

VANESSA PENNA

**ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO TGF β /BMP, MATRIZ EXTRACELULAR E
MOLÉCULAS DE ADESÃO DECORRENTE DA PASSAGEM
CELULAR EM CULTURA PRIMÁRIA DE hDPSC.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal De São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO
2014**

VANESSA PENNA

ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO TGF β /BMP, MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO DECORRENTE DA PASSAGEM CELULAR EM CULTURA PRIMÁRIA DE hDPSC.

Dissertação apresentada à Universidade Federal De São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

COORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. MONICA TALARICO DUAILIBI

Prof^ª.Dr^ª. MONICA VANNUCCI N. LIPAY

SÃO PAULO

2014

Penna, Vanessa.

Alteração da expressão gênica das vias de sinalização TGF β /BMP, matriz extracelular e moléculas de adesão decorrente da passagem celular em cultura primária de hDPSC. /Vanessa Penna – São Paulo, 2014. xvii, 99f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Alteration of gene expression of signaling TGF β / BMP pathways, extracellular matrix and adhesion molecules due to cell passage in hDPSC primary culture.

1. Engenharia Tecidual. 2. Cultura Celular Primária. 3. Matriz Extracelular. 4. Fator de crescimento transformador beta. 5. Proteína Morfogenética Óssea. 6. Interação Célula-Célula.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

Primeiramente agradeço a **DEUS** pela minha existência, por tudo o que tenho e o que sou, por ser um motivador da minha coragem e superação, e por me inspirar a ajudar o próximo ao invés de me lamentar pelas dores do mundo.

À minha mãe **CLEIDE SEGA**, minha companheira e defensora incansável, aquela que acredita em mim mais do que eu mesma, não mede esforços para me ajudar na procura da felicidade e me ensina a ser persistente e corajosa.

Ao meu pai **NILO PENNA JÚNIOR**, pelo estímulo à ciência, filosofia, ética, empatia e compaixão. Por me ensinar a comer muito sal, chocolate e leite ninho em papinha.

A minha irmã **NILEIDE PENNA GARRIDO**, que não me bateu mesmo quando eu fui a caçula chata, minha fonte de inspiração, meu jato propulsor, a única que conhece minha alma, essencial em momentos decisivos da minha vida, que me deu as duas sobrinhas mais lindas do mundo e me lembra de quem eu sou quando eu esqueço.

Aos meus avôs **MAFALDA JORGE, ANTONIO SEGA, ZULEIKA F. PENNA E NILO PENNA**, por me ensinar o que é sabedoria, humildade, luta pela vida, bondade, respeito (menos no truço que vale roubar), a jogar xadrez (me deixando ganhar quase sempre) e a tocar piano repetindo 1000 vezes no primeiro mês qual era o “Dó da chavinha”.

Aos meus padrinhos **SUZI M. CAMARGO e ANTONIO ODUVALDO SEGA**, por cumprirem tão maravilhosamente o papel de pai e mãe do coração sempre que eu precisei, pelos ensinamentos de vida com palavras e acima de tudo, com atitudes humanas.

Aos amigos **“FILÓSOFOS DA COPA”** pelos papos diários nos nossos almoços sobre origem do universo, entropia, moléculas pensantes, computadores que dominarão o mundo e pela abertura da hipótese de estarmos vivendo uma vida imaginária, como um vídeo game (e que o jogador responsável por mim é realmente ruim) e não, não usamos drogas.

Aos amigos da faculdade de Biotecnologia, **FERNANDA NEDEL**, **SAMUEL RIBEIRO** e **DANIELE MASIERO**, que me ensinaram a acreditar em mim, em meus sonhos e ideais, me mostraram toda a bondade e algumas tradições Gaúchas, além de como preparar um belo chimarrão. Sem dúvida, graças a vocês, o Rio Grande do Sul roubou meu coração. Em especial a **FERNANDA MARTINS RODRIGUES** por todas as dúvidas tiradas via Skype, por todos os arquivos enviados para o meu aperfeiçoamento, por ser essa amiga tão querida que me deu asas.

Aos amigos (mais do que professores) **ANTONIO DÉGAS** e **MONIQUE MATSUDA** por serem os grandes culpados do caminho que eu escolhi na pesquisa. Vocês mudaram o rumo da minha vida.

Aos meus inseparáveis amigos de longos anos, presentes em tantos momentos bons e ruins, que me inspiram, ajudam, me trazendo vida e alegria: **ERIKA ALVES DE CAMPOS**, **JULIANA CAMPOS**, **GUILHERME FERRI**, **RAFAEL IANOTTI**, **JOICE MEDINA**, **SUELLEN SLIDVAIN**, **TATIANA ZEMLIANAIA**, **CARLOS EDUARDO AFONSO**, **INGRID VELASQUES**, **LEANDRO RAMOS**, **LUCIANA MENDES** (nova agregada para mim), **RENATA LINS**, **FERNANDA RIBEIRO**, **VIVIANE NUNES** e **ALINE LOURENÇO**.

Em especial às minhas amigas **CARLA GARCIA**, **JULIANA LINHART** e **MARIANA OLIVEIRA** que tiveram presenças marcantes nas minhas mais difíceis decisões e nos mais difíceis momentos de vida. Tenho uma sorte imensa de ter (com certeza comprovada) tantos amigos do bem, verdadeiros e para qualquer ocasião, que iriam ao meu encontro a qualquer momento com um simples chamado. Vocês não fazem idéia do papel que tiveram para me manter em pé, sã e alegre durante meus desafios de vida, e por me lembrarem de quem eu sou e do meu valor quando eu me esquecia.

À minha querida amiga e professora de inglês **LIEGE F. BARBOSA**, por toda sua paciência, competência e bondade.

Agradeço a todos que participaram dos meus dias durante este mestrado: **SÉRGIO** e **GERÔNIMO** da segurança do CTCMol, **IVANETE** da esterilização, **MARCINHA** da limpeza e dos cafés que salvam vidas, **MAGALI** e **SANDRA** técnicas sempre dispostas a nos fazer rir e **JOÃO** do biotério.

Por último e de forma muito especial à minha coorientadora **MONICA VANNUCCI N. LIPAY**, pessoa por quem eu tenho grande carinho e admiração, presente em todos os momentos decisivos e críticos, pessoais e profissionais.

Meus mais sinceros agradecimentos

Ao meu orientador **SILVIO EDUARDO DUAILIBI** e minha coorientadora **MONICA TALARICO DUAILIBI**, pelos grandes ensinamentos, oportunidades, cuidados (diversas vezes como uma família, inclusive nas brigas) e por me inspirar a crescer sempre mais, a fazer ciência pelo bem do próximo e a deixar a imaginação fluir.

À minha também coorientadora **MONICA VANNUCCI N. LIPAY**, que foi essencial para que esse trabalho se concretizasse. Você me deu segurança enquanto eu aprendia a dar os primeiros passos nos experimentos e me ensinou quase toda a biologia molecular que conheço.

À Professora **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela oportunidade de estar aqui junto a profissionais, acadêmicos e docentes que admiro e respeito, e pela luta constante para a formação de grandes cientistas.

Ao Professor **MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pelo apoio e incentivo aos docentes, alunos e todos os participantes das atividades ligadas ao programa.

As amigas, de participação diária, que esse mestrado me trouxe: **NATASHA MACHADO** e **JENNIFER SANTOS**. Vocês me ensinaram tudo o que sei sobre o dia a dia do laboratório de Engenharia Tecidual, estiveram juntas mesmo “só” para fazer companhia ou dar um apoio moral nos experimentos, seguraram lágrimas, barras, desesperos e me ajudaram, literalmente, a caminhar para as aulas da pós-graduação.

Aos amigos de mestrado, de participação semanal, e não menos importantes: **RANI MORETTI** e **PAULO OLIVEIRA**. De maneira especial a **LUCIANA IWAMOTO** por quem eu tenho um carinho e admiração especial por sua bondade, humanidade, sensibilidade e garra.

As “amigas dos outros labs”, como costume dizer, por toda a ajuda em relação a procedimentos, teorias, empréstimos de materiais e risadas: **CAMILA FERREIRA**, **CARLA LONGO**, **GRACIELE OLIVEIRA** e **HELOÍSA ROSA**. Em especial agradeço a **BIANCA F. ZANETTI**, dona de um coração e uma inteligência enorme, que me ajudou de maneira especial durante meu projeto, tornou-se uma amiga verdadeira, sempre pronta a ensinar, ajudar e comer pizza.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**, pelas grandes contribuições em minha formação, pelos ensinamentos que promoveram e estimularam o desenvolvimento de minha capacidade intelectual.

À **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste projeto.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo financiamento desta pesquisa (processo n° 2013/00288-4).

"Somos assim: sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Mas é isso que tememos: o não ter certezas. Por isso trocamos o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram."

Fiódor Dostoiévski

"O que realmente conta nessa vida não é apenas o fato de termos vivido; é a diferença que fizemos nas vidas dos outros que determina a importância de nossa própria vida."

Nelson Mandela

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	ix
EPÍGRAFE.....	xii
LISTAS.....	xviii
RESUMO.....	xxvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA.....	8
3.1 ENGENHARIA TECIDUAL.....	9
3.2 MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	10
3.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	13
3.3.1 VIA DE SINALIZAÇÃO TGF β /BMP.....	13
3.4 GENES DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	15
3.4.1 <i>TIMPI</i> – INIBIDOR 1 DA METLOPEPTIDASE.....	15
3.4.2 <i>THBS1</i> - TROMBOSPODINA 1.....	16
3.4.3 <i>TGFBI</i> - FATOR DE CRESCIMENTO, BETA INDUZIDO.....	16
3.4.4 <i>NCAM1</i> - MOLÉCULA 1 DE ADESÃO CELULAR NEURAL.....	17
3.4.5 <i>ITGA8</i> - INTEGRINA, ALFA 8.....	17
3.4.6 <i>FNI</i> - FIBRONECTINA 1.....	17

3.4.7	<i>COL16A1</i> - COLÁGENO TIPO XVI, ALFA 1.....	18
3.4.8	<i>CD44</i>	19
3.5	GENES DA VIA TGF β /BMP.....	19
3.5.1	<i>TSC22D1</i> - FAMÍLIA DOMÍNIO TSC22 MEMBRO 1.....	20
3.5.2	<i>ID1</i> - INIBIDOR DE LIGAÇÃO 1 DO DNA.....	20
3.5.3	<i>BGLAP</i> (OSTEOCALCINA).....	21
3.5.4	<i>RPL13A</i> - PROTEÍNA RIBOSSOMAL L13A.....	21
4.	MÉTODOS.....	23
4.1	DESENHO DE PESQUISA.....	24
4.1.1	ASPÉCTOS ÉTICOS	24
4.2	AMOSTRAS	24
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	26
4.4	CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....	26
4.5	CULTURA CELULAR.....	26
4.6	PROLIFERAÇÃO CELULAR E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE.....	27
4.7	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	28
4.8.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	29
4.8.1	EXTRAÇÃO DO RNA.....	29
4.8.2	QUANTIFICAÇÃO DO RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	30
4.8.3	<i>REAL TIME PCR ARRAYS</i>	30

4.9 ANÁLISE DE RESULTADOS.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR E MORFOLOGIA.....	34
5.1.1 AMOSTRA 1 – CULTIVADA	34
5.1.2 AMOSTRA 2 – CULTIVADA.....	37
5.1.3 AMOSTRA 3 – CULTIVADA.....	39
5.1.4 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS.....	42
5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR PCR <i>ARRAY</i>	45
5.2.1 <i>ARRAY</i> DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOL. DE ADESÃO.....	47
5.2.1.1 GENE <i>COL16A1</i>	47
5.2.1.2 GENE <i>TIMP1</i>	47
5.2.1.3 GENE <i>THBS1</i>	48
5.2.1.4 GENE <i>TGFBI</i>	48
5.2.1.5 GENE <i>NCAM1</i>	49
5.2.1.6 GENE <i>ITGA8</i>	49
5.2.1.7 GENE <i>FNI</i>	50
5.2.1.8 GENE <i>CD44</i>	50
5.2.2 <i>ARRAY</i> TGF β /BMP.....	51
5.2.2.1 GENE <i>BGLAP</i>	51
5.2.2.2 GENE <i>IDI</i>	51

5.2.2.3 GENE <i>TSC22D1</i>	52
5.2.2.4 GENE <i>RPL13A</i>	52
6. DISCUSSÃO.....	53
6.1 GENE <i>TIMP1</i>	55
6.2 GENE <i>THBS1</i>	56
6.3 GENE <i>TGFBI</i>	58
6.4 GENE <i>NCAM1</i>	59
6.5 GENE <i>ITGA8</i>	60
6.6 GENE <i>FNI</i>	61
6.7 GENE <i>COL16A1</i>	62
6.8 GENE <i>CD44</i>	63
6.9 GENE <i>TSC22D1</i>	64
6.10 GENE <i>IDI</i>	65
6.11 GENE <i>BGLAP</i>	66
6.12 GENE <i>RPL13A</i>	67
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS.....	72
NORMAS ADOTADAS.....	82
ABSTRACT.....	83

APÊNDICES.....	85
ANEXOS.....	95
FINANCIAMENTO.....	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem..... 35
- Figura 2.** Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL..... 36
- Figura 3.** Gráficos da amostra 1, mostrando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir)..... 36
- Figura 4.** Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem..... 37
- Figura 5.** Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 40 mL..... 38
- Figura 6.** Gráficos da amostra 2, mostrando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir)..... 39
- Figura 7.** Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem..... 39
- Figura 8.** Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL..... 41
- Figura 9.** Gráficos da amostra 3, mostrando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir)..... 41

Figura 10. Fotos da cultura celular em 1º passagem, 2º passagem e 3º passagem. Aumento de 10x.....	42
Figura 11. Confocal da cultura celular de 3º passagem de todas as amostras.....	43
Figura 12. Gráficos comparativo das amostras apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 1º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 1º passagem (dir).....	43
Figura 13. Gráficos comparativo das amostras apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 2º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 2º passagem (dir).....	44
Figura 14. Gráficos comparativo das amostras apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 3º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 3º passagem (dir).....	44
Figura 15. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>COL16A1</i> (dir).....	47
Figura 16. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>TIMPI</i> (dir).....	47
Figura 17. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>THBS1</i> (dir).....	48
Figura 18. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>TGFBI</i> (dir).....	48
Figura 19. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>NCAMI</i> (dir).....	49
Figura 20. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>ITGA8</i> (dir).....	49

Figura 21. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>FNI</i> (dir).....	50
Figura 22. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>CD44</i> (dir).....	50
Figura 23. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>BGLAP</i> (dir).....	51
Figura 24. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>IDI</i> (dir).....	51
Figura 25. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>TSC22D1</i> (dir).....	52
Figura 26. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene <i>RPL13A</i> (dir).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado dos genes que se apresentaram significativamente distintos..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BGLAP- Proteína Óssea que contém ácido Gama-Carboxiglutâmico

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

CD44- Glicoproteína de superfície celular

cm³- Centímetros Cúbicos

CO₂- Dióxido de Carbono

COL16A1- Colágeno tipo XVI, Alfa 1

CTCMol- Centro de Terapia Celular e Molecular

DMEN- Meio Dulbecco Modificado por Eagle

ET – Engenharia Tecidual

FBS- Soro Fetal Bovino

FNI- Fibronectina 1

°C- Graus Celcius

Ham's F12 – Nutriente para Meio de Cultura

HBSS – Solução Salina Balanceada de Hank

hDPSC- Células Tronco de Polpa Dental Humana

ICC- Interação Célula-Célula

IDI- Inibidor 1 de Ligação do DNA

INFAR – Instituto de Farmacologia

ITGA8- Integrina, Alfa 8

MAPK – Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos

MEC- Matriz Extra Celular

µg – Micrograma

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MMP – Metaloproteínases

NCAM1- Molécula de Adesão Celular Neural 1

nM- Nanômetro

PBS- Tampão Fosfato Salino

% - Porcentagem

PS- Proteínas de Superfície

RPL13A- Proteína Ribossomal L13A

SMAD - Família de proteínas envolvidas na translocação de sinais dos receptores do TGF-beta e BMP

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF β – Fator de Transformação do Crescimento Beta

TGFBI- Fator de Crescimento, Beta Induzido

THBS1- Trombospondina 1

TIMP1 – Inibidor 1 da Metalopeptidase

TSC22D1- Família Domínio TSC22 Membro 1

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

TERMOS SEM TRADUÇÃO PARA O PORTUGUÊS

Arrays – Grupo de genes estudados em um mesmo ensaio

Fold change - Variação da expressão gênica em relação a um gene constitutivo.

Housekeeping - Genes de controles endógenos.

Scaffold - Arcabouço 3D no qual as células podem ser semeadas.

Real Time PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Threshold – Sinal de fluorescência ao atingir um limiar

Well-plates - placa com múltiplos poços para cultura celular

RESUMO

Introdução: A Engenharia Tecidual (ET) tem como objetivo a fabricação de órgãos e tecidos. Preconiza-se o uso de células autólogas para evitar a incompatibilidade imunológica, porém, pela escassez do número de células obtidas na fonte celular, muitas passagens se tornam necessárias para atingir um número adequado de células. As culturas primárias freqüentemente sofrem diferenciação indesejada, modificando o comportamento e o destino celular. O uso de enzimas proteolíticas durante as passagens celulares é potencialmente lesivo à fisiologia celular, todavia pouca relevância tem sido dada a este aspecto na ET. Essas enzimas, ao digerir a matriz extracelular (MEC), também alteram proteínas de superfície (PS), interferindo na interação célula-célula (ICC). Conseqüentemente podem alterar a sinalização celular, a expressão gênica, o comportamento e o destino. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica na via de sinalização TGF β /BMP, em matriz extracelular e em moléculas de adesão, das células tronco mesenquimais de polpa dental humana (hDPSC) obtidas diretamente do tecido e sob cultura primária até a terceira passagem. **Métodos:** Foi analisada a expressão gênica por *qRT-PCR array* da via de sinalização TGF β /BMP, matriz extracelular e moléculas de adesão após três passagens celulares na cultura primária de hDPSC. **Resultados:** Os genes *COL16A1*(p=0,045), *TIMP1*(p=0,003), *THBS1*(p=0,027), *TGFBI*(p=0,001), *ITGA8*(p=0,002), *FNI*(p=0,035), *CD44*(p=0,046), *TSC22D1*(p=0,026) e *RPL13A*(p=0,017) tiveram sua expressão aumentada e os genes *NCAMI*(p=0,047), *BGLAP*(p=0,037) e *IDI*(p=0,027) tiveram sua expressão diminuída em relação às células de tecido de origem. **Conclusão:** Houve alteração da expressão gênica na cultura celular de hDPSC após três passagens. Porém, um gene solitariamente pode não exercer função chave na diferenciação de células, influenciada pela relação com a MEC e com o ambiente extracelular. O controle por modulação da diferenciação celular representa um aspecto importante no desenvolvimento da ET.

Palavras chave: Matriz extracelular, Cultura celular primária, Engenharia Tecidual, Fator de crescimento transformador beta, Proteína morfogenética óssea e Interação célula-célula.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é uma ciência multidisciplinar que envolve, dentre várias especialidades, a Biologia Molecular e Celular, Engenharia, Física e Química, visando o desenvolvimento tecnológico necessário para substituição ou reparação de órgãos e tecidos ausentes ou comprometidos por lesões ou doenças (LANGER & VACANTI, 1999).

