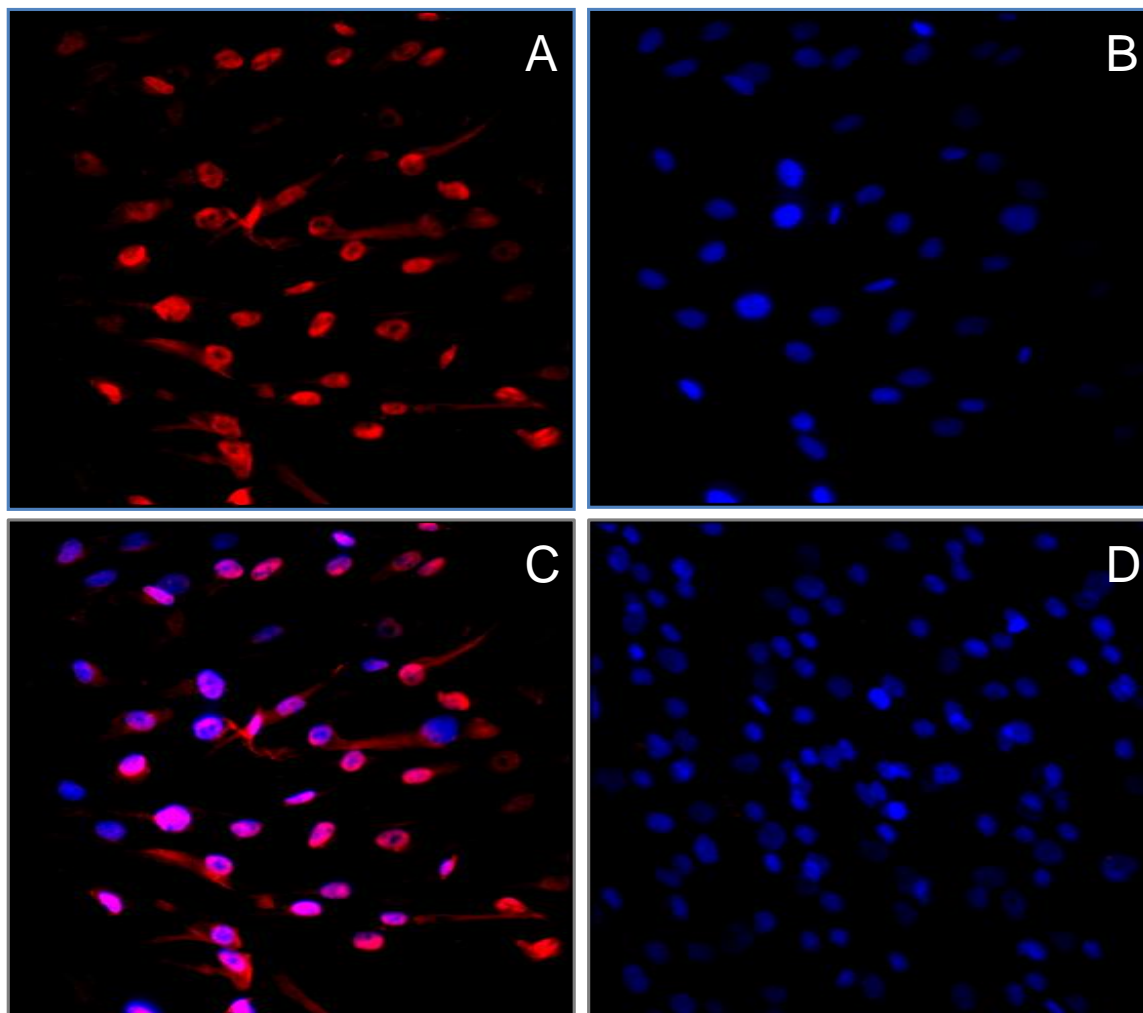


Figura 4: Detecção protéica, por imunofluorescência, do marcador OCT-4 em IDPSC indiferenciadas. Em A, células positivamente marcadas para OCT-4. Em B, coloração do núcleo com DAPI. Em C, sobreposição de A e B, mostrando a expressão nuclear de OCT-4. Em D, controle negativo, já com a sobreposição

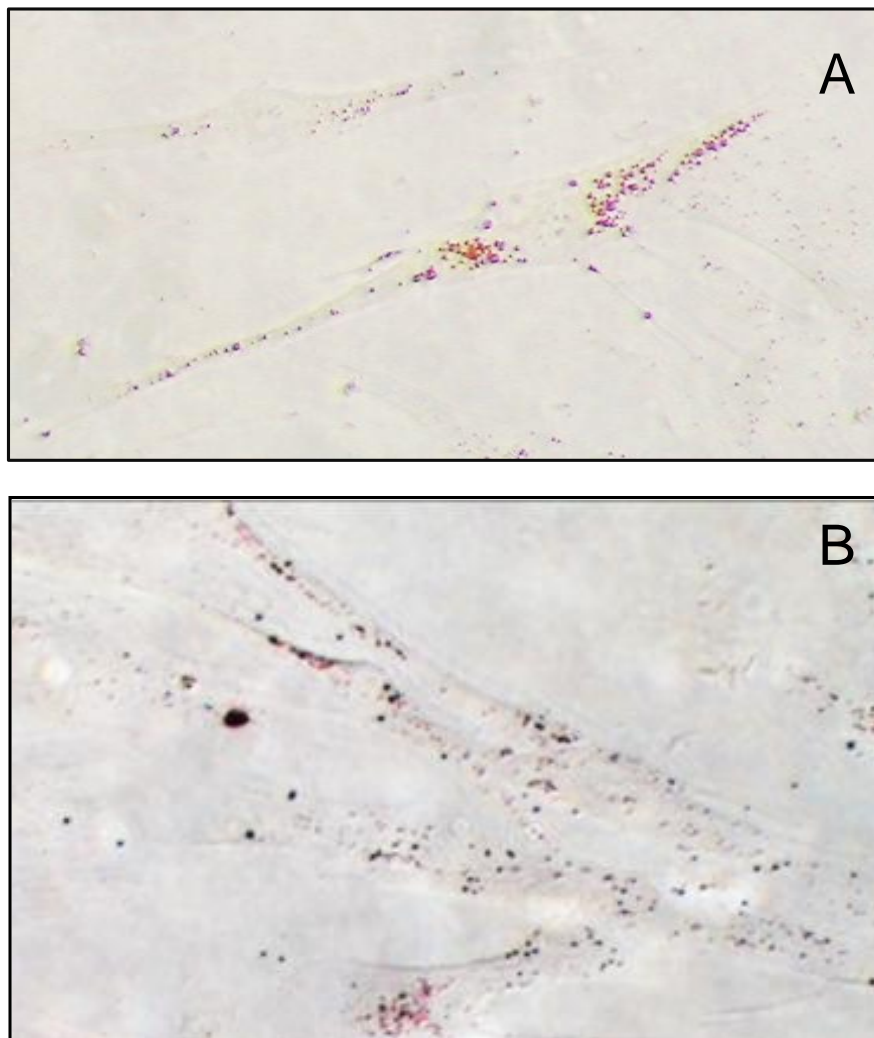


Figura 5: Diferenciação de IDPSCs em adipócitos. (A) Células espontaneamente diferenciadas para adipócitos. (B) Células após 21 dias de tratamento com meio indutor B. As deposições de lipídeos foram coradas com óleo vermelho. As fotos foram adquiridas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F



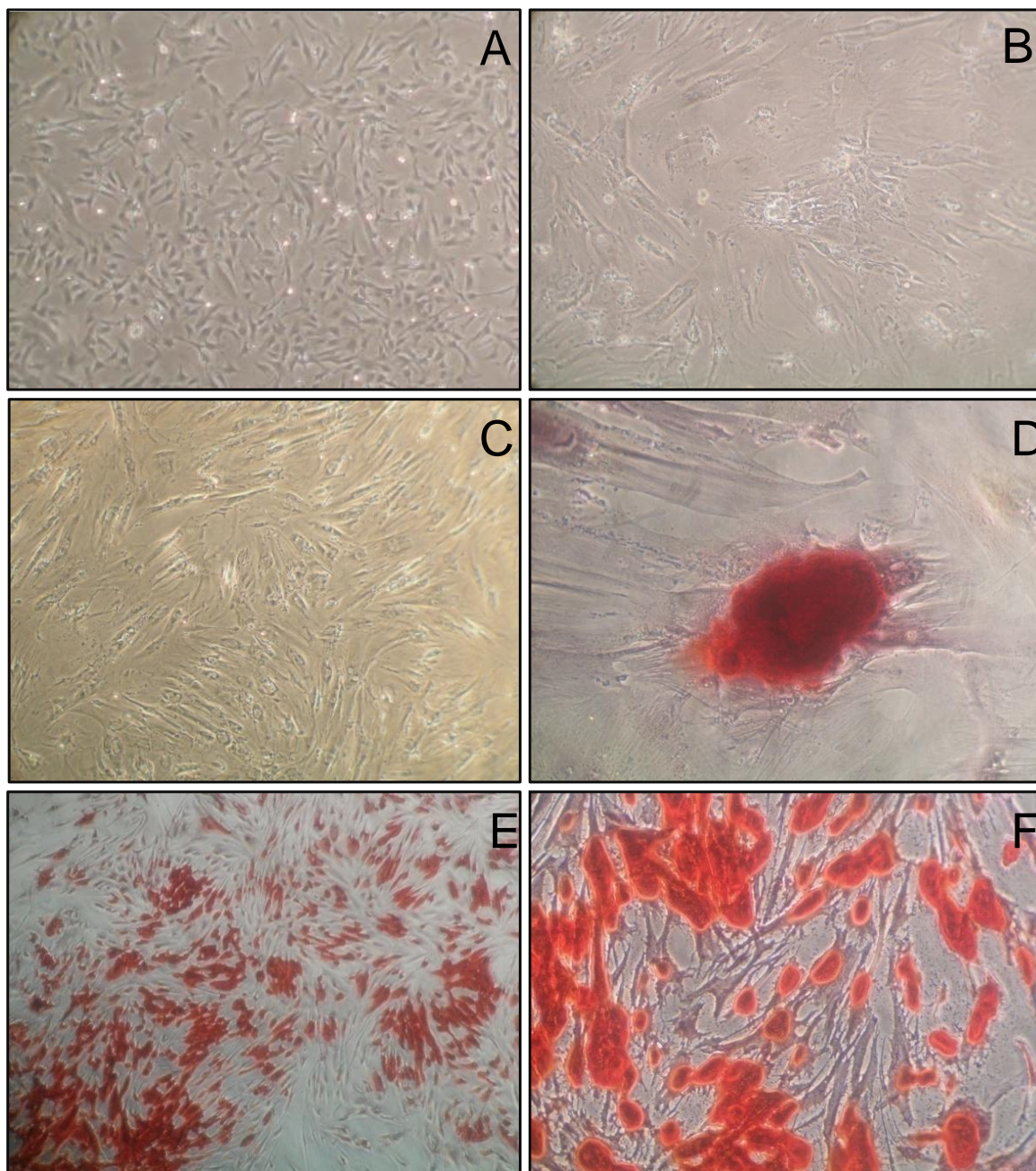


Figura 6: Diferenciação osteogênica de IDPSC. (A) Células indiferenciadas. (B) dia 10 da diferenciação. (C) Após 21 dias. (D) células após 21 dias de diferenciação osteogênica coradas com alizarina vermelha. (E) e (F) células após dois meses de diferenciação osteogênica coradas com solução de alizarina vermelha.. (E) aumento de 40X e em F aumento de 100X. As fotos foram obtidas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F

Tabela 4: Pluripotencialidade de células-tronco de polpa de dente. Comparação entre os resultados obtidos por experimentos de diferenciação celular realizados com diferentes linhagens de células –tronco de polpa de dente.

Linhagem	Diferenciação adipogênica	Diferenciação osteogênica	Diferenciação para cartilagem	Diferenciação neural	Diferenciação miogênica
DPSC Gronthos <i>et al.</i> , 2000	-	+	Não investigada	Não investigada	Não investigada
DPSC Gronthos <i>et al.</i> , 2002	+	+	Não investigada	+	Não investigada
SHEDs (Miura <i>et al.</i> , 2003)	+	+	Não investigada	+	Não investigada
IDPSC Kerkis <i>et al.</i> , 2006	+	+	+	+	+
Arthur <i>et al.</i> , 2008	Não investigada	Não investigada	Não investigada	+	Não investigada

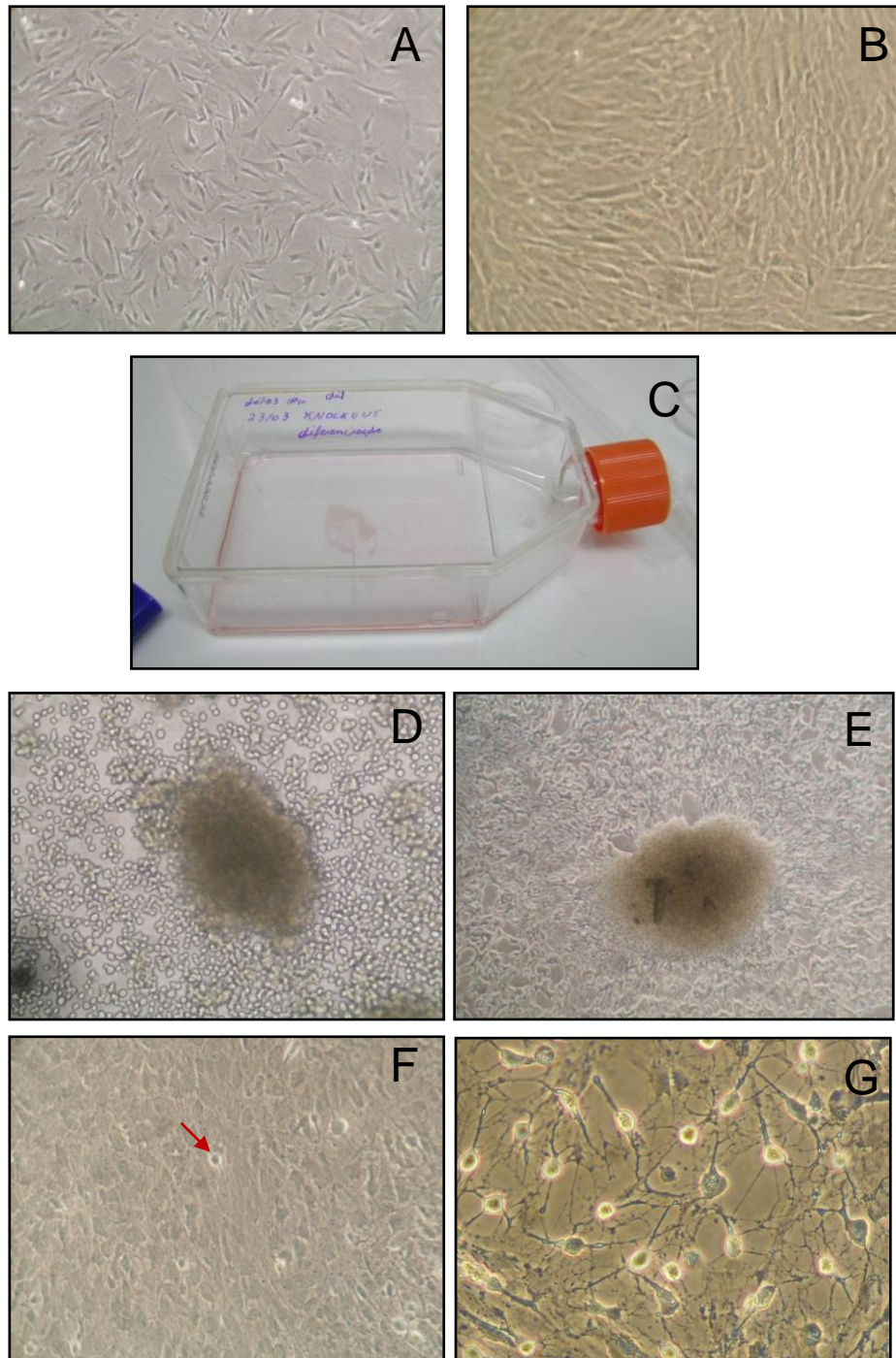


Figura 7: Diferenciação neural espontânea das IDPSCs. (A) Células indiferenciadas. (B) Após sete dias de cultivo em meio DMEM Knock-Out /20% KSR. (C) Massa de células que se forma após o tratamento com tripsina. (D) Imagem de parte da massa de células após imediata transferência para placa de 35mm de diâmetro. (E) 24 horas após transferência. Nota-se que a massa já aderiu à superfície celular. (F) Após quinze dias de cultivo nestas condições. Observam-se algumas células mais brilhantes e arredondadas sobre o tapete de células que cobre a placa (seta). (G) após dois meses de cultivo nestas condições. As fotos foram obtidas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F.

