



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

*COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE  
DECÍDUO E PERMANENTE*

**Aluno: Agner Henrique Dorigo Hochuli**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Co-Orientadora: Dra. Letícia Fracaro

**Curitiba**

**2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

*COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE  
DECÍDUO E PERMANENTE*

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Co-Orientadora: Dra. Letícia Fracaro.

**Curitiba  
2021**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

H685c  
2021 Hochuli, Agner Henrique Dorigo  
Comparação do potencial de diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente decíduo e permanente / Agner Henrique Dorigo Hochuli ; orientador: Paulo Roberto Slud Brofman ; co-orientadora: Leticia Fracaro.– 2021.  
81 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021  
Bibliografias: 61-72

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Biomarcadores. 3. Ectoderma. 4. Polpa dentária. I. Brofman, Paulo Roberto Slud. II. Fracaro, Leticia. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL  
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 14 dias do mês de maio de 2021 às 09:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE DECÍDUO E PERMANENTE" apresentado por Agner Henrique Dorigo Hochuli para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman - Presidente	
Profa. Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto (PUCPR)	
Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura (UFRN)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman                      Conceito: **aprovado**

Profa. Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto                      Conceito: **aprovado**

Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura                      Conceito: **aprovado**

**Parecer Final: aprovado**

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Presidente da Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR



## FOLHA INFORMATIVA

*A dissertação foi elaborada seguindo a normatização Vancouver. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, no Núcleo de Tecnologia Celular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente meus pais, José Mauricio Hochuli e Cassiana Lucia Dorigo Hochuli, que nunca pouparam esforços para me oferecer uma educação de qualidade, e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Muito obrigado!

À minha irmã, Alexia Dorigo Hochuli, que sempre me apoiou e incentivou, e minhas irmãs de quatro patas: Lisa, Jade e Bebel por me alegrarem em todos os momentos.

À minha co-orientadora Dra. Leticia Fracaro, por me aceitar como seu primeiro orientado, por acreditar em mim quando muitas vezes eu não acreditava, pelo companheirismo, pelas risadas, pelas divertidas noites no laboratório fazendo experimentos e pela confiança, muito obrigado!

À Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, por todas as orientações, conversas, debates e cafés. Obrigado por sempre me encorajar a seguir novos desafios e, acima de tudo, confiar em mim.

Ao meu orientador Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, por confiar em mim para realização deste projeto e por todo auxílio durante este período.

Aos meus companheiros, parceiros de laboratório e da vida, que ajudaram a tornar essa experiência o mais leve possível, Bruna Schaidt e Mateus Oliveira Lisboa, muito obrigado!

À Dra. Fabiane Barchiki, que me ensinou as técnicas de cultivo celular e esteve comigo desde o início da minha jornada como jovem pesquisador e, com certeza, teve um papel fundamental para minha formação.

À Dra. Lidiane Maria Boldrini Leite, por todos os ensinamentos e momentos divertidos no laboratório.

À Dra. Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto, por todo o ensinamento, incentivos, debates, momentos de risadas e também pelas tortas, bolos e pudins.

A todos os integrantes do Núcleo de Tecnologia Celular, que de alguma maneira contribuíram para a execução deste projeto.

A todos meus companheiros do Laboratório de Medicina Regenerativa da Universidade de Pádua – Itália, Dr. Maurizio Muraca, Dra. Michela Pozzobon, Fabio, Anna, Mattia, Riccardo, Marco, Anna Maria, Giada, Stefania, Michele e Federica, que me ensinaram técnicas fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Paula Maíra Portela do Nascimento, secretária da Pós-graduação, pelo auxílio durante esses anos.

À Coordenação da Iniciação Científica da PUCPR pelo apoio financeiro e bolsa de estudos concedidos para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** As células-tronco mesenquimais (MSC) atuam na reparação e manutenção dos tecidos adultos. Essas células secretam vários fatores solúveis que podem diminuir a inflamação e aumentar a reparação do tecido danificado, características que incentivam seu uso na medicina regenerativa. As MSC de tecido dentário são de fácil coleta, têm a mesma origem embrionária dos neurônios e expressam constitutivamente os marcadores de proteínas neuroprogenitoras que estimulam estudos para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) e permanentes (DPSC) expressam marcadores neuronais e já são conhecidas pelo potencial de diferenciação em células do tecido nervoso, como neurônios e células gliais. Porém, ainda não está claro qual dessas fontes, SHED ou DPSC, tem maior potencial de diferenciação neuronal. **Objetivo:** Comparar as MSC de polpa de dente decíduo e polpa de dente permanente em relação ao potencial de diferenciação neuronal. **Metodologia:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CAAE: 09537119.0.0000.0020). Foram coletados três dentes decíduos de crianças e três dentes permanentes (3º molar) de adultos. As MSC foram isoladas por digestão enzimática e cultivadas com meio IMDM e 15% de SBF. Foram caracterizadas conforme sua morfologia fibroblastóide, diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e caracterizadas imunofenotipicamente com os marcadores sugeridos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). Foi avaliado a potencial clonogênico, proliferativo e senescente das células em diferentes passagens celulares. Para avaliar qual fonte de origem dentária, SHED ou DPSC, tem maior potencial para diferenciação na linhagem neuronal, as células foram induzidas à diferenciação neuronal por 21 dias. Para confirmar a diferenciação, ambas as fontes foram caracterizadas por imunofluorescência e perfil imunofenotípico com marcadores neuronais específicos. **Resultados:** As SHED e DPSC apresentaram morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico, positividade para os marcadores CD29, CD73, CD90 e CD105 e negatividade para CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR. Foi observado nas SHED e DPSC a diferenciação osteogênica e condrogênica, porém não a adipogênica. As SHED apresentaram maior potencial em formar colônias fibroblastóides ( $p=0,0042$ ). Não houve diferença estatística significativa nos ensaios de proliferação e senescência celular entre as fontes durante as passagens. Antes da indução à diferenciação neuronal (estágio indiferenciado) as SHED e DPSC expressaram marcadores neuronais como  $\beta$ tubulina III, SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina, nestina, CD271, CD56 e CD146. O perfil imunofenotípico das SHED e DPSC após a indução à diferenciação neuronal foi semelhante ao estágio indiferenciado, não houve diferença significativa entre as fontes. **Conclusão:** Foi possível observar a expressão precoce de marcadores neuronais nas SHED e DPSC possivelmente porque essas células compartilham a mesma origem embrionária dos neurônios, a ectoderme. O conjunto de dados obtido neste estudo confirma que não há diferença em induzir as SHED e DPSC na linhagem neuronal *in vitro* em relação a expressão de marcadores neuronais. Isto estimula o uso dessas células em estágio indiferenciado para estudos futuros no tratamento de doenças neurodegenerativas.

**Palavras chaves:** células-tronco mesenquimais, ectoderme, diferenciação neuronal, marcadores neuronais.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mesenchymal stem cells (MSC) act in the repair and maintenance of adult tissues. These cells secrete several soluble factors that can decrease inflammation and increase the repair of damaged tissue, characteristics that encourage its use in regenerative medicine. Dental tissue MSC is easy to collect. They have the same embryonic origin as neurons and constitutively express the neuroprogenitor protein markers that stimulate their use in treating neurodegenerative diseases. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and permanent teeth (DPSC) express neuronal markers. They are already known for the potential for differentiation in nerve tissue cells such as neurons and glial cells. However, it is not yet clear which of these sources, SHED or DPSC has the most significant neuronal differentiation potential. **Objective:** To compare the MSC of deciduous tooth pulp and permanent tooth pulp concerning neuronal differentiation potential. **Methodology:** The Research Ethics Committee of PUCPR approved this study (CAAE: 09537119.0.0000.0020). Three primary teeth were collected from children and three permanent teeth (3<sup>rd</sup> molar) from adults. MSC were isolated by enzymatic digestion and cultured with IMDM medium and 15% FBS. They were characterized according to their fibroblastoid morphology, differentiation in adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineage and characterized immunophenotypically with the markers suggested by the International Society for Cellular Therapy (ISCT). The clonogenic potential and the proliferative and senescent capacity of these sources in different cell passages were evaluated. To assess which source of dental origin, SHED or DPSC, has a higher potential for differentiation in the neuronal lineage, the cells were induced to neuronal differentiation for 21 days. Immunofluorescence and immunophenotypic profile with specific neuronal markers were performed to confirm the differentiation. **Results:** SHED and DPSC showed fibroblast morphology, adhesion to plastic, positive immunophenotypic profile for the CD29, CD73, CD90, CD105 markers, and reduced expression CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR. Osteogenic and chondrogenic differentiation was observed in SHED and DPSC but not adipogenic. SHED showed more significant potential to form fibroblast colonies ( $p=0,0042$ ). There was no statistically significant difference in the cell proliferation and senescence assay between the passages. Before inducing neuronal differentiation (native stage), SHED and DPSC immunoexpressed neuronal markers such as  $\beta$ III-tubulin, SOX1, SOX2, GFAP, doublecortin, nestin, CD271, CD56, and CD146. The immunophenotypic profile of SHED and DPSC after induction to neuronal differentiation was similar to the native stage; there was no significant difference between the sources. **Conclusion:** It was possible to observe the early expression of neuronal markers in SHED and DPSC, possibly because they share the same embryonic origin of neurons, the ectoderm. The data set obtained in this study confirms that there is no difference in inducing SHED and DPSC in the neuronal lineage concerning the expression of neuronal markers *in vitro*, stimulating the use of these cells in an undifferentiated stage for future treatment of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, ectoderm, neuronal differentiation, neuronal markers.

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
®	registrada
<b>APC</b>	aloficocianina (do inglês <i>allophycocyanin</i> )
<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
<b>BMMSC</b>	Célula-tronco mesenquimal derivada da medula óssea (do inglês <i>bone marrow mesenchymal stem cell</i> )
<b>BMP2</b>	proteína morfogenética óssea 2 (do inglês <i>bone morphogenic protein 2</i> )
<b>BrdU</b>	bromodesoxiuridina
<b>CD</b>	grupos de diferenciação celular (do inglês <i>cluster of differentiation</i> )
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês <i>complementar desoxyribonucleic acid</i> )
<b>CFU-F</b>	unidades formadoras de colônias fibroblastóides (do inglês <i>colony forming units-fibroblast</i> )
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro quadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DAPI</b>	4',6'-diamino-2-fenil-indol
<b>DFPC</b>	células precursoras do folículo dentário (do inglês <i>dental follicle precursor cells</i> )
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>DPSC</b>	células-tronco da polpa de dente permanente (do inglês <i>dental pulp stem cells</i> )
<b>DPSCa</b>	células-tronco da polpa de dente permanente (do inglês <i>dental pulp stem cells</i> ) induzida à diferenciação adipogênica

<b>DPSCd</b>	células-tronco da polpa de dente permanente (do inglês <i>dental pulp stem cells</i> ) induzida à diferenciação neuronal
<b>DPSCo</b>	células-tronco da polpa de dente permanente (do inglês <i>dental pulp stem cells</i> ) induzida à diferenciação osteogênica
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>EdU</b>	5-etinil-2'-desoxiuridina
<b>EGF</b>	fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor</i> )
<b>EPM</b>	erro padrão médio
<b>ESC</b>	células-tronco embrionárias (do inglês <i>embryonic stem cells</i> )
<b>FABP4</b>	proteína 4 de ligação ao ácido graxo (do inglês <i>fatty-acid-binding proteins</i> )
<b>FACS</b>	separador de células ativadas por fluorescência (do inglês <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
<b>FGF/bFGF</b>	fator de crescimento de fibroblasto (do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i> )
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GFAP</b>	proteína glial ácida fibrilar (do inglês <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>HLA</b>	sistema antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human leukocyte antigen</i> )
<b>igG1</b>	Imunoglobulina G1
<b>IMDM</b>	meio Iscove modificado Dulbecco (do inglês <i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i> )

<b>iPSC</b>	células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> )
<b>ISCT</b>	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês <i>International Society for Cellular Therapy</i> )
<b>LECC</b>	Laboratório Experimental de Cultivo Celular
<b>MAP2</b>	proteína associada a microtúbulos 2 (do inglês <i>microtubule-associated protein 2</i> )
<b>mM</b>	milimolar
<b>MO</b>	medula óssea
<b>mRNA</b>	ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<b>MSC</b>	células-tronco mesenquimais (do inglês <i>mesenchymal stem cell</i> )
<b>n.s</b>	não significativo
<b>nestina</b>	proteína de células-tronco neuroepiteliais (do inglês <i>acronym for neuroectodermal stem cell marker</i> )
<b>NeuN</b>	proteína do núcleo neuronal (do inglês <i>neuronal nuclei protein</i> )
<b>ng</b>	nanograma
<b>nm</b>	nanômetro
<b>NSC</b>	células-tronco neuronais (do inglês <i>neural stem cells</i> )
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>Oct-4</b>	fator de transcrição de ligação de octâmero 4 (do inglês <i>octamer-binding transcription factor 4</i> )
<b>p</b>	valor de p
<b>P</b>	passagem
<b>PBS</b>	solução salina fosfatada (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )



<b>PDLSC</b>	células-tronco do ligamento periodontal (do inglês <i>periodontal ligament stem cells</i> )
<b>PE</b>	ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i> )
<b>PerCP</b>	complexo proteína clorofila peridininina (do inglês <i>peridinin chlorophyll protein complex</i> )
<b>PFA</b>	paraformaldeído
<b>PPARy2</b>	proliferadores de peroxissoma gamma 2 (do inglês <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma 2</i> )
<b>PSA-NCAM</b>	molécula de adesão de células neurais (do inglês <i>polysialic acid-neural cell adhesion molecule</i> )
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RT-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
<b>RTq-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (do inglês <i>reverse transcription quantitative real time</i> )
<b>SBF</b>	soro bovino fetal
<b>SC</b>	células-tronco (do inglês <i>stem cell</i> )
<b>SCAP</b>	células-tronco da papila apical (do inglês <i>stem cells from apical papilla</i> )
<b>SHED</b>	células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado (do inglês <i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> )
<b>SHEDa</b>	células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado (do inglês <i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> ) induzida à diferenciação adipogênica
<b>SHEDd</b>	células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado (do inglês <i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> ) induzida à diferenciação neuronal

<b>SHEDo</b>	células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado (do inglês <i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> ) induzida à diferenciação osteogênica
<b>SOX1</b>	SRY (região sexual determinante Y) box 1 (do inglês <i>SRY-Box Transcription Factor 1</i> )
<b>SOX2</b>	SRY (região sexual determinante Y) box 2 (do inglês <i>SRY (sex determining region Y) box 2</i> )
<b>SRY</b>	região sexual determinante Y (do inglês <i>sex-determining region Y</i> )
<b>TCLE</b>	termo de consentimento livre e esclarecido
<b>™</b>	marca comercial (do inglês <i>Trade Mark</i> )
<b>vs.</b>	<i>versus</i>
<b>βtubulinIII</b>	beta tubulina de classe III
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes fontes de MSC do tecido dentário.....	20
Figura 2. Desenho do estudo. ....	27
Figura 3. Imagens representativas do cultivo celular das SHED e DPSC.. ....	38
Figura 4. Diferenciação <i>in vitro</i> das SHED e DPSC. ....	39
Figura 5. Quantificação da intensidade de Oil Red O por densidade óptica (absorbância) nas amostras SHED e DPSC controle e nas SHED e DPSC induzidas à diferenciação adipogênica. ....	40
Figura 6. Quantificação da intensidade de Alizarina Red S por densidade óptica (absorbância) nas amostras SHED e DPSC controle e nas SHED e DPSC induzidas à diferenciação osteogênica. ....	41
Figura 7. Análise da expressão do marcador STRO-1 por citometria de fluxo, representando as médias amostras de SHED e DPSC. ....	43
Figura 8. Ensaio de formação de colônia das SHED e DPSC. ....	44
Figura 9. Ensaio de proliferação celular avaliando a incorporação do nucleosídeo EdU durante 24 (vinte e quatro) horas em SHED e DPSC nas passagens 3 (três), 5 (cinco) e 7 (sete). ....	45
Figura 10. Determinação de células viáveis obtidas no ensaio de proliferação celular das amostras de SHED e DPSC, nas passagens 3 (três), 5 (cinco) e 7 (sete). ....	45
Figura 11. Ensaio de senescência celular avaliando expressão da enzima $\beta$ -galactosidase, por citometria de fluxo, em SHED e DPSC nas passagens 3 (três), 6 (seis), 9 (nove) e 12 (doze). ....	46
Figura 12. Diferenciação <i>in vitro</i> das SHED marcadas com o anticorpo anti- $\beta$ tubulinalll. ....	47
Figura 13. Diferenciação <i>in vitro</i> das DPSC marcadas com o anticorpo anti- $\beta$ tubulinalll. ....	47
Figura 14. Intensidade de fluorescência da expressão da proteína $\beta$ tubulinalll SHED e DPSC controle e nas SHED e DPSC induzidas à diferenciação neuronal. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados referentes a caracterização imunofenotípica das amostras de SHED e DPSC.....	42
Tabela 2. Caracterização imunofenotípica das SHED, DPSC, SHED induzida à diferenciação neuronal e DPSC induzidas à diferenciação neuronal utilizando marcadores da linhagem neuronal. ....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios de inclusão e exclusão para seleção das amostras de SHED e DPSC. ....	27
Quadro 2. Marcadores utilizados na caracterização das SHED e DPSC. ....	32
Quadro 3. Marcadores neuronais utilizados na caracterização das SHED e DPSC antes e após a indução à diferenciação neuronal. ....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 CÉLULAS-TRONCO .....	17
1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	18
1.3 CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA .....	19
1.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO .....	21
1.5 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE PERMANENTE .....	22
1.6 MARCADORES NEURONAIS .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO .....	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO .....	28
<b>4.2.1 Diferenciação Adipogênica</b> .....	<b>29</b>
4.2.1.1 <i>Quantificação da diferenciação adipogênica</i> .....	29
<b>4.2.2 Diferenciação Condrogênica</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.3 Diferenciação Osteogênica</b> .....	<b>30</b>
4.2.3.1 <i>Quantificação da diferenciação osteogênica</i> .....	31
<b>4.2.4 Caracterização imunofenotípica</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2.5 Ensaio de unidade formadora de colônia – fibroblastóides (CFU-F)</b> .	<b>32</b>
4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO .....	33
4.4 ENSAIO DE SENESCÊNCIA .....	33
4.5 INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL .....	34
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS INDUZIDAS À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL .....	34
<b>4.6.1 Imunofluorescência</b> .....	<b>34</b>
4.6.1.1 <i>Quantificação da intensidade do sinal fluorescente</i> .....	35
<b>4.6.2 Perfil Imunofenotípico</b> .....	<b>35</b>

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS SHED E DPSC .....	38
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SHED E DPSC .....	38
<b>5.2.1 Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.2 Análise do perfil imunofenotípico .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.3 Quantificação das unidades formadoras de colônia fibroblastóides</b> <b>(CFU-F).....</b>	<b>43</b>
5.3 INCORPORAÇÃO DO NUCLEOSÍDEO EdU .....	44
5.4 EXPRESSÃO DA BETA-GALACTOSIDASE.....	45
5.5 EXPRESSÃO DE BETA-TUBULINA III .....	46
5.6 EXPRESSÃO DE MARCADORES NEURONAIS ANTES E APÓS A INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL .....	48
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (SC – do inglês *stem cell*) são células não especializadas que possuem alto potencial de autorrenovação e são capazes de dar origem a diferentes tipos de células <sup>[1]</sup>. Foi observado que em determinadas condições ambientais, ou na presença de sinais específicos, uma SC pode dar origem a diferentes tipos celulares, assumindo morfologia e funcionalidade especializadas <sup>[2]</sup>.

Essas células podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação (totipotente, pluripotente e multipotente) e sua origem (embrionária e adulta) <sup>[3,4]</sup>. As células-tronco totipotentes são encontradas nas primeiras etapas de desenvolvimento do embrião, desde o zigoto e as células provenientes do seu desenvolvimento até a fase de mórula. Estas células podem se diferenciar em qualquer tipo de célula do organismo e anexos embrionários <sup>[5]</sup>. As SC consideradas pluripotentes podem dar origem a células dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), um exemplo de SC pluripotentes são as células-tronco embrionárias (ESC – do inglês *embryonic stem cells*), que são obtidas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento, porém sua utilização em pesquisa possui limitações devido a implicações éticas <sup>[3,4,6,7]</sup>. Uma alternativa à utilização das ESC são as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC – do inglês *induced pluripotent stem cells*). Essas células (geralmente células somáticas) são geneticamente reprogramadas para expressar genes responsáveis por características pluripotentes, assim se assemelhando as ESC à nível transcricional e epigenético <sup>[8-11]</sup>. Apesar de possuir algumas limitações, como envelhecimento prematuro, alta taxa de apoptose e alto custo para obtenção e expansão, as iPSC apresentam vantagens como: ausência de questões éticas, menor taxa de imunorejeição e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares <sup>[10,12]</sup>.

As células-tronco adultas, por sua vez, são consideradas multipotentes e podem ser encontradas em vários tecidos que compõem todo o organismo e exibem comportamentos diferentes dependendo do microambiente em que se encontram <sup>[13]</sup>. Sua principal função é manter a homeostase celular e atuar na renovação e na manutenção de tecidos mesenquimais adultos. Em muitos tecidos, existe um número



reduzido de células-tronco, que estão localizadas em um microambiente especializado e vascularizado denominado nicho [3-5,14-16].

## 1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSC – do inglês *mesenchymal stem cell*) foram identificadas pela primeira vez por Friedenstein e colaboradores (1966) [17] que avaliaram as células progenitoras da medula óssea de ratos, residentes no compartimento estromal da medula óssea [18].

As MSC são células adultas multipotentes e funcionalmente definidas como tendo capacidade de autorrenovação, diferenciação em várias linhagens celulares e extensa atividade parácrina e imunomoduladora [14,19-21]. Inicialmente, pensava-se que as MSC eram capazes de se diferenciar exclusivamente em linhagens de células da mesma origem embrionária do tecido de onde foram isoladas, mas vários estudos demonstraram que essas células possuem uma alta taxa de plasticidade *in vitro* [2,18,22], e são capazes de se diferenciar em células de outras origens embrionárias além da mesoderme, como células neuronais derivadas da ectoderme [23] e células  $\beta$  de ilhotas pancreáticas derivadas da endoderme [24].

A função primária das MSC *in vivo* é atuar na reparação e manutenção dos tecidos adultos. Essas células secretam vários fatores solúveis que podem diminuir a inflamação e aumentar a reparação do tecido danificado [25]. Além disso, apresentam efeitos antiapoptóticos, anti-fibróticos que funcionam como inibidores da formação de cicatrizes e estimuladores da angiogênese. As MSC apresentam baixa ou nenhuma expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II e moléculas coestimuladoras, demonstrando sua reduzida imunogenicidade e evitando o uso de imunossupressores após um transplante alogênico [19,26-29].

Devido à necessidade de padronização das MSC, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT - do inglês *International Society for Cellular Therapy*) estabeleceu padrões para a caracterização de MSC, que são adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e caracterização imunofenotípica, na qual as MSC devem expressar os marcadores de superfície (mais que 95% da população) CD73, CD90 e CD105 e

expressão negativa (menos que 2% da população) para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR [21,30,31].

A célula-tronco mesenquimal derivada da medula óssea (BMMSC – do inglês *bone marrow mesenchymal stem cell*) é a fonte de MSC mais estudada, porém, apresenta algumas limitações como coleta invasiva e baixa porcentagem de MSC (cerca de 0,01% a 0,001% de MSC), as tornando uma fonte pouca atrativa para o isolamento de MSC [32,33]. Por esses motivos, outras fontes de MSC têm sido estudadas como o cordão umbilical, tecido adiposo e tecidos dentários [33–35]. O tecido dentário tem maior capacidade de proliferação celular e uma vantagem significativa de diferenciação osteogênica quando comparado a BMMSC [36,37].

### 1.3 CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM DENTÁRIA

Durante a embriogênese, as células que derivam da ectoderme, mais especificamente da crista neural, dão origem à tecidos neurais e não neurais. Diversos genes participam neste processo de desenvolvimento, sendo expressos ou silenciados de acordo com o comissionamento das células [38]. Genes como da proteína ácida fibrilar glial (GFAP – do inglês *glial fibrillary acidic protein*) e o marcador de células-tronco neuroectodérmicas (Nestina - do inglês *acronym for neuroectodermal stem cell marker*) são expressos durante a fase de proliferação e diferenciação celular, enquanto a beta tubulina de classe III ( $\beta$ tubulinIII) é expressa durante a migração celular [39–41].

Os tecidos derivados da crista neural incluem a polpa, o ligamento periodontal e os tecidos que sustentam a raiz e seu ápice, incluindo os seguintes tipos de células: odontoblastos, células do ligamento periodontal, células gliais e célula-tronco da polpa dentária [42–47]. Estudos sugerem que algumas células dos tecidos dentários e periodontais podem ter um potencial superior de diferenciação em múltiplas linhagens e podem ser comparadas as células embrionárias e células pluripotentes induzidas, pois possuem alguns marcadores que desempenham papel essencial na manutenção e conservação de células embrionárias e na manutenção de seu *status* indiferenciado, como o fator de transcrição de ligação de octâmero 4 (Oct-4 – do inglês *octamer-binding transcription factor 4*) e Nanog [48–50].

O tecido dentário e peridontário (periodonto) apresentam diferentes fontes de MSC: células-tronco da polpa de dente permanente (DPSC – do inglês *dental pulp stem cells*), células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED – do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*), células-tronco da papila apical (SCAP – do inglês *stem cells from apical papilla*), células-tronco do ligamento periodontal (PDLSC – do inglês *periodontal ligament stem cells*) e células precursoras do folículo dentário (DFPC – do inglês *dental follicle precursor cells*) (Figura 1). As MSC derivadas da polpa dentária podem ser isoladas de dentes de leite de crianças entre seis e doze anos e de dentes permanentes em adultos [16,51,52].