Diversos métodos são utilizados pela ET, dentre eles, o uso de *scaffolds* semeados por células. O *scaffold* tem o papel de um arcabouço, que fornecerá uma estrutura mecânica tridimensional (3D) com a função de matriz extracelular. Este pode ser fabricado com materiais reabsorvíveis ou integráveis, dentre outros. O *scaffold* é semeado por células previamente a implantação *in vivo* para dar sustentação às células e evitar a desagregação destas, após implantação.

Por experiência laboratorial, estima-se que seja necessário semear 20 milhões de células por cm^3 de *scaffold*. Com a necessidade da utilização de um número elevado de células e uma fonte celular escassa, é necessário um tempo elevado de cultura celular, e diversas passagens, para expansão do número dessas.

Células autólogas são importantes fontes para a ET por evitar a incompatibilidade imunológica, porém, existe o desafio de manter as características expressas no tecido ou órgão de origem ao expandir o número de células em cultura. Esse desafio decorre do fato de que os

protocolos de processamento, expansão e purificação necessários para o uso destas células ainda não estão estabelecidos (KELM & FUSSENEGGER, 2010).

A cultura celular está em constante evolução e desenvolvimento, desta maneira, todos os materiais e processos são freqüentemente melhorados e reavaliados. Os plásticos de cultura atuais permitem uma adesão celular mais eficiente, a composição dos meios de cultura e seus suplementos são pesquisados de maneira incansável por influenciar diretamente a viabilidade, diferenciação, sinalização e proliferação celular (CURI *et al.*, 2007; DEBERARDINIS & THOMPSON, 2012). Além disso, os métodos de desagregação usados nas passagens celulares, como enzimas proteolíticas, tendem a ser repensados.

A cultura celular visa garantir o crescimento e proliferação *in vitro*, porém, os métodos tradicionais que utilizam enzimas proteolíticas, tais como a tripsina, destroem a interação célula-célula (ICC) e proteínas de superfície (PS) (YANG *et al.*, 2012). A matriz extracelular (MEC), PS e a ICC tem uma importância fundamental na sinalização, mas esse mecanismo ainda não é bem compreendido. Estudos apontam a interação imediata de receptores com o citoesqueleto, núcleo e nucléolo e a influencia da adesão celular na translocação de fatores de crescimento para o núcleo (FELDHERR & AKIN, 1993; MANIOTIS *et al.*, 1997; GUILLAME-GENTIL *et al.*, 2010). Além disso, nos tecidos e órgãos, a interação entre as células ocorrem por meio de receptores, freqüentemente PS que interagem com seus ligantes extracelulares. Esses ligantes podem ser glicanos, fatores de crescimento, proteínas, bem como células vizinhas. Em muitos casos, essa ligação desencadeia vias de sinalização específicas e tem efeito profundo no destino e no comportamento celular (GUILLAME-

GENTIL *et al.*, 2010), o qual é regulado por sinais do ambiente extracelular que podem dirigir estas células para proliferação, diferenciação, migração ou apoptose (HATA *et al.*, 2009; GUILLAME-GENTIL *et al.*, 2010).

A interação entre as células e o ambiente é essencial para a expressão e controle genético, bem como para o fenótipo e conseqüentemente destino celular (MARGUERAT & BÄHLER, 2010; GUILLAME-GENTIL *et al.*, 2010).

Neste contexto geral, a importância da MEC e moléculas de adesão tem sido pouco consideradas nas pesquisas que envolvem cultura celular e o uso freqüente da tripsina não é considerado como possível modificador do comportamento e destino celular em cultura.

Dentre os diversos tipos celulares cultivados rotineiramente, as células mesenquimais extraídas de polpa dental humana de jovens ou adultos (hDPSC) tem potencial para terapias regenerativas por demonstrar grande capacidade de diferenciação *in vitro* em diversos tecidos como dentina, nervo e endotélio vascular (DUAILIBI *et al.*, 2006).

A estimulação da via TGF β é importante para a manutenção e expansão das células mesenquimais progenitoras. Além disso, pela estimulação das vias Smad2/3 e MAPK estas células são comprometidas a diferenciação em osteoblastos. Há ainda uma cooperação da via TGF β com sinalizadores BMP (MASSAGUÉ, 2012). A via de sinalização TGF β /BMP tem um papel muito bem estabelecido na formação óssea durante o desenvolvimento embrionário e a alteração do controle desta via tem sido associadas a diversas doenças ósseas (CHEN *et al.*, 2012).

Entender o comportamento destas células em cultura e controlá-lo é necessário para manter as características do ambiente tecidual na cultura,

quando o objetivo final é o uso destas células na terapia clínica segura dos substitutos biológicos (DUAILIBI *et al.*, 2012).

Para isso, compreender as modificações de expressão gênica decorrentes do período de cultura auxiliará no desenvolvimento desta padronização, bem como criará parâmetros para a avaliação celular pré-implantação clínica.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a expressão gênica da via de sinalização TGF β / BMP e de matriz extracelular e moléculas de adesão nas culturas primárias de hDPSC até terceira passagem.

3. LITERATURA

3.1 ENGENHARIA TECIDUAL

LANGER & VACANTI (1999) estudaram a ET, descrevendo que a reparação de tecidos perdidos requer uma estrutura de reposição, seja por próteses ou enxertos teciduais. Segundo os autores, a ET é uma alternativa que está tornando-se viável aos estudos clínicos com a substituição de tecido vivo por tecido vivo, desenvolvido e construído especialmente para as necessidades de cada paciente.

HUTMACHER *et al.* (2001) descreveram que as terapias em uso atualmente, além de caras, apresentam complicações como: a imperfeição na adaptação tecidual de um órgão transplantado e a necessidade de medicamentos imunossupressores. Os autores relatam que estas complicações se resolverão somente quando os tecidos humanos, específicos para estes pacientes, puderem ser desenvolvidos de modo que cresçam e se adaptem funcionalmente.

STOCK & VACANTI (2001) consideraram que a ET evitaria riscos como rejeição pelo simples fato de poder utilizar células autólogas.

DUAILIBI *et al.* (2006) revisaram as perspectivas para a substituição biológica dental pela ET e demonstraram a presença de células-tronco no tecido pulpar de dentes permanentes em estágios iniciais de desenvolvimento. Estas células apresentam potencial para terapias regenerativas por demonstrar grande capacidade de diferenciação *in vitro* em diversos tecidos como dentina, nervo e endotélio vascular, além disso, podem ser utilizadas na geração esmalte, osso alveolar e cimento. Em estudos realizados, mostraram a presença das estruturas dentais desenvolvidas por ET utilizando marcadores celulares específicos (amelogenina, sialoproteína dentinária, vimentina) de células-tronco dentárias, mostraram a diferenciação celular destas em trabalhos anteriores (DUAILIBI *et al.*, 2004) e sua confirmação em estudo realizado posteriormente (DUAILIBI *et al.*, 2008).

3.2 MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO

MANIOTIS *et al.* (1997) relataram que as células vivas e o núcleo são fortemente interligados de tal modo que, uma tração mecânica aplicada aos receptores de superfície celular podem mudar imediatamente a organização molecular no citoplasma e núcleo. Ligações moleculares entre integrinas, filamentos do citoesqueleto e arcabouço nuclear podem proporcionar uma maneira de transferir mecanicamente sinais através das células, bem como um mecanismo para produção de mudanças integradas na célula e estrutura nuclear em resposta a mudanças na adesividade da MEC.

Os trabalhos de LELIÈVRE & BISSELL (1998), LELIÈVRE *et al.* (1998, 2000), NELSON & BISSEL (2006) e SPENCER *et al.* (2010) mostraram que a ideia de que os *scaffolds* celulares servem somente como veículo passivo com o qual estuda-se a relação entre expressão gênica e função celular tornou-se ultrapassada. É evidente atualmente que o microambiente celular contribui com os domínios de sinalização complexas espacial e temporalmente, dirigindo o fenótipo celular. Os trabalhos mostram que o fenótipo pode suplantar o genótipo através, simplesmente, da interação com a MEC. Desta maneira, a célula não pode mais ser pensada como uma entidade solitária definida por seu genoma, mas sim avaliada no contexto da MEC, fatores de crescimento solúveis, hormônios e outras pequenas moléculas que regulam órgãos, organismos, formações e funções.

BIRGERSDOTTER *et al.* (2005) esclarecem que a dinâmica do ambiente extracelular dirige a cascata de sinalização intracelular que influencia no destino do fenótipo através da alteração da expressão gênica e finalmente da proteína.

DALEY *et al.* (2008) descrevem a MEC como uma arquitetura complexa de proteínas estruturais, tais como fibronectina, colágeno e laminina que fornecem as propriedades mecânicas da matriz. As modificações do ambiente são transmitidas para as células por meio da ligação entre as integrinas na superfície celular e as proteínas da matriz. Os proteoglicanos hidratados preenchem o espaço intersticial nessa matriz, sequestrando biomoléculas solúveis: fatores de crescimento, pequenas

glicoproteínas que ligam-se as integrinas e proteínas da matriz. As células dinamicamente reestruturam o microambiente para liberação das moléculas sinalizadoras e para a migração ou acomodação celular. Esse mecanismo funciona através de proteínas que clivam a matriz, como as metaloproteinases (MMP's) e pela deposição dos componentes da matriz, tudo regulado pelas vias de sinalização mediadas pela integrina.

PARKER & KOHLER (2010) relatam que os glicanos de superfície celular são mediadores de diversas interações receptor-ligante. Recentemente demonstrou-se que diversas enzimas extracelulares naturalmente produzidas alteram a estrutura dos glicanos e conseqüentemente, suas propriedades de ligação. Isso causa uma mudança dos sinais transduzidos, reforçando a importância das interações receptor-ligante no destino e comportamento celular.

GUILLAME-GENTIL *et al.* (2010) descreveram que o destino celular é regulado por sinais do ambiente extracelular, direcionando quando ocorrerá a divisão, a diferenciação, migração ou morte. Receptores celulares específicos interagem com proteínas, glicanos, fatores solúveis, bem como as células vizinhas e guiam o destino celular, deixando clara a importância da conservação da MEC e receptores celulares.

HUANG *et al.* (2010) estudaram as alterações proteômicas provocadas por tripsinização das células. Os resultados demonstraram 36 proteínas que foram diferentemente expressas nas células tratadas com

tripsina. Proteínas ligadas à regulação do metabolismo, do crescimento, do transporte de elétrons pela mitocôndria e adesão celular foram menos expressas e proteínas que regulam apoptose celular foram mais expressas.

3.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO

Em organismos multicelulares, é essencial que as células se comuniquem, possibilitando ações coordenadas. Essa comunicação se dá através de moléculas sinalizadoras (ligantes) que determinada célula produz e coloca no meio extracelular para serem então percebidas por outras células, por meio dos seus receptores. A comunicação pode ser feita também pelo contato entre os receptores e ligantes de células próximas entre si, sem que o ligante tenha que ser colocado no meio extracelular. A ligação receptor-ligante desencadeia vias de sinalização específicas e direciona o destino e o comportamento celular (GUILLAME-GENTIL *et al.*, 2010). Diversas vias de sinalização existem em uma célula e cada uma, direciona para um comportamento específico.

3.3.1 VIA DE SINALIZAÇÃO TGF β / BMP

De acordo com MASSAGUÉ (2012), a partir de 1980 iniciou-se uma maior procura pela compreensão da via TGF β . Até então, não era bem compreendido como essa via poderia inibir a proliferação celular, mas também promover o seu crescimento, ou mesmo acelerar a pluripotência de célula-tronco, mas também a sua diferenciação. Elucidou-se que a via de sinalização TGF β pode guiar diferentes respostas, até opostas, dependendo do tipo celular e das condições envolvidas. Por exemplo, a abundância, a atividade e a combinação de diferentes ligantes de TGF β , bem como, seus

receptores e reguladores, determinarão a intensidade dos sinais enviados ao núcleo. Além disso, o panorama geral epigenético de cada célula ditará sua susceptibilidade a determinado estímulo de acordo, por exemplo, com o padrão de eucromatina dessa célula, ou seja, de cada gene disponível para ser expresso. A via de sinalização TGF β também regula a expressão de componentes da MEC como: Colágeno, fibronectina, proteoglicanos e receptores transmembrânicos. O autor ainda ressalta que o comportamento das células em resposta a ativação da via TGF β apóia-se também no citoesqueleto e na mecanotransdução de sinais e no contato célula-célula, e que esses mecanismos não-transcricionais ainda precisam ser mais estudados.

CHEN *et al.* (2012) elucidam que a estimulação parácrina e autócrina promovida pelo TGF- β é importante para a manutenção e expansão das células-tronco mesenquimais, que são progenitoras dos osteoblastos. Além disso, há uma cooperação entre TGF- β e BMP na diferenciação de osteoblastos, por exemplo: TGF- β 1 estimula fortemente a formação ectópica de osso induzida por BMP-2, porém, se esse estímulo é feito somente por BMP-2, o volume ósseo formado é cinco vezes menor, demonstrando assim, uma forte conexão entre a sinalização de TGF- β 1 e BMP na diferenciação de células em osteoblastos. O desequilíbrio da sinalização TGF/BMP tem sido associada a diversas doenças ósseas e todas estas conexões e conhecimentos tem sido importantes para o campo da ET.

3.4 GENES DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO

Dos 84 genes analisados (Apêndice 4) no presente estudo, oito genes apresentaram diferença significativa em sua expressão. Uma revisão da literatura de cada um destes foi realizada. Até o presente momento a literatura dos genes em questão no tipo celular de interesse para este estudo é muito escassa.

3.4.1 *TIMP1* – INIBIDOR 1 DA METALOPROTEINASE

GONG *et al.* (2013) estudaram a expressão do gene *TIMP1* no estroma de células de próstata humana e de câncer de colo. O autor concluiu que o aumento da expressão do gene *TIMP1* promovia crescimento *in vivo* em ambos os tipos de câncer.

ABDULLAH *et al.* (2014) compararam a cultura de células tronco de dentes decíduos esfoliados e de polpa dental de dentes permanentes extraídos. O gene *TIMP1* teve sua expressão aumentada de forma significativa em dentes decíduos esfoliados.

ROCHA *et al.* (2014) avaliaram o secretoma de células de medula óssea durante os primeiros passos da diferenciação dessas em condrócitos. O estudo revelou o aumento de *TIMP1* nas células em processo de diferenciação condrocitária.

3.4.2 *THBS1*- TROMBOSPONDINA 1

QIAN & TUSZYNSKI, (1996) afirmaram que o gene *THBS1* é uma das proteínas mais secretadas por plaquetas humanas e um componente de MEC de uma grande variedade de células. Essa proteína mostra-se muito expressa em tecidos malignos e promove adesão de células tumorais na metástase e angiogênese. Essa proteína tem um papel importante na progressão tumoral.

MOTEGI *et al.*,(2008) estudaram a ação o gene *THBS1* de maneira dose-dependente na migração de células humanas endoteliais. Concluiu que esse gene não apresentou efeitos nas células tumorais para inibição de metástase.

JOHN *et al.*,(2009) avaliaram os efeitos de *THBS1* na expressão do gene *TIMP1* em adenocarcinoma de células humanas mamárias e de câncer de próstata e concluíram que o gene *THBS1* influencia o balanço entre metaloproteinases de matriz e seus inibidores, interferindo na progressão de tumores.

BALEY DUBOSE *et al.*, (2012) estudaram a função do gene *THBS1* para capacidade de bloquear células de medula óssea em cultura a se diferenciar em odontoblastos via regulação de $TGF\beta$. Os autores demonstraram a influência crítica do gene *THBS1* na diferenciação odontoblastica.

3.4.3 *TGFBI*- FATOR DE CRESCIMENTO, BETA INDUZIDO

YU *et al.*, (2012) mostraram o papel do gene *TGFBI* por meio da interrupção desse gene em ratos. O autor concluiu a importância deste gene para o tamanho e massa de ossos em formação.

3.4.4 NCAM1- MOLÉCULA DE ADESÃO CELULAR NEURAL 1

SHI *et al.*, (2012) estudaram o gene *NCAM* em células mesenquimais estromais de medula óssea de ratos e demonstrou seu papel na migração e diferenciação osteogênica destas células.

GNANAPAVAN *et al.*, (2013) utilizaram modelo *in vitro* de esclerose múltipla para investigar o papel da *NCAM* na progressão da doença e demonstrou que a depleção de *NCAM* é associada a progressão da doença.

3.4.5 ITGA8- INTEGRINA, ALFA 8

GAHMBERG *et al.*, (2009) em um trabalho de revisão, concluíram um papel complexo das integrinas. Estas proteínas agem bi-direcionalmente, por meio da sinalização extra-celular para o meio intra-celular e vice-versa.

3.4.6 FNI- FIBRONECTINA 1

MOURSI *et al.*, (1997) testaram por meio de imunocitoquímica a hipótese do efeito da fibronectina na osteogênese via interação com a integrina em células de tecido calvarial em fetos de camundongo e em cultura de osteoblastos em vários estágios de diferenciação. Concluiu-se que a ligação entre fibronectina e integrina é requerida para a morfogênese óssea e para a diferenciação odontoblástica.

GLOBUS *et al.*, (1998) em revisão citam o papel da fibronectina na adesão, diferenciação e função de células aderentes de várias origens. Além disso, para determinar a função da fibronectina para a sobrevivência de osteoblastos, cultura celular de osteoblastos tratadas com antagonistas de fibronectina foram realizadas e determinou-se o papel fundamental da fibronectina na sobrevivência osteoblástica.

KIM *et al.*, (2012) realizaram uma análise proteômica em células tronco mesenquimais de microvasos humanos e demonstrou o aumento de FN1 em processos de diferenciação osteoblástica.

3.4.7 COL16A1- COLÁGENO TIPO XVI, ALFA 1

LAI & CHU, (1996) examinaram o colágeno XVIA1 por imunocitoquímica e hibridização *in vitro* em tecidos de ratos adultos e em embriões de ratos em desenvolvimento. O estudo demonstrou que esse colágeno é amplamente distribuído em MEC e contribui para a integridade estrutural de diversos tecidos.

RATZINGER *et al.*, (2011) demonstraram que o colágeno tipo XVI é muito expresso em áreas de epitélio da mucosa oral em pacientes com carcinoma de células escamosas e leva a proliferação deste fenótipo celular.

GRASSEL & BAUER, (2013) em seu trabalho de revisão descrevem que colágeno age como uma proteína adaptadora conectando e organizando a comunicação de fibras alongadas e assim modulando a integridade e estabilidade da MEC. Alterações nos níveis de colágeno XVI aparentemente promove tumorigenese e perpetuam alterações inflamatórias.

3.4.8 CD44

LEONARDI *et al.*, (2006) pesquisaram por imunohistoquímica a presença de CD44 em seis dentes pré-molares extraídos de crianças e encontrou essa proteína em odontoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal e cementoblastos. Os autores concluem que a proteína CD44 possivelmente está envolvida em diferenciação das células dentais e na interação com a MEC.