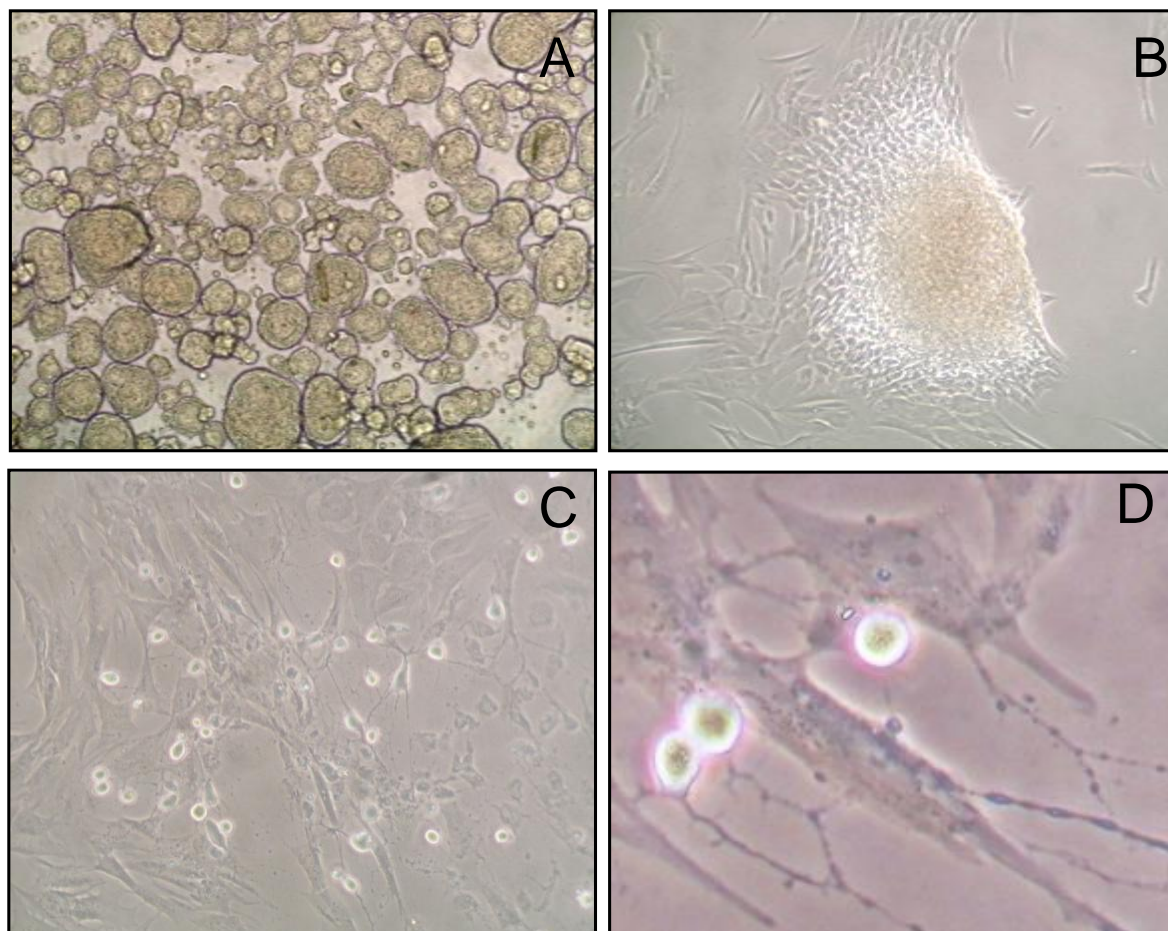


Figura 8: Tratamento indutor da diferenciação neural de IDPSC com RA. (A) Imagem dos agregados celulares obtidos (descritos por Kerkis *et al*, 2006 como SLS- *sphere-like structures*). (B) 24 horas após a transferência para placas aderentes. (C) 30 dias após a transferência.(D) Células brilhantes, com morfologia semelhante à neural e mais achatadas, escuras. As fotos foram obtidas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F.

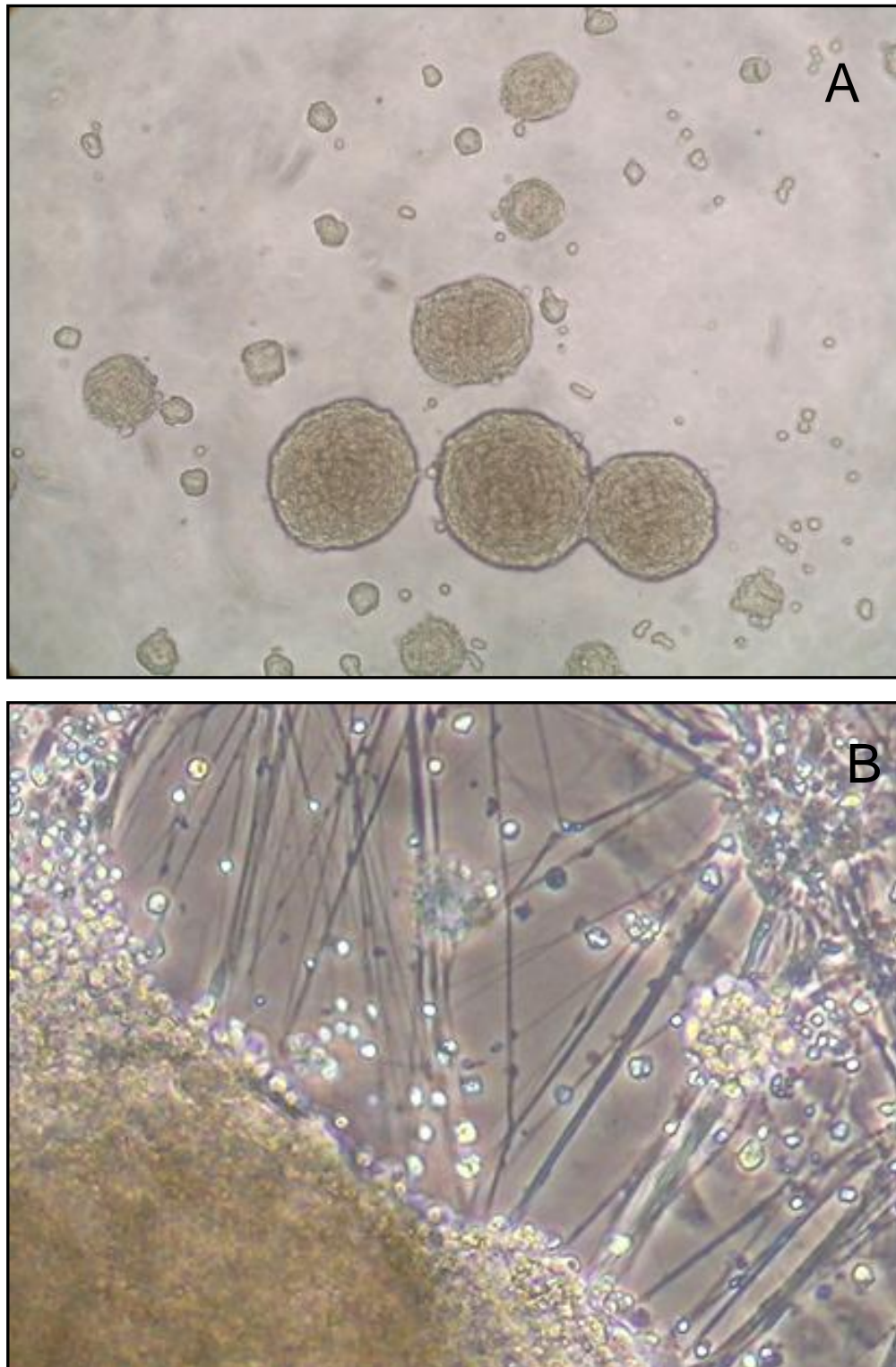


Figura 9: Diferenciação neural de CTEs humanas com RA. (A) Imagem dos agregados celulares obtidos (descritos por Kerkis *et al*, 2006 como SLS- *sphere-like structures*). (B) 10 dias após a transferência para placas aderentes. As fotos foram obtidas por meio de uma câmera Nikon com lentes da Zeiss, acopladas a um microscópio de luz Nikon TMS-F.

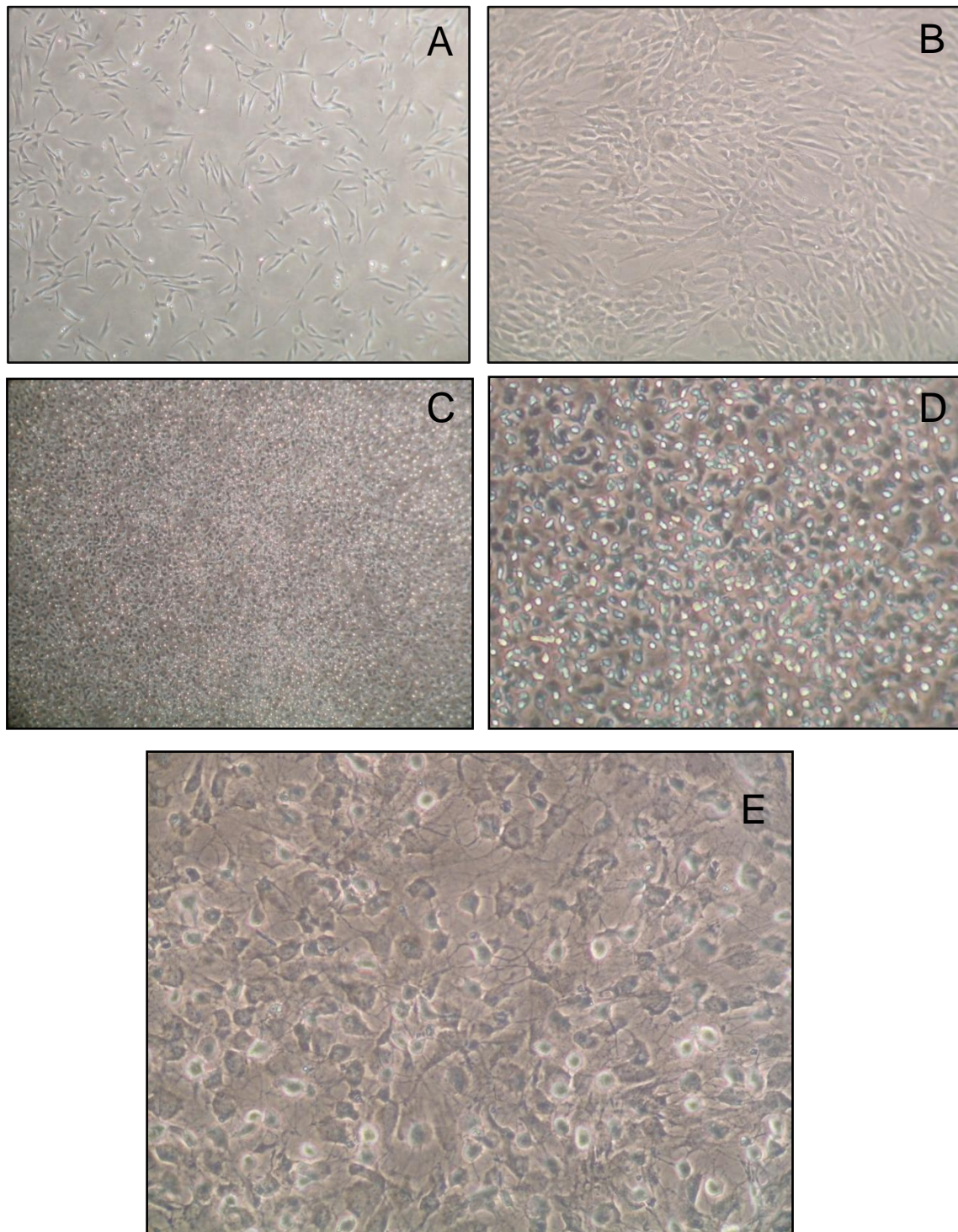


Figura 10: Tratamento indutor da diferenciação neural de IDPSCs com FGF-2 e dbcAMP. (A) células indiferenciadas (aumento de 40X). (B) Após sete dias de cultivo com meio indutor composto de 500µM de dibutilil AMP cíclico e 20ng/ml de FGF -2. (C) Células após 21 dias de cultivo na presença dos indutores, aumento de 40X; (D) zoom (4X) da foto C. (E) Aumento de 200X. As fotos C, D e E mostram o panorama geral da cultura, com células mais brilhantes sobre células mais escuras e fortemente aderidas como o descrito por Schwartz *et al*, 2003.