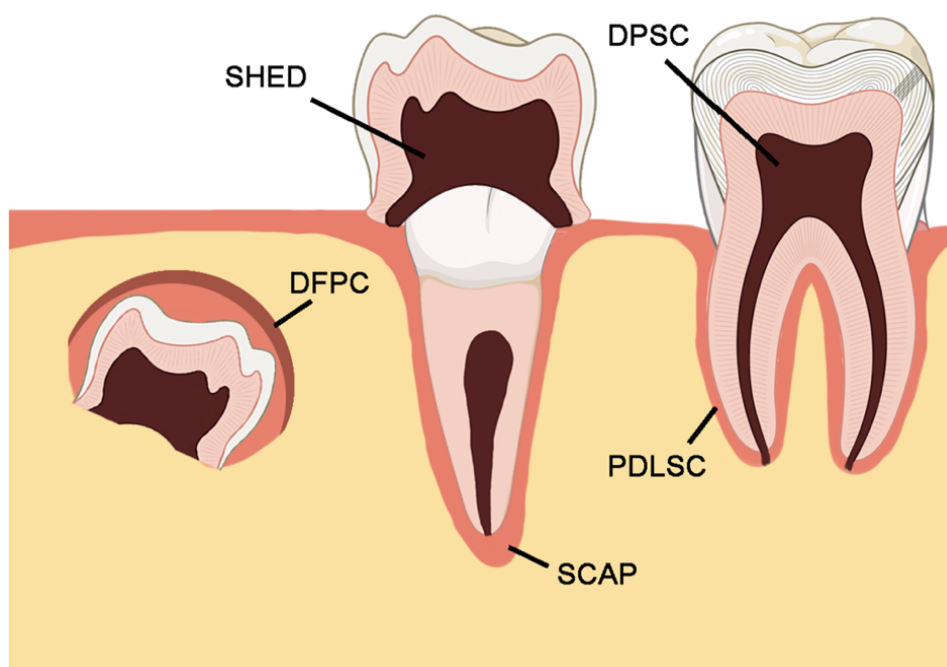


Figura 1. Diferentes fontes de MSC do tecido dentário e periodontal. DFPC: células precursoras do folículo dentário; SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; SCAP: células-tronco da papila apical; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; PDLSC: células-tronco do ligamento periodontal. Fonte: Hochuli et al., 2021 [53]

As MSC dos tecidos dentários apresentam uma vantagem na indução a diferenciação neuronal por compartilharem a mesma origem embrionária do sistema nervoso, a ectoderme. [42,43,47,54–58]. A polpa de dente é encontrada na câmara pulpar e canais radiculares e é formada pelo tecido conjuntivo frouxo localizado no centro do dente. Seus principais componentes celulares são MSC derivadas da crista neural, fibroblastos e odontoblastos altamente diferenciados que formam a dentina. Já foi demonstrado que as MSC presentes na polpa de dente são uma pequena população,

menos de cinco por cento de células [56,59]. O número de MSC isoladas pode variar, pois cada dente possui um tamanho de raiz, que pode ser reabsorvido em diferentes níveis, podendo interferir na quantidade de polpa extraída [60].

As SHED e DPSC possivelmente possuem diferenças por estarem em diferentes estágios de desenvolvimento. Estas diferenças provavelmente estão ligadas ao microambiente, que é controlado por eventos genéticos e epigenéticos que regulam a atividades das MSC, acarretando os diferentes padrões de expressão dos marcadores de células-tronco e variação do potencial de diferenciação [35,57,61].

#### 1.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO

As SHED são consideradas células imaturas [57,61,62]. Quando comparadas às BMSC, possuem maior capacidade de proliferação e de expressão do fator de crescimento de fibroblasto (bFGF - do inglês *basic fibroblast growth factor*), fator de crescimento envolvido na indução da angiogênese e na indução da formação de osso e cartilagem e a proteína morfogenética óssea 2 (BMP2 - do inglês *bone morphogenic protein 2*) envolvida no início da diferenciação dos osteoblastos [37,63]. As SHED têm vantagens porque são derivadas de uma fonte acessível e não invasiva que é naturalmente esfoliada [60].

Na última década, a coleta das MSC para armazenamento por longo prazo para uso terapêutico tornou-se cada vez mais popular. Devido à alta taxa de proliferação e sobrevivência, as SHED têm sido armazenadas em bancos de células mesenquimais dentárias para o benefício futuro de seu próprio paciente ou em bancos alogênicos [16,64,65]. Quando comparadas com banco de células do cordão umbilical, as SHED possuem vantagem pois podem ser coletadas posteriormente e apresentam excelente relação custo-benefício [16,64,65].

As SHED possuem vantagem na indução à diferenciação neuronal, na medida em que apresentam um fenótipo de crista neural e expressam constitutivamente os marcadores de proteínas neuroprogenitoras. Foi relatado por alguns estudos que SHED expressam positivamente marcadores de superfície neuronal, como CD146 (MUC18; molécula de adesão celular de melanoma), CD271 (receptor de crescimento neuronal) e marcadores intracelulares, como a  $\beta$ tubulinaIII e a nestina [43,48,57,62,66-71].

Isso ocorre porque eles compartilham a mesma origem embrionária do sistema nervoso, a ectoderme [56,57,72–74]. A expressão positiva precoce desses marcadores neuronais em SHED pode favorecer a capacidade dessas células de se agrupar em neuroesferas e se diferenciar em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos [53].

### 1.5 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE PERMANENTE

As DPSC têm localização perivascular e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens semelhantes à MSC obtidas a partir de outros tecidos. Essas células podem ser isoladas de terceiros molares e dentes permanentes que normalmente são descartados, não sendo necessária uma cirurgia para sua obtenção. Os terceiros molares têm uma vantagem significativa sobre os outros dentes adultos, pois não estão completamente desenvolvidos e, portanto, apresentam um fenótipo mais imaturo no momento da extração [50].

As DPSC apresentam alto potencial clonogênico, alta taxa de proliferação, capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens celulares [75]. As DPSC também demonstram uma menor senescência celular e maior capacidade osteogênica quando comparadas as MSC de cordão umbilical [61]. *In vitro* as DPSC possuem potencial de diferenciação em neurônios funcionais, apresentando morfologia e expressando os genes desse tipo celular [43,76,77].

Arthur e colaboradores (2008) [72] foram os pioneiros na diferenciação de DPSC em neurônios funcionais, usando fatores de crescimento e sinalização específicos. Király e colaboradores (2009) [78] demonstraram que ativando vias específicas de proteínas é possível diferenciar DPSC em neurônios funcionais, com morfologia neuronal e canais de sódio e potássio responsivos.

### 1.6 MARCADORES NEURONAIS

Induzir as SHED e DPSC à diferenciação neuronal pode ser uma estratégia para obtenção de células com propriedades e funcionalidades semelhantes às células-tronco neuronais (NSC – do inglês *neural stem cells*). O processo de diferenciação requer a sincronização de dois eventos opostos, como a repressão e a regulação positiva de genes que determinam, respectivamente, a manutenção do estado indiferenciado ou diferenciado para uma linhagem celular específica [79]. Este processo

pode ser feito pelo uso de meios de diferenciação específicos que estimulam as células à nível molecular, ocorrendo interação entre um conjunto de diversos fatores de crescimento, receptores, moléculas de sinalização molecular e de transcrição [75,80].

Alguns marcadores podem ser utilizados para identificar células precursoras neuronais, neurônios e células gliais envolvidas na neurogênese. Os marcadores mais usados para a caracterização da indução à diferenciação neuronal por SHED e DPSC são os marcadores relacionados ao citoesqueleto [53]. O citoesqueleto neuronal é composto por microtúbulos, actina e rede de filamentos intermediários que atuam na migração extracelular para estabelecer conexões com outras células [81-84].

A  $\beta$ tubulina III é uma proteína que constitui os microtúbulos intracelulares presentes no citoesqueleto e está associada à migração de células da crista neural [85,86] e tem alta expressão em neurônios imaturos [57,71,72,87]. A nestina é uma das proteínas que atuam como filamento intermediário do citoesqueleto e são amplamente expressa durante a neurogênese, em tecidos do sistema neural, células neuroepiteliais, células-tronco do sistema nervoso central e é crítica para o desenvolvimento neural embrionário. As células que expressam nestina têm características de células progenitoras, como alta proliferação, diferenciação em diversas linhagens celulares e capacidade de regeneração [88,89].

Outros marcadores podem ser usados para avaliar o perfil das células após a indução à diferenciação neuronal, a expressão desses marcadores pode trazer respostas a respeito do comportamento, comissionamento e nível de diferenciação das células induzidas a linhagem neuronal [53], exemplos desses marcadores são: as proteínas da família SOX, SRY (região sexual determinante Y) 1 (SOX1 do inglês *SRY-Box Transcription Factor 1*) e SRY (região sexual determinante Y) 2 (SOX2 do inglês *SRY-Box Transcription Factor 2*) expressos em células precursoras neurais [90], GFAP que é expressa em astrócitos e atua nas interações astrócito-neurônio [91] e a doublecortina expressa em células progenitoras neuronais e neurônios imaturos [92].

A expressão precoce de marcadores neuronais em SHED e DPSC estimula a utilização destas células em estudos *in vivo* para tratamento de doenças neurodegenerativas [53]. Porém, ainda não está claro se SHED ou DPSC, possui um maior potencial de diferenciação neuronal. Este conhecimento é de suma importância, uma vez que a escolha da fonte para obtenção das MSC pode resultar em uma

população com maior potencial de diferenciação neuronal, que podem ser utilizadas nos ensaios pré-clínicos e clínicos para tratar doenças neurodegenerativas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Doenças neurodegenerativas e eventos traumáticos podem levar à degeneração axonal, inflamação ou morte de neurônios. As terapias convencionais têm eficácia limitada na recuperação funcional de danos neuronais, uma vez que a regeneração desses tecidos é particularmente desafiadora por várias razões. O tecido nervoso possui menos células precursoras capazes de se regenerarem, bem como, o potencial neurogênico dessas populações diminui com a idade. Estudos mostram que terapias baseadas em células-tronco podem ter um potencial estratégico na regeneração de células e no reparo de tecidos neuronais <sup>[46,93]</sup>.

A utilização da metodologia proposta neste estudo permitirá comparar o potencial de diferenciação neuronal das SHED e DPSC. A hipótese deste estudo é que as SHED, por serem células mais jovens e imaturas, possuam maior potencial de diferenciação neuronal quando comparadas às DPSC.



### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar e comparar o potencial de diferenciação neuronal da população SHED e DPSC.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a capacidade de diferenciação e expressão de marcadores de membrana de SHED e DPSC conforme sugerido pela ISCT;
- Avaliar e comparar o potencial clonogênico das SHED e DPSC;
- Comparar a capacidade de proliferação e senescência das SHED e DPSC em diferentes passagens celulares;
- Comparar a expressão de proteínas neuronais antes e após a indução à diferenciação neuronal das SHED e DPSC;

## 4. MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná conforme a Figura 2.

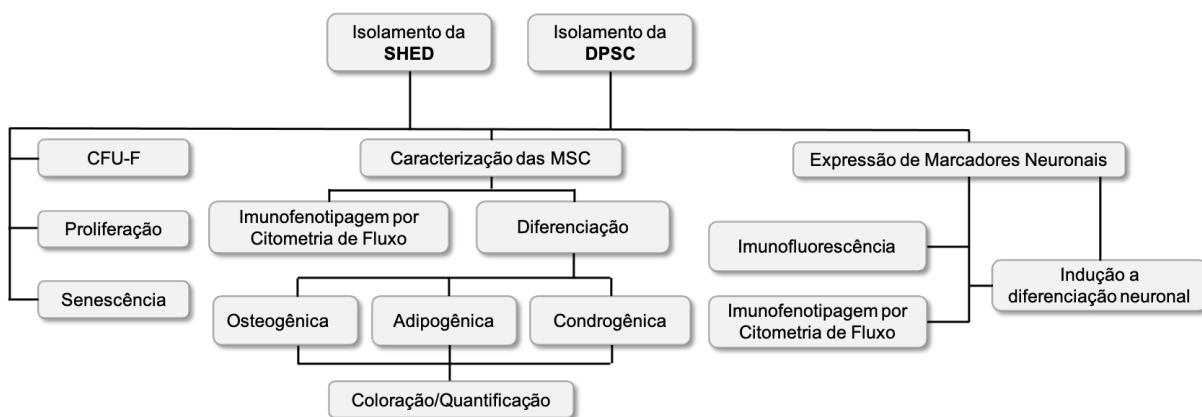


Figura 2. Desenho do estudo. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco derivadas de polpa de dente permanente; MSC: células-tronco mesenquimal; CFU-F: unidade formadora de colônia fibroblastóide.

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (parecer nº 3.355.573). Foram coletados três dentes decíduos de crianças entre sete e doze anos e três dentes permanentes erupcionados (3º molar) de adultos entre vinte e vinte e seis anos na clínica de odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, de acordo com os critérios de não inclusão, inclusão e exclusão estabelecidos (Quadro 1). Os pacientes/responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e os pacientes menores de 18 anos assinaram o termo de assentimento concordando em participar da realização do estudo, autorizando a coleta do material.

	SHED	DPSC
Critérios de não Inclusão	Pacientes com doenças infecciosas ou neoplásicas; Idade inferior a 5 anos ou superior a 12 anos.	Pacientes com doenças infecciosas e neoplásicas; Idade inferior a 18 anos ou superior a 27 anos.
Critérios de Inclusão	Crianças saudáveis sem problemas médicos.	Pacientes saudáveis sem problemas médicos.
Critérios de Exclusão	Dentes cariados ou danificados;	Dentes cariados ou danificados;

Quadro 1. Critérios de não inclusão, inclusão e exclusão para seleção das amostras de SHED e DPSC. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco derivadas de polpa de dente permanente.