CHEN *et al.*, (2013) estudaram dez dentes terceiros molares de humanos com formação incompleta de raiz para realizar imunohistoquímica para CD44. Células *knockdown* para CD44 foram cultivadas e transplantadas na região subcutânea de ratos imunocomprometidos para compreender melhor sua função. Concluiu-se que CD44 tem um papel essencial para mineralização inicial de dentes e estruturas associadas.

3.5 GENES DA VIA TGF β /BMP

Dos 84 genes analisados (Apêndice 4) no presente estudo, quatro genes apresentaram diferença significativa em sua expressão. Uma revisão da literatura de cada um destes foi realizada. Até o presente momento a literatura dos genes em questão no tipo celular de interesse para este estudo é muito escassa.

3.5.1 *TSC22D1*- FAMÍLIA DOMÍNIO TSC22 MEMBRO 1

SHIBANUMA *et al.*, (1992) trataram osteoblastos de ratos com TGF- β 1 por duas horas e verificou que o gene *TSC-22* foi ativado por essa indução. A indução foi rápida e transiente, atingindo o pico em duas horas.

KESTER *et al.*, (1999) utilizaram um modelo de levedura para mostrar que a proteína TSC-22 forma um heterodímero por meio do seu domínio leucina-zíper e tem atividade repressora da transcrição ao ligar-se com o DNA.

HOMIG-HOLZEL *et al.*, (2011) demonstraram um aumento de mais de 100 vezes na expressão gênica de *TSC22D1* em células humanas de fibroblastos e melanócitos induzidos a senescência, sugerindo que esse gene tenha um papel na indução da apoptose celular.

3.5.2 *ID1*- INIBIDOR 1 DE LIGAÇÃO DO DNA

QIAN & CHEN *et al.*, (2008) descrevem o gene *ID1* como inibidor da diferenciação e ligação ao DNA, com um importante papel na proliferação celular, diferenciação e tumorigênese. Além disso, descrevem que o gene *ID1* é diminuído em diversos tipos de câncer em humanos e o seu aumento é correlacionado com um prognóstico ruim. Os autores pesquisaram a comunicação do gene *ID1* com *p53*. Foi mostrado que o *ID1* mostrou-se diminuído, de uma maneira dependente da *p53*, em células tratadas com agentes que danificam o DNA e que o aumento de *ID1* diminuiu a morte por senescência induzida nas células com danos ao DNA.

MACIEJEWSKA *et al.* (2014) avaliaram o impacto da expressão de *IDI* na diferenciação de células tronco de polpa dental e observaram que o aumento de *IDI* resultava em um aumento na expressão gênica de sialoproteínas de dentina e de proteínas de matriz dentinária 1, o que indica uma diferenciação odontogênica destas células. A diminuição de *IDI* tem o efeito oposto, diminuindo a velocidade de diferenciação das células tronco de polpa dental. Os autores salientam que esse gene pode ser usado como marcador importante da diferenciação do tipo celular em questão, pela ET.

3.5.3 *BGLAP* (OSTEOCALCINA)

LEE *et al.*, (2007) descrevem que a regulação do remodelamento de ossos por hormônios adipocitários infere que o osso pode exercer um controle na homeostase energética. Eles testaram essa hipótese em osteoblastos e mostram que ratos que não expressão a osteocalcina desenvolviam intolerância a glicose e resistência a insulina. Os autores concluem que o tecido ósseo exerce uma regulação autócrina da homeostase do metabolismo do açúcar.

3.5.4 *RPL13A*- PROTEÍNA RIBOSSOMAL L13A

STUDER *et al.*, (2012) testaram sete genes referência para células mesenquimais de medula óssea durante a expansão em adip, condro e osteogênese, por quatro passagens. Os genes foram *GAPDH*, *RPL13A*, *ACTB*, *YWHAZ*, *EF1 α* , *B2M*, e *18S*. Os resultados mostram que o gene *RPL13A* pode e deve ser usado como referência para esse tipo celular.

ZHOU *et al.*, (2014) cita que o qRT-PCR é uma das técnicas mais usadas para avaliar a expressão de genes e que requer uma normalização apropriada para resultados confiáveis, porém, muitos genes usados como referência para o cálculo destes resultados sofrem regulação e podem trazer alterações nos dados finais. Os autores testaram 20 genes usados para referência em placa terminal vertebral humana e confirmam a necessidade de explorar genes confiáveis de forma tecido-específica, pois, alguns genes de referência tiveram sua expressão regulada.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DA PESQUISA

O presente estudo apresenta caráter primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado e de centro único, desenvolvido no laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação da UNIFESP.

4.1.1 ASPECTOS ÉTICOS

Contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos, o presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – CEP/UNIFESP, com parecer nº 81404/12, obedecendo a Resolução 196/96.

A concordância da participação no estudo foi previamente concedida pelo sujeito ou seu responsável legal, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE (ANEXO I).

4.2 AMOSTRAS

As amostras de células humanas foram obtidas a partir do explante do tecido não mineralizado (células tronco de polpa dental humana-hDPSC) de três terceiros molares de doadores voluntários atendidos em

órgãos de saúde públicos ou consultórios particulares, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico. Os dentes inclusos com indicação clínica de extração foram cirurgicamente removidos, sob anestesia local com Mepivacaína, de acordo com o protocolo descrito por TORRES *et al.* (2010). Os dentes foram transportados em meio de preservação HBSS, sob a temperatura de 37°C até o laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação no Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP, local de realização dos estudos.

A separação do tecido não mineralizado foi realizada em placa de Petri, com auxílio de lâminas de bisturi número 15. Metade da polpa foi utilizada como controle e a outra metade foi cultivada até terceira passagem, como mostra o fluxograma (Apêndice 1). O tecido que se destinou às culturas foram fragmentados em dimensões de 1mm e transferidos para *well-plates* previamente submetidos ao tratamento de superfície adequado, sendo FBS (Soro Fetal Bovino). Este procedimento de obtenção dos explantes foi realizado em câmara de fluxo laminar, de acordo com o protocolo utilizado por DUAILIBI *et al.* (2004) e DUAILIBI *et al.* (2008). O tecido controle foi imediatamente colocado em um tubo de congelamento preenchido com Qiasol e congelado em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA e análise da expressão gênica do tecido *in vivo*, ou seja, não cultivado.

Foram utilizados no presente estudo três dentes terceiros molares, separados em dois grupos, células primárias, obtidas diretamente da separação da polpa dental, e células obtidas dessa separação, porém, submetidas a cultivo celular por três passagens. Tem-se então, um total de seis amostras.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados candidatos a participação no presente estudo os pacientes com terceiros molares inclusos (intra-ósseo) com indicação clínica de remoção, de ambos os gêneros, com idade entre 14 e 20 anos por apresentar nesta faixa etária, células mais novas e adequadas à pesquisa (DUAILIBI *et al.*, 2011). Os pacientes não deveriam apresentar doenças sistêmicas e possuíam os terceiros molares em estágio 2-3 segundo a classificação de DUAILIBI *et al.* (2011). Os pacientes concordaram com a participação voluntária assinando o TCLE.

4.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Não foram incluídos os pacientes com utilização crônica de medicação, cirurgias com indicação de odontosseção ou desgaste coronário, portadores de doenças infecto-contagiosas ou anomalias dentárias de qualquer natureza, terceiros molares com exposição coronária, contaminados ou próximos a regiões contaminadas.

4.5 CULTURA CELULAR

O meio de cultura utilizado foi composto por DMEN/HAM'S F12 1:1 (Dulbecco's Modified Eagle's médium/ Ham's F-12 nutrient mixture), suplementado com 5% de FBS 0,5% de penicilina e streptomicina. As

hDPSC permaneceram em incubadora umidificada, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) na temperatura de 37°C. A troca do meio de cultura ocorreu a cada três dias. As hDPSC foram cultivadas até a confluência celular e então tripsinizadas conforme o protocolo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação (Apêndice 2).

4.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE

As células hDPSC em cultura, após confluência, foram tripsinizadas (Apêndice 2) e em seguida foi realizada a homogeneização do *pellet* formado em meio de cultura. O volume de 10 microlitros foi retirado deste concentrado celular e misturado com o mesmo volume do corante azul de Tripan a 0,4% e homogeneizado novamente. Dez microlitros da solução corada foram transferidos para o espaço destinado na *chamber slide*. A amostra foi introduzida no contador de células automático (Countess – Invitrogen®, Califórnia, EUA), que calculou a quantidade de células totais, vivas e mortas. Este procedimento foi realizado após a expansão celular e após todas as tripsinizações.

Para identificação das células vivas, mortas, totais e para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular, o contador automático leva em consideração a coloração do núcleo celular. O corante *trypan blue* só é capaz de penetrar na membrana celular e corar o núcleo de células mortas ou em apoptose, sendo assim, as células com o núcleo corado são consideradas mortas.

As células, após contagem, são transferidas para outras garrafas de cultura dando continuidade a proliferação celular. Foram realizadas três passagens celulares nos três grupos amostrais cultivados.

As células foram fotografadas em seu local de incubação sob microscopia óptica invertida (Carl Zeiss®) com auxílio do *Software AxioVison*® 4.1 - Germany.

4.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.

Por meio da microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser foram avaliadas a mitocôndria, estruturas do citoesqueleto e núcleo, nas células em cultura, na terceira passagem. No fundo das placas de *well plate* de 6 poços, foram introduzidas lamínulas de 25x25 mm para o crescimento e adesão celular.

Para a identificação das estruturas foram utilizados os marcadores *Hoechst* na concentração de 4µg/ml durante 15 minutos para a coloração do núcleo (azul), *Mitotracker* na concentração de 5 nM durante 10 minutos para as mitocôndrias (vermelho) e *Alexa Fluor 1:500* durante 40 minutos para o citoesqueleto (verde). A incubação dos marcadores foi realizada ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As avaliações das células coradas foram realizadas em Microscópio Confocal Zeiss – LSM, no Instituto de Farmácia (INFAR) da UNIFESP.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.8.1 EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA total do tecido da polpa dental foi isolado utilizando o reagente Qiazol lysis®- Qiagen (Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O bom maceramento do tecido da polpa dental é necessário para uma melhor extração de RNA e pode ser facilitado pela mistura do Qiazol com gotas de nitrogênio líquido, em um cadinho. Após esse maceramento o tecido é levado a microtubos de plástico de 2mL e adiciona-se clorofórmio. Será observada uma separação de fases e a fase aquosa transparente superior possui o RNA que foi isolado, de acordo com o protocolo do fabricante.

O RNA total da cultura celular (3^o passagem) foi isolado utilizando o reagente RNEasy Mini Kit - Qiagen (Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Nesse kit as células lisadas em um tubo Falcon são transferidas para uma coluna (fornecida pelo kit) e após adição dos reagentes presentes no kit, na sequência determinada pelo fabricante, o RNA ficará retido nesta coluna e poderá ser retirado e ressuspensionado com a adição de água DNase free. É importante que a ressuspensão seja feita com o mínimo de água requerida (30µL), pois, é mais fácil realizar a diluição de uma amostra muito concentrada, do que o oposto.

A contaminação por DNA genômico, se existente, foi solucionada pelo tratamento com DNase I, utilizando o Kit RNase Free DNase set – Qiagen (Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após mistura dos reagentes e da quantidade requerida de RNA, essa

amostra é levada para incubação de 20-30°C por 15 minutos. Após o procedimento deve ser quantificada novamente.

4.8.2 QUANTIFICAÇÃO DO RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A quantificação de RNA foi medida pelo NanoDrop – Thermofisher (USA). A relação 260nm/280nm foi usada para avaliar a pureza da RNA. Uma relação 260/280 acima de 2.0 é considerada e aceita como uma boa qualidade de pureza de RNA.

O cDNA foi sintetizado com o RT² First Strand Kit- Qiagen (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram previamente tratadas com DNase (fornecido no kit), incubando-as a 42°C por 5 minutos e logo após são transferidas para o gelo por pelo menos 1 minuto. Após esse tratamento, misturou-se de os reagentes do kit (5x Buffer BC3, Control P2, RE3 Reverse Transcriptase Mix, RNase-free water), de acordo com o protocolo do fabricante, com 0,8 µg de RNA (quantidade recomendada para os *arrays* utilizados e especificados no item 4.8.3). É necessária a utilização de um termociclador em 42°C por 15 minutos e 95°C por 5 minutos. Os cDNAs foram mantidos a -20°C.

4.8.3 REAL TIME PCR ARRAYS

Foi utilizado o array *Human TGFβ/ BMP Pathway* Qiagen - RT² Profiler PCR array (PAHS-035ZR-12), o qual contém 84 genes da via em questão (Apêndice 4) e *Human Extracellular Matrix and Adhesion*

Molecules Qiagen - *RT² Profiler PCR array* (PAHS-013ZR-12), o qual contém 84 genes (Apêndice 4) de MEC e moléculas de adesão. Os *arrays* foram utilizados em combinação com o RT2 SYBR Green Mastermixes – Qiagen (Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado no Rotor-Gene cycler – Qiagen (Hilden, Alemanha) com as seguintes condições de ciclagem: 1) 10 minutos a 95°C; 2) 15 segundos a 95°C, e 30 segundos a 60°C por 40 ciclos; e 3) temperatura final mantida em 4°C.

Cinco genes de controles endógenos presentes no *array* de PCR foram usados para normalização dos resultados. Eles são: *B2M* (ID: 567, localização: 15q21-q22.2), *HPRT1* (ID: 3251, localização: Xq26.1), *RPL13A* (ID: 23521, localização: 19q13.3), *GAPDH* (ID: 2597, localização: 12p13) e *ACTB* (ID: 60, localização: 7p22).

4.9 ANÁLISE DE RESULTADOS

Os resultados da expressão gênica foram calculados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ gerado pelo *RT² Profiler PCR Array Rotor Gene Data Analysis*- SABiosciences (Maryland-USA), programa padrão disponível na internet para análise dos *Arrays* que foram escolhidos para o presente estudo.

As variações da expressão gênica entre os grupos controle (tecido de polpa dental) e os grupos experimentais (cultivados até terceira passagem) são mostrados como aumento ou diminuição da denominada *fold change*

que demonstra a variação da expressão gênica em relação a um gene constitutivo.

A expressão gênica relativa dos genes alvos são normalizados com os 5 genes citados no item 4.9.3 B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH e ACTB, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e dados como proporção em comparação com o controle. Detalhes no apêndice 3.

A localização da threshold no *array* de TGF β /BMP foi 0,1045 e no *array* de matriz extracelular e moléculas de adesão foi de 0,0854.

O valor de p teve seu cálculo baseado no teste t de Student dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das replicadas para cada gene no grupo controle e experimental. Foram considerados valores de p menores de 0,05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Um dente terceiro molar, de três pacientes distintos, no estágio dois segundo a classificação de DUAILIBI *et al.* (2011) foram utilizadas no presente estudo. Cada polpa dental foi separada em dois grupos: células usadas como controle, as quais tiveram seu RNA extraído para avaliação da expressão gênica *in vivo*, e células obtidas dessa separação, porém, submetidas a cultivo celular por três passagens. Tem-se então, um total de seis amostras, três controles e três cultivadas.

5.1 PROFIFERAÇÃO CELULAR E MORFOLOGIA

As três amostras tiveram um padrão de normalidade de hDPSC na morfologia, proliferação e viabilidade. O tempo de confluência e número de células apresentaram variações em decorrência do número de explantes que efetivamente liberaram células para o plástico de cultura.

5.1.1 AMOSTRA 1 - CULTIVADA

A morfologia das células mostrou-se dentro da normalidade de células tronco mesenquimais de polpa dental (hDPSC). A Figura 1 apresenta as fotos da cultura celular obtidas na primeira, segunda e terceira passagem celular e na microscopia confocal da terceira passagem. Essa apresentou padrões de normalidade morfológica de núcleo, citoesqueleto e mitocôndria

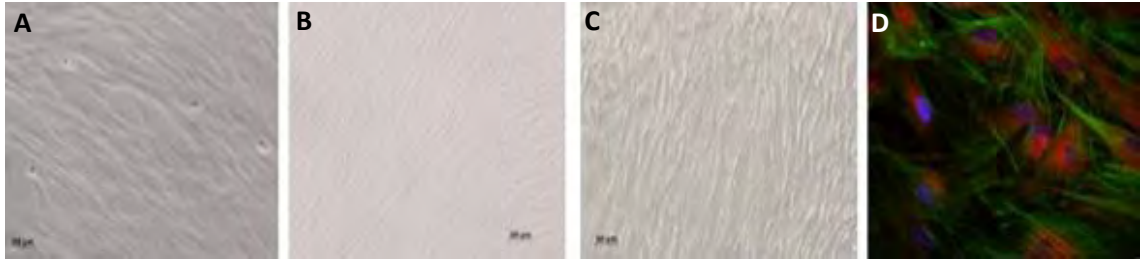


Figura 1. Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem.

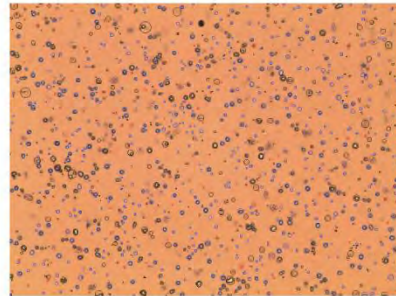
A confluência da primeira passagem celular ocorreu em 28 dias. O número total de células foi de $1,2 \times 10^7$, sendo $1,1 \times 10^7$ viáveis e $1,4 \times 10^6$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 89%.

A confluência da segunda passagem celular ocorreu em 22 dias. O número total de células foi de $5,7 \times 10^7$, sendo $5,4 \times 10^7$ viáveis e $3,5 \times 10^6$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 94%.

A confluência da terceira passagem celular ocorreu em 32 dias. O número total de células foi de $1,7 \times 10^8$, sendo $1,5 \times 10^8$ viáveis e $1,4 \times 10^7$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 92%. Detalhes da contagem automática da terceira passagem são mostrados na Figura 2. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL.

A visão geral da proliferação celular e da viabilidade da amostra 1 nas três passagens é mostrada na Figura 3.

File Name : SMLB 3P 32D MES DT28 ST3 VANESSA 30ML
Date : Feb. 17, 2014 13:33

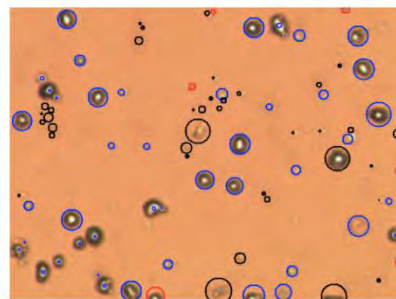


Results

Total cell concentration : 5.8×10^6 cells/mL
Viable cell concentration : 5.3×10^6 cells/mL
Dead cell concentration : 4.7×10^5 cells/mL
Viability : 92%
Average viable cell size : 12.0 μ m
Average dead cell size : 8.5 μ m
Total Cells Counted : 1146
Viable Cells Counted : 1053
Dead Cells Counted : 93

Parameters applied

Sensitivity : 95.0
Min Cell Size : 5 μ m
Max Cell Size : 13 μ m
Circularity : 80
Gating Applied: 5 μ m - 20 μ m



Cell Size Graph

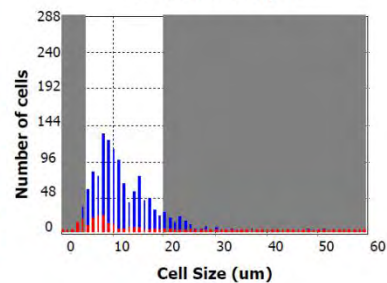


Figura 2. Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL.