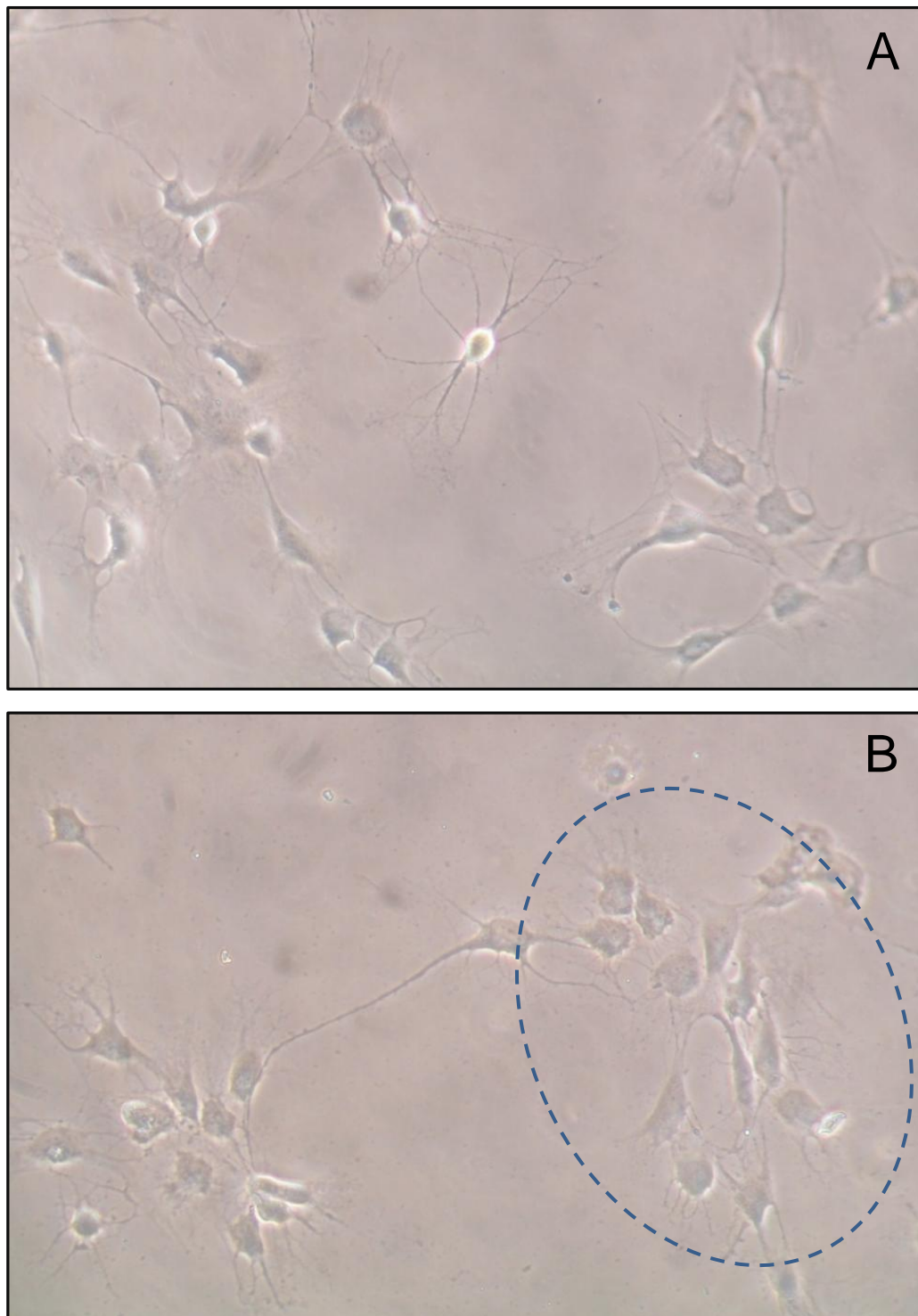


Figura 11: IDPSCs tratadas com meio indutor composto de 500 $\mu$ M de dbcAMP e 20ng/ml de FGF -2 por 21 dias, posteriormente tratadas com tripsina e transferidas para placa tratada com 0,1% de gelatina. (A): Observa-se no centro da imagem uma célula com morfologia neural típica. (B): A região delimitada mostra a formação de agregados celulares comumente feitos neste protocolo.

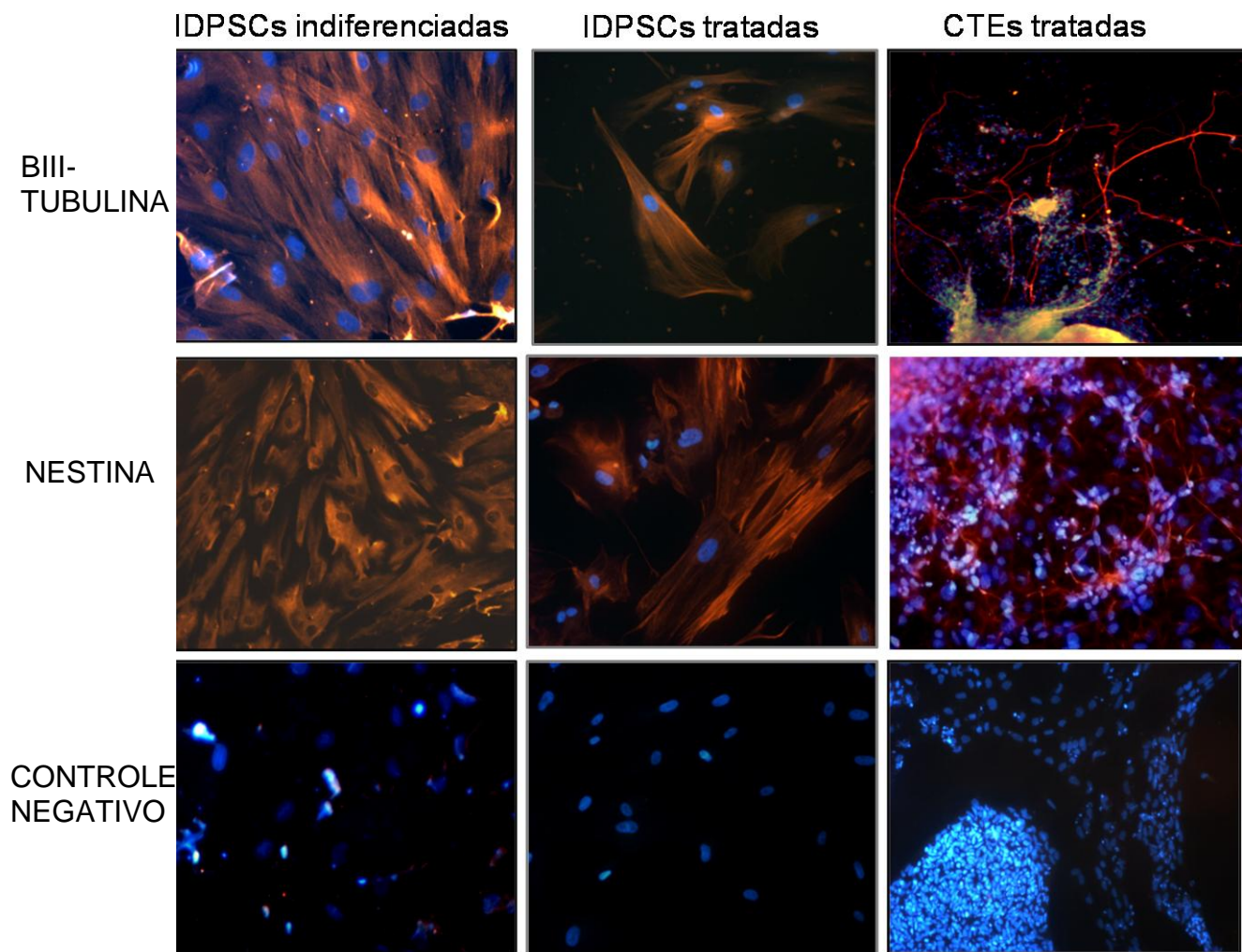


Figura 12: Imunofluorescência usando marcadores neurais  $\beta$ III-TUBULINA e NESTINA para IDPSCs indiferenciadas e após tratamento com RA e para CTEs tratadas com RA. Para o controle negativo houve apenas incubação com anticorpo secundário. Em azul, núcleo celular corado com DAPI.

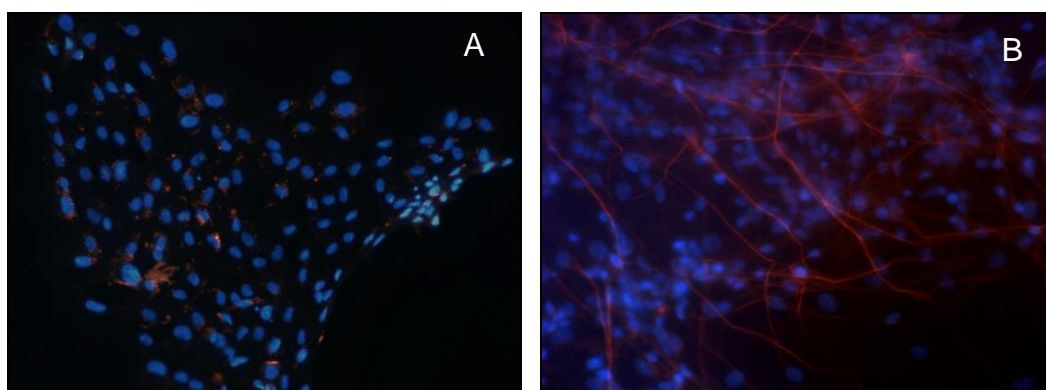


Figura 13: Imunofluorescência para MAP-2. (A) IDPSCs após tratamento com RA. (B) Controle positivo feito com CTEs diferenciadas para neurônio



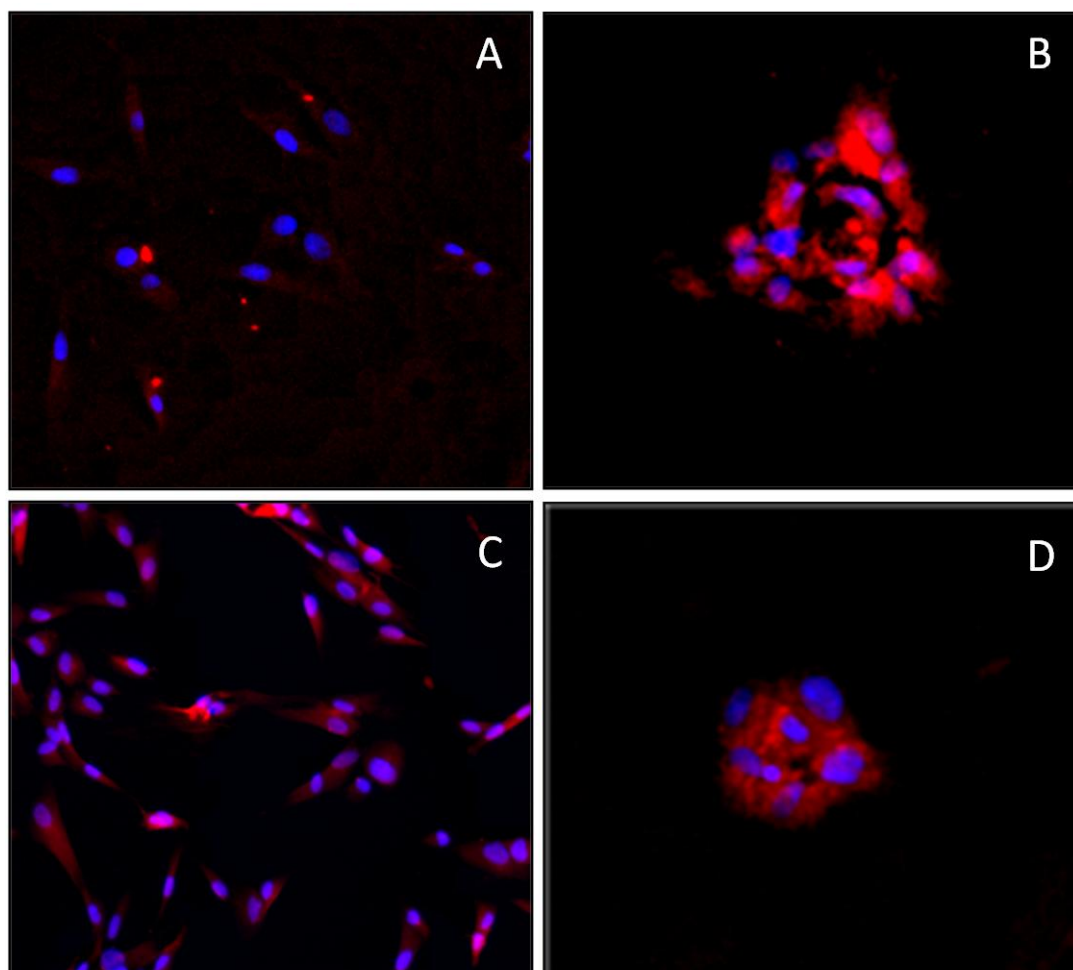


Figura 14: Imunofluorescência usando marcadores neurais  $\beta$ III-TUBULINA e GFAP para IDPSCs tratadas com dbcAMP e FGF-2. Em A e B marcação para GFAP. Em A, células indiferenciadas e em B, após tratamento indutor. Em C e D, células marcadas para  $\beta$ -III TUBULINA. Em C, células indiferenciadas e em D após tratamento indutor. Em azul, núcleo celular corado com DAPI.

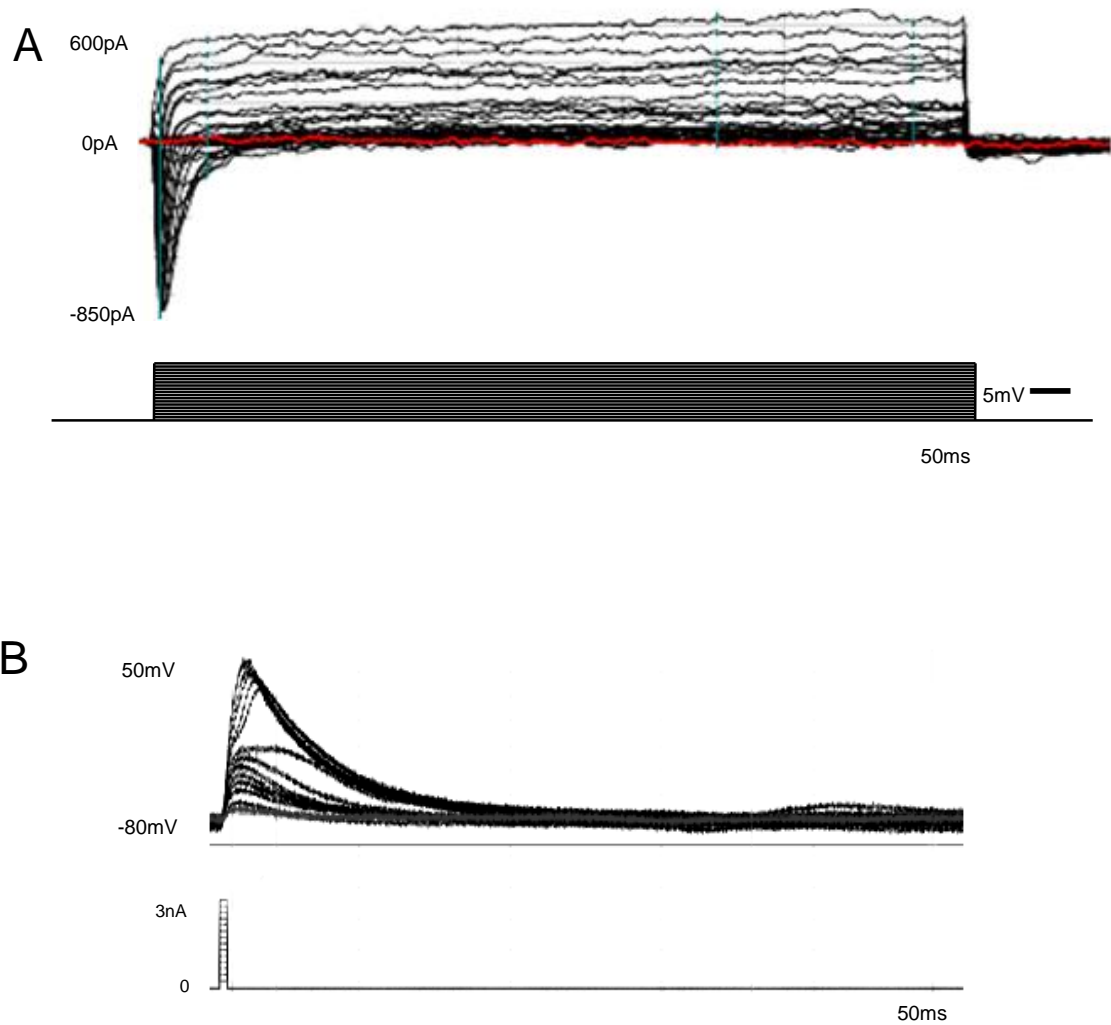


Figura 15: Medidas de eletrofisiologia para IDPSCs indiferenciadas. (A) Linhas representativas das correntes de sódio e potássio obtidas ao longo de 50ms de passos despolarizantes, com incrementos de 5mV, partindo de uma fixação de voltagem de -100mV (B) Potencial de ação. Os pulsos despolarizante sofreram incrementos de 0,2nA.