#### 4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO

Após a extração do dente, as amostras foram encaminhadas para o LECC, imersos em solução de meio *Iscoves Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), heparina (5000 unidades/mL; Hemofol, Cristália, São Paulo, Brasil) e fluconazol (Isofarma, Eusébio, Brasil). O isolamento foi realizado conforme descrito por Fracaro e colaboradores (2020) <sup>[94]</sup>. Os dentes foram lavados duas vezes com solução tampão salina fosfato (PBS) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), suplementado com penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), em seguida foi realizada a extração da polpa com lima endodôntica e a transferência da amostra para uma placa de Petri, onde foi realizada a maceração mecânica com o auxílio de bisturi.

O macerado foi colocado em solução de collagenase tipo II (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), incubado por 30 minutos à 37°C, e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o botão de células ressuspendido em IMDM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). As células foram cultivadas em IMDM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). As células foram colocadas em incubadoras à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana.

Quando as culturas atingiram cerca de 80%-90% de confluência, as células foram dissociadas utilizando tripsina/ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 0,25% (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e replaqueadas. Cada realização da dissociação enzimática foi chamada de passagem.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO

Para a caracterização das MSC, as amostras foram acompanhadas diariamente em microscópio invertido analisadas quanto a sua morfologia, e foram caracterizadas imunofenotipicamente e diferenciadas em adipócitos, osteoblastos e condroblastos conforme a orientação da ISCT.

### 4.2.1 Diferenciação Adipogênica

As MSC foram induzidas a diferenciação adipogênica conforme descrito por Fracaro e colaboradores (2020) [94]. Para a diferenciação adipogênica as células foram plaqueadas em triplicatas e cultivadas em placas de vinte e quatro poços sobre lamínulas de vidro (20.000 células/cm<sup>2</sup>). As células foram mantidas em incubadoras a 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado 500 µl do meio específico de diferenciação adipogênica *hMSC Adipogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza, Walkersville, MD, EUA). As trocas de meio foram realizadas três vezes por semana durante 21 dias. Para avaliar a presença de vacúolos lipídicos no interior das células, as células foram fixadas com Bouin (Sigma-Aldrich, MO, USA), lavadas com etanol a 70% e água, e coradas com uma solução de 0,5% de Oil Red O (Sigma-Aldrich, MO, USA), este corante tem afinidade por lipídios e triglicerídeos. Para coloração do núcleo foi utilizado Hematoxilina de Harris (Laborclin, PR, BR). Como controle foram utilizadas as células que não foram induzidas à diferenciação adipogênica (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF). Como controle positivo foi utilizada a BMSC (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF) e induzida à diferenciação adipogênica.

#### 4.2.1.1 Quantificação da diferenciação adipogênica

Após a indução à diferenciação adipogênica as SHED e DPSC foram submetidas ao ensaio de quantificação da absorvância (densidade ótica) do corante Oil Red O (Sigma-Aldrich, MO, USA) por espectrofotometria conforme descrito por Anker e colaboradores (2003) [95]. As células foram lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 15 minutos. Em seguida, a membrana celular foi permeabilizada com etanol 70% e adicionado o corante Oil Red O (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com álcool isopropílico 60% e água destilada e foi adicionado etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por cinco minutos. A absorvância foi quantificada pelo espectrofotômetro (VersaMax Microplate Reader™, Molecular Device™, CA, EUA) no comprimento de onda de 550 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle foram utilizadas as células que não foram induzidas à diferenciação adipogênica e como controle da reação foi

utilizado a solução de etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como controle positivo foi utilizada a BMMSC (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF) e induzida à diferenciação adipogênica.

#### **4.2.2 Diferenciação Condrogênica**

A indução a diferenciação condrogênica foi realizada conforme Fracaro e colaboradores (2020) <sup>[94]</sup> por cultura em micromassa. Aproximadamente  $2 \times 10^6$  células foram cultivadas em um tubo cônico para formar um botão celular. Foi adicionado o meio de diferenciação condrogênico (*Differentiation Basal Medium-Chondrogenic*, Lonza, Walkersville, MD, USA) e as células foram cultivadas durante 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana. Após este período, o agregado celular foi fixado e embocado em parafina. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram corados com solução de Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, MO, USA). Como controle foram utilizadas as células que não foram induzidas à diferenciação condrogênica (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF). Como controle positivo foi utilizada a BMMSC (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF) e induzida à diferenciação condrogênica.

#### **4.2.3 Diferenciação Osteogênica**

A diferenciação osteogênica nas SHED e DPSC foi realizada conforme descrito por Fracaro e colaboradores (2020) <sup>[94]</sup>. As células foram plaqueadas em triplicatas e cultivadas em placas de vinte e quatro poços sobre lamínulas de vidro (20.000 células/cm<sup>2</sup>). As células foram mantidas em incubadoras a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado 500  $\mu\text{l}$  do meio específico de diferenciação osteogênica *Differentiation Basal Medium-Osteogenic* (Lonza, Walkersville, MD, EUA). As trocas de meio foram realizadas três vezes por semana durante 21 dias. Para avaliar a presença de cristais de cálcio, as células foram fixadas e coradas com o corante Alizarina Red S (Sigma-Aldrich, MO, USA). Como controle foram utilizadas as células que não foram induzidas à diferenciação osteogênica (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF). Como controle positivo foi utilizada a BMMSC (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF) e induzida à diferenciação osteogênica.

#### 4.2.3.1 Quantificação da diferenciação osteogênica

Após a indução a diferenciação osteogênica em ambas as fontes, SHED e DPSC, as células foram submetidas ao ensaio de quantificação da absorvância do corante Alizarina Red S (Sigma-Aldrich, MO, USA) por espectrofotometria conforme descrito por Gupta, Panetta e Longaker (2011) <sup>[96]</sup>. Brevemente as células foram lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e água destilada e fixadas com etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 15 minutos. Foi adicionado o corante Alizarina Red S (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 40 minutos e as células foram lavadas com água destilada e PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Em seguida, foi adicionado a solução de lixiviação à 10% de ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 20% de metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 15 minutos em agitador orbital à temperatura ambiente. A absorvância foi quantificada por espectrofotômetro (VersaMax Microplate Reader™, Molecular Device™, CA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle foram utilizadas as células que não foram induzidas à diferenciação osteogênica e como controle da reação foi utilizada a solução de lixiviação. Como controle positivo foi utilizada a BMMSC (cultivadas em meio IMDM com 15% de SBF) e induzida à diferenciação osteogênica.

#### 4.2.4 Caracterização imunofenotípica

As células foram caracterizadas pela técnica de citometria de fluxo quanto ao seu perfil imunofenotípico conforme descrito por Rebelatto e colaboradores (2008) <sup>[97]</sup>. Para a marcação, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células foram lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e incubadas no escuro durante 30 minutos com anticorpos descritos no Quadro 2. Após a marcação, as células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 300  $\mu$ L de uma solução contendo 1% de formaldeído. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. Aproximadamente 100.000 células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e analisadas por meio do software FlowJo®.

Marcadores	Alvo	Fluorocromo	Marca	Catálogo	Diluição
CD29	Células-tronco mesenquimais e músculo cardíaco e esquelético	APC	BD Pharmigen	559883	1:20
CD73	Células-tronco mesenquimais	APC	BD Pharmigen	560847	1:33
CD90	Células-tronco e processos axonais de neurônios maduros	PE	BD Pharmigen	555596	1:100
CD105	Células-tronco hematopoiéticas/progenitoras	APC	BD Pharmigen	562408	1:20
CD14	Marcador de monócitos e macrófagos	FITC	BD Pharmigen	555397	1:20
CD19	Linfócitos B	FITC	BD Pharmigen	555412	1:20
CD34	Células-tronco hematopoiéticas, endoteliais e fibroblastos embrionários	APC	BD Pharmigen	555824	1:20
CD45	Antígeno comum de leucócitos	FITC	BD Biosciences	347463	1:20
STRO-1	Encontrado em grandes vasos sanguíneos em seções da medula óssea humana	APC	Invitrogen	MA5-28635	1:20
HLA-DR	Células apresentadoras de antígenos	PerCP	BD Pharmigen	551375	1:33
Anexina V	Identificação de células apoptóticas	PE	BD Pharmigen	51-65875X	1:20
7-AAD	Corante Vital	-	BD Pharmigen	51-68981E	1:20

Quadro 2. Marcadores utilizados na caracterização das SHED e DPSC. APC: alofocianina; CD: grupos de diferenciação celular; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: complexo proteína clorofila peridina; APC: alofocianina.

#### 4.2.5 Ensaio de unidade formadora de colônia – fibroblastóides (CFU-F)

No ensaio de formação de colônias 600 células foram plaqueadas na passagem quatro, em triplicata, em placa de seis poços. Essas células foram cultivadas durante dez dias, fixadas e coradas com cristal violeta (Sigma-Aldrich, MO, USA). A contagem das colônias foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Leica, DE). Foram consideradas colônias aquelas que apresentarem cinquenta ou mais células. Para obter a porcentagem de colônias foi utilizado o seguinte cálculo: média da contagem da triplicata dividido pelo número de células plaqueadas inicialmente (600) multiplicado por 100.

#### 4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

Para a realização do ensaio de proliferação cerca 300.000 células foram cultivadas em garrafas de cultivo 75 cm<sup>2</sup> com meio de cultura IMDM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), suplementado com 15% de SBF (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e foram mantidas em incubadoras a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após três dias em cultivo, o meio foi trocado e adicionado o nucleosídeo 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (Invitrogen, NY, USA), o qual é incorporado durante a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*). Após 24 horas, as células foram dissociadas com o auxílio da tripsina/EDTA 0,25% (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), contadas e coradas com o 7-AAD (BD Bioscience, USA) para análise de viabilidade celular.

As amostras foram marcadas com o kit *Click-iT® Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits* (Invitrogen, NY, USA), conforme as orientações do fabricante. As células foram fixadas, permeabilizadas, marcadas com o fluorocromo Alexa Fluor 488 e incubadas por 30 minutos na ausência de luz. Após as lavagens, as células foram ressuspendidas e adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo®. As células foram submetidas ao ensaio de proliferação na passagem três, cinco e sete.

#### 4.4 ENSAIO DE SENESCÊNCIA

O ensaio de senescência foi realizado com o auxílio do Kit *CellEvent™ Senescence Green Flow Cytometry Assay* (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) que avalia a expressão da β-galactosidase, comumente usada como um biomarcador para células senescentes. Para realizar este ensaio cerca 300.000 células foram cultivadas em garrafas de cultivo 75 cm<sup>2</sup> com meio de cultura IMDM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), suplementado com 15% de SBF (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e foram mantidas em incubadoras à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após quatro dias em cultivo, as células foram dissociadas com o auxílio da tripsina/EDTA 0,25% (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), contadas e fixadas com 2% de PFA (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 15 minutos na ausência de luz. As células foram lavadas e marcadas com reagente



*CellEvent™ Senescence Green Probe* (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e incubadas por 90 minutos em estufa a 37°C, com ausência de luz e CO<sub>2</sub>, conforme as orientações do fabricante. As células foram lavadas, ressuspendidas e adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e foram analisadas por meio do software FlowJo®. As células foram submetidas ao ensaio de senescência na passagem três, seis, nove e 12.

#### 4.5 INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Após a expansão das SHED e DPSC, as células foram cultivadas em placas e frascos de cultivo previamente recobertos com rhLaminina-521 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) conforme descrito por Su, Shi e Ko (2013) [98]. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado então o meio Neurobasal-A (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) suplementado com B-27 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e os seguintes fatores: fator de crescimento epidérmico (EGF – do inglês *epidermal growth factor*) (PeproTech, USA), glutamina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF – do inglês *fibroblast growth factor*) (PeproTech, USA). A troca de meio foi realizada duas vezes por semana durante três semanas.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS INDUZIDAS À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Para avaliar a diferenciação neuronal foi realizada a avaliação da expressão de marcadores neuronais por imunofluorescência e o perfil imunofenotípico por citometria de fluxo.

##### 4.6.1 Imunofluorescência

Para a avaliação da indução à diferenciação neuronal foi realizada a análise da expressão do marcador neuronal  $\beta$ tubulina III (tubulina específica de neurônios) por imunofluorescência. Para esta avaliação, as células foram lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 10 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e realizada a permeabilização com uma solução contendo 0,5%

triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) por três minutos e lavadas com solução de lavagem (PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) com 0,2% de albumina bovina (InLab, SP, BR)). Foi realizada o bloqueio com a solução de 10% de soro de cabra por 1 hora em temperatura ambiente e adicionado o anticorpo primário anti- $\beta$ tubulinaIII (Santa Cruz, 1:800), as amostras foram incubadas *overnight*, à 4°C.

Após a incubação foi adicionado o anticorpo secundário anti-camundongo (FITC – Sigma-Aldrich, MO, USA, 1:300). O material foi lavado novamente com solução de lavagem e o núcleo corado com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI). As lâminas foram analisadas em Microscópio NIKON Eclipse Ni e as imagens digitais foram obtidas por meio do programa NIS-Elements.