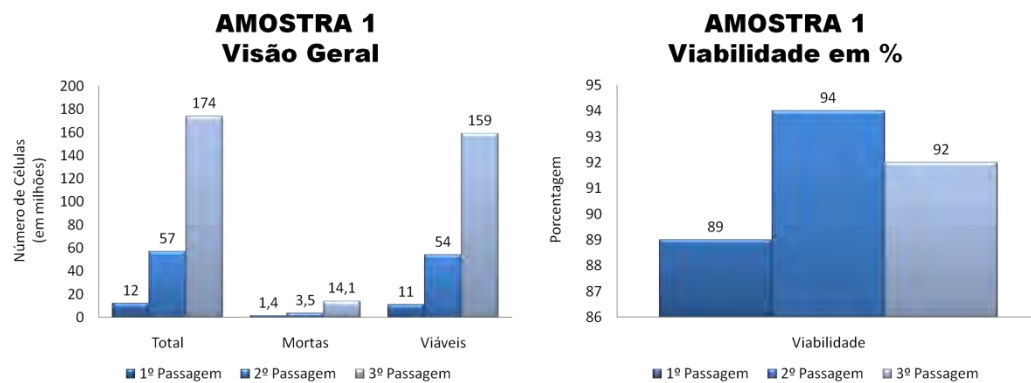


Figura 3. Gráficos da amostra 1, apresentando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir).

5.1.2 AMOSTRA 2 - CULTIVADA

A morfologia celular mostrou-se dentro da normalidade encontrada em células tronco mesenquimais de polpa dental (hDPSC). A Figura 4 apresenta as fotos obtidas na primeira, segunda e terceira passagem celular e na microscopia confocal da terceira passagem. Essa apresentou padrões de normalidade morfológica de núcleo, citoesqueleto e mitocôndria

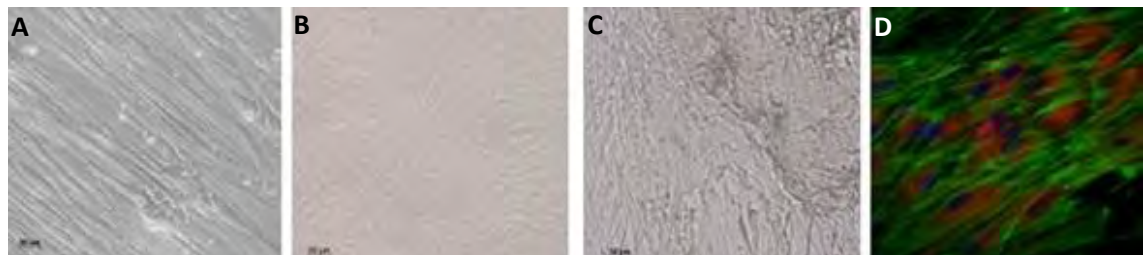


Figura 4. Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem.

A confluência da primeira passagem celular ocorreu em 52 dias. O número total de células foi de $4,3 \times 10^7$, sendo $3,9 \times 10^7$ viáveis e $4,3 \times 10^6$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 90%.

A confluência da segunda passagem celular ocorreu em 23 dias. O número total de células foi de $1,5 \times 10^8$, sendo $1,4 \times 10^8$ viáveis e $1,7 \times 10^7$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 89%.

A confluência da terceira passagem celular ocorreu em 32 dias. O número total de células foi de $1,8 \times 10^8$, sendo $1,6 \times 10^8$ viáveis e $1,6 \times 10^7$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 91%. Detalhes da contagem automática da terceira passagem são mostrados na Figura 5. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e

desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 40 mL.

A visão geral da proliferação celular e da viabilidade da amostra 2 nas três passagens é mostrada na Figura 6.

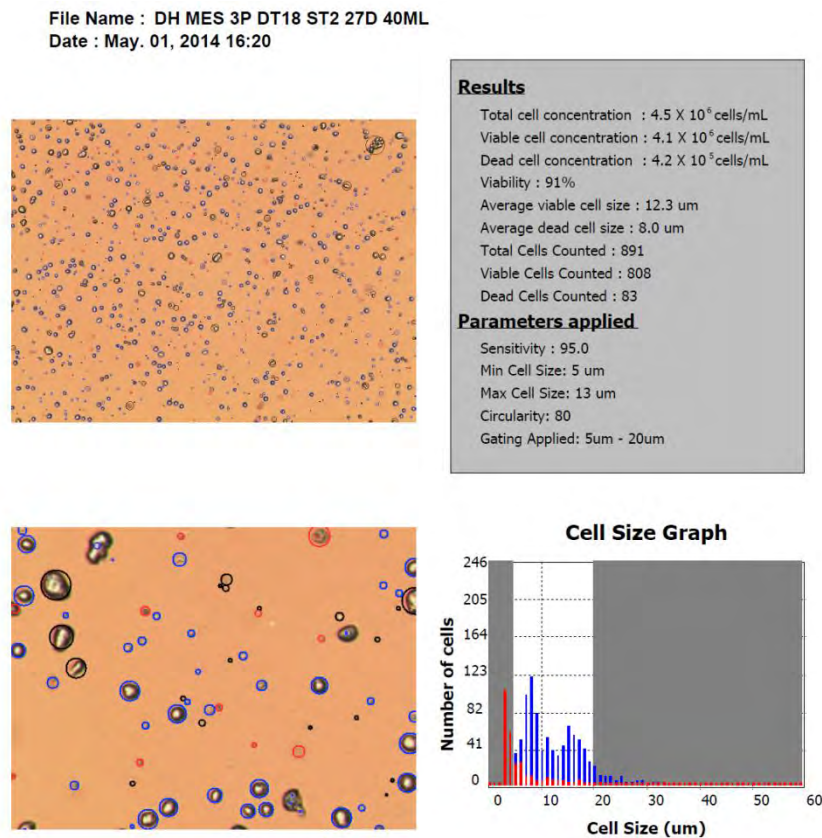


Figura 5. Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 40 mL.

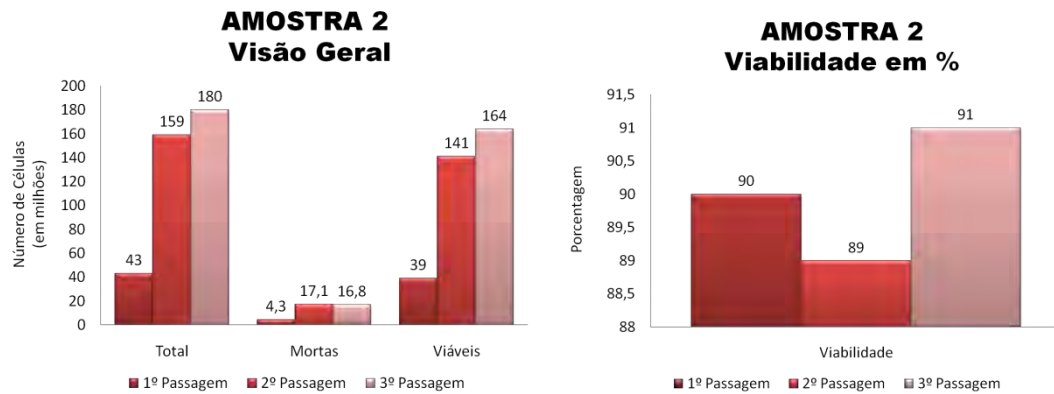


Figura 6. Gráficos da amostra 2, apresentando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir).

5.1.3 AMOSTRA 3 - CULTIVADA

A morfologia celular mostrou-se dentro da normalidade de células tronco mesenquimais de polpa dental (hDPSC). A Figura 7 apresenta as fotos obtidas na primeira, segunda e terceira passagem celular e na microscopia confocal da terceira passagem. Essa apresentou padrões de normalidade morfológica de núcleo, citoesqueleto e mitocôndria

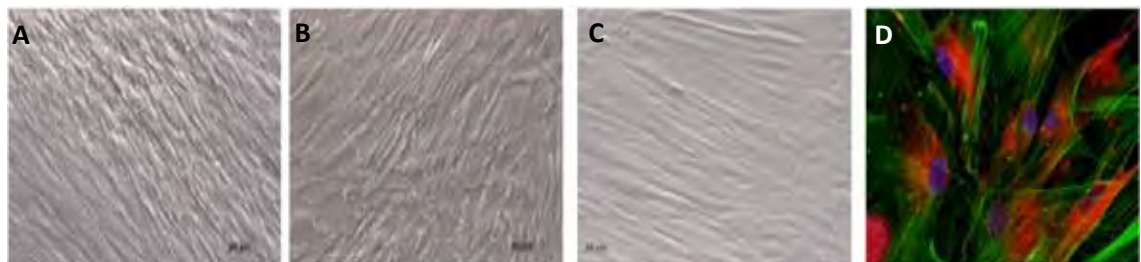


Figura 7. Fotos **A-** Cultura celular 1º passagem, aumento de 10x. **B-** Cultura celular 2º passagem, aumento de 10x. **C-** Cultura celular 3º passagem, aumento de 10x. **D-** Confocal da cultura celular 3º passagem.

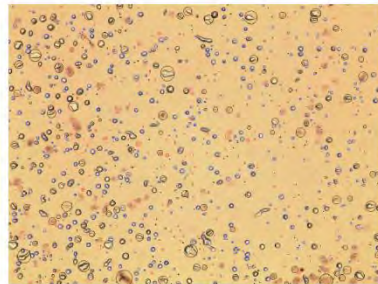
A confluência da primeira passagem celular ocorreu em 48 dias. O número total de células foi de $1,4 \times 10^7$, sendo $1,3 \times 10^7$ viáveis e $9,1 \times 10^5$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 94%.

A confluência da segunda passagem celular ocorreu em 23 dias. O número total de células foi de $6,3 \times 10^7$, sendo $5,4 \times 10^7$ viáveis e $8,9 \times 10^6$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 86%.

A confluência da terceira passagem celular ocorreu em 30 dias. O número total de células foi de $1,5 \times 10^8$, sendo $1,2 \times 10^8$ viáveis e $2,9 \times 10^7$ consideradas mortas. A viabilidade celular foi de 81%. Detalhes da contagem automática da terceira passagem são mostrados na Figura 8. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL.

A visão geral da proliferação celular e da viabilidade da amostra 3 nas três passagens é mostrada na Figura 9.

File Name : CCSN D18 30ML ST3 MES 3P 30D
Date : Sep. 05, 2014 16:22

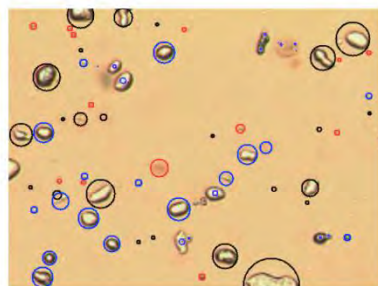


Results

Total cell concentration : 5.1×10^6 cells/mL
Viable cell concentration : 4.1×10^6 cells/mL
Dead cell concentration : 9.8×10^5 cells/mL
Viability : 81%
Average viable cell size : 11.7 μ m
Average dead cell size : 5.8 μ m
Total Cells Counted : 1003
Viable Cells Counted : 808
Dead Cells Counted : 195

Parameters applied

Sensitivity : 95.0
Min Cell Size : 5 μ m
Max Cell Size : 13 μ m
Circularity : 80
Gating Applied : 4 μ m - 19 μ m



Cell Size Graph

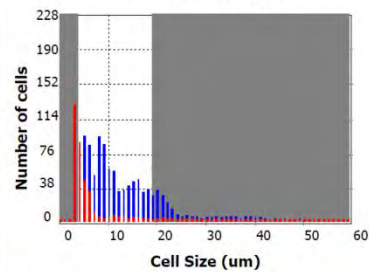


Figura 8. Foto da contagem automática. Células consideradas vivas são circuladas em azul, mortas vermelho e desconsideradas em preto. O resultado gerado é dado em mL, porém, o valor total é de 30 mL.

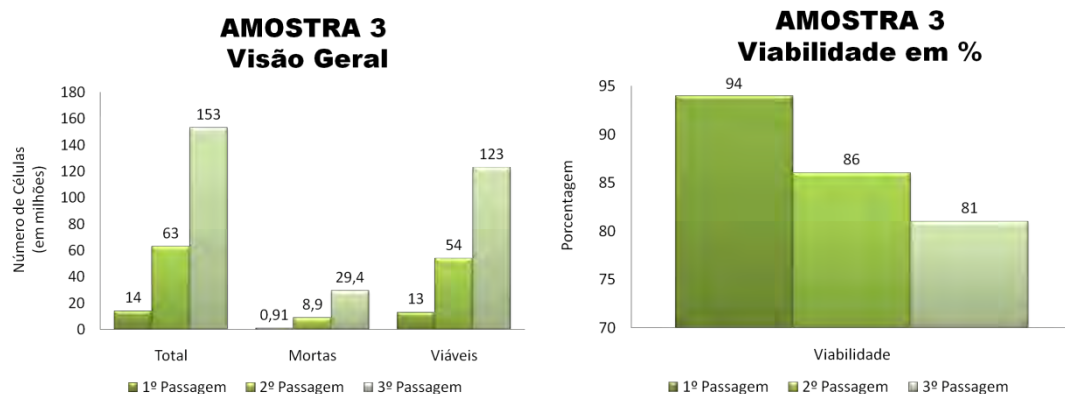


Figura 9. Gráficos da amostra 3, apresentando o número de células totais, mortas e vivas nas três passagens (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, nas três passagens (dir).

5.1.4 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS

A comparação morfológica entre as amostras é mostrada nas figuras 10 e 11 a seguir. A morfologia de todas as amostras são semelhantes e dentro da normalidade.

Gráficos de comparação das amostras em todas as passagens são mostrados nas figuras 12, 13 e 14.

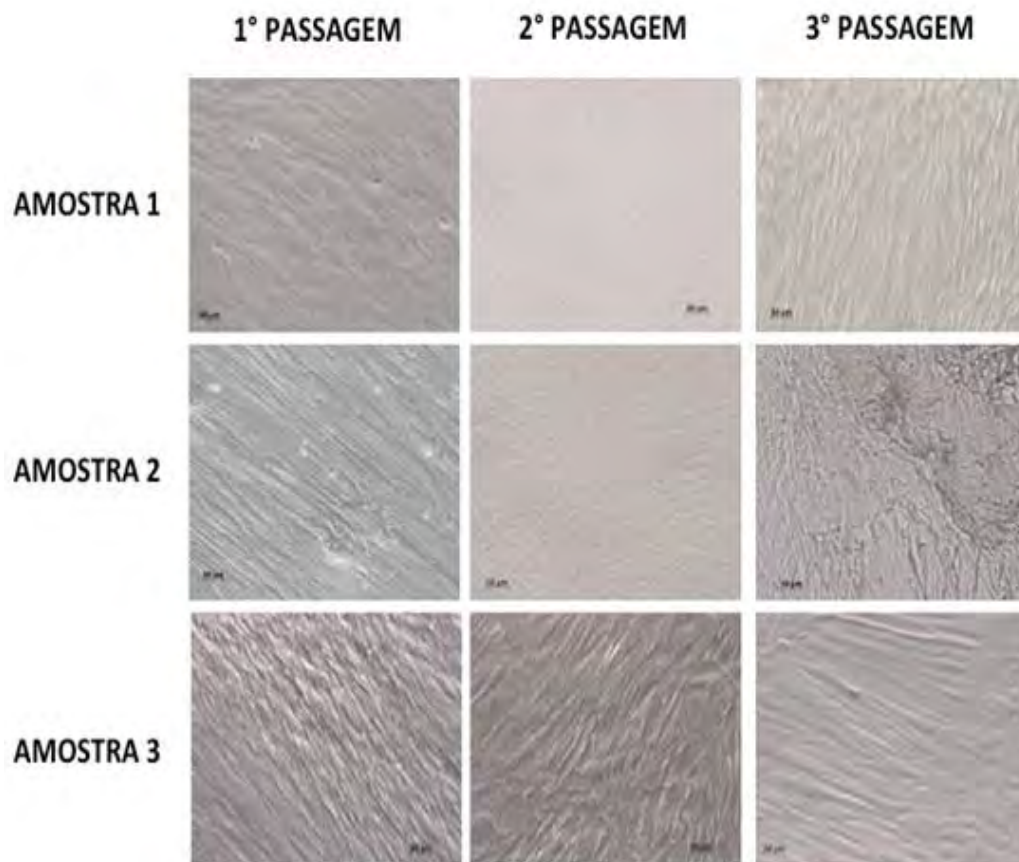


Figura 10. Fotos da cultura celular em 1° passagem, 2° passagem e 3° passagem. Aumento de 10x.

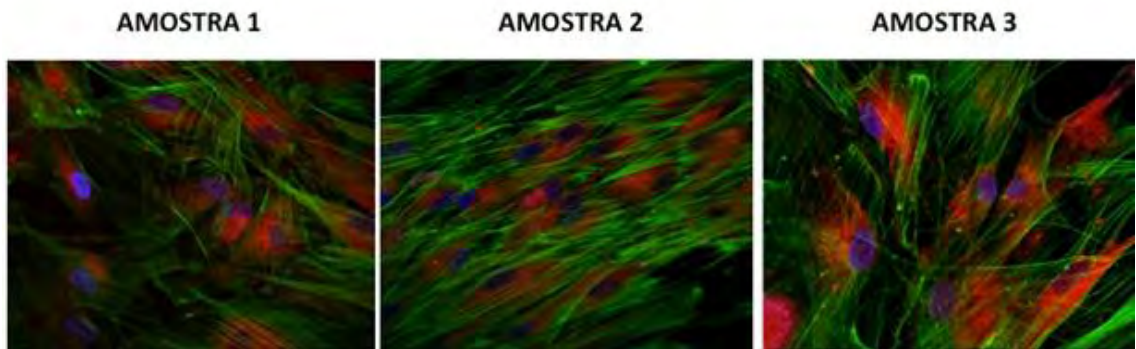


Figura 11. Confocal da cultura celular de 3º passagem de todas as amostras.

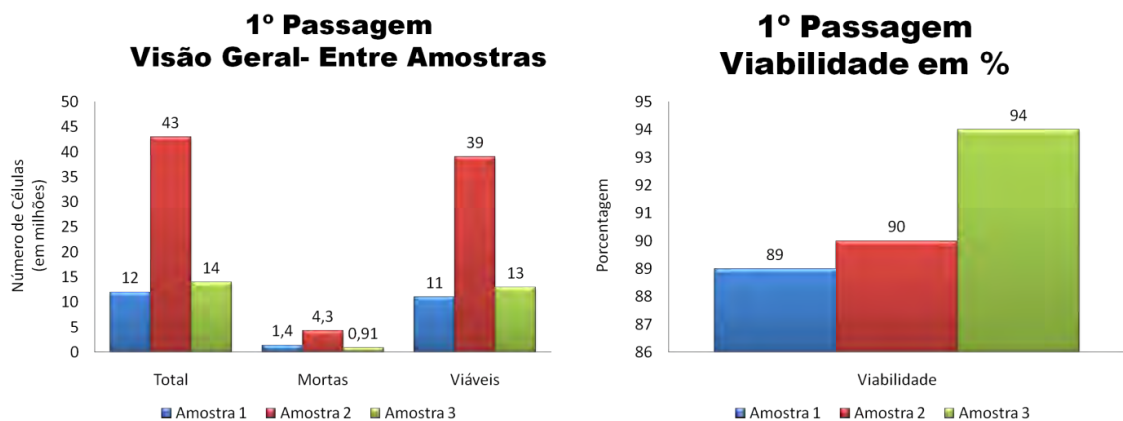


Figura 12. Gráficos comparativo das amostras apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 1º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 1º passagem (dir).