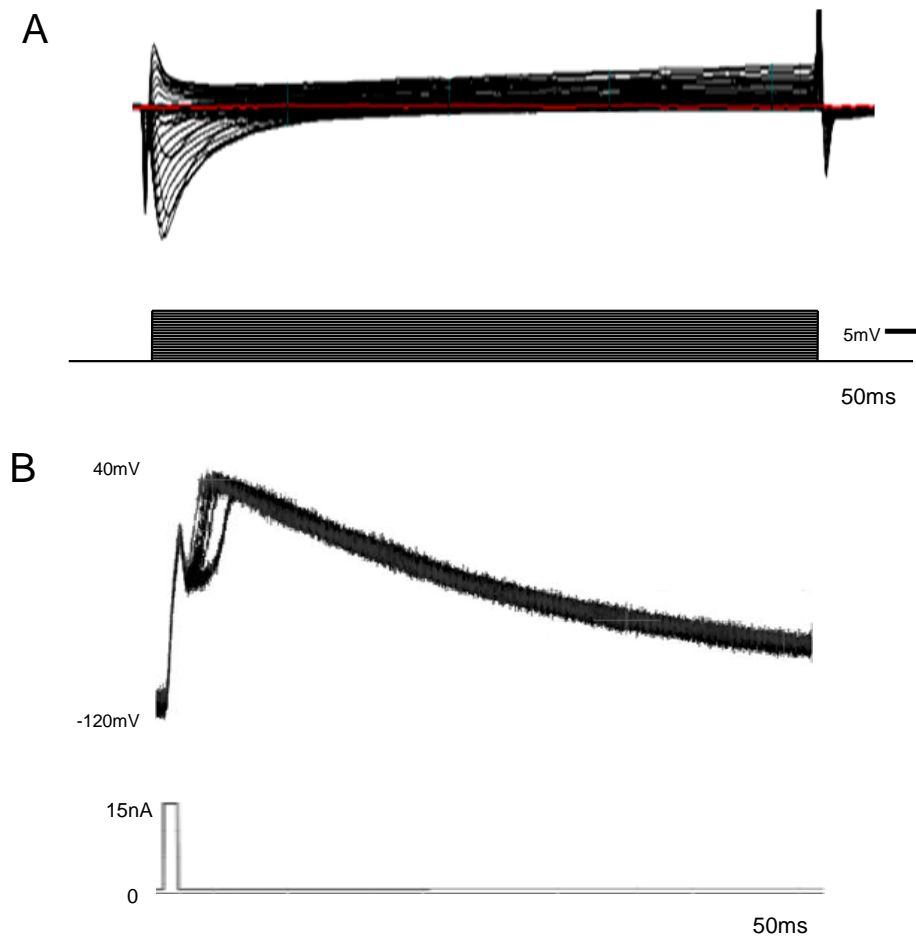


Figura 16: Medidas de eletrofisiologia para IDPSCs após tratamento com RA. (A) Linhas representativas das correntes de sódio e potássio obtidas ao longo do tempo. (B) Potencial de ação. O pulso despolarizante foi de 15nA

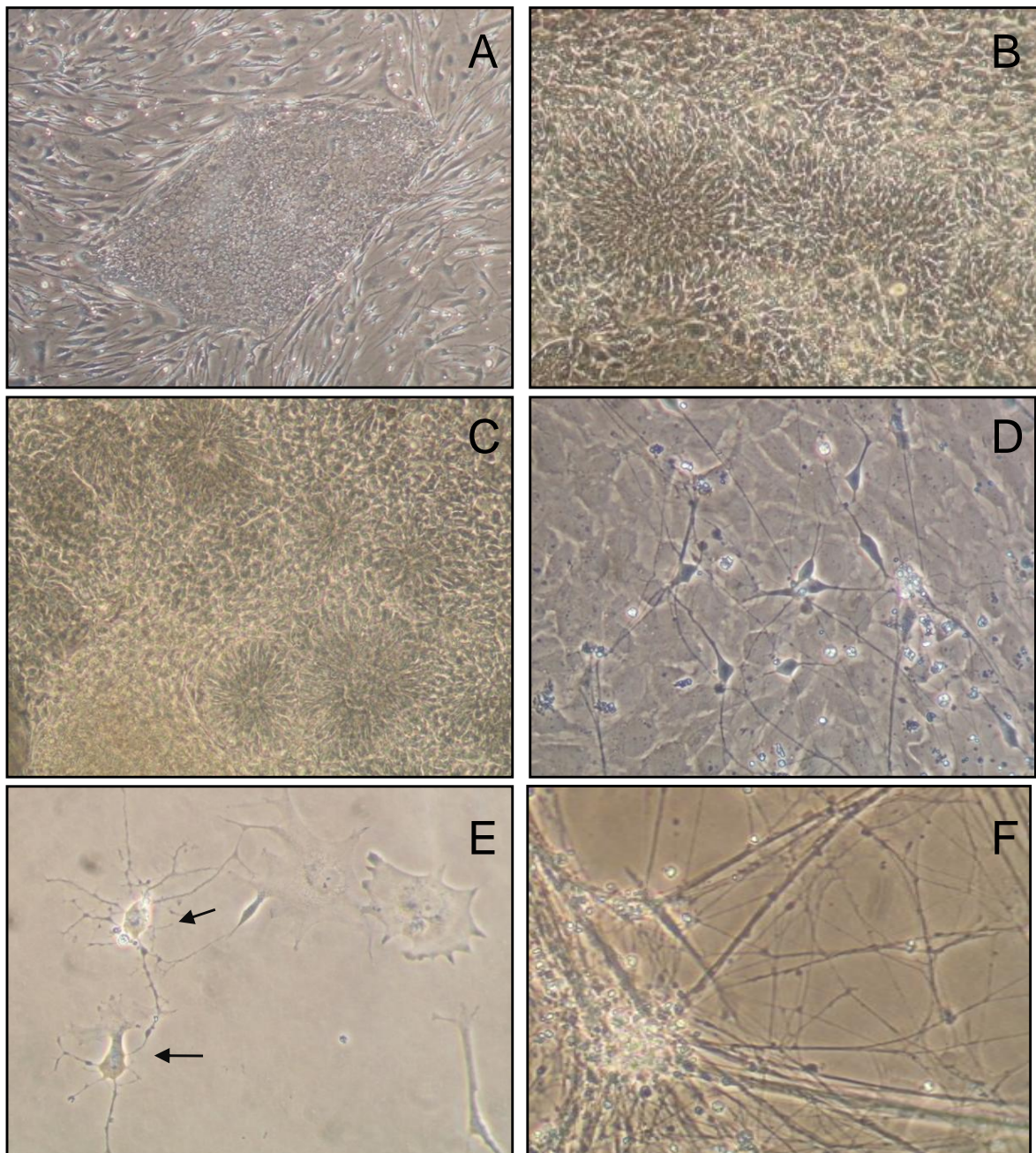


Figura 17: Diferenciação neural de CTEs humanas induzida por IDPSCs. As CTEs foram mantidas em *feeder* murino antes de passagem para células de polpa. (A) Após três dias de cultivo sobre IDPSC indiferenciadas e irradiadas ainda é possível se notar colônias com morfologia típica de CTEs indiferenciadas. (B) Quinze dias após o cultivo sobre IDPSCs. Células começam a se organizar formando estruturas colunares, adotando uma morfologia que lembra a formação de um tubo neural (C). (D) Quinze dias após transferência das rosetas para placas aderentes em meio Neurobasal/B27, na ausência de IDPSCs. Células com morfologia típica de neurônio podem ser visualizadas. E também com morfologia mais parecida com a de células da glia (seta) (E). (F) Quarenta e cinco dias após a transferência.



Figura 18: Meio mTESR inibe a diferenciação das CTEs. Em (A), colônia de CTEs indiferenciadas, após sete dias de cultivo em matrigel/mTESR. Em B e C, CTEs cultivadas sobre IDPSCs em meio normal de cultivo de CTEs ou em mTESR pelo mesmo período de tempo, respectivamente. Nota-se que na ausência de mTESR (B), há formação de estruturas neurais enquanto na presença deste meio (C), apesar de estarem semeadas sobre polpas, as colônias não sofreram diferenciação.

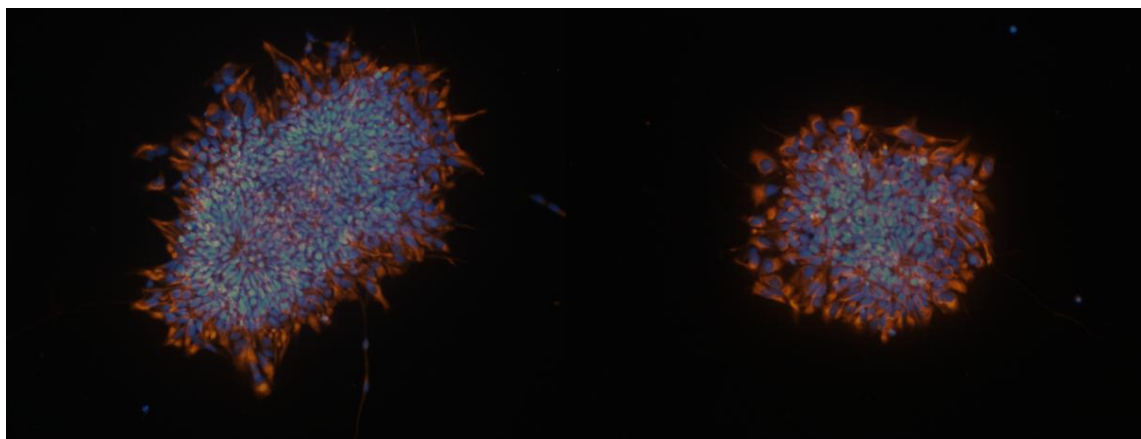


Figura 19: Estruturas neurais organizadas em forma de roseta expressam o marcador neural NESTINA. Em azul núcleo celular corado com DAPI. Aumento de 100X.

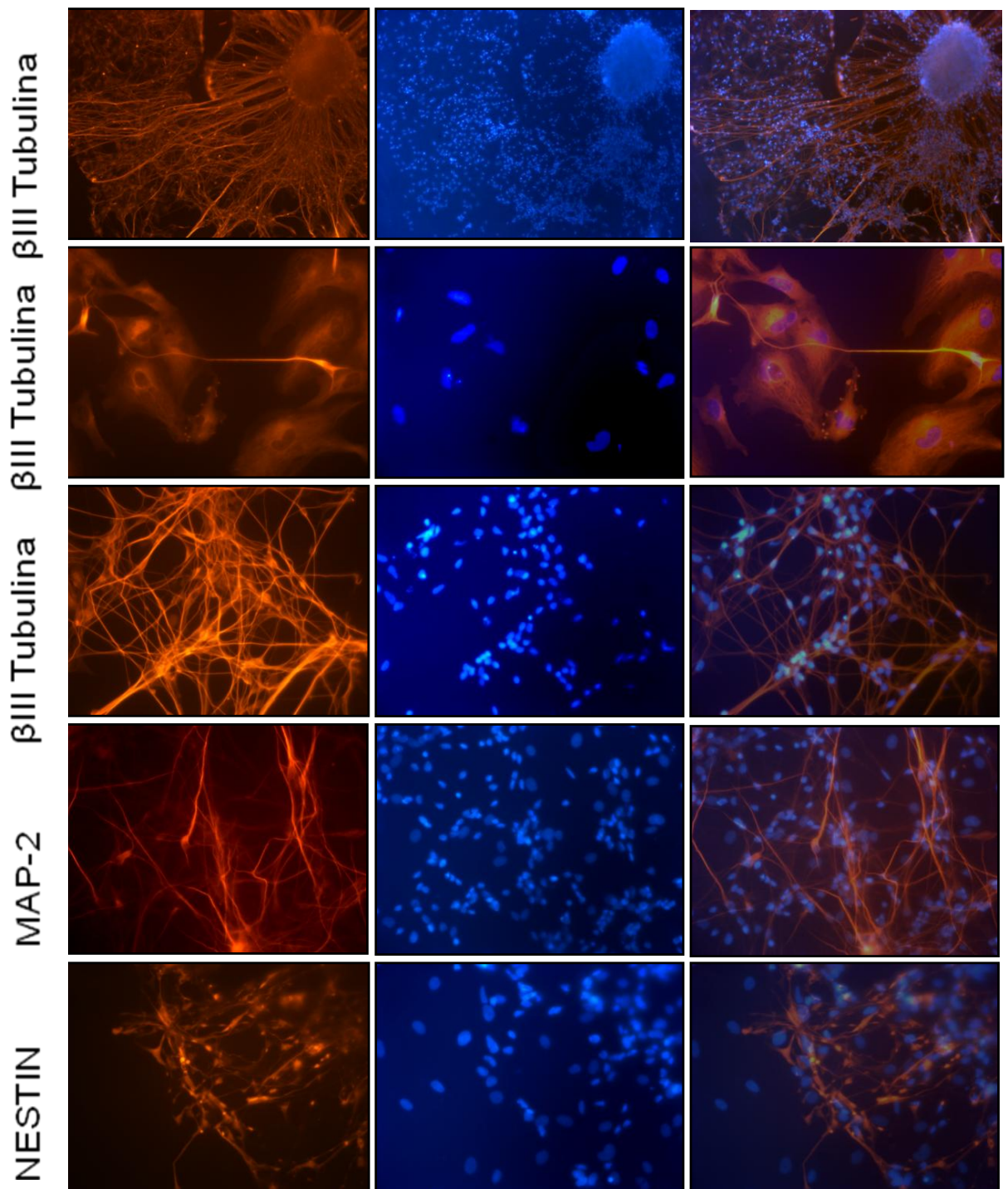


Figura 20: Imunofluorescência para detecção de marcadores neurais em CTEs diferenciadas para neurônios após co-cultura com IDPSCs. Estruturas neurais organizadas expressam os marcadores  $\beta$ III-TUBULINA, MAP-2 e NESTINA. Em azul núcleo celular corado com DAPI.

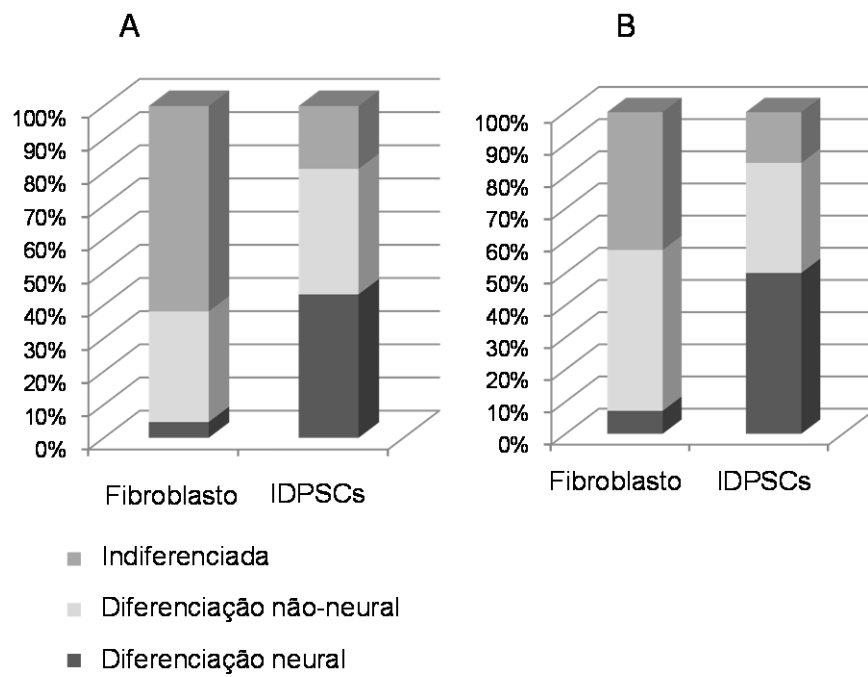


Figura 21: Comparação da quantidade de estruturas neurais formadas após 12 (A) e 19 (B) dias, de cultivo das CTEs humanas sobre células de prepúcio humano e sobre IDPSCs irradiadas.