#### 4.6.1.1. Quantificação da intensidade do sinal fluorescente

A intensidade de fluorescência foi quantificada para comparar e avaliar uma possível diferença na expressão da  $\beta$ tubulina III entre as fontes antes e após a indução à diferenciação neuronal. A quantificação da intensidade da fluorescência foi realizada conforme descrito por Jensen (2013) <sup>[100]</sup> usando o software ImageJ desenvolvido por Wayne Rasband versão 2.0 para MacOS (Cambridge – Reino Unido). Sete imagens de cada amostra foram selecionadas e configuradas em oito bits (Image-Type-8-bit). Para quantificar a intensidade do sinal fluorescente, o histograma (Image-Ajust-Threshold) foi usado com as seguintes configurações selecionadas: “Default” e “Dark Background”. Foi realizado a normalização dos resultados, dividindo a intensidade da fluorescência pelo o número de núcleos (corados com DAPI) em cada imagem analisada. Os dados foram expressos em porcentagem.

#### 4.6.2 Perfil Imunofenotípico

Antes e após a indução à diferenciação neuronal foi realizada por citometria de fluxo, a caracterização imunofenotípica utilizando marcadores neuronais de superfície e intracelulares (Quadro 3).

As amostras foram processadas conforme descrito no kit comercial BD *Stemflow Human Neural Lineage Analysis* (BD Bioscience, USA). As células foram dissociadas com *StemPro® Accutase®* (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) por quatro minutos, lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e fixadas com *BD Cytifix™*

(BD Bioscience, USA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e permeabilizadas *BD Phosflow™ Perm Buffer III* (BD Bioscience, USA) durante 30 minutos sob gelo. As células foram lavadas com tampão de lavagem (PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) contendo 1% de albumina humana (CSL Behring AG, Berna, CH) e incubadas no escuro durante 30 minutos com os anticorpos. As células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspendidas em 350 µL. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. Aproximadamente 100.000 (cem mil) células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience, USA) e analisadas por meio do software FlowJo®. Como controle positivo foi utilizado NSC derivadas de cérebro fetal humano (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) que foram cultivadas conforme as orientações do fabricante.

Marcadores	Alvo	Fluorocromo	Marca	Catálogo	Diluição
SOX1	Determinação e diferenciação das células neuronais	PerCP	BD Biosciences	561549	1:20
SOX2	Células-tronco no sistema nervoso central	PerCP	BD Biosciences	561506	1:20
GFAP	Astrócitos do sistema nervoso central e em células satélites dos gânglios periféricos	APC	BD Biosciences	561470	1:20
Doublecortina	Migração neuronal, regulação, organização e estabilidade dos microtúbulos e neurônios imaturos	PE	BD Biosciences	561505	1:20
Nestina	Células do sistema nervoso	APC	BD Biosciences	560393	1:20
CD271	Células-tronco mesenquimais de baixa afinidade para receptor do fator de crescimento do nervo (NGFR) ou p75NTR (receptor da neurotrofina)	PE	BD Pharmigen	557196	1:10
CD56	Células <i>natural killer</i> , células T ativadas, cérebro e cerebelo e tecidos neuroendócrinos	PE	BD Pharmigen	555516	1:10
CD146	Células da crista neural e melanoma	PE	BD Pharmigen	550315	1:20

Quadro 3. Marcadores neuronais utilizados na caracterização das SHED e DPSC antes e após a indução à diferenciação neuronal. GFAP: proteína glial ácida fibrilar; PerCP: complexo proteína clorofila peridina; PE: ficoeritrina. APC: alofocianina.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram processados e a significância estatística foi determinada usando o software GraphPad Prism versão 9.0.0 para MacOS (San Diego – Califórnia USA). Os dados são expressos como média ( $\pm$ ), erro padrão médio (EPM) ou desvio padrão (DP). Para todos os experimentos, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino & Pearson, a significância estatística foi determinada usando o Teste t de Student de variância igual ou o teste Mann Whitney U; Valores de  $p$ : n.s =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS SHED E DPSC

Foram isoladas três amostras de SHED e três amostras de DPSC. A eficiência de obtenção das SHED e DPSC foi de 100%. As SHED e DPSC isoladas e cultivadas apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, características das MSC (Figura 3).

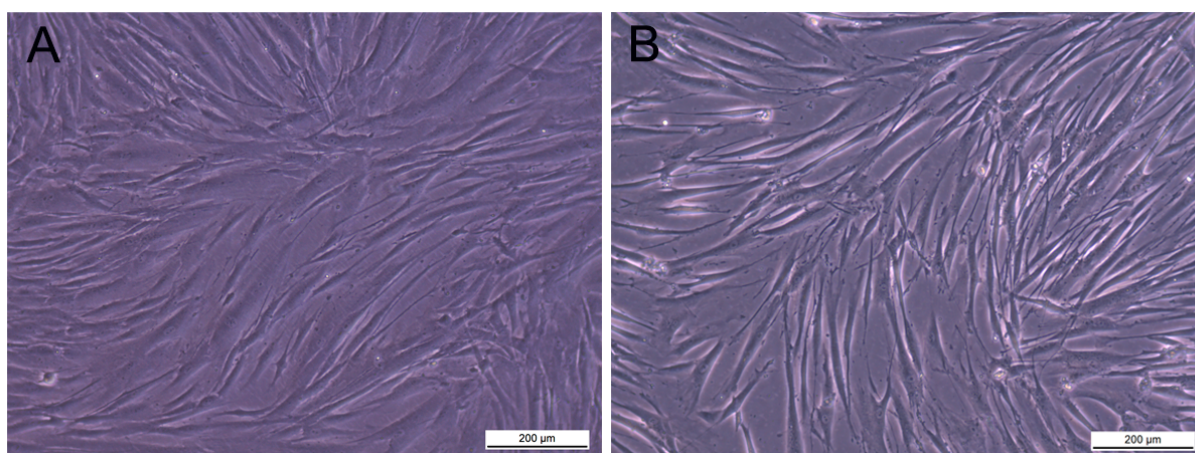


Figura 3. Imagens representativas do cultivo celular das (A) SHED e (B) DPSC. As células das duas fontes apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico. Aumento:100x. Barra: 200μm. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco derivadas da polpa de dente permanente.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SHED E DPSC

#### 5.2.1 Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica

Para a caracterização, três amostras de cada fonte foram diferenciadas em três linhagens, critério da ISCT para definir MSC. Após 21 dias de indução à diferenciação adipogênica em ambas as fontes, SHED e DPSC, não foi possível observar a formação de vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (Figura 4A, 4B, 4C, 4D), em contrapartida, foi possível observar a formação de vacúolos lipídios corados com Oil Red O nas amostras de BMMSC após a indução à diferenciação adipogênica (Figura 4F), utilizadas como controle positivo (Figura 4E).

Nas SHED e DPSC foi possível observar a diferenciação condrogênica pois foi possível visualizar a morfologia cuboidal, presença de proteoglicanas e lacunas ao

redor dos condrócitos jovens (Figura 4H, 4J), o mesmo foi observado na BMMSC (Figura 4L). Não foi possível observar essas características nas amostras controle (Figura 4G, 4I, 4K). Em ambas as fontes, SHED e DPSC foi possível observar a diferenciação osteogênica, pois apresentaram cristais de cálcio corados em vermelho após os 21 dias (Figura 4N, 4P), as mesmas características foram observadas nas BMMSC (Figura 4R). Nas amostras controle não foi possível observar a formação destes cristais (Figura 4M, 4O, 4Q).

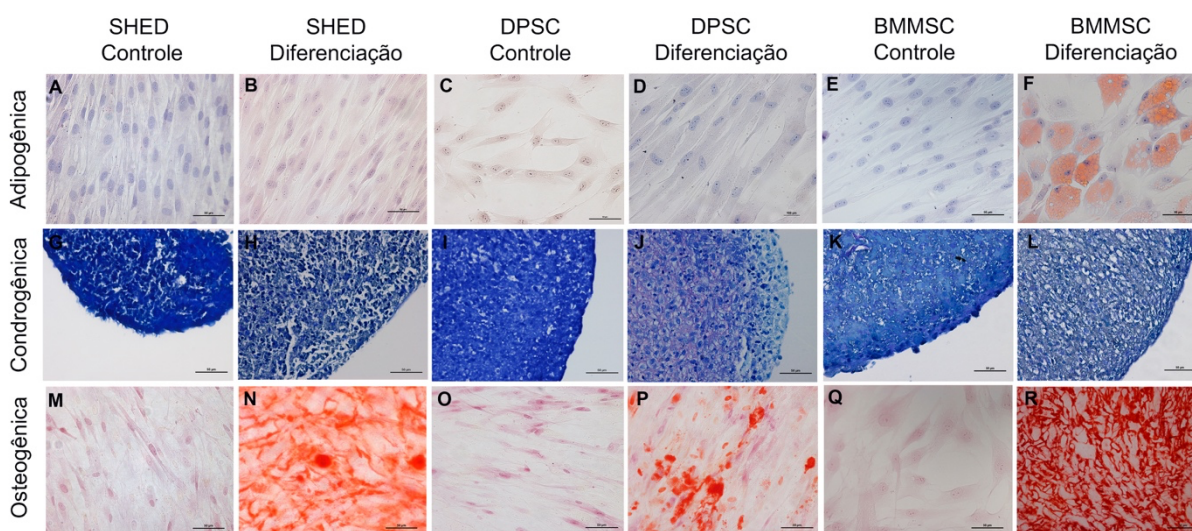


Figura 4. Diferenciação *in vitro* das SHED e DPSC. (A) SHED linhagem adipogênica: controle. (B) SHED linhagem adipogênica: diferenciação. (C) DPSC linhagem adipogênica: controle. (D) DPSC linhagem adipogênica: diferenciação. (E) BMMSC linhagem adipogênica: controle positivo. (F) BMMSC linhagem adipogênica: controle positivo da diferenciação, presença de vacúolos lipídios. Coloração: Oil Red O. (G) SHED linhagem condrogênica: controle. (H) SHED linhagem condrogênica: diferenciação. (I) DPSC linhagem condrogênica: controle. (J) DPSC linhagem condrogênica: diferenciação. (K) BMMSC linhagem condrogênica: controle. (L) BMMSC linhagem condrogênica: controle positivo da diferenciação. Lacunas presente aos redores dos condrócitos jovens. Coloração: Azul de Toluidina. (M) SHED linhagem osteogênica: controle. (N) SHED linhagem osteogênica: diferenciação. (O) DPSC linhagem osteogênica: controle. (P) DPSC linhagem osteogênica: diferenciação. (Q) BMMSC linhagem osteogênica: controle. (R) BMMSC linhagem osteogênica: controle positivo da diferenciação. Presença de cristais de cálcio em vermelho. Coloração: Alizarina Red S. Imagens representativas. Aumento: 400x. Barra: 50µm. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; BMMSC: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (controle positivo).

Foi avaliado em ambas as fontes, SHED e DPSC, o potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico através da quantificação da densidade óptica (absorbância) do corante Oil Red O e Alizarina Red S, respectivamente. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) na quantificação da densidade óptica (absorbância) do corante Oil Red O das SHED e DPSC quando comparadas as BMMSC induzidas à diferenciação adipogênica, utilizadas como controle positivo

(Figura 5A, 5B). Como já observado por coloração, não houve diferenciação na linhagem adipogênica para as amostras SHED e DPSC (Figura 5C), o que demonstra que estas células não apresentam potencial de diferenciação adipogênica durante 21 dias na presença de meio de diferenciação adipogênico.

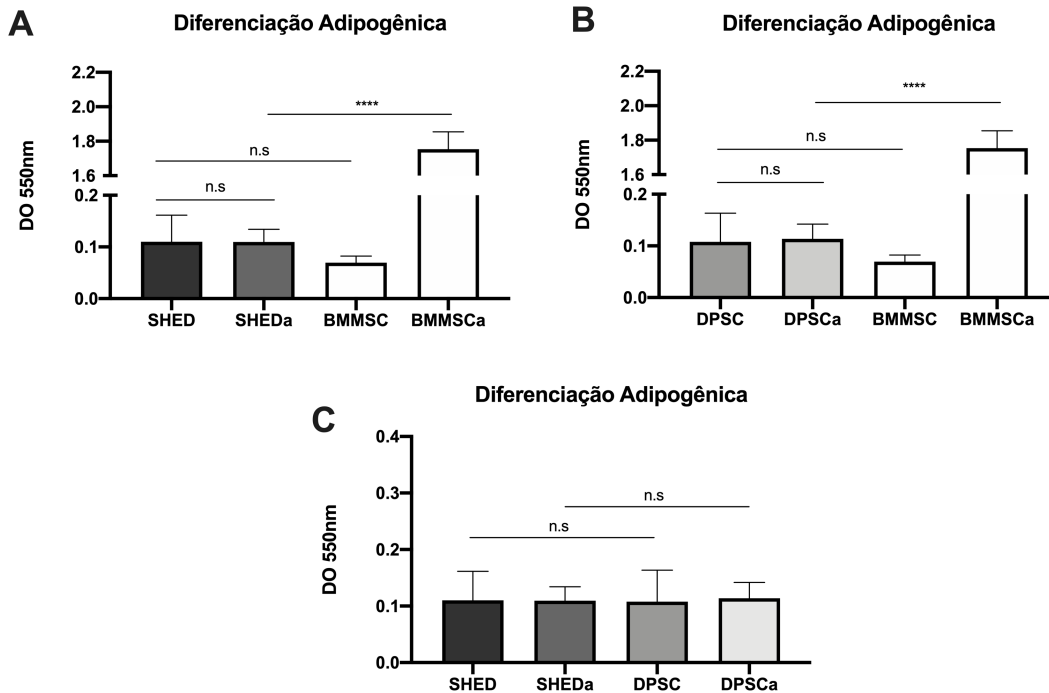


Figura 5. Quantificação da intensidade de Oil Red O por densidade óptica (absorbância) nas amostras SHED e DPSC controle e nas SHED e DPSC induzidas à diferenciação adipogênica. (A) SHED e SHEDa induzidas à diferenciação adipogênica e BMMSC e BMMSCa induzidas à diferenciação adipogênica, utilizadas como controle positivo. (B) DPSC e DPSCa induzidas à diferenciação adipogênica e nas BMMSC e BMMSCa induzidas à diferenciação adipogênica, utilizadas como controle positivo. (C) SHED e DPSC controle e DPSCa e SHEDa induzidas à diferenciação adipogênica. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; SHEDa: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado induzidas à diferenciação adipogênica; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; DPSCa: células-tronco da polpa de dente permanente induzidas à diferenciação adipogênica; BMMSC: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (controle positivo). BMMSCa: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea induzidas à diferenciação adipogênica (controle positivo). DO: Densidade óptica. 550 nm: comprimento de onda de 550 nm. Dados expressos em média e desvio padrão. O valor de  $p$  foi obtido a partir de teste Mann Whitney U. n.s:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Foi observado diferença estatística significativa na quantificação da densidade óptica (absorbância) do corante Alizarina Red S em relação as SHED ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6A) e DPSC ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6B) antes e após a indução a diferenciação osteogênica e quando comparado ao controle positivo (BMMSC). Foi possível observar que em estágio indiferenciado as SHED apresentaram maior absorbância do corante Alizarina Red S quando comparadas as DPSC em estágio indiferenciado, esta diferença é estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6C). Houve diferença estatística



significante ( $p < 0,0001$ ) entre as fontes após a indução a diferenciação osteogênica, as DPSC apresentaram maior absorvância (Figura 6C).