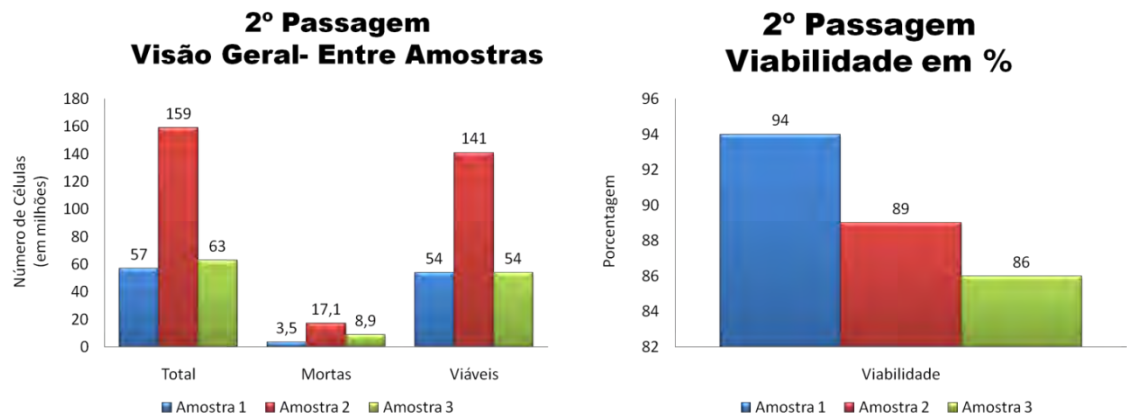


Figura 13. Gráficos comparativo das amostras, apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 2º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 2º passagem (dir).

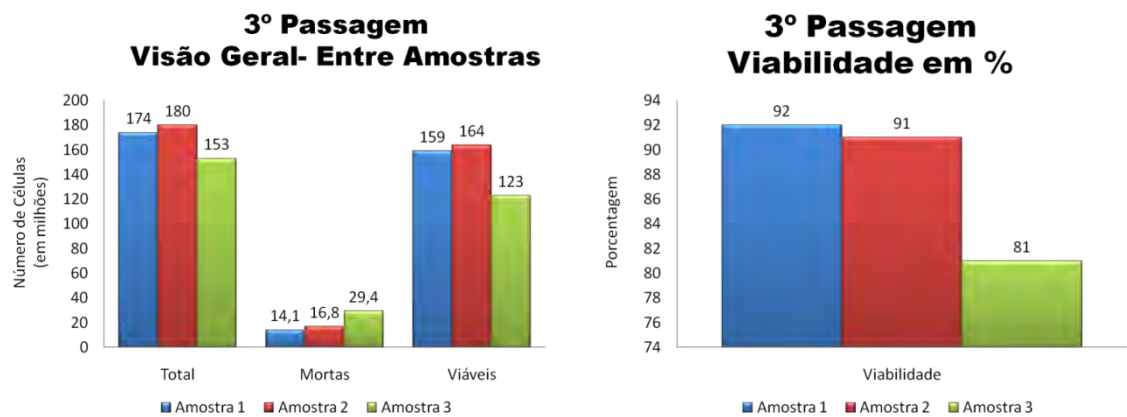


Figura 14. Gráficos comparativo das amostras, apresentando o número de células totais, mortas e vivas na 3º passagem (esq) e a viabilidade celular, em porcentagem, na 3º passagem (dir).

Os três grupos celulares cultivados em nosso experimento apresentaram variações em relação ao número de células e dias necessários para realização da passagem. Isso se deve a diferença de número de explantes que efetivamente liberaram células para o plástico de cultura.

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR PCR *ARRAY*

Os resultados dos *arrays* foram somente considerados se a amplificação da curva do gene de controle de contaminação por DNA genômico iniciasse sua amplificação a partir do ciclo 33, sendo assim, negativa. Além disso, a triplicata dos genes controles de qualidade da transcrição reversa deveriam se mostrar semelhantes, comprovando uma transcrição reversa eficiente. O threshold adotado para todas as amostras dos *arrays* de matriz extracelular e moléculas de adesão foi de 0,0854 e o threshold adotado para todas as amostras dos *arrays* de TGF β /BMP foi de 0,1045. Os valores de threshold foram adotados através da primeira amostra corrida do array, ao cruzar a curva de amplificação do gene de controle de DNA genômico, em sua fase exponencial.

Após a verificação dos controles da reação, citados acima, os dados foram tabulados e analisados quanto à significância das expressões gênicas, e os resultados que se apresentaram significativamente distintos são apresentados na Tabela 1.

Gene	ID	Localização	<i>Fold Change</i>	Valor de p
<i>COL16A1</i>	1307	1p35-p34	17,58	0,045
<i>TIMPI</i>	7076	Xp11.3-p11.23	8,24	0,003
<i>THBS1</i>	7057	15q15	17,34	0,027
<i>TGFBI</i>	7045	5q31	9,36	0,001
<i>NCAM1</i>	4684	11q23.1	- 5,90	0,047
<i>ITGA8</i>	8516	10p13	7,17	0,002
<i>FNI</i>	2335	2q34	3,18	0,035
<i>CD44</i>	960	11p13	7,96	0,046
<i>BGLAP</i>	632	1q22	- 97,95	0,037
<i>IDI</i>	3397	20q11	- 12,71	0,027
<i>TSC22D1</i>	8848	13q14	3,1	0,026
<i>RPL13A</i>	23521	19q13.3	2,51	0,017

Tabela 1. Resultado dos transcritos dos genes que se apresentaram diferencialmente expressos de maneira significativa ($p < 0,05$).

A seguir, são **apresentados somente os resultados dos transcritos dos genes da Tabela 1 ($p < 0,05$)**, considerando-se as expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, provenientes de diferentes indivíduos. Os ideogramas representam a localização dos genes relacionados.

5.2.1 ARRAY DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO

5.2.1.1 GENE *COL16A1*- COLÁGENO, TIPO XVI, ALFA 1.

O gene Colágeno, Tipo XVI, Alfa 1, teve sua expressão aumentada em 17,58 após três passagens, $p=0,045$, como mostra a figura 15.

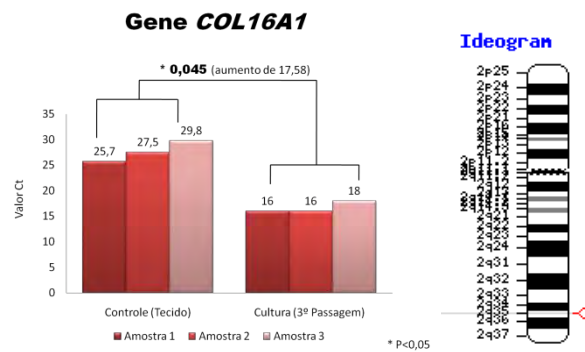


Figura 15. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *COL16A1* (dir).

5.2.1.2 GENE *TIMP1*- INIBIDOR 1 DA METALOPEPTIDASE

O gene Inibidor1 de Metalopeptidase TIMP, teve sua expressão aumentada em 8,24 após três passagens, $p=0,003$, como mostra a figura 16.

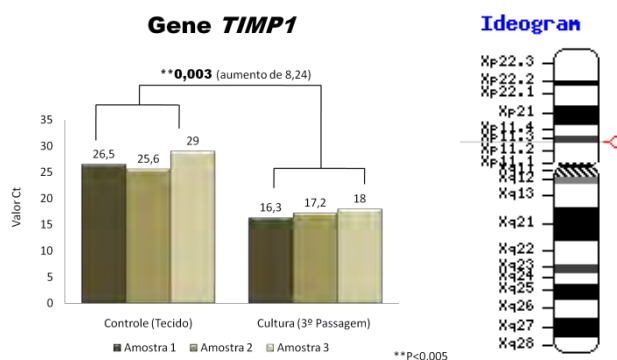


Figura 16. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *TIMP1* (dir).

5.2.1.3 GENE *THBS1*- TROMBOSPONDINA 1

O gene Trombospondina1, teve sua expressão aumentada em 17,34 após três passagens, $p=0,027$, como mostra a figura 17.

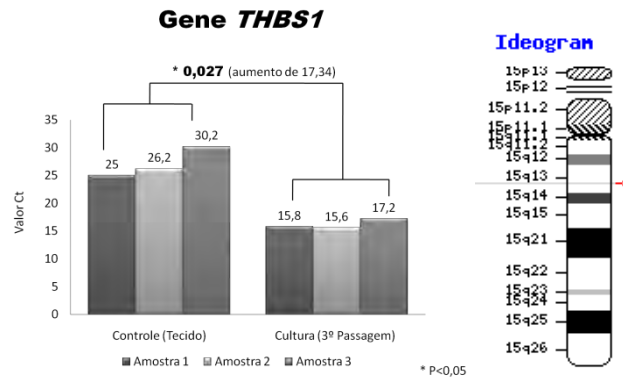


Figura 17. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *THBS1* (dir).

5.2.1.4 GENE *TGFBI* - FATOR DE CRESCIMENTO, BETA INDUZIDO

O gene Fator de Crescimento Transformador, Beta Induzido, teve sua expressão aumentada em 9,36 após três passagens, $p=0,001$, como mostra a figura 18.

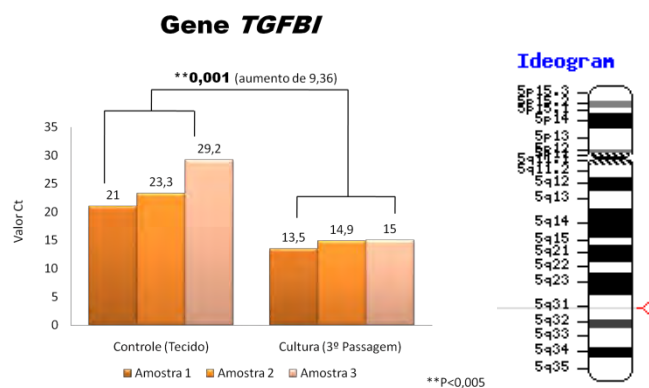


Figura 18. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *TGFBI* (dir).

5.2.1.5 GENE *NCAM1*- MOLÉCULA 1 DE ADESÃO CELULAR NEURAL

O gene Molécula de Adesão Celular Neuronal teve sua expressão diminuída em $-5,90$ após três passagens, $p=0,047$, como mostra a figura 19.

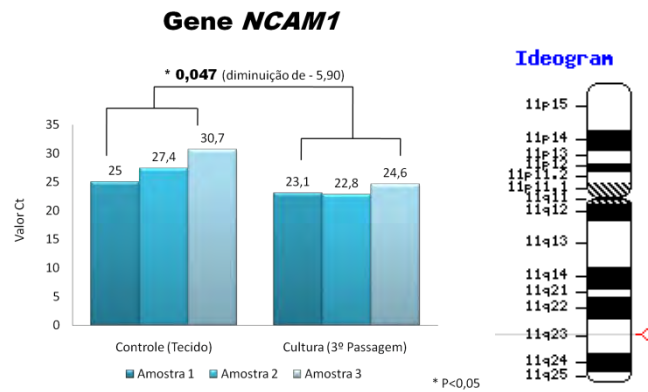


Figura 19. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *NCAM1* (dir).

5.2.1.6 GENE *ITGA8* - INTEGRINA, ALFA 8

O gene Integrina, Alfa 8, teve sua expressão aumentada em $7,17$ após três passagens, $p=0,002$, como mostra a figura 20.

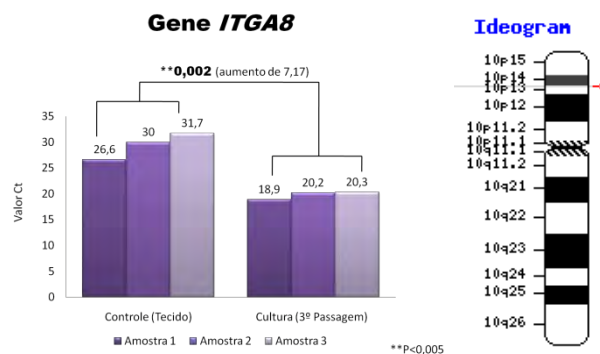


Figura 20. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *ITGA8* (dir).

5.2.1.7 GENE *FN1*- FIBRONECTINA 1

O gene *FN1* teve sua expressão aumentada em 3,18 após três passagens, $p=0,035$, como mostra a figura 21.

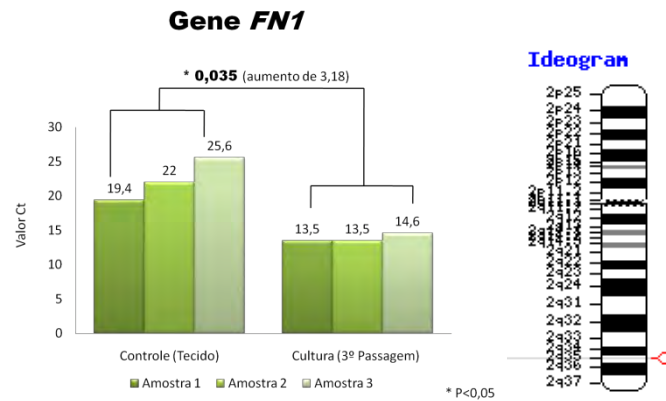


Figura 21. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *FN1* (dir).

5.2.1.8 GENE *CD44*

O gene Molécula CD44 teve sua expressão aumentada em 7,96 após três passagens, $p=0,046$, como mostra a figura 22.

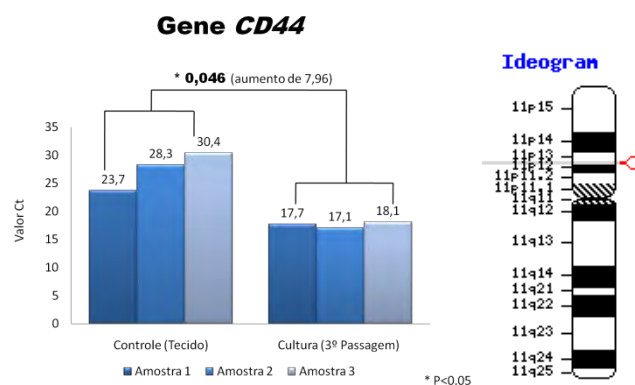


Figura 22. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *CD44* (dir).

5.2.2 ARRAY TGF- β /BMP

5.2.2.1 GENE *BGLAP*-PROTEÍNA ÓSSEA GAMA-CARBOXIGLUTAMATO (OSTEOCALCINA).

O gene *BGLAP* teve sua expressão diminuída em – 97,95 após três passagens, $p=0,037$, como mostra a figura 23.

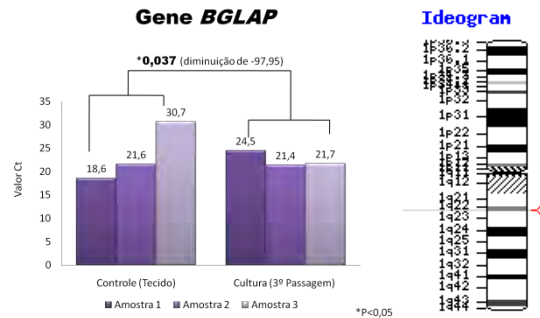


Figura 23. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *BGLAP* (dir).

5.2.2.2 GENE *IDI*- INIBIDOR 1 DE LIGAÇÃO DO DNA

O gene *IDI* teve sua expressão diminuída em – 12,71 após três passagens, $p=0,027$, como mostra a figura 24.

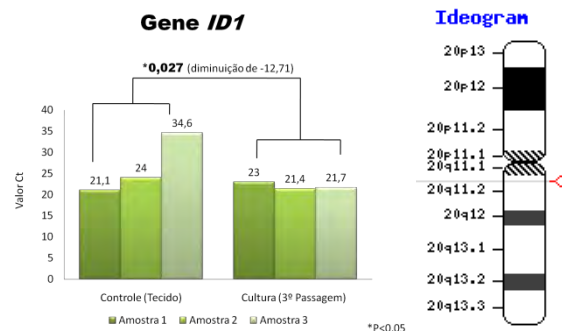


Figura 24. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e a diminuição da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *IDI* (dir).

5.2.2.3 GENE *TSC22D1*- FAMÍLIA DOMÍNIO TSC22 MEMBRO 1

O gene *TSC22D1* teve sua expressão aumentada em 3,10 após três passagens, $p=0,026$, como mostra a figura 25.

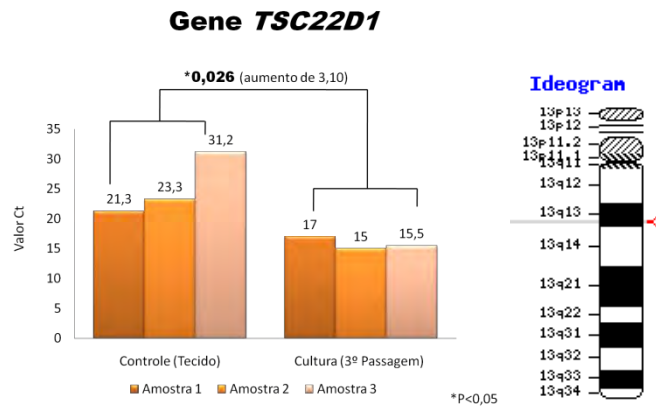


Figura 25. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *TSC22D1* (dir).

5.2.2.4 GENE *RPL13A*- PROTEÍNA RIBOSSOMAL L13A

O gene *RPL13A* teve sua expressão aumentada em 2,51 após três passagens, $p=0,017$, como mostra a figura 26.

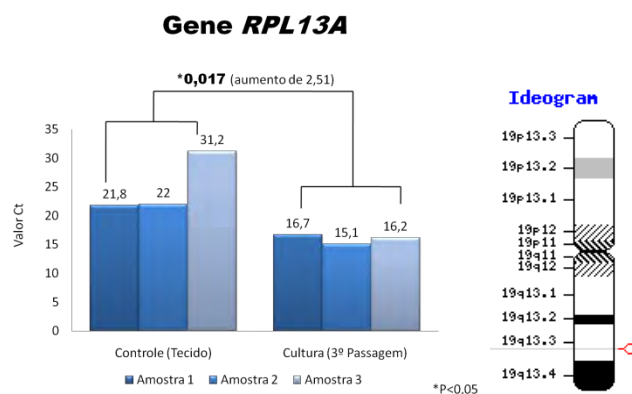


Figura 26. Expressões observadas nas três diferentes amostras analisadas, o valor de p e o aumento da sua expressão (esq). Ideograma representando a localização do gene *RPL13A* (dir).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A ET busca desenvolver tecnologias para a fabricação de órgãos e tecidos substitutos (LANGER & VACANTI. 1999) com o objetivo de solucionar as complicações existentes nos transplantes de órgãos (HUTMACHER *et al.*, 2001) como por exemplo, a rejeição (STOCK & VACANTI. 2001).