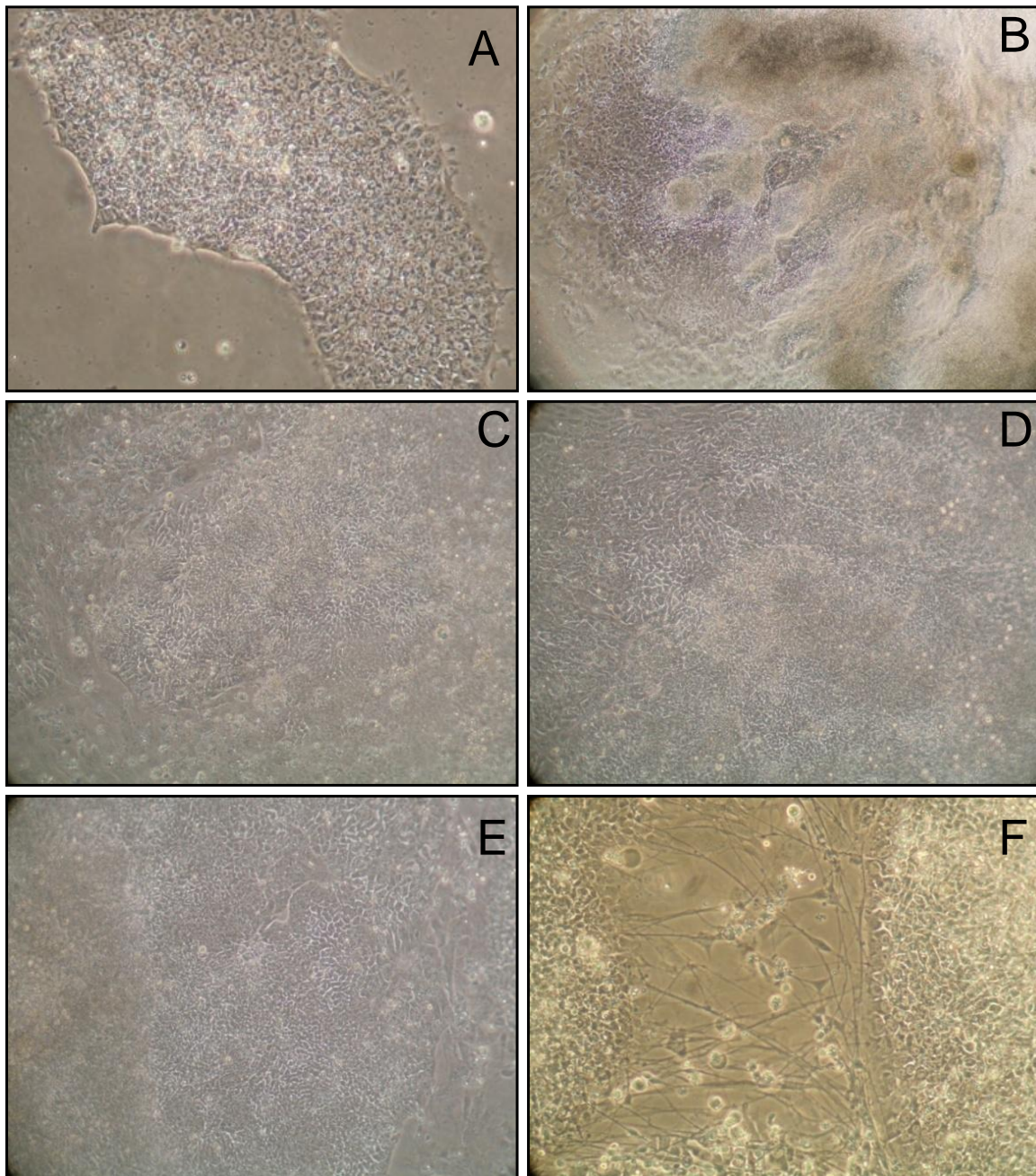


Figura 22: Ensaio de co-cultura usando placas Transwell por quinze dias. Nota-se que as colônias mantidas em mTESR permaneceram indiferenciadas ao passo que as colônias mantidas em meio de cultivo de CTE sofreram diferenciação (B). Quando do co-cultivo com IDPSCs PDL1 (C) e PDL2 (D) e prepúcio humano H27 (E) as colônias sofreram diferenciação, mas não para estruturas neurais. Apenas foi detectada diferenciação neural em CTEs co-cultivadas com *feeder* murino (F).



# **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização de IDPSCs:

A possibilidade de IDPSCs se diferenciarem em células neurais, especificamente em neurônios, abre grandes perspectivas para seu uso em terapia celular, e como um modelo de estudo *in vitro* de diferenciação neural em situações normal e patológica. Com o objetivo de explorar o uso dessas células em pesquisa básica, duas novas linhagens de IDPSCs foram estabelecidas, e examinamos sua capacidade de diferenciação neural.

A caracterização fenotípica das duas linhagens por citometria de fluxo mostrou sua origem mesenquimal e não-hematopoética. Além disso, as células foram capazes de se diferenciar em osteoblastos e adipócitos, confirmando sua identidade de célula-tronco.

Curiosamente, foi detectada a expressão protéica de SSEA-4 e OCT-4 nas IDPSCs indiferenciadas, marcadores característicos de células-tronco pluripotentes, sugerindo que estas possam ter uma maior plasticidade. De fato, Kerkis *et al.* (2007) descreveram a expressão de OCT-4, SSEA-4, TRA-1-81 e TRA-1-60 em suas linhagens de IDPSCs.

Porém, a análise semi-quantitativa de expressão gênica realizada em nosso trabalho com as linhagens PDL1 e PDL2 mostrou que para *OCT-4* e *NANOG*, os principais marcadores de células-tronco pluripotentes, a expressão nas IDPSC era 60 e 200 vezes menor, respectivamente, do que em CTEs. Isso sugere que a expressão desses genes não deve ser suficiente para conferir pluripotência às IDPSCs. Corroborando esta hipótese, a injeção de outras linhagens de IDPSCs em camundongos imunodeficientes não foi capaz de gerar teratomas nos mesmos

(Kerkis *et al.*, 2007), conforme o verificado para linhagens de CTEs (Przyborski, 2005).

Finalmente, a análise do cariótipo das duas linhagens identificou em torno de 6% de células tetraplóides. Poliploidias já foram encontradas em células de polpa de dente por outros pesquisadores da área (Tsutsui *et al.*, 2006). Além disso, Lizier e colaboradores (2007) mostraram que IDPSC eram capazes de fundir espontaneamente *in vitro* entre si e também com células murinas. Em alguns tipos celulares, como músculo esquelético e osteoclasto, a fusão é um passo próprio do programa celular, que culmina na diferenciação (Taylor *et al.*, 2002 e Vignery *et al.*, 2000). É possível que o mesmo se aplique às células provenientes da polpa do dente decíduo, o que por sua vez sugere uma grande importância no controle da confluência das mesmas durante o cultivo.

## **5.2 Diferenciação neural *in vitro***

### **5.2.1 Ser ou não ser um neurônio**

Nos últimos dez anos muitos grupos concentraram esforços na tentativa de verificar se células-tronco adultas apresentavam uma plasticidade maior a que se supunha, de forma que elas pudessem se diferenciar em células de outro folheto embrionário (Woodbury *et al.*, 2000; Raff, 2003; Lu *et al.*, 2004; Krabbe *et al.*, 2005; Bertani *et al.*, 2005; Croft *et al.*, 2006). Com relação à diferenciação neural, particularmente, parecia bastante promissor conseguir direcionar a diferenciação de uma célula-tronco adulta humana não-neural neste tipo celular, visto que se poderia ter fontes acessíveis de células nervosas, ao mesmo tempo em que se contornaria as discussões éticas relacionadas à obtenção de CTEs humanas.

Nos primeiros protocolos envolvendo diferenciação neural de células-tronco mesenquimais (MSCs), apenas a morfologia e a expressão de proteínas típicas do trato neural e de neurônios maduros foram suficientes para se considerar que a diferenciação tinha de fato ocorrido (Kim *et al.*, 2002; Sanchez – Ramos, 2000; Woodbury *et al.*, 2000; Fugimura *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Porém, um número crescente de trabalhos começou a questionar os resultados obtidos, demonstrando que artefatos de cultura poderiam levar a resultados similares aos encontrados (Bertani *et al.*, 2005; Croft e Przyborsky , 2006; Krabbe *et al.*, 2005) .

Os dados obtidos apontavam para a necessidade de se realizar medidas de eletrofisiologia para que se pudesse confirmar a identidade das células supostamente diferenciadas. Porém, não é incomum encontrar resultados similares com interpretações distintas, de forma que se torna necessário também definir quais são os requerimentos mínimos para se considerar que uma célula não-neural de fato sofreu diferenciação para essa via e, para tanto, é indispensável que se tenha em mente antes quais características definem um neurônio (Svendsen *et al.*, 2001).

De acordo com Kandel e colaboradores (2000), um neurônio pode ser compreendido como uma célula tipicamente polarizada, constituída por corpo celular, dendritos, axônio e terminais sinápticos, sendo células excitáveis, capazes de propagar potenciais de ação e conduzir os sinais por longas distâncias. Se essa definição for usada, então a presença de corrente de sódio que flui por canais para sódio dependentes de voltagem pode ser considerada um indício, mas não prova de que a diferenciação neuronal se deu, sendo para tanto necessário que houvesse disparo de potencial de ação num modo similar ao de um neurônio.

Algumas perspectivas para confirmar que a diferenciação neural de fato se deu podem ser: checar a expressão de marcadores de neurônio maduros;

demonstrar a ocorrência de disparo de potencial de ação nestas células; realizar uma investigação mais detalhada da cinética dos canais para sódio e potássio dependentes de voltagem, verificando quais subunidades estão expressas em dado tipo celular antes e após a diferenciação; checar a ocorrência de sinapses, com lançamento de neurotransmissores e, por fim, comparar a diferenciação de células-tronco mesenquimais com a de modelos bem caracterizados, como CTEs (Fraichard *et al.*, 1995; Bibel *et al.*, 2004), ECs (Jones Villeneuve *et al.*, 1982; MacPherson, 1997) e células-tronco neurais (Biella *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2002).

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que provar a identidade de uma célula supostamente diferenciada não é trivial. De acordo com Svendsen e colaboradores (2001), quando os neurônios são gerados a partir de tecido ou de células-tronco/progenitoras neurais a necessidade de usar diversas técnicas a fim de elucidar a identidade celular após o tratamento indutor é menor, embora seja altamente recomendável. Contudo, em se tratando de uma mudança dramática, como no caso da transdiferenciação de células-tronco mesenquimais, torna-se indispensável a aplicação de um número combinado de métodos. E, enquanto houver indícios, mas não a comprovação dessa identidade é mais aconselhável usar o termo “neurônios presuntivos”.

### **5.2.2 Morfologia e marcadores**

Diversas fontes de células-tronco mesenquimais foram analisadas quanto à capacidade de diferenciação neural, incluindo células da medula óssea (Bertani *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2002; Sanchez – Ramos, 2000; Woodbury *et al.*, 2000), de tecido adiposo (Fugimura *et al.*, 2005; Safford *et al.*, 2002), de cordão umbilical (Lee *et al.*, 2007), de polpa dental (Miura *et al.*, 2003; Kerkis *et al.*, 2007; Arthur *et al.*,

2008), dentre outras. Na maioria dos experimentos as células foram consideradas diferenciadas com base na morfologia e expressão protéica. Nesse contexto, decidimos verificar se as IDPSCs poderiam ser induzidas a se diferenciar para células neurais, apresentando morfologia, expressão protéica e resposta funcional típicas do trato neural.

O tratamento indutor empregando RA e FGF-2 permitiu a formação de uma camada de células mais achatadas e escuras recoberta por células brilhantes e esféricas, com projeções que lembram neuritos, conforme o descrito por Schwartz e colaboradores (2003). Porém o fenótipo observado parece inconsistente com uma diferenciação neural típica. Na diferenciação paralela conduzida com CTEs humanas, a morfologia neural tornou-se mais acentuada conforme aumentava o tempo de diferenciação, ao passo que, durante o mesmo tempo de tratamento indutor, a cultura de IDPSC perdeu a morfologia neuronal.

Ainda assim, as IDPSCs tratadas foram conduzidas para ensaios de imunofluorescência e medidas de eletrofisiologia. Com relação aos marcadores neurais, apesar de as células tratadas exibirem expressão de proteínas neurais como NESTINA, BIII-TUBULINA e GFAP, não foi detectada a expressão de MAP-2, característica de neurônios maduros. Além disso, as células indiferenciadas também expressaram NESTINA e  $\beta$ -III TUBULINA, limitando a interpretação do significado da presença destes marcadores em células após tratamento indutor.

Em seu trabalho com as SHED, Miura e colaboradores (2003) encontraram nas células indiferenciadas expressão dos marcadores GFAP, NeuN, NF-M, CNPase e mais surpreendentemente, para GAD, um marcador de neurônio especializado, produtor de glutamato, embora a expressão observada desse último tivesse sido baixa. O tratamento das SHED com FGF-2 e EGF levou à formação de células com

morfologia neural e gerou um aumento na expressão de  $\beta$ III-TUBULINA, GAD e NeuN. Curiosamente, os níveis de NESTINA, NFM, GFAP e CNPase permaneceram inalterados. A tabela 5 sumariza os resultados obtidos por diferentes grupos que testaram protocolos indutores da diferenciação neural para células-tronco de polpa de dente.

Tabela 5: Diferenciação neural de células-tronco de polpa de dente

Tipo celular utilizado	SHED	IDPSC	IDPSC	DPSC
<b>Autores</b>	Miura <i>et al.</i> , 2003	Kerkis <i>et al.</i> , 2007	Kerkis <i>et al.</i> , 2007	Arthur <i>et al.</i> , 2008
<b>Fatores usados</b>	EGF e FGF	Sem adição de fatores	RA	EGF e FGF ou EGF, FGF e RA
<b>Detecção de marcadores neurais em células indiferenciadas</b>	NESTINA; BIII-TUBULINA; GAD;GFAP NeuN; NFM e CNPase	NESTINA	NESTINA	NESTINA; BIII-TUBULINA; PSA-NCAM; NF-M; NF-H
<b>Detecção de marcadores neurais em células diferenciadas</b>	NESTINA; NFM; GFAP;CNPase; $\uparrow$ BIII-TUBULINA; $\uparrow$ GAD; $\uparrow$ NeuN; NFM	NESTINA, GFAP, BIII-TUBULINA	BIII-TUBULINA	$\downarrow$ NESTINA; $\downarrow$ BIII-TUBULINA; PSA-NCAM; $\uparrow$ NF-M; $\uparrow$ NF-H
<b>Tempo de cultura</b>	4 semanas	Cerca de duas semanas	Dois semanas	3 semanas
<b>Tipo celular após diferenciação</b>	Células neurais	Glia e Neurônios	Neurônios	Neurônios
<b>Resposta funcional <i>in vitro</i></b>	Não testada	Não testada	Não testada	Detecção de atividade VGSC por eletrofisiologia

As setas  $\uparrow$   $\downarrow$  indicam que houve aumento ou diminuição, respectivamente, na expressão de dado marcador após tratamento indutor da diferenciação neural.