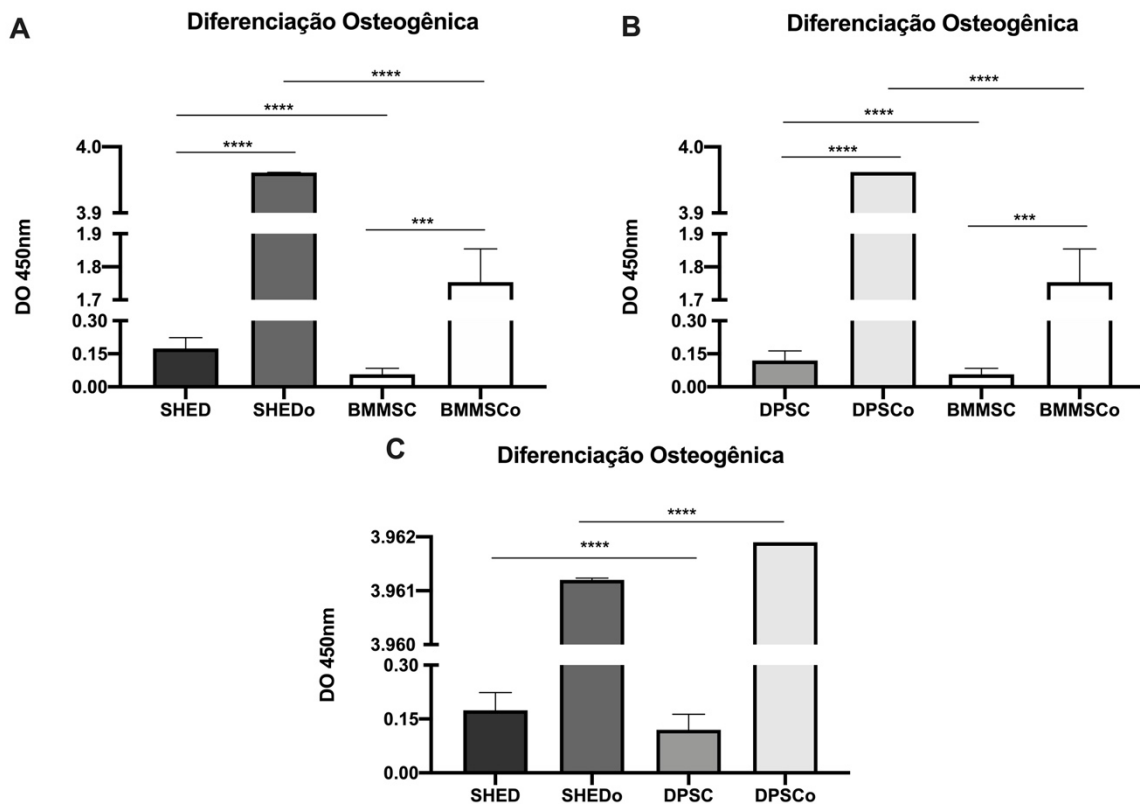


Figura 6. Quantificação da intensidade de Alizarina Red S por densidade óptica (absorvância) nas amostras SHED e DPSC controle e nas SHEDo e DPSCo induzidas à diferenciação osteogênica. (A) SHED e SHEDo induzida à diferenciação osteogênica e BMMSC e BMMSCo induzidas à diferenciação osteogênica, utilizadas como controle positivo (B) DPSC e DPSCo induzida à diferenciação osteogênica BMMSC e BMMSCo induzidas à diferenciação adipogênica, utilizadas como controle positivo (C) SHED e DPSC controle e DPSCo e SHEDo induzidas à diferenciação osteogênica. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; SHEDo: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado induzidas à diferenciação osteogênica; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; DPSCo: células-tronco da polpa de dente permanente induzidas à diferenciação osteogênica. BMMSC: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (controle positivo). BMMSCo: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea induzidas à diferenciação osteogênica (controle positivo). Dados expressos em média e desvio padrão. O valor de  $p$  foi obtido a partir de teste Mann Whitney U. DO: Densidade óptica. 450 nm: comprimento de onda de 450 nm. Dados expressos em média e desvio padrão \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Ambos as fontes apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica comparativamente à BMMSC. Este potencial de diferenciação é maior nas DPSC.

### 5.2.2 Análise do perfil imunofenotípico

Por meio da citometria de fluxo foram avaliados os antígenos de superfície das amostras de SHED e DPSC. As amostras das duas fontes apresentaram um perfil



imunofenotípico positivo para os marcadores: CD29, CD73, CD90 e CD105 e expressão reduzida para CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR. Ambas as fontes, SHED e DPSC apresentaram perfil imunofenotípico conforme as diretrizes da ISCT (Tabela 1). Para verificar a viabilidade das células foi utilizado o corante 7-AAD, e a Anexina-V foi utilizada para identificar as células que estão em processo de apoptose. A média da viabilidade das amostras foi de  $92,81 \pm 2,92$  nas SHED e  $96,14 \pm 2,68$  nas DPSC. Ambas as fontes apresentaram valores reduzidos para apoptose com média de  $2,7 \pm 3,35$  nas SHED e  $1,74 \pm 1,35$  nas DPSC.

Tabela 1. Resultados referentes a caracterização imunofenotípica das amostras de SHED e DPSC.

Marcadores	SHED		DPSC	
	Média (%)	DP	Média (%)	DP
CD29	100	0	98,83	1,53
CD73	99,8	0,1	99,60	0,53
CD90	99,86	0,15	99,03	1,00
CD105	99,8	0,17	97,33	1,93
CD14	1,17	0,23	0,39	0,03
CD19	0,74	0,36	0,43	0,36
CD34	0,57	0,41	1,05	0,70
CD45	0,25	0,06	0,79	0,85
HLA-DR	0,90	0,65	1,13	0,64

A porcentagem positiva (%) para cada marcador é representada como média e desvio padrão; DP: desvio padrão; SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco derivadas de polpa de dente permanente.

Neste estudo foi verificado a expressão do marcador de superfície celular STRO-1 (*stromal precursor antigen 1*) em apenas  $6,33\% \pm 0,24$  da população de SHED e  $2,08\% \pm 2,17$  em DPSC, com diferença estatística significativa ( $p=0,0308$ ) entre as fontes (Figura 7).

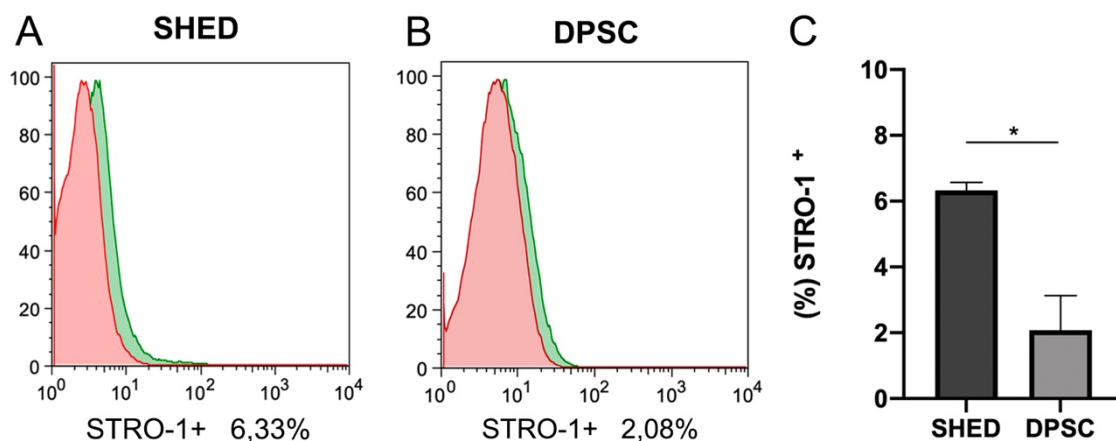


Figura 7. Análise da expressão do marcador STRO-1 por citometria de fluxo, representando as médias amostras de SHED e DPSC. (A) Histograma representativo da expressão de STRO-1 nas SHED. (B) Histograma representativo da expressão de STRO-1 nas DPSC. Os histogramas verdes indicam a porcentagem da população positiva para cada anticorpo enquanto os histogramas vermelhos indicam o controle isotípico dos anticorpos. (C) Comparação da média de expressão do marcador STRO-1 em SHED e DPSC. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t de Student pareado: \*  $p < 0.05$ ; SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente.

### 5.2.3 Quantificação das unidades formadoras de colônia fibroblastóides (CFU-F)

Após 10 dias de cultivo as SHED e DPSC formaram colônias (Figura 8A, 8B, 8C, 8D). Após a contagem das CFU-F, a média de colônias observadas nas amostras foi de  $50 \pm 7,78$  nas SHED e  $38,58 \pm 9,29$  nas DPSC. A média da eficiência de formação de colônias entre as amostras de SHED foi de 8,34% e entre as amostras de DPSC foi de 6,43%. Quando comparadas as DPSC, as SHED apresentaram uma diferença estatística significativa na formação de colônias ( $p=0,0042$ ) e na eficiência de formação de colônias ( $p=0,0042$ ). Em ambas as fontes foi possível observar uma grande diferença entre o desvio padrão do número de colônias e a eficiência de formação de colônias, possivelmente relacionada com a variabilidade entre as amostras.

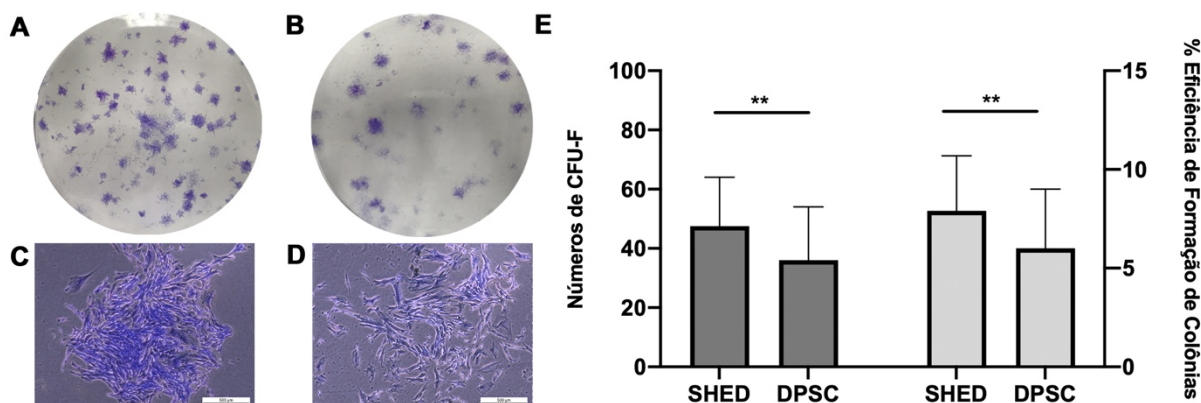


Figura 8. Ensaio de formação de colônia das SHED e DPSC. Colônias formadas pelas amostras de (A) SHED e (B) DPSC coradas com Violeta Cristal. (C) Morfologia das colônias SHED. (D) Morfologia das colônias DPSC. Aumento: 50x. (E) Média do número de colônias e porcentagem de eficiência de formação de colônias das SHED e DPSC. SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t de Student pareado: \*\* =  $p < 0,01$ ; Barra: 500 $\mu$ m.