O uso de hDPSC é uma importante fonte celular por sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos, mineralizados ou não (DUAILIBI *et al.*, 2004, 2006 e 2008). As vias TGF β /BMP participam intimamente de diversas sinalizações destas células (MASSAGUÉ. 2012 e CHEN *et al.*, 2012).

Porém, para alcançar esse objetivo é necessário entender a mecanotransdução celular (MANIOTIS *et al.*, 1997; DALEY *ET AL.*, 2008), o papel desempenhado pela MEC no fenótipo celular (BISSEL *ET AL.*, 1998, 2000, 2006 e 2010) e a dinâmica de interação receptor-ligante para a regulação do ambiente intracelular por meio das vias de sinalização, expressa gênica e proteínas (BIRGERSDOTTER *et al.*, 2005; PARKER & KOHLER. 2010 e GUILLAME-GENTIL *ET AL.*, 2010).

Em um contexto geral, o ambiente extracelular influenciando no ambiente intracelular, bem como a comunicação entre eles, ainda é uma ciência de fronteira. A ET tem o desafio de compreender de maneira ampla estes ambientes e suas reais influências sobre as células, previamente a implantação clínica das mesmas (DUAILIBI *et al.*, 2012).

A literatura científica é escassa em estudos que envolvem hDPSC e os genes de interesse encontrados no presente estudo. Tipos celulares semelhantes como células tronco mesenquimais de medula óssea podem ajudar a elucidar os achados deste trabalho, porém, ainda sim existem em pequeno número na literatura. Grupos celulares muito distintos de hDPSC não foram usados como referência por serem muito distintos do grupo celular em questão.

A seguir, os genes citados no resultado, com valor de $p < 0,05$, serão discutidos individualmente.

6.1 *TIMP1*- INIBIDOR 1 DA METALOPEPTIDASE

O gene *TIMP1* (ID 7076) está localizado em Xp11.3-p11.23 e tem a função de um inibidor natural das MMP's (metaloproteinases de matriz extracelular), as quais estão envolvidas na degradação de MEC. A proteína produzida por este gene parece promover a proliferação celular e ter uma função anti-apoptótica (ABDULLAH *et al.*, 2014). De acordo com GONG *et al.* (2013), o gene *TIMP1* apresenta expressão aumentada em câncer de próstata e colo de útero.

No presente estudo, o *TIMP1* foi aumentado em 8,24. De acordo com ROCHA *et al.* (2014), o gene *TIMP1* tem a expressão aumentada durante a diferenciação de células humanas mesenquimais de medula óssea em condrócitos.

É de importância para a ET que as células aplicadas em pacientes tenham sua diferenciação compreendida e controlada. Uma possível diferenciação em condrócitos pode ser objetivo primordial em alguns

experimentos, porém, uma característica indevida em outros. Além disso, a modificação da expressão gênica dessas células pode ocorrer, possivelmente, por um desequilíbrio do meio extracelular, como por exemplo, na MEC. Neste caso, o gene em questão tem a função de um inibidor natural das MMP's, as quais estão envolvidas na degradação de MEC, o aumento de expressão deste gene pode indicar um desbalanceamento da construção/degradação de MEC e assim, um desequilíbrio.

Como descrito por FELDHERR & AKIN. (1993) e MANIOTIS *et al.* (1997), a MEC tem papel crucial na sinalização celular pela provável interação dela com receptores de superfície e desses com o citoesqueleto-núcleo.

6.2 *THBS1* – TROMBOSPODINA 1

O gene *THBS1* (ID 7057) se localiza em 15q15 e codifica uma glicoproteína de adesão que media a interação célula-célula e célula-matriz. Essa proteína pode ligar-se a fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno V, integrina (subunidade $\alpha V/\beta 1$) e parece desempenhar papéis em uma variedade de processos celulares como adesão, migração e angiogênese (QIAN & TUSZYNSKI, 1996).

Os estudos de JOHN *et al.* (2009) mostram que o gene *TIMP1* (item 6.1) tem papel fundamental na capacidade de invasão de células tumorais, e o gene *THBS1* parece estimular a expressão do gene *TIMP1* em alguns tumores mais avançados. Porém, existem controvérsias na literatura em relação aos genes *THBS1* e *TIMP1* os quais demonstraram um papel inibitório da metástase (MOTEGI *et al.*, 2008). Estas controvérsias

indicam a possibilidade de que a capacidade de invasão ou inibição seja dada pelo equilíbrio da regulação de enzimas MMP's e suas antagonistas, como *TIMP1*, demonstrando um importante papel do gene *THBS1* por sua influência na expressão do gene *TIMP1*.

A morte celular por apoptose devido à perda de adesividade celular, é um mecanismo importante para a homeostase e regulação do tecido. PALLERO *et al.* (2008) demonstraram um papel anti-apoptótico do gene *THBS1*.

Os estudos de BAILEY DUBOSE *et al.* (2012) demonstram que a atividade do gene *THBS1* tem papel importante na regulação do gene TGF- β , sendo assim, têm um papel crítico na determinação da diferenciação odontoblástica de células mesenquimas da medula óssea.

No presente experimento o gene *THBS1* estava aumentado em 17, 34.

Sendo o intuito da ET desenvolver tecidos ausentes ou comprometidos (LANGER & VACANTI, 1999), diversas vezes pode ser requerida a diferenciação de células em odontoblastos se este intuito for a formação de tecidos mineralizados. O papel positivo ou negativo que um possível aumento da proteína expressa por esse gene pode produzir dependerá da necessidade da ET, bem como a compreensão da real influência que produto deste gene, de forma solitária, pode influenciar na resposta geral do comportamento de uma célula, a qual pode co-depender de outros fatores e proteínas envolvidas.

6.3 *TGFBI* – FATOR DE CRESCIMENTO, BETA INDUZIDO.

O gene *TGFBI* (ID 7045) localizado em 5q31 codifica uma proteína que contém o motivo tridimensional RGD. Essa proteína liga-se ao colágeno tipo I, II e IV.

O motivo RGD é encontrado em muitas proteínas de MEC, modula adesão celular e desempenha um papel de sequência ligante que é reconhecido por muitas integrinas. A proteína codificada pelo gene *TGFBI* tem um papel em interação célula-colágeno e pode estar envolvida na ossificação endocondral (a ossificação endocondral acontece quando as células mesodérmicas se transformam em células produtoras de cartilagem).

De acordo com YU *et al.* (2012) o *TGFBI* regula positivamente o tamanho e a massa do osso em formação, e conseqüentemente sua força.

No presente experimento, o gene *TGFBI* está aumentado em 9,36.

A proteína TGF- β induz a *TGFBI* e age na inibição da adesão celular. Como discutido anteriormente, o gene *THBS1* (item 6.2) regula a expressão de TGF- β que por sua vez induz o gene *TGFBI* agindo na inibição da adesão celular.

É necessária a futura compreensão e análise da influência real no aumento da expressão de *TGFBI* e *THBS1* em relação a sua capacidade de impedimento de adesão de células que são semeadas aos *scaffolds*. Primeiramente é necessário verificar se os níveis de proteínas serão maiores ou, se o aumento da expressão destes genes sofreu alguma regulação pré-tradução. Em caso positivo, esse é um fator de extrema importância na ET, visto que a migração de células implantadas em

pacientes tem a possibilidade de desprender-se do enxerto e podem se ligar e proliferar em nichos indevidos. É necessária a certeza de que as células tenham sua capacidade de adesão aos *scaffolds* preservada.

Por outro lado, a possível regulação positiva para diferenciação destas células em cartilagem e osso, pode ser uma característica importante quando o objetivo da ET for a formação ou substituição destes tecidos. Células predispostas a essa diferenciação pode facilitar a reconstrução de abaulamentos ósseos ou de regiões cartilaginosas.

6.4 *NCAMI*- MOLÉCULA 1 DE ADESÃO CELULAR NEURAL

O gene *NCAMI*(ID 4684) localiza-se em 11q23.1 e codifica uma proteína que é um membro da superfamília das imunoglobulinas. Essa proteína é envolvida na interação célula-célula e célula-MEC durante o desenvolvimento e a diferenciação.

No presente estudo, a expressão de *NCAM* diminuiu em 5,90.

A proteína *NCAM* está particularmente envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso e desempenha um papel importante na vigilância imunológica. Desta maneira, a diminuição de sua expressão tem sido correlacionada com a progressão da esclerose múltipla (GNANAPAVAN *et al.*, 2013).

De acordo com SHI *et al.* (2012), a *NCAM* mostrou-se expressa em células mesenquimais do estroma de medula óssea de ratos. Além disso, células da medula óssea derivadas das células mesenquimais estromais deficientes em *NCAM* tinham menos habilidade migratória e uma menor capacidade de diferenciação osteogênica.

A diminuição da proteína codificada por esse gene pode indicar uma modulação negativa à formação de um tecido ósseo pelo presente grupo de células, o que está em desconcontro ao que foi indicado em genes discutidos anteriormente. Porém, o papel desempenhado pelo gene *NCAM* em células de polpa dental, bem como o aumento ou diminuição desta proteína, não foi estudado até o presente momento.

6.5 *ITGA8* – INTEGRINA, ALFA 8

O gene *ITGA8* (*ID 8516*) localiza-se em 10p13 e codifica a subunidade alfa 8 da integrina alfa 8 beta 1. Esse gene regula o recrutamento de células mesenquimais para estruturas epiteliais e media interação célula-célula. A proteína integrina alfa8 beta1 tem um papel importante na cicatrização e organogênese (processo de desenvolvimento do embrião).

Integrinas são receptores transmembrânicos que mediam diversos processos celulares como adesão, rearranjo do citoesqueleto e ativação de vias de sinalização. Como descrito por HATA *et al.* (2009) e GUILLAME-GENTIL *et al.* (2010), a interação entre as células e destas com o meio externo ocorre por meio de receptores (como integrina).

As integrinas agem como molécula de sinalização bidirecionalmente: 1) Extra-intracelular através do tipo de ligação das integrinas com a MEC, o que acarreta em mudanças na conformação da célula e 2) Intra-extracelular através de moléculas citoplasmáticas e

ativação de vias de sinalização que podem resultar na ativação ou desativação das integrinas (GAHMBERG *et al.*, 2009).

Compreender a interação da integrina/MEC com o interior da célula, e vice-versa, pode resultar no desenvolvimento de *scaffolds* construídos para tecidos específicos, com características próprias. Além disso, a compreensão dessa interação pode auxiliar na entrega intracelular através de nanomateriais.

No presente experimento, o gene *ITGA8* teve sua expressão aumentada em 7,17. Se a proteína codificada por esse gene seguir esta proporção de aumento, poderá provocar um desequilíbrio na sinalização bi-direcional dada pelas integrinas e uma resposta ou diferenciação celular inadequada após serem semeadas aos *scaffolds*.

6.6 *FNI*- FIBRONECTINA 1

O gene *FNI* (ID 2335) localiza-se em 2q34 e codifica a fibronectina, uma glicoproteína presente no plasma, na superfície celular e na MEC. Esta proteína é uma molécula chave na adesão celular e em processos de migração, incluindo embriogênese, cicatrização, defesa do hospedeiro e metástase.

No presente experimento a expressão do gene *FNI* está aumentada em 3,18.

SCHNAPP *et al.* (1995) demonstraram que a proteína *ITGA8* (item 6.5) funciona como um receptor para fibronectina. Fica a questão da possibilidade do aumento do *ITGA8* ser capaz de influenciar o aumento do *FNI* ou vice-versa.

O aumento da expressão dos genes *ITGA8* e *FNI* também foi demonstrado por LIU *et al.* (2011) em polpa dental cultivada em superfície com fluorapatita, um constituinte do esmalte dental. Há possibilidade de que o resultado obtido pelo autores tenha relação com a cultura celular e não somente pela presença da fluorapatita, visto que no presente experimento esses genes mostraram-se também aumentados.

KIM *et al.* (2012) demonstrou que *FNI* é significativamente mais expressa em osteoblastos no processo de diferenciação e MOURSI *et al.* (1997) concluiu que o *FNI* é requerida para a diferenciação osteoblástica e além disso, para a sobrevivência dos osteoblastos quando já maturados (GLOBUS *et al.*, 1998)

O aumento da expressão gênica de *FNI* no presente experimento pode sugerir uma tendência, das células em experimento, à diferenciação osteoblástica. A capacidade de diferenciação das células mesenquimais de polpa dental em dentina (produzida por osteoblastos) também foi citada por DUAILIBI *et al.* (2006).

6.7 GENE *COL16A1* – COLÁGENO, TIPO XVI, ALFA 1.

O gene *COL16A1* (ID 1307) está localizado no cromossomo 1 , região p35-p34, e codifica a cadeia alfa do colágeno tipo XVI, um membro da família de colágeno denominada FACIT. Membros dessa família são achados em associação com colágenos em forma de fibrila, como os tipos I e II e servem para manter a integridade da matriz extracelular (GRÄSSEL & BAUER, 2013).

No presente estudo, o gene *COL16A1* mostrou-se aumentado em 17,58.

Níveis altos deste colágeno têm sido achados em condrócitos em processo de diferenciação (LAI & CHU, 1996). De acordo com (GRÄSSEL &BAUER, 2013), TGF- β 2 provoca um aumento do nível de RNAm em fibroblastos dérmicos e parece ser relevante na diferenciação de células mesenquimais em condrócitos, nos quais são encontrados o aumento da expressão de *COL16A1*. Em contra partida, a expressão de *COL16A1* é diminuída em processos osteogênicos.

Níveis altos também são envolvidos na facilitação da proliferação de câncer bucal (RATZINGER *et al.*, 2011), o qual é muito agressivo, com metástase rápida e freqüente.

O tipo de proteína expressa pelas células, bem como sua quantidade, é uma característica essencial para ET, pois, pode modificar todo o equilíbrio de um tecido formado. KASSNER *et al.* (2003) afirma que o tipo de proteína expressa influencia as propriedades de carga de superfície eletrostática das fibras. Por exemplo, o colágeno tipo IX frequentemente carrega glicosaminoglicanos que possuem cargas negativas enquanto o colágeno XVI não possui essa propriedade. As diferenças dessas características criam oportunidades de modular a interação entre as fibras colágenas e as fibras extracelulares de carga negativa, modificando as propriedades do tecido.

6.8 CD44

O gene *CD44* (ID 960) localiza-se na região p13 do cromossomo 11 e codifica uma glicoproteína de superfície celular envolvida na interação célula-célula, adesão celular e migração. Essa proteína é um receptor de

ácido hialurônico e pode também interagir com outros ligantes, como osteoprina, colágeno e metaloproteinases de matriz.

A proteína codificada por esse gene participa de uma variedade de funções como ativação linfocitária, hematopoiese e metástase tumoral.

No presente estudo a expressão gênica de *CD44* está aumentada em 7,96.

CHEN *et al.* (2013) mostrou que a proteína *CD44* foi muito expressa em odontoblastos e está envolvido em mineralização da polpa dental. A expressão de *CD44* foi também observada em cementócitos (LEONARDI *et al.*, 2006). Esse resultado pode sugerir uma diferenciação em odontoblastos e uma mineralização das células de polpa dental cultivadas no presente experimento.

6.9 *TSC22D1* – FAMÍLIA DOMÍNIO TSC22 MEMBRO 1

O gene *TSC22D1* (ID 8848) localizado em 13q14 codifica uma proteína de um domínio do tipo leucina zíper (motivo encontrado como parte da região de ligação ao DNA) de fatores de transcrição.

A proteína codificada pelo gene *TSC22D1* é estimulada por TGF- β , regula a transcrição de vários genes e parece ter papel crítico em supressão de tumores através da indução de apoptose em células tumorais.

De maneira geral as proteínas TSC-22 tem uma atividade de repressão da transcrição quando ligado ao DNA (KESTER *et al.*, 1999). De acordo com HÖMIG-HÖLZEL *et al.* (2011), *TSC22D1* serve como um componente crítico de estimulação da via de sinalização que regula a

indução de senescência celular por células com características oncogênicas (para indução da apoptose).

No presente experimento a expressão do gene *TSC22D1* encontra-se aumentado em 3,20.

TSC22D1 foi reportado por SHIBANUMA *et al.* (1992) como um gene induzido por TGF- β em osteoblastos de ratos. Isso pode indicar uma diferenciação das células de polpa dental cultivadas neste experimento, em odontoblastos.

6.10 *ID1*- INIBIDOR 1 DE LIGAÇÃO DO DNA

O gene *ID1* (ID 3397) localizado em 20q11 e codifica uma proteína HLH que pode formar heterodímeros com membros da família HLH básica de fatores de transcrição. A proteína codificada por *ID1* pode inibir a ligação ao DNA e a ativação transcricional das proteínas HLH básicas. A proteína ID1 parece ter papel no crescimento e diferenciação celular (QIAN & CHEN. 2008).

No presente experimento, a expressão gênica de *ID1* foi diminuída em -12,71.

MACIEJEWSKA *et al.* (2014) observaram que o aumento e a diminuição de *ID1* modula a diferenciação de células de polpa dental humana. O aumento de *ID1* estimula a diferenciação odontogênica, aumentando a expressão de genes como o gene de proteína de matriz dentinária 1 e, o seu silenciamento tem o efeito oposto.

Desta maneira, a *IDI* mostra a possibilidade de ser considerada pela ET como moduladora da diferenciação de polpa dental humana.

6.11 *BGLAP*- PROTEÍNA ÓSSEA GAMA-CARBOXIGLUTAMATO (OSTEOCALCINA).

O gene *BGLAP* (ID 632) localizado na região 1q22 codifica a proteína Osteocalcina, uma proteína não colágena encontrada em ossos e dentina. Ela é secretada exclusivamente por osteoblastos, desempenha um papel na regulação do metabolismo corpóreo, é pró-osteoblastica (LEE *et al.*, 2007) e também relacionada à mineralização óssea.

No presente experimento, a expressão gênica de *BGLAP* foi diminuída em -97,95.

A diminuição expressiva desse gene pode indicar um distanciamento das células de polpa dental em relação a ossos e dentina, aspecto positivo dependendo do objetivo de uso destas células em ET. Por outro lado, indica uma menor capacidade de mineralização, aspecto que pode ser negativo se o intuito for a formação óssea.

De maneira contrária a outros genes, citados anteriormente, que indicam uma diferenciação odontoblastica das células no presente experimento, a diminuição da expressão do gene *IDI* (item 6.10) e do gene *BGLAP* indicam um caminho oposto, deixando clara a complexidade da inter-relação entre diversos genes e sinalizadores para estimular uma real diferenciação.

6.12 *RPL13A*- PROTEÍNA RIBOSOMAL L13A

Ribossomos são organelas que catalizam a síntese protéica e consistem de uma subunidade menor 40S e uma subunidade maior 60S. Juntas, essas subunidades são compostas de aproximadamente 80 proteínas estruturalmente distintas. O gene *RPL13A* (ID 23521) localizado em 19q13.3, codifica uma proteína presente na subunidade 60S.

Esse gene é frequentemente usado como um dos genes *housekeeping* em Real Time PCR. No presente experimento foi usado como tal. Porém, apresentou um aumento de expressão em 2,51, com significância de 0,0167.