A expressão de marcadores neurais em células-tronco de polpa de dente indiferenciadas pode ser interpretada como um indício de que (1) ao menos uma pequena porcentagem das células apresenta características de células-tronco neurais, o que poderia conferir ou não às mesmas uma predisposição à diferenciação para essa via; (2) tal característica é comum às diversas linhagens de MSCs indiferenciadas, como o visto para algumas linhagens de MSCs de medula óssea (Rooney *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2005); ou (3) alguns marcadores

considerados neurais não são específicos deste tecido (Bertani *et al.*, 2005, Svendsen, 2001).

Da mesma forma, a expressão destes marcadores nas células após tratamentos indutores deve ser vista com cautela uma vez que as células indiferenciadas em muitos casos já os apresentam e que, além disso, alguns trabalhos mostram que tratamentos indutores podem levar à morfologia e expressão protéica típicas do trato neural sem, contudo, ter havido diferenciação neural de fato.

Verificou-se, por exemplo, que MSCs de medula óssea expressavam constitutivamente marcadores de diversas linhagens, incluindo neurais e que, após o tratamento indutor, não houve uma modulação significativa na expressão destes últimos (Bertani *et al.*, 2005). A análise da expressão global de 21.000 genes mostrou que aqueles alterados pelo tratamento eram diferentes dos verificados em tecidos neurais imaturos e que, comparativamente, o tratamento não foi mais eficiente em direcionar as células para o trato neural do que para o hepático (Bertani *et al.*, 2005).

Adicionalmente, Croft e colaboradores (2006) mostraram que a formação de células com morfologia e expressão protéica semelhante à de neurônios a partir de células-tronco adultas não neurais poderia ser obtida por artefato da cultura e que o processo de diferenciação celular observado era inconsistente com o desenvolvimento neural típico, corroborando o encontrado por Bertani e colaboradores (2005).

No mesmo contexto, ao tentarem promover a diferenciação neural de MSCs, Deng e colaboradores (2005) mostraram que a elevação de AMP cíclico citoplasmático causado pelo tratamento com o análogo dbcAMP direcionava a mudança morfológica das células e aumentava a expressão de GFAP, porém a



expressão da maioria dos marcadores neurais observados não sofria mudanças consideráveis após o tratamento, sugerindo que os resultados obtidos poderiam indicar que não houve real diferenciação para o trato neural.

Esses dados em conjunto mostram que a morfologia e marcadores devem ser considerados indicativos de linhagem neural, mas não podem confirmar a identidade neuronal por si só (Svendsen, 2001), de forma que não podemos concluir com base em nossos resultados de análise morfológica e protéica, que houve diferenciação neural. Em nosso estudo a interpretação tornou-se ainda mais comprometida pelo fato de as células sem tratamento já apresentarem marcação e também pela ausência de marcação para MAP-2 nas células tratadas com RA.

Tais achados reforçaram a necessidade de haver uma caracterização mais detalhada das células, através da realização de medidas de eletrofisiologia, que poderiam nos esclarecer se as células obtidas seriam capazes de exibir resposta funcional típica de neurônio.

### **5.2.3 Avaliação da resposta funcional por medidas de eletrofisiologia**

Células neuronais são capazes de se comunicar a longas distâncias e com rapidez entre si e também com células alvo não-neurais, como células musculares ou glandulares. Essa capacidade depende da movimentação de íons através da membrana celular que podem levar a alterações rápidas da diferença de potencial elétrico através da mesma, causando o chamado disparo do potencial de ação. Neurônios funcionais expressam diferentes tipos de canais dependentes de voltagem, que participam na geração e propagação do potencial de ação, como canais para sódio e potássio dependentes de voltagem (Kandel *et al.*, 1997).

Neste trabalho verificamos que as células tratadas apresentaram correntes de sódio e potássio e foram capazes de disparar potencial de ação. Porém, surpreendentemente, também foi possível observar esse padrão de respostas nas células indiferenciadas. Embora já tenha sido verificada atividade de canais dependentes de voltagem em MSCs indiferenciadas, como mostrado na tabela 6, ainda não havia sido mostrado disparo de potencial de ação nas mesmas, como o descrito em nosso estudo. Contudo, o significado fisiológico deste achado ainda precisa ser esclarecido.

Tabela 6: Atividade de canais dependentes de voltagem em MSCs indiferenciadas de diferentes origens

Tipo celular	Tipo de corrente observada	Autores
MSC de medula óssea murina	IKCa I <sub>kir</sub> I <sub>Cl</sub>	Tao <i>et al.</i> , 2007
MSC de medula óssea de rato	IKCa IKDR I <sub>to</sub> I <sub>Na</sub> I <sub>Ca.L</sub>	Li <i>et al.</i> , 2006
MSC de medula óssea de coelho	I <sub>Kir</sub> Noise like IKCa, IKDR	Deng <i>et al.</i> , 2006
MSC de medula óssea humana	IKCa I <sub>Ba</sub>	Heubach <i>et al.</i> , 2003
MSC humana de líquido amniótico	I <sub>KDR</sub> I <sub>kCa</sub> I <sub>to</sub>	Liu <i>et al.</i> , 2008
MSC humana de cordão umbilical	I <sub>Na</sub> IKCa I <sub>to</sub> I <sub>KDR</sub>	Park <i>et al.</i> , 2007
MSC de medula óssea humana	IKCa I <sub>to</sub> IKDR-like (eag) K <sup>+</sup> channel I <sub>Na</sub> I <sub>Ca.L</sub> ether-à-go-go	Li <i>et al.</i> , 2005
MSC humana de líquido amniótico	IKDR IKCa I <sub>to</sub>	Bai X <i>et al.</i> , 2007

	INa	
--	-----	--

**IKCa**: Corrente de potássio ativada por cálcio

**INa**: Corrente de sódio

**IKir**: Corrente de influxo de potássio retificadora

**IKDR**: corrente de potássio retificadora

**ICI**: Corrente de cloreto

**Ito**: Corrente de potássio transiente

**ICa.L**: Corrente de cálcio tipo L

**IBa**: Corrente de bário

Recentemente, Arthur e colaboradores (2008) verificaram que DPSCs indiferenciadas exibiam atividade por canais de sódio dependentes de voltagem que se acentuava após tratamento para indução neural. Os autores concluíram que os dados indicavam que as células tratadas podem se diferenciar para neurônios maduros funcionais e que a resposta observada em células indiferenciadas pode ser interpretada como indício de que uma proporção de DPSCs apresente uma predisposição à diferenciação neural.

De fato o aumento na densidade de canais para sódio dependentes de voltagem está correlacionado com a maturação neuronal (Biella *et al.*, 2000). Porém, embora a atividade destes seja crítica para o disparo do potencial de ação em células excitáveis como neurônios e células musculares (Kandel *et al.*, 2000), esse não é o único pré-requisito para que a resposta funcional ocorra.

Em um trabalho com MSC de medula óssea de rato, por exemplo, verificou-se que apesar de o tratamento indutor levar as células a exibirem correntes para sódio e potássio compatíveis com a diferenciação neural, não se observavam respostas de potencial de ação típicas de um neurônio. Mediante tais dados, os autores concluíram que as células tratadas não possuem todas as características de um neurônio e que não atingiram a maturidade neuronal devido ou à ausência de estímulo apropriado ou a uma inabilidade intrínseca das mesmas (Wislet-Gendebien, *et al.*, 2005).

Algo semelhante foi observado também com MSCs de medula óssea e de tecido adiposo humano (Mareschi *et al.*, 2006; Anghileri *et al.*, 2008), sendo que em ambos os casos se concluiu que os dados sugeriam a ocorrência de diferenciação neural. Em outro estudo conduzido com MSCs de medula óssea de rato, empregando um dos protocolos mais disseminados para diferenciação neural, que prevê o tratamento indutor com DMSO e BHA, constatou-se que as células tratadas não exibiam correntes de sódio ou potássio e não eram capazes de disparar potencial de ação (Barnabé *et al.*, 2009). Esses trabalhos em conjunto mostram como ainda é controversa a questão acerca da capacidade das MSCs em se transdiferenciar para neurônios.

Em nosso estudo particularmente, a detecção de atividade de canais dependentes de voltagem e a capacidade de disparar potencial de ação das células indiferenciadas limita a interpretação acerca do valor que o tratamento teria na promoção da diferenciação neural. E ainda não está claro se tais células possuem uma propensão à diferenciação neural ou se são mais um tipo de célula excitável.

Novos trabalhos têm mostrado que pode haver mais tipos celulares excitáveis do que o concebido inicialmente, onde se acreditava que apenas células musculares e neurônios eram capazes de disparar potencial de ação (Onganer e Djamgoz, 2005; Allard *et al.*, 2006). Odontoblastos humanos, por exemplo, são capazes de disparar potencial de ação e, postula-se que tais células podem estar envolvidas na participação do processo de transdução de sinais sensoriais no dente, por meio de interações com fibras nervosas (Allard *et al.*, 2006). É possível que, assim como o verificado para os odontoblastos, as IDPSCs estejam envolvidas com a resposta sensorial e disparem potencial de ação, sem que isso signifique que elas estejam sofrendo diferenciação para o trato neural.

Não obstante, diversos trabalhos têm mostrado o envolvimento de canais dependentes de voltagem outras funções que não comunicação neuronal. Acredita-se, por exemplo, que canais para sódio dependentes de voltagem estejam envolvidos no comportamento metastático de células tumorais, como motilidade (Djamgoz *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2005), atividade secretória da membrana e endocitose (Mycielska *et al.*, 2003), adesão e capacidade de invasão (Smith e Harper, 2004).

Mediante a dificuldade em se provar a efetividade do tratamento de diferenciação neural sobre as IDPSCs, visto que, dentre outros achados, as células indiferenciadas apresentam previamente características de células excitáveis, nosso estudo não sustenta o emprego das mesmas como um bom modelo de estudo da diferenciação neural *in vitro*.

Em contrapartida, o recente advento da técnica de indução de pluripotência em células adultas (revisto por Yamanaka, 2009) tem se mostrado uma alternativa bastante interessante e viável para o estudo de diferenciação neural *in vitro* (Karumbayaram *et al.*, 2009) em situações normal e patológica, em particular para ALS (Dimos *et al.*, 2009). Esta técnica permite que células adultas de pacientes sejam reprogramadas para células pluripotentes (Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007), fornecendo uma célula com plasticidade elevada, que pode, portanto, ser empregada como modelo de diferenciação neural *in vitro*, útil na elucidação dos mecanismos envolvidos em patologias específicas do sistema nervoso.

### **5.3 Indução da diferenciação neural de CTEs *in vitro***

Os processos moleculares relacionados com os primeiros estágios da diferenciação neural têm sido tradicionalmente estudados em vertebrados como *Xenopus sp.* e em embriões de galinha e, comparativamente com esses modelos, pouco se sabe sobre os fatores regulatórios da diferenciação neural em mamíferos (Pankratz *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 2000). O estabelecimento de cultura de células-tronco embrionárias e neurais murinas e humanas certamente tem contribuído para o estudo dos eventos relacionados à neurogênese de mamíferos no que diz respeito a estas duas espécies.

Diversas técnicas têm sido empregados para promoção da diferenciação neural de células-tronco embrionárias (Zhong-Wei, 2004). Um dos protocolos freqüentemente utilizados envolve a formação de estruturas denominadas corpos embrióides (do inglês, *embryoid bodies*, ou simplesmente EBs). Para a formação destas estruturas, as células são cultivadas em suspensão e freqüentemente se encontram nos EBs derivativos da endoderme, mesoderme e ectoderme.

Para a diferenciação neural a partir do EB geralmente se adiciona ácido retinóico (Bain *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998), o que de acordo com alguns autores pode gerar alguns problemas, principalmente decorrentes do fato de ser difícil analisar e controlar os diferentes passos da diferenciação pela multiplicidade de linhagens celulares distintas que o EB pode originar (Kawasaki *et al.*, 2000). Neste contexto, protocolos que não envolvam a formação destas estruturas podem ser interessantes.

Neste trabalho, conseguimos promover a diferenciação neural de CTEs humanas sem a adição de fatores indutores, como RA, e sem a formação de corpos embrióides, apenas com o uso de células de polpa de dente decíduo como *feeder*.

A capacidade de indução da diferenciação neural de CTEs mediada por células-tronco mesenquimais foi verificada em trabalhos anteriores (Kawasaki *et al.*, 2000 e Zeng *et al.*, 2004). Empregando um método de co-cultura, Kawasaki e colaboradores (2000) verificaram que células PA6, derivadas do estroma de medula óssea craniana, foram capazes de induzir a diferenciação neural de CTEs murinas para neurônios dopaminérgicos. Essa habilidade foi denominada SDIA (do inglês “*stromal cell-derived inducing activity*”) e acredita-se estar relacionada a fatores expressos na membrana celular, visto que apenas o uso de meio condicionado de células PA6 não foi capaz de induzir a diferenciação neural.

Essa habilidade indutora das células PA6 foi também testada com CTEs humanas (Zeng *et al.*, 2004). Foi observado que, assim como para as CTEs murinas, havia uma grande diferenciação para neurônios dopaminérgicos e que estes, ao serem transplantados em rato, se integravam e eram capazes de exibir atividades bioquímicas e funcionais compatíveis com as de neurônios dopaminérgicos maduros.

É interessante notar que a capacidade identificada neste trabalho das IDPSC induzirem diferenciação neural de CTEs aderidas foi dependente de contato entre os dois tipos celulares. É possível que essa capacidade esteja associada a fatores expressos na membrana, como o discutido acima, mas também não se descarta a atuação de um gradiente de concentração de fatores neurotróficos secretados pelas IDPSCs.

Há diferenças significativas entre nosso protocolo e os utilizados por Kawasaki *et al.* (2000) e Zeng *et al.* (2004). Em nosso caso, as colônias foram mantidas por quinze dias em meio de cultura de CTEs, enquanto nos trabalhos citados as células foram transferidas para a camada de fibroblastos indutores em

meio próprio para a diferenciação neural. Mesmo assim, na presença de fatores inibidores de diferenciação celular, as IDPSC foram capazes de induzir a diferenciação neural das CTEs, indicando uma forte atividade neste sentido. Será importante repetir os experimentos de diferenciação das CTEs com as IDPSC em meio de cultivo indutor de diferenciação neural a fim de explorarmos todo o potencial das IDPSC na diferenciação de CTEs.

De qualquer forma, nossos dados mostram que as células de polpa de dente decíduo foram mais efetivas em promover a diferenciação neural *in vitro* quando comparadas com *feeder* de prepúcio humano. Estes resultados são significativos na medida em que mostram que estas células podem exercer efeitos neurogênicos *in vitro*, o que, se estendido a sistemas *in vivo*, pode torná-las ferramentas valiosas para aplicações no sistema nervoso, úteis no reparo de lesões, por exemplo.

De fato, verificou-se que células de polpa de dente de rato expressavam RNAs mensageiros de fatores de crescimento relacionados ao trato nervoso, como NGF, BDNF e GDNF (Nosrat *et al.*, 1998a). Além disso, estas células foram capazes de modular o microambiente *in vitro*, provendo suporte para a sobrevivência de neurônios trigeminais (Nosrat *et al.*, 2001) e dopaminérgicos (Nosrat *et al.*, 2004) em cultura, e também para neurônios motores em modelos experimentais de lesão de medula espinhal de rato (Nosrat *et al.*, 2001).

Em um trabalho recente envolvendo transplante de DPSCs de macaco *Rhesus* para hipocampo de camundongos, verificou-se que as células de polpa estimularam a proliferação e diferenciação de células neurais endógenas, o que se acredita ser devido a uma regulação na liberação de fatores neurotróficos como VEGF, NGF e FGF (Huang *et al.*, 2008).