### 5.3 INCORPORAÇÃO DO NUCLEOSÍDEO EdU

Para verificar a capacidade proliferativa das amostras de SHED e DPSC, foi mensurado por citometria de fluxo a incorporação do nucleosídeo EdU durante a síntese de DNA, durante 24 horas, nas passagens três, cinco e sete. Em todas as amostras SHED houve um decréscimo da média proliferação, porém sem diferença estatística significativa (Figura 9A). Nas DPSC também houve decréscimo da média de proliferação, com diferença estatística significativa apenas entre a passagem três e sete ( $p=0,0030$ ) (Figura 9B). Não houve diferença estatística significativa entre as SHED e DPSC (Figura 9C). Para avaliar a viabilidade das células durante o experimento as amostras foram marcadas com 7-AAD entre as passagens analisadas, e não houve diferença significativa na viabilidade destas células durante os experimentos (Figura 10).

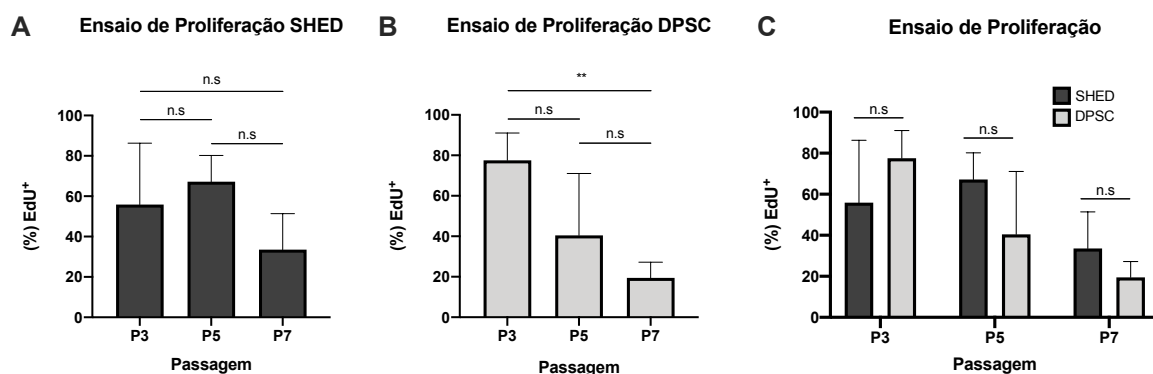


Figura 9. Ensaio de proliferação celular avaliando a incorporação do nucleosídeo EdU durante 24 (vinte e quatro) horas em SHED e DPSC nas passagens três, cinco e sete. (A) SHED. (B) DPSC. (C) Comparação entre as fontes SHED e DPSC. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t de Student pareado: \*\*  $p < 0,01$ , n.s.:  $p > 0,05$ . SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; P3: passagem três; P5: passagem cinco; P7: passagem sete.

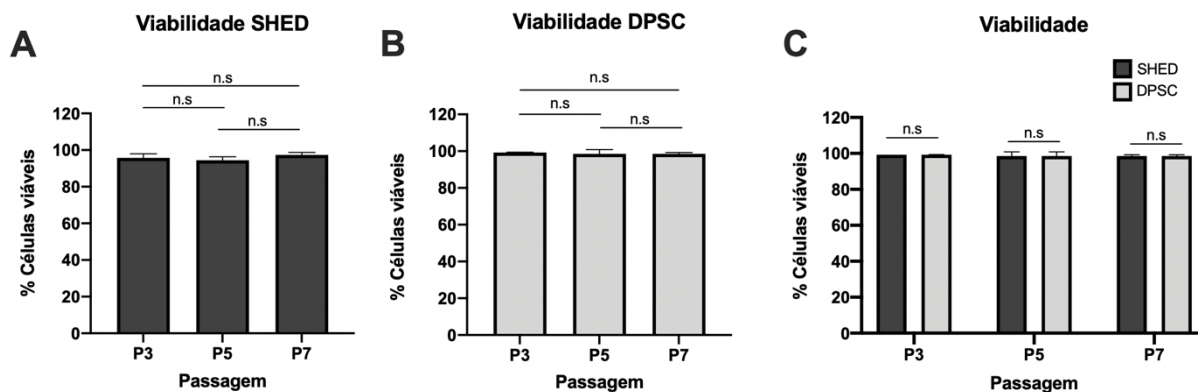


Figura 10. Determinação de células viáveis obtidas no ensaio de proliferação celular das amostras de SHED e DPSC, nas passagens três, cinco e sete. (A) SHED; (B) DPSC e (C) Comparação entre as fontes SHED e DPSC. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t de Student pareado: n.s.:  $p > 0,05$ . SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; P3: passagem três; P5: passagem cinco; P7: passagem sete.

#### 5.4 EXPRESSÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

Para verificar a porcentagem de células senescentes, foi mensurado a expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase nas amostras de SHED e DPSC, nas passagens três, seis, nove e 12 por citometria de fluxo (Figura 11). Houve diferença estatística significativa nas amostras da SHED na passagem três vs. passagem nove ( $p=0,0047$ ) e na passagem DPSC três vs. passagem 12 ( $p=0,0005$ ). Nas DPSC houve diferença estatística significativa entre a passagem três vs. passagem 12 ( $p=0,0174$ ) e entre a passagem seis vs. passagem 12 ( $p=0,0167$ ). Entre as fontes, não houve diferença estatística significativa na expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase entre as passagens.

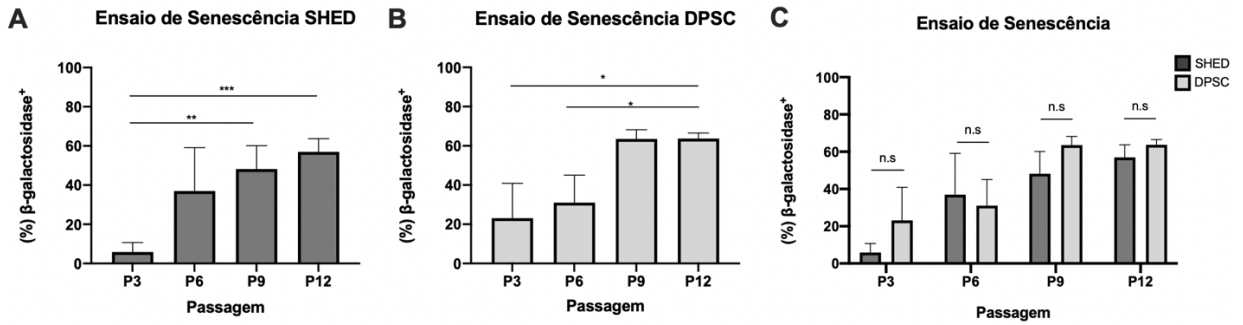


Figura 11. Ensaio de senescência celular avaliando expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase, por citometria de fluxo, em SHED e DPSC nas passagens três, seis, nove e 12. (A) SHED. (B) DPSC. (C) Comparação entre as fontes SHED e DPSC. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t de Student pareado: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0,005$ ; n.s.:  $p > 0.05$ . SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; P3: passagem três; P6: passagem seis; P9: passagem nove; P12: passagem 12.

## 5.5 EXPRESSÃO DE $\beta$ TUBULINA III

Foi verificada a expressão da proteína  $\beta$ tubulina III (tubulina específica de neurônios) antes e após a indução à diferenciação neuronal. Ambas as fontes SHED e DPSC foram marcadas com o anticorpo anti- $\beta$ tubulina III. Foi possível observar a expressão nas SHED (Figura 12) e DPSC (Figura 13), antes e após a indução à diferenciação neuronal. Após a indução à diferenciação neuronal, houve aumento da expressão de  $\beta$ tubulina III em ambas as fontes SHED e DPSC, com diferença estatística significativa na intensidade de fluorescência quando comparadas as SHED ( $p=0,0016$ ) e DPSC ( $p=0,0025$ ) não diferenciadas (Figura 14A e 14B).

Houve diferença estatística significativa ( $p=0.0137$ ) em relação a intensidade do sinal fluorescência, entre as fontes, em estágio indiferenciado; as DPSC apresentaram maior expressão de  $\beta$ tubulina III quando comparadas as SHED (Figura 14C). Após a indução à diferenciação neuronal não houve diferença estatística significativa entre as fontes ( $p=0.2844$ ). Embora estas células já expressem constitutivamente o marcador  $\beta$ tubulina III, o meio de indução à diferenciação neuronal, foi capaz de aumentar a expressão deste marcador nas células, ou seja, houve indução à diferenciação neuronal.

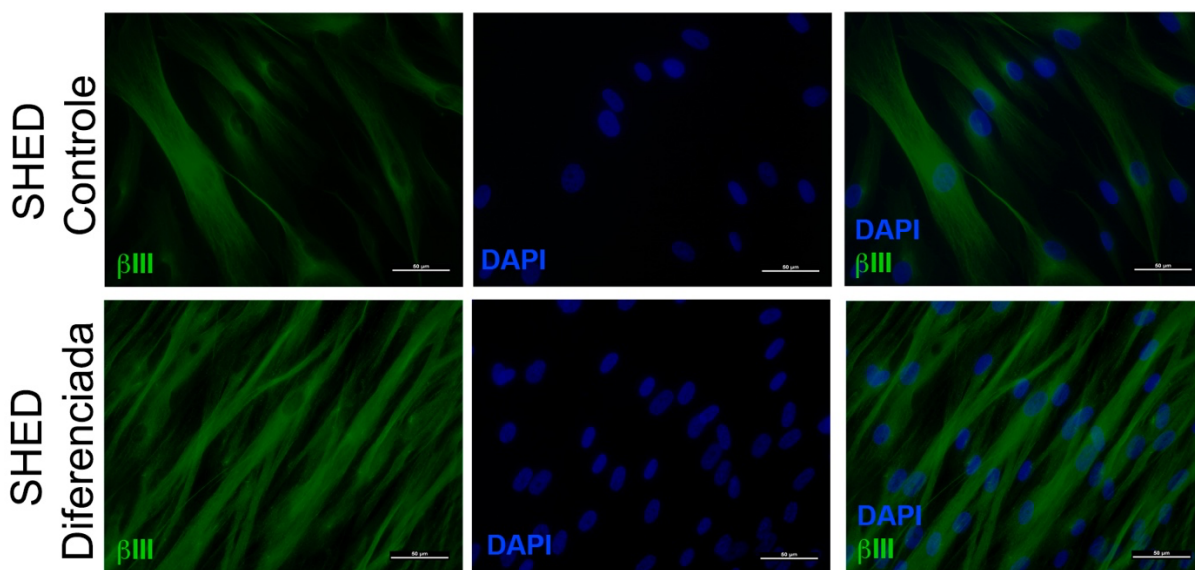


Figura 12. Diferenciação *in vitro* das SHED marcadas com o anticorpo anti- $\beta$ tubulinaIII. Imagens representativas de imunofluorescência nas SHED controle e nas SHED induzidas à diferenciação neuronal. Anti- $\beta$ tubulinaIII marcadas em verde. Núcleo celular marcado em azul (DAPI). SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado. Aumento: 400x. Barra: 50 $\mu$ m.

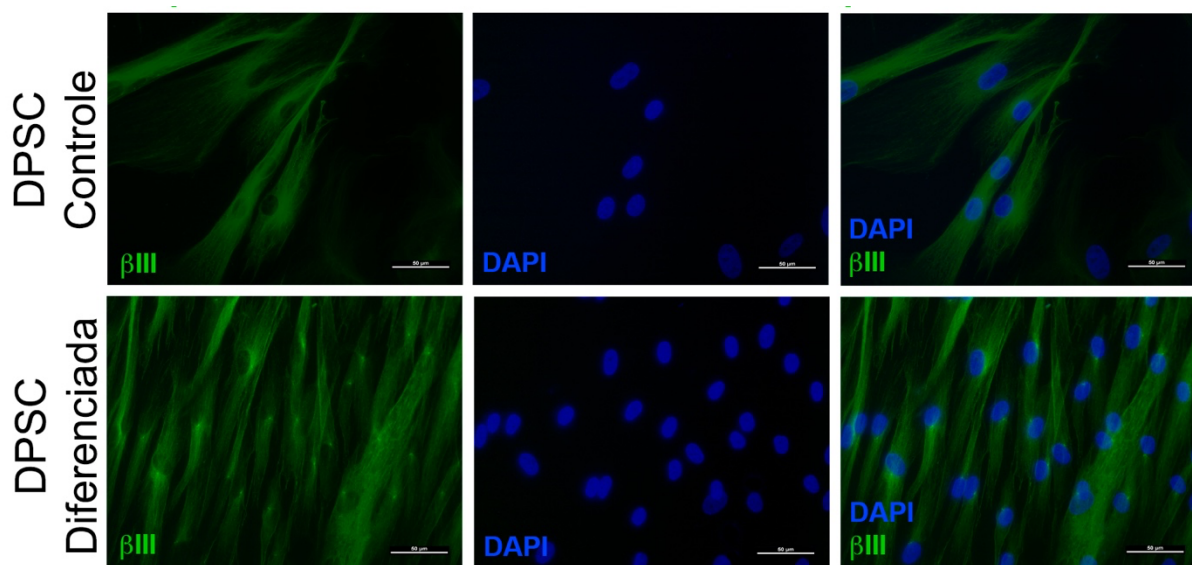


Figura 13. Diferenciação *in vitro* das DPSC marcadas com o anticorpo anti- $\beta$ tubulinaIII. Imagens representativas de imunofluorescência nas DPSC controle e nas DPSC induzidas à diferenciação neuronal. Anti- $\beta$ tubulinaIII marcadas em verde. Núcleo celular marcado em azul (DAPI). DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente. Aumento: 400x. Barra: 50 $\mu$ m.