De acordo com ZHOU *et al.* (2014), apesar de muitos genes serem usados como genes de referência, eles também são regulados e podem apresentar variações de expressão, fato este que poderia levar a uma interpretação equivocada do resultados. Os estudos destes autores confirmaram a idéia de que é necessário entender a estabilidade da expressão destes genes de acordo com cada tipo de tecido e situações experimentais antes de avaliar quantitativamente a expressão gênica em qRT-PCR.

STUDER *et al.* (2012) demonstraram que *RPL13A* foi validado como em gene de referência para estudos em qRT-PCR de células mesenquimais de medula-óssea durante expansão em adipo-, condro- e osteogênese.

É necessária uma maior compreensão se esse gene pode ser usado como referência para células de polpa dental humana. De qualquer

maneira, outros quatro genes *housekeeping* foram usados para normalização dos resultados.

Do ponto de vista de maquinaria celular para tradução de proteínas, a verificação do real aumento desta proteína ribossômica e a possível influência na tradução de todas as proteínas celulares deverá ser avaliada.

Como desfecho da discussão, podemos salientar que um gene solitariamente pode não exercer função chave na diferenciação de células em um determinado tecido e essa característica pode ser direcionada pela interação de diversos outros genes. Além disso, a célula é influenciada pela sua relação com a MEC e com o ambiente extracelular em âmbito geral, levando em consideração os meios de cultura e seus suplementos com seus papéis fundamentais na disponibilização de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras, influenciando fortemente a diferenciação celular (CURI *et al.*, 2007; DEBERARDINIS & TOMPSON, 2012). É necessária a compreensão e mapeamento, de forma global e interativa destes genes, bem como deles com o ambiente extracelular, antes de concluir qualquer predisposição das células em cultura à tecidos ósseos, tumorais, cartilagosos, ou a proliferação de células indiferenciadas.

Tem sido demonstrado que diversas alterações gênicas não são suficientes para desencadear fenótipos específicos e isso parece depender intimamente das mudanças da MEC, ou seja, mesmo com o genoma determinando que a célula se manifeste com um fenótipo específico, essa real manifestação dependerá do ambiente (MEC) em que a célula se localiza.

Como descrito por HUANG *et al.* (2010), o uso da tripsina nas passagens celulares pode modificar a expressão de proteínas. É possível

que diversas das alterações gênicas encontradas neste experimento, se efetivamente alterarem a expressão das proteínas codificadas por eles, decorrem da destruição da MEC, bem como de proteínas de superfície que promovem a sinalização celular. **O uso da tripsina precisa ser reavaliado.**

Esse novo conceito abre a compreensão da grande importância da MEC para a ET, principalmente quando esse ambiente é mimetizado através de *scaffolds*. Se esses forem incompatíveis com as características desejadas para determinado tecido poderá influenciar de maneira negativa o comportamento deste novo órgão/tecido desenvolvido e implantado. Além disso, esse novo conceito infere que pode não ser necessário o controle de toda e qualquer diferenciação na cultura celular e sim, a capacidade de modulá-la de tal modo que as células se comportem de maneira devida para o fim a que forem destinadas, *in vivo*.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

As células em cultura sofreram alterações em sua expressão gênica, tanto na via TGF β / BMP, quanto em MEC e moléculas de adesão. Essas modificações são naturais, pois, o novo ambiente fornecido pela cultura impõe desafios para as células primárias, as quais eram previamente organizadas sob um contexto tecidual e que, desta maneira, tendem a adaptarem-se às novas condições. Além disso, a utilização de enzimas proteolíticas deve ser reavaliada na cultura celular, pois a MEC e as PS participam ativamente na mecanotransdução de sinais para o núcleo, do fenótipo celular bem como da sinalização. Desta maneira, a destruição da MEC e de algumas PS decorrentes de cada passagem celular pode interferir de maneira significativa no comportamento e viabilidade das células em cultura. O desafio da cultura celular não está em controlar toda e qualquer diferenciação ou adaptação celular e sim, ser capaz de modular a diferenciação de forma que as células utilizadas para ET e construção de *scaffolds* sejam capazes de se comportar devidamente para o fim a que forem determinadas, *in vivo*. Além disso, garantir a segurança previamente à implantação clínica é um objetivo importante a ser alcançado, caso contrário, a ET poderá ser usada de maneira empírica, podendo causar assim, diversos efeitos colaterais indesejados aos pacientes.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABDULLAH MF, ABDULLAH SF, OMAR NS, MAHMOOD Z, FAZLIAH MOHD NOOR SN, KANNAN TP, MOKHTAR KI. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol Int*. 2014;38(5):582-90.

BAILEY DK, ZAYZAFOON M, MURPHY-ULLRICH JE. Thrombospondin-1 inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through latent TGF- β activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 8;422(3):488-93.

BIRGERSDOTTER A, SANDBERG R, ERNBERG I. Gene expression perturbation *in vitro*-A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):405-12.

CHEN G, DENG C, LI YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):272-88.

CHEN KL, HUANG YY, LUNG J, YEH YY, YUAN K. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):351-6.

CURI R, NEWSHOLME P, PROCOPIO J. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*. 2007;12:344-57.

DALEY WP, PETERS SB, LARSEN M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*. 2008;121(3):255-64.

DEBERARDINIS RJ & THOMPSON CB. Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us?. *Cell*. 2012;148:1132-44.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, YOUNG C, BARTETT JD, VACANTI JP, YELICK PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research*. 2004;83(7):523-38.

DUAILIBI SE, DUAILIBI MT, VACANTI JP, YELICK PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontology 2000*. 2006;41:177-87.

DUAILIBI SE, DUAILIBI M, ZHANG W, ARISCAN R, VACANTI JP, YELICK PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *J Dental Research*. 2008;87:745-50.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, DUAILIBI NETO EF, NEGREIROS RM, JORGE WA, FERREIRA LM, VACANTI JP, YELICK PC. Tooth tissue engineering: Optimal dental stem cell harvest based on tooth development. *Artif organs*. 2011;2(2):1-7.

DUAILIBI MT, KULIKOWSKI LD, DUAILIBI SE, LIPAY MVN, MALERAGNO MI, FERREIRA LM, VACANTI JP, YELICK PC. Citogenetic instability of dental pulp cell lines. *J Mol Hist*. 2012 feb;43(1):89-94.

FELDHERR CM, AKIN D. Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Exp Cell Res*. 1993;205(1):179-86

GAHMBERG CG, FAGERHOLM SC, NURMI SM, CHAVAKIS T, MARCHESAN S, GRÖNHOLM M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1790(6):431-44.

GLOBUS RK, DOTY SB, LULL JC, HOLMUHAMEDOV E, HUMPHRIES MJ, DAMSKY CH. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J. Cell Sci.* 1998;111:1385–93.

GNANAPAVAN S, HO P, HEYWOOD W, JACKSON S, GRANT D, RANTELL K, KEIR G, MILLS K, STEINMAN L, GIOVANNONI G. Progression in multiple sclerosis is associated with low endogenous NCAM. *J Neurochem.* 2013 Jun;125(5):766-73.

GONG Y, SCOTT E, LU R, XU Y, OH WK, YU Q. TIMP-1 promotes accumulation of cancer associated fibroblasts and cancer progression. *PLoS One.* 2013;15:8(10):e77366.

GRÄSSEL S, BAUER RJ. Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biol.* 2013 Mar 11;32(2):64-73.

GUILLAME-GENTIL O, SEMENOV O, ROCA AS, GROTH T, ZAHN R, VÖRÖS J, ZENOBI-WONG M. Engineering the extracellular environment: Strategies for building 2D and 3D cellular structures. *Adv Mater.* 2010;22:5443-62.

HATA H, BÄR A, DORFMAN S, VUKADINOVIC Z, SAWA Y, HAVERICH A, HILFKER A. Engineering a novel three-dimensional contractile myocardial patch with cell sheet and decellularised matrix. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;38:450-55.

HÖMIG-HÖLZEL C, VAN DOORN R, VOGEL C, GERMANN M, CECCHINI MG, VERDEGAAL E, PEEPER DS. Antagonistic TSC22D1 variants control BRAF(E600)-induced senescence. *EMBO J.* 2011 May 4;30(9):1753-65.

HUANG H, HSING H, LAI T, CHEN Y, LEE T, CHAN H, LYU P, WU C, LU Y, LIN S, LIN C, LAI C, CHANG H, CHOU H, CHAN H. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci.* 2010;17:36.

HUTMACHER DW, GOH JCH, TEOH SH. An Introduction to Biodegradable Materials for Tissue Engineering Applications. *Ann Acad Med Singapore.* 2001;30:180-91.

JOHN AS, HU X, ROTHMAN VL, TUSZYNSKI GP. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol.* 2009 Dec;87(3):184-8

KASSNER A, HANSEN U, MIOSGE N, REINHARDT DP, AIGNER T, BRUCKNER-TUDERMAN L, BRUCKNER P, GRASSEL S. Discrete integration of collagen XVI into tissue specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 2003;22:131-43.

KELM JM, FUSSENEGGER M. Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews.* 2010;62:753-64.

KESTER HA, BLANCHETOT C, DEN HERTOOG J, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27439-47.

KIM HS, CHOI DY, YUN SJ, CHOI SM, KANG JW, JUNG JW, HWANG D, KIM KP, KIM DW. Proteomic analysis of microvesicles

derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):839-49.

LAI CH, CHU ML. Tissue distribution and developmental expression of type XVI collagen in the mouse. *Tissue Cell.* 1996;28:155-64.

LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999;280:62-5.

LEE NK, SOWA H, HINOI E, FERRON M, AHN JD, CONFAVREUX C, DACQUIN R, MEE PJ, MCKEE MD, JUNG DY, ZHANG Z, KIM JK, MAUVAIS-JARVIS F, DUCY P, KARSENTY G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007;130(3):456-69.

LELIÈVRE SA, BISSELL MJ. Communication between the cell membrane and the nucleus: role of protein compartmentalization. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-1:250-63.

LELIÈVRE SA, WEAVER VM, NICKERSON JA, LARABELLCA, BHAUMIK A, PETERSEN OW, BISSELL MJ. Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:14711-16.

LELIÈVRE SA, BISSELL MJ, PUJUGUET P. Cell Nucleus in Context. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000;10(1):13-20.

LEONARDI R, LORETO C, CALTABIANO R, CALTABIANO C. Immunolocalization of CD44s in human teeth. *Acta Histo Chem.* 2006;108:425-9

LIU J, JIN TC, CHANG S, CZAJKA-JAKUBOWSKA A, CLARKSON BH. Adhesion and growth of dental pulp stem cells on enamel-like fluorapatite surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Mar 1;96(3):528-34.

MACIEJEWSKA I, SAKOWICZ-BURKIEWICZ M, PAWELCZYK T. Id1 Expression Level Determines the Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res*. 2014 Apr 2;93(6):576-581.

MANIOTIS AJ, CHEN CS, INGBER DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(3):849-54.

MARGUERAT S, BÄHLER J. RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:569-79.

MASSAGUÉ J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 October;13(10): 616–30.

MOTEGI K, HARADA K, OHE G, JONES SJ, ELLIS IR, CROUCH DH, SCHOR SL, SCHOR AM. Differential involvement of TGF-beta1 in mediating the motogenic effects of TSP-1 on endothelial cells, fibroblasts and oral tumour cells. *Exp Cell Res*. 2008 Aug ;314(13):2323-33.

MOURSI, AM, NAJAFI M, GLOBUS RK, DAMSKY CH. Integrin fibronectin interactions are critical for osteogenesis and osteoblast differentiation. *J. Dent. Res*. 1997;76:2261.

NELSON CM, BISSELL MJ. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:287–309.

PALLERO MA, ELZIE CA, CHEN J, MOSHER DF, MURPHY-ULLRICH JE. Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J.* 2008 Nov;22(11):3968-79

PARKER RB, KOHLER JJ. Regulation of intracellular signaling by extracellular glycan remodeling. *ACS Chem Biol.* 2010;5(1):35-46.

QIAN Y, CHEN X. ID1, inhibitor of differentiation/DNA binding, is an effector of the p53-dependent DNA damage response pathway. *J Biol Chem.* 2008 Aug 15;283(33):22410-6.

QIAN X, TUSZYNSKI GP. Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996;212:199–207.

RATZINGER S, GRÄSSEL S, DOWEJKO A, REICHERT TE, BAUER RJ. Induction of type XVI collagen expression facilitates proliferation of oral cancer cells. *Matrix Biol.* 2011 Mar;30(2):118-25.

ROCHA B, CALAMIA V, CASAS V, CARRASCAL M, BLANCO FJ, RUIZ-ROMERO C. Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J Proteome Res.* 2014;7:13(2):1045-54.

SHIBANUMA M, KUROKI T, NOSE K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor β 1 and other growth factors. *J Biol Chem.* 1992;267:10219-24.

SCHNAPP LM, HATCH N, RAMOS DM, KLIMANSKAYA IV, SHEPPARD D, PYTELA R. The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem.* 1995 Sep 29;270(39):23196-202.

SHI Y, XIA YY, WANG L, LIU R, KHOO KS, FENG ZW. Neural cell adhesion molecule modulates mesenchymal stromal cell migration via activation of MAPK/ERK signaling. *Exp Cell Res.* 2012 Oct 15;318(17):2257-67.

SPENCER VA, XU R, BISSELL MJ. Gene Expression in the Third Dimension: The ECM-nucleus Connection. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(1): 65–71.

STOCK UA, VACANTI JP. Tissue Engineering: Current State and Prospects. *Annu Rev Med.* 2001;52:443-51.

STUDER D, LISCHER S, JOCHUM W, EHRBAR M, ZENOBI-WONG M, MANIURA-WEBER K. Ribosomal protein l13a as a reference gene for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells during expansion, adipo-, chondro-, and osteogenesis. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Oct;18(10):761-71.

TORRES JB, FREITAS MD, MÉNDEZ LL, SAMPEDRO FG, REY JMG, GARCÍA AG. Evaluation of the surgical difficulty in lower third molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6):e869-74.

YANG L, CHENG F, LIU T, LU JR, SONG K, JIANG L, WU S, GUO W. Comparison of mesenchymal stem cells released from poly(N-isopropylacrylamide) copolymerfilm and by trypsinization. *Biomed Mater.* 2012;7(3): 035003. Epub 2012 Feb 23.

YU H, WERGEDAL JE, ZHAO Y, MOHAN S. Targeted disruption of TGFBI in mice reveals its role in regulating bone mass and bone size through periosteal bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2012 Jul;91(1):81-7.

ZHOU ZJ, ZHANG JF, XIA P, WANG JY, CHEN S, FANG XQ, FAN SW. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time polymerase chain reaction in human cartilage end plate of the lumbar spine. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e88892.

NORMAS ADOTADAS

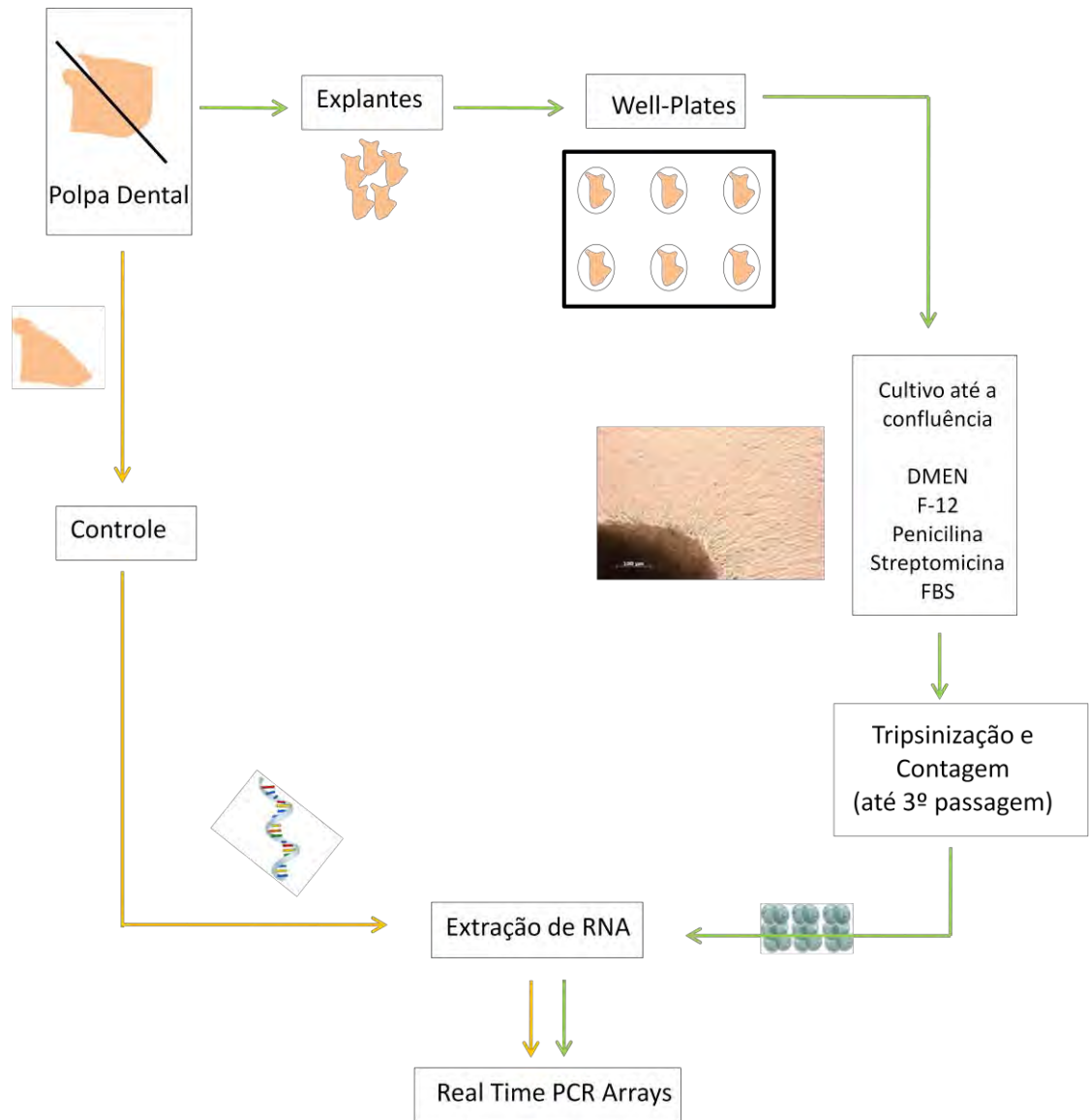
- ICMJE – *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal*. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF;1996. 24p.
- Consulta DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.
- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos científicos. São Paulo;2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Tissue Engineering (TE) aims to manufacture organs and tissues and advocates the use of autologous cells to avoid immune incompatibility. However, a longer culture time is necessary to achieve that purpose. Primary cultures often suffer undesirable differentiation, modifying behavior and cell fate. The use of proteolytic enzymes during cell passages is potentially harmful to cell physiology, but little importance has been given to this aspect in ET. These enzymes which digest the extracellular matrix (ECM) also alter surface proteins (SP) and interfere with cell-cell interactions (ICC). Consequently, may alter cell signaling by modifying gene expression, behavior and cell fate. **Objective:** To assess gene expression in the signaling TGF β / BMP pathway, in extracellular matrix and in adhesion molecules, of mesenchymal human dental pulp cells from tissue and cultured until third passage. **Methods:** We had evaluated gene expression by qRT-PCR array of signaling TGF β / BMP pathway, in extracellular matrix and in adhesion molecules, of mesenchymal cells from primary and third passage cultured human dental pulp **Results:** *COL16A1*(p=0,045), *TIMP1*(p=0,003), *THBS1*(p=0,027), *TGFBI*(p=0,001), *ITGA8*(p=0,002), *FNI*(p=0,035), *CD44*(p=0,046), *TSC22D1*(p=0,026) and *RPL13A*(p=0,017) genes had their expression increased and *NCAM1*(p=0,047), *BGLAP*(p=0,037) and *ID1*(p=0,027) genes had reduced expression compared to primary cells. **Conclusion:** There were modifications in gene expression after three passages. However, a single gene could not be enough to exert a key role in cell differentiation that is broadly affected by its relationship with the ECM and extracellular environment. The control by modulation of cellular differentiation, is an important aspect in the development of ET.