Finalmente, verificou-se que DPSC de ratos foram capazes de exercer efeito neuroprotetor em modelos de estudo das doenças de Alzheimer e Parkinson *in vitro* (Apel *et al.*, 2009). Esses dados em conjunto indicam que as células de polpa de dente têm um grande potencial ainda a ser explorado para uso em terapia celular no sistema nervoso, não como fonte de células nervosas, mas como agente indutor de regeneração, evitando a morte neuronal e auxiliando na auto-reparação de tecidos lesados.

# **CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

As células isoladas por nosso grupo são de origem mesenquimal, sendo descartada a possibilidade de contaminação por células hematopoéticas. Pudemos detectar a expressão de *OCT-4* e *NANOG*, relacionados à manutenção do estado de pluripotencialidade celular, porém, esta expressão é muito baixa, indicando que os mesmos não devem conferir pluripotencialidade às IDPSCs. As células foram capazes de se diferenciar *in vitro* para osteócitos após tratamento com meio indutor e também para adipócitos, como outras linhagens de células-tronco mesenquimais.

Observamos nas IDPSC tratadas com RA a expressão de proteínas neurais *NESTINA* e *BIII-TUBULINA* e as células foram capazes de disparar potencial de ação. Entretanto, tais resultados também foram verificados para IDPSCs indiferenciadas, limitando a interpretação acerca do efeito do tratamento indutor de diferenciação neural sobre as células o que, conseqüentemente, restringe o uso das mesmas como modelo de estudo da diferenciação neural *in vitro*.

As células de polpa de dente decíduo constituem um material acessível e com características peculiares. O estabelecimento de protocolos que permitissem a diferenciação neural destas células *in vitro* seria interessante, visto que se poderia ter uma ferramenta valiosa para estudos *in vitro* dos eventos relacionados à neurogênese e neurodegeneração.

Porém, mediante todas as controvérsias sobre a diferenciação neural das células-tronco mesenquimais, das quais as IDPSCs fazem parte, bem como a dificuldade existente em se provar a identidade destas células após o tratamento indutor da diferenciação neural, caminhos alternativos devem ser levados em consideração, como empregar células adultas para reprogramação nuclear

(Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). As células geradas, com características similares a CTEs, podem ser um modelo mais adequado para o estudo da de diferenciação neural *in vitro*.

É importante ressaltar que, apesar da questão da diferenciação neural destas células permanecer não respondida, não se pode descartar a capacidade que as mesmas têm em exercer efeitos terapêuticos (Nosrat *et al.*, 2001; Nosrat *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). Adicionalmente, nossos resultados mostraram que essas células foram capazes de induzir a diferenciação neural de células-tronco embrionárias *in vitro*, corroborando trabalhos que apontam as IDPSCs como boas candidatas para terapia celular, não como uma fonte de células nervosas funcionais, mas como indutoras de regeneração tecidual *in vivo*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, B.; MAGLOIRE, H.; COUBLE, M.L.; MAURIN, J.C.; BLEICHER, F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 281 No 39 September 29, 2006.
- ANDREWS, P.W.; OOSTERHUIS, J.; DAMJANOV, I. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.Robertson, Ed. (IRL, Oxford, pp. 207-248, 1987.
- ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A.; CIFELLI, P.; GALIÉ, M.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BELLUZZI, O.; BONETTI, B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Dev.* Oct 17(5):909-16, 2008.
- APEL, C.; FORLENZA, O. V.; DE PAULA, V. J. R.; TALIB, L. L.; DENECKE, B.; EDUARDO, C.P.; GATTAZ, W. F. The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission.* Volume 116, Number 1, PP 71-78 , January, 2009
- ARTHUR, A.; RYCHKOV, G.; SHI, S.; KOBLAR, A.S.; GRONTHOS, S.. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* Vol. 26 No. 7 pp. 1787-1795, July 2008.
- BABAIE, Y.; HERWIG, R.; GREBER, B.; BRINK, T.C.; WRUCK, W.; GROTH, D.; LEHRACH, H.; BURDON, T.; ADJAYE, J. Analysis of Oct4-dependent

- transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. Feb;25 (2):500-10, 2007.
- BAI, X.; MA, J.; PAN, Z.; SONG, Y.H.; FREYBERG, S.; YAN, Y.; VYKOUKAL, D.; ALT, E. Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Nov;293(5):C1539-50 2007
- BARRY, F.P..Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res*; 69:250–6, 2003.
- BARNABÉ, G.F.; SCHWINDT, T.T.; CALCAGNOTTO, M.E.; MOTTA, F.L.; MARTINEZ, G.J.R.; OLIVEIRA, A.C.; KEIM, L.M.N.; D'ALMEIDA V.; MENDEZ-OTERO R.; MELLO, L.E. Chemically-Induced RAT Mesenchymal Stem Cells Adopt Molecular Properties of Neuronal-Like Cells but Do Not Have Basic Neuronal Functional Properties. *PLoS ONE* April Volume 4: 1-11, 2009.
- BENVENUTI, S.; SACARDI, R.; LUCIANI, P.; URBANI, S.; DELEDDA, C.; CELLAI, I.; FRANCINI, F.; SQUECCO, R.; ROSATI, F.; DANZA, G.; GELMINI, S.; GREEVE, I.; ROSSI, M.; MAGGI, R.; SERIO, M.; PERI, A. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: Changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene *seladin-1*. *Experimental cell research* 312: 2592-2604, 2006.
- BERTANI, N.; MALATESTA, P.; VOLPI, G. *et al.* Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: Analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci* ; **118**: 3925-3936, 2005
- BHATTACHARYYA, A. e SVENDSEN, C.N. Human neural stem cells: a new tool for studying cortical development in Down's syndrome. *Genes, Brain and Behavior* 2: 179–186, 2003

- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192, 2001.
- BIBEL, M.; RICHTER, J; SCHRENK, K.; TUCKER, K.L.; STAIGER, V.; KORTE, M.; GOETZ, M. e BARDE, Y.A. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nature Neuroscience* 7, 1003 – 1009, 2004.
- BIELLA, G.; DI FEBO, F.; GOFFREDO, D. *et al.* Differentiating embryonic stem-derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials. *Neuroscience*;149:38–52, 2007.
- BLAU, H.M.; BRAZELTON, T.R.; WEIMANN, J.M. The evolving concept of a stem cell:entity or function? *Cell* 105:829-841, 2001.
- BRAZELTON, T.R.; ROSSI, F.M.V.; KESHET, G.I.; BLAU, H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779, 2000.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells; cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198-1211, 2005.
- CERVENKA, J. E.; BALLIN, R. Tissue Culture and Chromosomal Analysis of Dental Pulp Cells. *J Dent Res* Vol 53 No. 3, May-June 1974
- CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; *et al.* Functional expression cloning of Nanog; a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-655, 2003.
- CHO, K.J.; TRZASKA, K.A.; GRECO, S.J.; MCARDLE, J.; WANG, F.S.; YE, J.H.; RAMESHWAR, P. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the



- neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells* Mar;23(3):383-91, 2005.
- COUBLE, M.L.; FARGES, J.C.; BLEICHER, F.; PERRAT-MABILLON; BOUDEULLE, M. e MAGLOIRE, H. Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in Explant Cultures. *Calcif. Tissue Int.* 66: 129-938, 2000.
- COWAN, C.A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J.P.; WANG, S.; MORTON, C.C.; MCMAHON, A.P.; POWERS, D.; MELTON, D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med.* Mar 25;350(13):1353-6, 2004.
- CROFT, A.P.; PRZYBORSKI, S.A. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells.* Aug;24(8):1841-51, 2006.
- DENG, J.; PETERSEN, B.E.; STEINDLER, D.A.; JORGENSEN, M.L.; LAYWELL, E.D. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):1054-64. Epub 2005
- DENG, X.L.; SUN, H.Y.; LAU, C.P. e LI, G.R. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 348, Issue 1, 15 Pages 301-309. September 2006.
- DEZAWA, M.; TAKAHASHI, I.; ESAKI, M.; TAKANO, M.; SAWADA, H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Euro J Neurosci* 14:1771-1776, 2001.
- DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C.E.; EGGAN, K. Induced pluripotent

- stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. Aug 29;321(5893):1218-21, 2008.
- DISS, J.K.; FRASER, S.P.; DJAMGOZ, M.B. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys J*. May;33(3):180-93. Epub 2004 Feb 12. Review.
- DRAPER, J.S.; PIGOTT, C.; THOMSOM, J.A. e ANDREWS, P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat. March*; 200(3): 249–258, 2002.
- EGLITIS, M.A.; MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brain of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4080-4085, 1997.
- ERICKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERICKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317, 1998.
- ESTACION, M. Characterization of ion channels seen in subconfluent human dermal fibroblasts. *J Physiol.* ;436:579–601, 1991.
- FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; BILBAUT, G.; DEHAY, C.; SAVATIER, P. e SAMARUT, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cell Science*, Vol 108, Issue 10 3181-3188, 1995
- FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100:143-155, 2000.
- FUJIMURA; J.; OGAWA, R., MIZUNO, H., FUKUNAGA, Y. AND SUZUKI, H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 333:116–121, 2005.

- GALITSKI, T.; SALDANHA, A.J.; STYLES, C.A.; LANDER, C.E.S.; FINK, G.R. Ploidy regulation of gene expression. *Science*. 285(5425):251-4, Jul 9; 1999.
- GALLI, R.; BORELLO, U.; GRITTI, A.; MINASI, M.G.; BJORSON, C.; COLETTA, M.; MORA, M.; DE ANGELIS, M.G.; FIOCCO, R.; COSSU, G.; VESCOVI, A.L. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3:986-991, 2000.
- GANGARAJU, V.K. e LIN, H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 10 Fev. 116-125, 2009.
- GEUNA, S.; BORIONE, M.; FORNARO, M.G.; GIACOBINI-ROBECCHI. Adult stem cells and neurogenesis: historical roots and state of the art. *The Anatomical record* 265:132-141, 2001.
- GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, G.P.; SHI, S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81(8):531-535, 2002.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13625- 13630, 2000.
- GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C.D.; BUZNEY, E.A.; KHAN, M.K.; FLINT, A.F.; KUNKEL, L.M.; MULLIGAN, R.C. Dystrophin expression in he *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394, 1999.
- HARADA, H.; KETTUNEN, P.; JUNG, H.S.; MUSTONEN, T.; WANG, Y.A.; THESLEFF, I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 147:105-120, 1999.

- HERRERA, M.B.; BRUNO, S.; BUTTIGLIERI, S.; TETTA, C.; GATTI, S.; DEREGIBUS, M.C.; BUSSOLATI, B.; CAMUSSI, G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24(12):2840-50, 2006.
- HEUBACH, J.F.; GRAF, E.M.; LEUTHEUSER, J.; BOCK, M.; BALANA, B.; ZAHANICH, I.; CHRIST, T.; BOXBERGER, S.; WETTWER, E.; RAVENS, U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol.* 2004 Feb 1;554 (Pt 3):659-72. Epub Oct 24, 2003.
- HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* Jun;23(6):699-708, 2005.
- HOUGHTON, J.; STOICOV, C.; NOMURA, S.; ROGERS, A.B.; CARLSON, J.; LI, H.; CAI, X.; FOX, J.G.; GOLDENRING, J.R.; WANG, T.C. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004. Nov 26;306(5701):1568-71
- HUANG, A.H.; SNYDER, B.R.; CHENG, P.H.; CHAN, A.W. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* Oct 2008; 26: 2654–2663
- HWANG, N.S.; VARGHESE, S.; ZHANG, Z.; ELISSE, W.F.F.J. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate-modified hydrogels. *Tissue engineering* 12(9):2695-706, 2006.
- IZADPANA, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J.M.; BUNNELL, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived

from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* ;99(5):1285-97 Dec 1 2006..

JACKSON, D.E.; WARD, C.M.; WANG, R.; NEWMAN, P.J. The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 6986-6993, 1997.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, .L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* . 428: 145-150 march 2004.

JONES-VILLENEUVE, E.M.V.; MCBURNEY, M.W.; ROGERS, K.A. e KALNINS, V.I. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells . *J. Cell Biol.* 94, 253-262, 1982.

KADOTA, M.; NISHIGARKI, R.; WANG, C.C.; TODA, T.; SHIRAYOSHI Y.; INOUE T.; GOJOBORI T.; IKEO K.; ROGERS MS E OSHIMURA M. Proteomic signatures and aberrations of mouse embryonic stem cells containing a single human chromosome 21 in neuronal differentiation: an in vitro model of Down syndrome. *Neuroscience* 129 325–335, 2004.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of neural science. 4a Edição. 2000

KANNAGI, R.; COCHRAN, N.A.; ISHIGAMI, F.; HAKOMORI, S.; ANDREWS, P. W.; KNOWLES, B.B. e SOLTER, D. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 2(12): 2355–2361, 1983.

- KARUMBAYARAM, S.; NOVITCH, B.G.; PATTERSON, M.; UMBACH, J.A.; RICHTER, L.; LINDGREN, A.; CONWAY, A.E.; CLARK, A.T.; GOLDMAN, S.A.; PLATH, K.; WIEDAU-PAZOS, M.; KORNBLUM, H.I.; LOWRY, W.E. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):806-11.
- KAWASAKI, H.; SUEMORI, H.; MIZUSEKI, K. *et al.* Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99:1580–1585, 2002.
- KERKIS I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUTKART-PARSON, G.C.; MASSIRONI, S.M.G.; PEREIRA, L.V.; CAPLAN, A.I. e CERRUTI, H.F. Isolation and Characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing oct-4 and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues Organs*, v. 184, p. 105-116, 2007.
- KIM, B.J.; SEO, J.H.; BUBIEN, J.K.; OH, Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport*. 2002;13:1185–1188
- KOTOULA, V.; PAPAMICHOS, S.I.; LAMBROPOULOS, A.F. Revisiting OCT4 Expression in Peripheral Blood Mononuclear *Cells Stem Cells* Vol. 26 No. 1 January; pp. 290 -291, 2008.
- KRABBE, C.; ZIMMER, J. e MEYER, M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review . *APMIS* 113: 831–44, 2005
- KUO, M.Y.; LAN, W.H.; LIN, S.K.; TSAI, K.S.; HAHN, L.J. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol*. Nov 37(11):945-52, 1992.
- KURODA, T.; TADA, M.; KUBOTA, H.; KIMURA, H.; HATANO, S.Y.; SUEMORI, H.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Octamer and Sox elements are required for

- transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.* Mar;25(6):2475-85, 2005.
- LABONNE, C.; BRONNER-FRASER, M. Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;15:81-112, 1999.
- LE BLANC, K.; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K.; ZETTERBERG, E.; RINGDEN, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells *Experimental Hematology*, Volume 31, Issue 10, pp 890-896 Outubro 2003.
- LEE, M.W.; MOON, Y.J.; YANG, M.S.; KIM, S.K.; JANG, I.K.; EOM, Y.; PARK, J.S.; KIM, H.C.; SONG, K.Y.; PARK, S.C.; LIM, H.S. e KIM, Y.J. Neural differentiation of novel multipotent progenitor cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 29;358(2):637-43. Epub May 7, 2007.
- LEE, O.K. KUO, T.K; CHEN, W.M.; LEE, K.D.; HSIEH, S.L.; CHEN, T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, Vol. 103, No. 5, pp. 1669-1675. March, 2004.
- LEE, T.I.; JENNER, R.G.; BOYER, L.A.; GUENTHER, M.G.; LEVINE, S.S.; KUMAR, R.M.; CHEVALIER, B.; JOHNSTONE, S.E.; COLE, M.F.; ISONO, K.; KOSEKI, H.; FUCHIKAMI, T.; ABE, K.; MURRAY, H.L.; ZUCKER, J.P.; YUAN, B.; BELL, G.W.; HERBOLSHEIMER, E.; HANNETT, N.M.; SUN, K.; ODOM, D.T.; OTTE, A.P.; VOLKERT, T.L.; BARTEL, D.P.; MELTON, D.A.; GIFFORD, D.K.; JAENISCH, R.; YOUNG, R.A. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* Apr 21;125 (2):301-13, 2006.