Keywords: Extracelular Matrix, Primary Cell Culture, Tissue Engineering, Transforming Growth Factor beta, Bone Morfogenetic Protein and Cell-Cell Intecation.

APÊNDICE 1 – FLUXOGRAMA DOS MÉTODOS

APÊNDICE 2 - PROTOCOLO TRIPSINIZAÇÃO DE CÉLULAS

Etapas do procedimento

Retirar as células da incubadora (37°C).

Com uma pipeta, retirar o meio de cultura da garrafa T 75.

Adicionar 2 ml de PBS para remover resíduos localizados na superfície das culturas, movimentando a garrafa para que a solução cubra toda a superfície. Repetir o procedimento.

Adicionar 1ml de tripsina e movimentar a garrafa para cobrir toda a superfície da cultura. Incubar a 37°C por 15 minutos.

Após 15 minutos, retirar a garrafa da incubadora e adicionar 5ml de meio de cultura e re-suspender a solução para homogeneizar a amostra. Levar a solução homogeneizada para um tubo falcon e repetir o procedimento.

Centrifugar as amostras a 1.500 RPM durante 10 minutos.

Retirar a amostra da centrífuga e desprezar o meio de cultura sobrenadante em Becker com hipoclorito, mantendo o pellet.

Adicionar 10ml de meio de cultura e re-suspender o pellet para homogeneizar a amostra.

APÊNDICE 3 - ANÁLISE DOS RESULTADOS UTILIZANDO O MÉTODO $\Delta\Delta$ CT PARA FORMATO ROTOR-DISC.

A1. Alterar todos os valores relatados como Ct superior a 33 ou N / A (não detectadas) a 33. Neste ponto, qualquer valor Ct igual a 33 é considerado negativo.

A2. Examine os valores de Ct dos poços de controle genômicos para DNA (GDC) da seguinte forma:

- Calculate o Ct GDC.

- Se o valor é superior a 33, o nível de contaminação por DNA genômico é demasiado baixo para afetar os resultados do perfil de expressão genica e nenhuma ação é necessária.

-Se o valor é inferior a 33, a contaminação do DNA genômico é evidente.

A3. Examinar os valores de Ct do controle de transcrição reversa (RTC) usando os valores para o controle positivo de PCR (PPC), como se segue:

Calcular Δ Ct = AVG Ct RTC - AVG Ct PPC.

-Se este valor é inferior a 5, então, não há inibição da reação de transcrição reversa aparente. Nenhuma ação é necessária.

-Se este valor é maior do que 5, existe evidência de impurezas que pode ter inibido a reação de transcrição reversa.

A4. Examine os valores de Ct dos poços de controle PCR positivos (PPC) como segue.

- Calculate o CtPPC.

- O valor médio CtPPC deve ser 14 ± 2 em cada array RT2 Profiler PCR e não deve variar mais do que dois ciclos entre os RT2 Profiler PCR Arrays que estão sendo comparados.
- Diferenças maiores nos valores médios entre os valores CtPPC entre as amostras indicam a presença de inibidores de amplificação por PCR. Isto significa que as amostras de RNA exigem purificação adicional.
- Valor médio de CtPPC que é sempre superior a 16 para todas as amostras pode indicar um problema com as condições de ciclagem ou simplesmente pode ser um indicativo da sensibilidade relativa de seu instrumento.

A5. Calcular o ΔCt para cada gene da via de sinalização em cada Rotor-disc utilizando os valores Ct para o gene de interesse (GOI) e os genes *housekeeping* utilizados para a normalização (HKG). Use a fórmula:
 $= \Delta Ct \text{ CtGOI} - CtAVG \text{ HKG}$.

Observação: O nível de expressão dos genes *housekeeping* escolhidos para a normalização não deve ser influenciada pelas condições experimentais. Se um ou mais desses genes *housekeeping* foram previamente identificados por meio independente e, se a matriz RT2 Profiler PCR reproduziu resultados anteriores, utilizar a média dos seus valores de Ct na equação acima. Se um gene *housekeeping* não tiver sido anteriormente identificado, utilizar o valor médio de Ct de todos os genes *housekeeping*. Alternativamente, use zero no lugar do CtHKG médio para cada grupo a ser comparado.

A6. Quando replicatas biológicas e / ou técnicas são realizadas, calcular o valor médio ΔCt de cada gene (cada poço) através das replicatas dos arrays para cada grupo experimental.

A7. Calcule o $\Delta\Delta Ct$ para cada gene através do 2 RT2 Profiler PCR Arrays (ou grupos de amostras). Utilizar a fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{grupo 2}) -$

ΔC_t (grupo 1), onde o grupo 1 é a amostra de controle ou grupo de amostras controles e o grupo 2 é a amostra experimental ou grupo de amostras experimentais.

A8. Calcule o *fold-change* para cada gene do grupo 1 para o grupo 2 como $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

DETALHAMENTO MATEMÁTICO DA EXPLICAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE DADOS $\Delta\Delta C_t$.

Devido à relação inversa entre o ciclo limiar (C_t) e o nível de expressão do gene original, e a duplicação da quantidade de produto em cada ciclo, o nível de expressão original (G) para cada gene de interesse é expresso como:

$$L = 2^{-C_T}$$

Para normalizar o nível de expressão de um gene de interesse (GOI) para um gene *housekeeping* (HKG), os níveis de expressão dos dois genes são divididos:

$$\frac{2^{-C_T(\text{GOI})}}{2^{-C_T(\text{HKG})}} = 2^{-[C_T(\text{GOI}) - C_T(\text{HKG})]} = 2^{-\Delta C_T}$$

Para determinar as alterações na expressão de genes em *fold-change*, a expressão normalizada do GOI na amostra experimental é dividida pela expressão normalizada da mesma GOI na amostra de controle:

$$\frac{2^{-\Delta C_T(\text{expt})}}{2^{-\Delta C_T(\text{ctrl})}} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{Where } \Delta\Delta C_T \text{ is equal to } \Delta C_T(\text{expt}) - \Delta C_T(\text{ctrl})$$

O cálculo completo segue como: RT2

$$\frac{\frac{2^{-\Delta_{CT}(\text{GOI})}_{\text{expt}}}{2^{-\Delta_{CT}(\text{HKG})}_{\text{expt}}}}{\frac{2^{-\Delta_{CT}(\text{GOI})}_{\text{ctrl}}}{2^{-\Delta_{CT}(\text{HKG})}_{\text{ctrl}}}} = \frac{2^{-[\Delta_{CT}(\text{GOI}) - \Delta_{CT}(\text{HKG})]_{\text{expt}}}}{2^{-[\Delta_{CT}(\text{GOI}) - \Delta_{CT}(\text{HKG})]_{\text{ctrl}}}} = \frac{2^{-\Delta_{CT}_{\text{expt}}}}{2^{-\Delta_{CT}_{\text{ctrl}}}} = 2^{-\Delta\Delta_{CT}}$$

APÊNDICE 4 – LISTA COMPLETA DOS GENES ANALISADOS NOS ARRAYS.

ARRAY DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO

Moléculas de adesão celular

Receptores transmembrânicos: *CD44, CDH1 (E-Cadherin), HAS1, ICAM1, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4 (CD49D), ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, MMP14, MMP15, MMP16, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL (LECAM-1), SELP, SGCE, SPG7, VCAM1.*

Adesão célula-célula: *CD44, CDH1 (E-Cadherin), COL11A1, COL14A1, COL6A2, CTNND1, ICAM1, ITGA8, VCAM1.*

Adesão célula-Matriz extracelular: *ADAMTS13, CD44, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4 (CD49D), ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, SGCE, SPP1, THBS3.*

Outras moléculas de adesão: *CNTN1, COL12A1, COL15A1, COL16A1, COL5A1, COL6A1, COL7A1, COL8A1, VCAN, CTGF, CTNNA1, CTNNB1, CTNND2, FNI, KAL1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, THBS1 (TSP-1), THBS2, CLEC3B, TNC, VTN.*

Moléculas de matriz extracelular

Constituintes de membrana basal: *COL4A2, COL7A1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPARC.*

Constituintes estruturais de colágeno e matriz extracelular: *COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL1A1, COL4A2, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL7A1, COL8A1, FNI, KAL1.*

Proteases de matriz extracelular: *ADAMTS1, ADAMTS13, ADAMTS8, MMP1, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, SPG7, TIMP1.*

Inibidores de proteases de matriz extracelular: *COL7A1, KAL1, THBS1 (TSP-1), TIMP1, TIMP2, TIMP3.*

Outras moléculas de matriz extracelular: *VCAN, CTGF, ECM1, HAS1, SPP1, TGFBI, THBS2, THBS3, CLEC3B, TNC, VTN.*

ARRAY DE MATRIZ TGF β /BMP

Ligantes da superfamília TGF β : *INHA, INHBA, INHBB, AMH, BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, GDF2 (BMP9), GDF3 (VGR-2), GDF5 (CDMP-1), GDF6, GDF7, NODAL, TGFB1, TGFB2, TGFB3, BAMBI, CHRDL, DCN, FST, LEFTY1, LTBP1, LTBP2, NOG, TGFBI, TGFBRAP1, THBS1, TGIF1.*

Receptores da superfamília TGF β : *ACVR1 (ALK2), ACVR2A, ACVRL1 (ALK1), AMHR2, BMPRIA (ALK3), BMPR1B (ALK6), BMPR2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3.*

Reguladores e fatores de transcrição: *DLX2, FOS, GSC, HIPK2, ID1, JUN, JUNB, MYC, RUNX1 (AML1), SMAD1 (MADH1), SMAD2 (MADH2), SMAD3 (MADH3), SMAD4 (MADH4), SMAD5 (MADH5), SMAD7, SOX4, STAT1, TGFB111, TSC22D1 (TGFB114).*

Genes alvo SMAD:

TGF β responsivo: *ATF4, CDKN1A (p21WAF1/p21CIP1), CDKN1B (p27KIP1), CDKN2B (p15INK2B), COL1A1, COL1A2, DCN, EMP1, FOS, GADD45B, GSC, HERPUD1, IFRD1, IGF1, IGFBP3, IL6, JUN, JUNB, MYC, PDGFB, SERPINE1 (PAI-1), TGFB111, TNFSF10, TSC22D1 (TGFB114), TGFBI, TGIF1.*
BMP-Responsivo: *BGLAP (Osteocalcin), DLX2, ID1, ID2, JUNB, SOX4, STAT1.*

Moléculas de sinalizadoras da regulação da superfamília TGF β : *BAMBI, BMPER, CDKN2B (p15INK2B), CHRDL, ENG (Evi-1), MECOM, FST (Follistatin), HIPK2, NOG, PLAU (uPA), RUNX1 (AML1), SMURF1.*

Moléculas extracelulares e de adesão:

Moléculas de adesão: *BGLAP (Osteocalcin), ENG (Evi-1), TGFB111, TGFBI.*
Constituintes estruturais de matriz extracelular: *BGLAP (Osteocalcin), COL1A1, COL1A2, LTBP1, LTBP2, TGFBI.*

Genes envolvidos em processos celulares e de desenvolvimento:
Apoptose: *CDKN1A (p21WAF1/p21CIP1), CDKN1B (p27KIP1), HIPK2, IGFBP3, INHA, INHBA, STAT1, TGFBI.*

Desenvolvimento embrionário: *BMP4, INHBA, MECOM, SMAD3, SMURF1.*

Desenvolvimento Muscular: *DCN, IGF1, SMAD3.*

Neurogênese: *DLX2, INHA, INHBA, NOG.*

Reprodução: *AMH, AMHR2, FST* (Follistatin), *INHA, INHBA, INHBB*.

Desenvolvimento esquelético: *BGLAP* (Osteocalcin), *BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMPR2, CHRD, COL1A1, COL1A2, IGF1, INHA, INHBA, NOG*.

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1- TÍTULO DA PESQUISA - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO TGF β /BMP, MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DE ADESÃO EM CÉLULAS MESENQUIMAIS DE POLPA DENTAL HUMANA PRIMÁRIAS E SOB CULTURA.

2 – PROPOSTAS DE ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Pesquisa. Antes de decidir se quer participar ou não, é importante que entenda porque o Estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Por favor, leia com atenção as informações ou peça que as mesmas sejam lidas a você pelo profissional que está apresentando. Sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos visando responder as suas dúvidas.

O objetivo desta pesquisa é verificar as modificações que ocorrem em células dentárias cultivadas em laboratório, visando a segurança na aplicação clínica futura destas células em substitutos biológicos de dentes. Para este estudo serão utilizados dentes com indicação de extração, avaliados por meio de exame clínico e radiográfico, os quais em condições normais seriam desprezados após a cirurgia. A sua participação será somente como doador do órgão dentário. No laboratório, serão extraídas as células dentárias.

3 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes incluídos neste estudo deverão concordar com o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** assinando o protocolo clínico anexado.

Após os exames clínico e radiográfico e constatada a indicação de extração dental como único tratamento, você será submetido ao procedimento cirúrgico. Este procedimento é

exatamente igual ao praticado na rotina odontológica e também seria realizado independente deste estudo.

4 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS

O procedimento cirúrgico consistirá na extração dentária e você poderá ser medicado com anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e analgésicos de acordo com as rotinas e necessidades clínicas pré e pós-operatórias de cirurgias de dentes inclusos.

5 - RISCOS E DESCONFORTO

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos nos procedimentos de extração dentária ocorrerão independentemente da sua participação nesta pesquisa. Os riscos e desconfortos poderão ser:

Anestesia local durante a cirurgia: dor da punção na anestesia; sensação de amortecimento na região; pressão, vibração.

No pós-operatório: inchaço; dor; limitação de movimento; dor na articulação da boca; mal gosto e febre.

Todos os itens descritos são os mesmos observados em procedimentos semelhantes à extração dental de dentes inclusos. Você não deverá deixar de informar ao profissional a respeito de quaisquer dúvida ou sintomas que observar telefonando imediatamente ao profissional responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

6 - BENEFÍCIOS

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento *in vitro* (em laboratório) das células dentais. Este protocolo de estudo não lhe trará benefícios diretos mas, ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. Somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de benefícios e o quanto úteis eles poderão ser.

7 - ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO

Caso você opte por não participar deste Protocolo de Pesquisa não doando o dente, o profissional responsável dispensará o mesmo jogando-o no lixo contaminado.

8 - GARANTIA DE ACESSO

Você terá acesso a todo e qualquer destino dado às células utilizadas e/ou estocadas, além dos resultados obtidos com este estudo, garantimos que em qualquer etapa, você poderá esclarecer suas eventuais dúvidas com os profissionais responsáveis pela pesquisa. Os principais investigadores são Profs. Drs. Silvio Eduardo Duailibi e Monica Talarico Duailibi que podem ser encontrados no seguinte endereço: Av. Chibará, 452 e no telefone 011- 5051 1898. A aluna Vanessa Penna é participante da pesquisa e pode ser contatada pelo telefone 011-8919 9480. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br.

9 – PARTICIPAÇÃO

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa.

10 - CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários. Tanto o profissional responsável quanto a equipe envolvida, manterão em sigilo absoluto sua identidade e as informações que você vier a apresentar. Você não será identificado em nenhuma publicação onde o conteúdo do trabalho seja apresentado, garantindo o segredo profissional.

11 – ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, após a sua extração. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional no estudo, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – COMPROMISSO

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise da expressão gênica das vias de sinalização $tgf\beta$ /bmp, matriz extracelular e moléculas de adesão em células mesenquimais de polpa dental humana primárias e sob cultura.” Eu discuti com o Dr. Silvio Eduardo Duailibi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/_____

Assinatura da Testemunha

Data: ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/___

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE DEZOITO ANOS

Meu nome é Vanessa Penna e o meu trabalho é coletar células de dente e avaliar as modificações que ocorrem nas células em laboratório. Queremos melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e achamos que esta pesquisa pode ajudar nisso. Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não, é você quem decide. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça para parar a qualquer momento e eu explicarei.

Estamos testando células de adolescentes/adultos jovens de sua idade porque as suas células estão mais novas e mais adequadas para esta pesquisa.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Se decidir não participar da pesquisa, nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde

estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

A sua saúde é muito importante e você veio ao dentista para tratá-la. O seu dente precisa ser arrancado mesmo que você decida não participar desta pesquisa. Para participar desta pesquisa você deve doar o seu dente que seria jogado no lixo para utilizarmos em laboratório.

O uso do dente em laboratório é seguro e já foi testado em outras crianças e adolescentes. Não houve nada que nos preocupasse. Porém, se qualquer coisa incomum acontecer a você, você deverá se sentir à vontade de nos chamar a qualquer momento para falar sobre suas preocupações ou perguntas. Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. Talvez você sinta dor depois que o seu dente for arrancado, mas isso é passageiro e não tem nada a ver com este estudo.

A sua participação nesta pesquisa é muito importante para melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes. Isto irá ajudar muitas pessoas agora ou mais tarde. Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não comunicaremos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Eu entendi que a pesquisa é sobre a avaliação do desenvolvimento de células em laboratório. Eu entendi que o meu dente precisa ser arrancado mesmo que eu não queira participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/___

Assinatura dos Pais ou Responsável

Data: ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/___

ANEXO II – APROVAÇÃO CEP - UNIFESP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título:ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DE RNA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS CULTIVADAS EM CELL SHEETS

Área Temática:

Pesquisador: Vanessa Penna

Versão: 2

Instituição: Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

CAAE: 06089012.4.0000.5505

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 81404

Data da Relatoria: 24/08/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Recomendações:

Conforme parecer CEP 72596 de 13/8/2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias adequadamente respondidas. Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

As pendências foram atendidas, o colegiado acatou o parecer do relator. Projeto aprovado.

SAO PAULO, 24 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

FINANCIAMENTO

Configuram como parceiros do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação - UNIFESP a Faculdade de Engenharia de Materiais, Química e Mecânica da UNICAMP, a FAPESP vinculada ao Projeto JP 07/51227-4, o CNPq vinculado ao projeto n° 573661/2008-1 do INCT Biofabris (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biofabricação) e FAPESP 08/57860-3, além do apoio da Rede Ibero-Americana de Biofabricação – Cytel.

O presente projeto possui auxílio regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP 2013/00288-4.