- LI, G.R.; DENG, X.L.; SUN, H.; CHUNG, S.S.; TSE, H.F.; LAU, C.P. Ion Channels in Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow . *Stem Cells* Vol. 24 No. 6 pp. 1519 -1528 June, 2006.
- LI, G.R.; SUN, H.; DENG, X. LAU, C.P. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* Mar; 23(3):371-82, 2005.
- LIEDTKE, S.; ENCZMANN, J.; WACLAWCZYK, S.; WERNET, P.; KÖGLER, G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell*. Oct 11;1(4):364-6, 2007.
- LIU, B.; LIN, X.; CHEN, L. E FANG, Q. The property of ion current in human amniotic mesenchymal stem cell (hAMSC). *IFMBE Proceedings* 19 pp92-94, 2008.
- LIZIER, N. F.; Maranduba CMC ; Fonseca SAS ; KERKIS, I. . Estudo in vitro da fusão celular espontânea de células tronco imaturas da polpa de dente. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia. Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007.
- LOMBET, A.; FRELIN, C.; RENAUD, J. e LAZDUNSKI, M. Na<sup>+</sup> channels with binding sites of high and low affinity for tetrodotoxin in different excitable and non-excitable cells. *European Journal of Biochemistry* 124, 199-203, 1982.
- LU, P.; BLESCHE, A.; TUSZYNSKI, M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation; transdifferentiation, or artifact. *J Neurosci Res*; **77**: 174-191, 2004.
- MACPHERSON, P.A.; JONES, S.; PAWSON, P.A.; MARSHALL, K.C. e MCBURNEY, M.W. P 19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro. *Neuroscience* 80, pp. 487–499, 1997.



- MARESCHI, K.; NOVARA, M.; RUSTICHELLI, D.; FERRERO, I.; GUIDO, D.;  
CARBONE, E.; MEDICO, E.; MADON, E.; VERCELLI, A.; FAGIOLI, F.  
Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for  
expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types  
*Experimental Hematology*, Volume 34, Issue 11, Pages 1563-1572, 2006
- MEZEY, E.; CHADROSS, K.J.; HARTA, G.; MAKI, R.A.; MCKERCHER, S.R. Turning  
blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone  
marrow. *Science* 290:1779-1782, 2000.
- MEZEY, E.; CHANDROSS, K.J. Bone marrow: A possible alternative source of cells  
in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 405:297-302, 2000.
- MIURA, M.S.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L.W.; ROBEY, P.G.;  
SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl  
Acad Sci USA* 100:5807-5812, 2003.
- MOSS, E.G.; TANG, L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its  
developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol*;  
258:432-442, 2003.
- MÜLLER, G.A.; MÜLLER, C.; BOCKHORN, H.; LENHARD, V.; DREIKORN, K.;  
FETTA, R.F.; WILMS, H.; FAßBINDER, W.; GRUMBEL, B.; ALBERT, F.W.;  
EWALD, R.W.; GOLDMANN, S. SPRENGER-KLASSEN I.; FRANZ HE AND  
WERNET P. HLA-DR-MT matching improves graft survival rate in cadaver  
kidney transplantation. *Journal of Molecular Medicine* 61:17-23, 1983.
- MÜLLER-STEINHARDT, M.; FRICKE, L.; KIRCHNER, H.; HOYER, J.; KLÜTER, H.  
Monitoring of anti-HLA class I and II antibodies by flow cytometry in patients  
after first cadaveric kidney transplantation  
*Clinical Transplantation* 14 (1), 85–89, 2000.

- MUNSON, R.; WESTERMARK, B. e GLASER, L. Tetrodotoxin-sensitive sodium channels in normal human fibroblasts and normal human glia-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76, 6425-6429, 1979.
- NOSRAT, I.V.; SMITH, C.A.; MULLALLY, P.; OLSON, L. e NOSRAT, C.A. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro, implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *European Journal of Neuroscience*. Vol 19 pp 2388-2398, 2004.
- NOSRAT, I.V.; WIDENFALK, J.; OLSON, L. e NOSRAT, C.A. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Devel. Biol.* 238: 120-132, 2001.
- ONGANER, P.U.; DJAMGOZ, M.B. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression in vitro. *J Membr Biol.* Mar;204(2):67-75, 2005.
- PAN, G.; THOMSON, J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* Jan;17(1):42-9, 2007.
- PANKRATZ, M.T.; LI, X.J.; LAVAUTE, T.M. *et al.* Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem Cells*; 25: 1511-1520, 2007.
- PARK, K.S., JUNG, K.H., KIM, S.H., KIM, K.S., CHOI, M.R., KIM, Y., CHAI, Y.G. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2044-52.

- PAXINOS, G. Atlas of the developing rat nervous system. ACADEMIC PRESS INC, 1994. Segunda edição
- PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates Amsterdam: Elsevier, 2007. Sexta Edição
- PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*.;19(4):271-8, 2001.
- PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.M.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.; GREENBERGER, G.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170, 1999.
- PITTINGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284: 143- 147, 1999.
- PITTINGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95: 9-20, 2004.
- POCHAMPALLY, R.R.; SMITH, J.R.; YLOSTALO, J.; PROCKOP, D.J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1647-52. Epub Nov 20, 2003.
- POUYSSÉGUR, J.; JACQUES, Y.; LAZDUNSKI, M. Identification of a tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channel in a variety of fibroblast lines. *Nature* 286, 162–164, 1980.

- POZZOBON, M.; PICCOLI, M.; DITADI, A.; BOLLINI, S.; DESTRO, R.; ANDRÉ-SCHMUTZ, I.; MASIERO, L.; LENZINI, E.; ZANESCO, L.; PETRELLI, L.; CAVAZZANA-CALVO, M.; GAZZOLA, M.V.; DE COPPI, P. Mesenchymal stromal cells can be derived from bone marrow CD133<sup>+</sup> cells: implications for therapy. *Stem Cells and Development* pp 1-44, 2008.
- PRZYBORSKI, S.A. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice, *Stem Cells* **23** pp. 1242–1250, 2005.
- RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.*;19:1-22, 2003.
- RICHARD, M.; TAN, S.P.; TAN, J.H.; CHAN, W.K.; BONGSO, A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 2004; 22:51-64
- ROONEY, G.E.; HOWARD, L.; O'BRIEN, T.; WINDEBANK, A.J.; BARRY, F.P. Elevation of cAMP in Mesenchymal Stem Cells Transiently Upregulates Neural Markers rather than Inducing Neural Differentiation. *Stem Cells Dev.* Jun 13, 2008.
- ROSNER, M.H.; VIGANO, M.A.; OZATO, K.; TIMMONS, P.M.; POIRIER, F.; RIGBY, P.W.; STAUDT, L.M. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature.* 1990 Jun 21; 345(6277):686-92
- SANCHEZ-RAMOS, J.R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 880-893

- SCHOPPERLE, W.M. DEWOLF W.C. The TRA-1-60 and TRA-1-81 Human Pluripotent Stem Cell Markers Are Expressed on Podocalyxin in Embryonal Carcinoma. *Stem Cells* Vol. 25 No. 3, pp. 723 -730, March 2007.
- SCHWARTZ, P.H.; BRYANT, P.J.; FUJA, T.J.; SU, H.; O'DOWD, D.K.; KLASSEN, H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res.* Dec 15;74(6):838-51, 2003.
- SECOMBE, J.; PIERCE, S.B.; EISENMAN, R.N. Myc: a weapon of mass destruction. *Cell* 2004; 117:153–6
- SERAKINCI, N.; KEITH, W.N (2006). Therapeutic potencial of adult stem cells. *European Journal of Cancer.* Oxford, England 1990, 42 (9), 1243-6
- SHIBA, H.; NAKAMURA, S.; SHIRAKAWA, M.; NAKANISH.; OKAMOTO, H.; SATAKEDA, H.; NOSHIRO, M.; KAMIHAGI, K.; KATAYAMA, M. e KATO, Y. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 170: 457-466, 1995.
- SOLTER, D.; KNOWLES, B.B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov;75(11):5565–5569, 1978.
- SONG, H.J.; STEVENS, C.F e GAGE, F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neuroscience* 5, 438 - 445, 2002.
- STEWART, R.; PRZYBORSKI, S.A. Non-neural adult stem cells: tools for brain repair? *Bioessays*, 24(8):708-13. Aug 2002.
- STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5 (1):45-54. Review, Jan 2004.

- SUO, G.; HAN, J.; WANG, X.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; ZHAO, Y.; DAI, J. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 2;337(4):1047-51, 2005.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* Nov 30;131(5):861-72, 2007.
- TAKAHASHI, S; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors *Cell*, Volume 126, Issue 4, Pages 663-676, 2006.
- TAO, R.; LAU, C.P.; TSE, H.F.; LI, G.R. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1561-C1567, 2007.
- TAYLOR, M.V. Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol.* 2002 Mar 19;12(6):R224-8. Review, 2002.
- TERADA, N.; HAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI, M.; MASTALERZ, D.M.; NAKANO, Y.; MEYER, E.M.; MOREL, L.; PETERSEN, B.E e SCOTT, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545, 2002.
- THOMAS, S.; THOMAS, M.; WINCKER, P.; BABARIT, C.; XU, P.; SPEER, M.C.; MUNNICH, A.; LYONNET, S.; VEKEMANS, M.; ETCHEVERS, H.C.. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet.* Aug 8, 2008.
- THOMAS, S.; THOMAS, M.; WINEKER, P.; BARABARI, C.; XU, PUTING.; SPEER, MC.; MUNNICH, A.; LYONNET, S.; VEKEMANS, M.; ETCHEVERS, H.C.

- Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Human Molecular Genetics* 1-45, 2002.
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHAL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
- THOMSON, J.R.; GUDAS, L.J. Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene. *Mol Cell Endo* 195:119–133, 2002.
- TOMA, J.G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K.J.L.; BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPPLAN, D.; MILLER, F. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology* Vol. 3. September pp 778-784, 2001.
- TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFTE, M. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319-326, 2004.
- TSUKAMOTO, Y.; FUKUTANI, S.; SHIN-IKE, T.; KUBOTA, T.; SATO, S.; SUZUKI, Y.; MORI, M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* Dec.; 37(12):1045-55, 1992.
- TSUTSUI, T.W.; INABA, T.; FISHER, L.W.; ROBEY, P.G.; TSUTSUI, T. In vitro chromosome aberration tests using human dental pulp cells to detect the carcinogenic potential of chemical agents. *Odontology.* Sep; 94 (1):44-50, 2006.
- VIGNERY, A. (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol.* Oct;81(5):291-304. Review.

- WAGERS, A.J. e WEISSMAN, I. Plasticity of adult stem cell. *Cell*, Vol. 116, 639–648, 2004.
- WANG, H.S.; HUNG, S.C.; PENG, S.T.; HUANG, C.C.; WEI, H.M.; GUO, Y.J.; FU, Y.S.; LAI, M.C.; CHEN, C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22(7):1330-7, 2004.
- WISLET-GENDEBIEN, S.; HANS, G.; LEPRINCE, P.; RIGO, J.M.; MOONEN, G.; ROGISTER, B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 2005 Mar;23(3):392-402, 2005.
- WOODBURY, D.; SCHARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLAK, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364-370, 2000.
- YAMANAKA, S. *Cell*. A fresh look at iPS cells. Apr 3;137(1):13-7, 2009.
- YIN, A.H.; MIRAGLIA, S.; ZANJANI, E.D.; ALMEIDA-PORADA, G.; OGAWA, M.; LEARY, A.G.; OLWEUS, J.; KEARNEY, J. e BUCK, D.W. AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood*, Vol. 90 No. 12: pp. 5002-5012, 1997
- YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G.A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. Dec 21; 318(5858):1917-20, 2007.
- ZANGROSSI, S.; MARABESE, M.; BROGGINI, M.; GIORDANO, R.; D'ERASMO, M.; MONTELATICI, E.; INTINI, D.; NERI, A.; PESCE, M.; REBULLA, P.;



- LAZZARI, L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells*. Jan;26(1):290-1, 2008.
- ZENG, X.; CAI, J.; CHEN, J.; LUO, Y.; YOU, Z.B.; FOTTER, E.; WANG, Y.; HARVEY, B.; MIURA, T.; BACKMAN, C.; *et al.* Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 925–940, 2004.
- ZHONG-WEI DU and SU-CHUN ZHANG. Neural Differentiation from Embryonic Stem Cells: Which Way?. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 13:372-381,2004

# **ANEXOS**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF.CEP/IB/012/2005

São Paulo, 11 de maio de 2005.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto, em reunião realizada em 15 de março de 2005, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa "Caracterização de células-tronco humanas derivadas da polpa do dente de leite" de sua responsabilidade (**Protocolo nº 026/2004**), conforme cópia do Parecer em anexo.

Lembramos que deverão ser apresentados relatórios anual e final.

Atenciosamente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Mae Rita Bu", is written above the typed name.

Prof. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos  
IBUSP

Ilma. Sra.

Prof. Dra. LYGIA DA VEIGA PEREIRA CARRAMASCHI  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

### **PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA**

**PROTOCOLO CEP-IBUSP – 026/2004**

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** “Caracterização de células-tronco humanas derivadas da polpa do dente de leite”

**Pesquisadora Responsável:** Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

**Objetivos do projeto de pesquisa:** 1) Estabelecer linhagens de Células troncos (CT) isoladas da polpa de dentes (de leite e definitivos); 2) Caracterizar essas linhagens quanto a sua capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro*; 3) Analisar a expressão de diferentes marcadores de CTs embrionárias, hematopoiéticas e mesenquimais nas CTs isoladas de polpa de leite e 4) Analisar sua capacidade de formação de tumores quando injetadas em camundongos imuno-suprimidos.

**Local da realização do projeto, duração e financiamento:** O Projeto será realizado na clínica de odontologia CERA, sob a responsabilidade do Dr. Humberto Cerrutti, no Laboratório de Genética-Molecular do Departamento de Biologia do IB-USP e no Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto Butantã, sob a responsabilidade da Dra. Irina Kerkis. Uma parte significativa dos experimentos será financiada pelo Dr. Humberto Cerrutti. Há também financiamento da FAPESP.

**Comentários:** O Projeto científico é interessante e poderá trazer contribuições importantes para o conhecimento científico e de aplicação prática em terapia celular. A metodologia a ser aplicada é adequada para atingir os objetivos propostos; A extração de dentes será realizada na clínica do Dr. Cerrutti, e este é o único responsável por este procedimento. A polpa dentária será coletada apenas de dentes que serão regularmente extraídos por motivos odontológicos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é redigido de forma bastante concisa e de fácil entendimento.

**Considerações:** O projeto apresentado preenche todos os pré-requisitos éticos conforme resolução CNS 196/96. Diante do Exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS – 196/96, aprova o projeto de pesquisa proposto. A pesquisadora responsável deverá apresentar, ao CEP, relatórios anual e final.

**Situação: Projeto APROVADO.**

São Paulo, 18 de Março de 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Rita dos Santos e Passos Bueno".

Prof. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos  
IBUSP