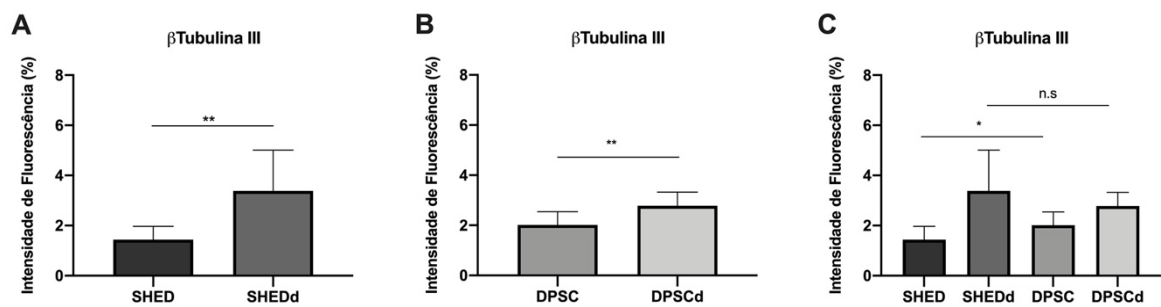


Figura 14. Intensidade de fluorescência da expressão da proteína  $\beta$ tubulinaIII SHED e DPSC controle e nas SHED e DPSC induzidas à diferenciação neuronal. (A) Quantificação da intensidade de fluorescência da  $\beta$ tubulinaIII nas SHED e SHED induzida à diferenciação neuronal (B) Quantificação da intensidade de fluorescência da  $\beta$ tubulinaIII nas DPSC e DPSC induzida à diferenciação neuronal (C) Quantificação da intensidade de fluorescência da  $\beta$ tubulinaIII nas SHED e DPSC nas DPSC e SHED induzidas à diferenciação neuronal. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O valor de p foi obtido a partir de Teste t Student pareado: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; n.s:  $p > 0.05$ . SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; SHEDd: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado induzidas à diferenciação neuronal; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; DPSCd: células-tronco da polpa de dente permanente induzidas à diferenciação neuronal.

## 5.6 EXPRESSÃO DE MARCADORES NEURONAIS ANTES E APÓS A INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Para verificar a expressão de marcadores neuronais nas amostras de SHED e DPSC, antes e após a indução à diferenciação neuronal, foi realizado a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Antes da indução à diferenciação neuronal as amostras das duas fontes, SHED e DPSC, apresentaram um perfil imunofenotípico positivo para os marcadores analisados: SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina, nestina e CD146 (Tabela 2), sem diferença significativa entre as fontes. O marcador CD271, proteína transmembrana capaz de se ligar a neurotrofina, apresentou resultados similares para SHED e DPSC. Para a SHED apresentou uma média de  $17,2\% \pm 7,94$  enquanto para DPSC apresentou uma média de  $25,2\% \pm 4,71$  ( $p=0,2095$ ). Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,0481$ ) na expressão do marcador CD56 (comumente expresso na superfície de neurônios, células gliais e músculo esquelético); as DPSC em estágio indiferenciado apresentaram maior expressão de CD56 com média de  $72\% \pm 39,67$  enquanto as SHED apresentaram uma média de  $7,0\% \pm 2,62$ .

Após a indução das duas fontes à diferenciação neuronal não houve diferença estatística significativa entre as SHED e DPSC nos marcadores neuronais analisados (Tabela 2). Ambas as fontes induzidas à diferenciação neuronal apresentaram um perfil imunofenotípico positivo para os marcadores analisados: SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina e nestina, e expressão reduzida para os marcadores: CD271, CD56 e CD146.

Quando comparado a expressão de marcadores neuronais entre as SHED antes e após a indução à diferenciação neuronal (Tabela 2) não foi possível observar diferença estatística entre os marcadores: SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina, nestina, CD271, CD56 e CD146. Em relação ao perfil imunofenotípico dos marcadores neuronais analisados entre as DPSC antes e após a indução neuronal (Tabela 2), não foi possível verificar diferença estatística significativa nos marcadores: SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina, nestina, CD56 e CD146. Houve diminuição, com diferença estatística significativa ( $p=0,0268$ ), na expressão do marcador CD271 nas DPSC induzidas à diferenciação neuronal.



Tabela 2. Caracterização imunofenotípica das SHED, DPSC, SHED induzida à diferenciação neuronal e DPSC induzidas à diferenciação neuronal utilizando marcadores da linhagem neuronal.

Marcadores Neurais	SHED			DPSC					Controle Positivo
	SHED (%)	SHEDd (%)	Valor de $p$ (SHED e SHEDd)	DPSC (%)	DPSCd (%)	Valor de $p$ (DPSC e DPSCd)	Valor de $p$ (SHED e DPSC)	Valor de $p$ (SHEDd e DPSCd)	NSC (%)
SOX1	91,7 ± 9,79	96,8 ± 0,67	n.s ( $p=0,4518$ )	98,37 ± 1,06	97,77 ± 1,56	n.s ( $p=0,7323$ )	n.s ( $p=0,3215$ )	n.s ( $p=0,3123$ )	98,6
SOX2	94,6 ± 2,09	96,9 ± 2,12	n.s ( $p=0,9730$ )	88,67 ± 13,9	96,73 ± 0,40	n.s ( $p=0,3745$ )	n.s ( $p=0,3770$ )	n.s ( $p=0,9200$ )	98,7
GFAP	96,8 ± 2,41	99,3 ± 0,98	n.s ( $p=0,8492$ )	99,83 ± 0,15	99,23 ± 1,16	n.s ( $p=0,4243$ )	n.s ( $p=0,3982$ )	n.s ( $p=0,9147$ )	98,7
Doublecortina	99,5 ± 0,58	85,9 ± 4,9	n.s ( $p=0,1522$ )	99,83 ± 0,20	88 ± 11,23	n.s ( $p=0,1422$ )	n.s ( $p=0,3592$ )	n.s ( $p>0,9999$ )	5,1
Nestina	100 ± 0	99,4 ± 1,01	n.s ( $p=0,3630$ )	100 ± 0	99,97 ± 0,06	n.s ( $p>0,9999$ )	n.s ( $p>0,9999$ )	n.s ( $p=0,3630$ )	99,8
CD271	17,2 ± 7,94	9,06 ± 9,85	n.s ( $p=0,3286$ )	25,2 ± 4,71	11,27 ± 5,25	* ( $p=0,0268$ )	n.s ( $p=0,2095$ )	n.s ( $p=0,7486$ )	27,3
CD56	7,0 ± 2,62	23,2 ± 12,58	n.s ( $p=0,0939$ )	72,0 ± 39,67	51,29 ± 39,64	n.s ( $p=0,5468$ )	* ( $p=0,0481$ )	n.s ( $p=0,3076$ )	97,7
CD146	52,2 ± 32,98	41,7 ± 49,5	n.s ( $p=0,7750$ )	52,6 ± 14,54	22,57 ± 21,6	n.s ( $p=0,1164$ )	n.s ( $p=0,9856$ )	n.s ( $p=0,5728$ )	82,7

Dados referentes a média da caracterização imunofenotípica, realizada por citometria de fluxo, de marcadores específicos da linhagem neuronal das amostras: SHED, DPSC, SHED induzida à diferenciação neuronal e DPSC induzidas à diferenciação neuronal. Como controle positivo foi realizada a caracterização dos mesmos marcadores em NSC. A porcentagem positiva (%) para cada marcador é representada como média e desvio padrão ( $\pm$ ); O valor de  $p$  foi obtido a partir de Teste  $t$  pareado, sendo significativo valores menores ou iguais à 0,05; \*  $p<0,05$ , n.s:  $p>0,05$ .; SHED: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado; SHEDd: células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado induzidas à diferenciação neuronal; DPSC: células-tronco da polpa de dente permanente; DPSCd: células-tronco da polpa de dente permanente induzidas à diferenciação neuronal. NSC: células-tronco neuronais (controle positivo).

## 6 DISCUSSÃO

As SHED e DPSC isoladas e cultivadas *in vitro* apresentaram morfologia fibroblastóides e aderência ao plástico; no referente aos marcadores superfície celular, as células de ambas as fontes apresentaram expressão positiva para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e expressão negativa para CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR, seguindo os critérios estabelecidos pelo Comitê de Células-tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) [21] para definição de MSC, corroborando com os resultados de outros pesquisadores que utilizaram as mesmas fontes em seus estudos [21,56,75,90,94,101,102].

A expressão do marcador de membrana STRO-1 já foi descrita em células colocalizadas nas paredes externas dos grandes vasos sanguíneos da polpa dentária [103]. Pesquisadores descreveram que apenas algumas fontes de MSC expressaram o marcador STRO-1, são elas: BMMSC [104] e ligamento periodontal [105], e não é expresso em MSC derivadas de cordão umbilical [106] e tecido adiposo [107]. As médias da expressão do STRO-1 nas SHED e DPSC, demonstradas neste estudo, estão de acordo com os resultados encontrado por outros pesquisadores [35,57,75,87,103,108], entretanto, em nosso estudo as SHED apresentaram maior expressão deste marcador quando comparadas às DPSC.

Estudos demonstram que as células capazes de formar colônias fibroblastóides são uma subpopulação específica de MSC, que são conhecidas como progenitoras estromais [109] e expressam o marcador de membrana STRO-1 [104]. A capacidade das SHED e DPSC em formarem colônias já foi descrita por diversos pesquisadores [37,56,110,111], entretanto o número de células iniciais cultivadas e o tempo de cultivo é muito divergente, dificultando a comparação entre os resultados. Estudos demonstram que as SHED e DPSC possuem uma vantagem em formar colônias quando comparadas as BMMSC e MSC de derivadas do cordão umbilical [37,56]. Em nosso estudo, as SHED demonstraram maior potencial em formar colônias quando comparadas as DPSC, sendo esta, uma vantagem importante pois as células precursoras de CFU-F *in vivo* demonstraram ser quiescentes [112].

A limitação de ambas as fontes, SHED e DPSC, em se diferenciarem em adipócitos em 21 dias já foi observada anteriormente [94,113], mas ainda inspira controvérsias. Pesquisadores relataram [37,57,90] que as após a indução à diferenciação

adipogênica as SHED foram capazes de formar vacúolos lipídicos (coloração com Oil Red O) e a expressar genes específicos da linhagem adipogênica: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma 2 (PPAR $\gamma$ 2 - do inglês *peroxisome proliferator activated receptor gamma 2*) e a proteína 4 de ligação ao ácido graxo (FAB - do inglês *fatty-acid-binding proteins*) por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR - do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) em SHED após 3 (três) semanas, entretanto utilizaram tempo e meio de indução à diferenciação adipogênica diferentes do nosso trabalho.

Em estudos com as DPSC, Majumdar e colaboradores (2016) <sup>[71]</sup> utilizaram meio de indução a diferenciação adipogênica diferente deste estudo e observaram a presença de vacúolos lipídicos corados com Oil Red O e a expressão dos genes PPAR $\gamma$ 2 e FABP4 por RT-PCR. Em contrapartida, Struys e colaboradores (2001) <sup>[113]</sup> relataram que não foi possível observar a formação de vacúolos lipídicos corados com Oil red O e foi possível avaliar a expressão do FABP4, entretanto a expressão deste gene já foi observada em outros tipos celulares, além de adipócitos, e sua expressão pode estar relacionada a reposta das células aos indutores presentes no meio de diferenciação adipogênica <sup>[114]</sup>. Fracaro e colaboradores (2020) <sup>[94]</sup> utilizaram técnicas moleculares mais precisas para avaliar o potencial de diferenciação adipogênico das DPSC e relataram que estas células possuem este potencial reduzido, pois essas células possuem ausência/presença de genes que impedem/retardam a diferenciação na linhagem adipogênica; este resultado vem de encontro com o que foi observado neste estudo. Após realizar a observação microscópica, coloração e quantificação da absorbância do Oil red O, em ambas as fontes, foi possível determinar que as SHED e DPSC possuem uma capacidade limitada de diferenciação em adipócitos.

Em nosso estudo as SHED e DPSC, após a indução à diferenciação osteogênica apresentaram cristais de cálcio corados com Alizarina Red S. Outros pesquisadores <sup>[37,63,90,94,113,115–117]</sup> também observaram a diferenciação osteogênica em SHED e DPSC após 21 dias utilizando meio de indução similares e diferentes do nosso estudo. Além da coloração também comprovaram a diferenciação osteogênica pelas técnicas de imunocitoquímica (expressão de osteocalcina) e RT-PCR. Após a observação microscópica e a quantificação da absorbância do corante Alizarina Red

S foi possível determinar que as DPSC possuem maior capacidade de se diferenciar na linhagem osteogênica quando comparadas as SHED.

As SHED e DPSC apresentaram morfologia cuboidal, presença de proteoglicanas e lacunas ao redor dos condrócitos jovens, como já foi demonstrado anteriormente por outros estudos [37,94,116,117]. Este é mais um elemento que aproxima essas células dos critérios mínimos para definir uma MSC [21]. Apesar da falta de diferenciação na linhagem adipogênica, essas células apresentaram um conjunto de atributos que as caracterizam como MSC, como: perfil imunofenotípico, capacidade de formar colônias fibroblastóides e plasticidade, pois foram capazes de se diferenciarem *in vitro* na linhagem condrogênica, osteogênica e neuronal. A desatualização nos critérios mínimos estabelecidos pela ISCT limita a caracterização e dificulta inclusão de novas fontes de MSC.

A capacidade de proliferação de ambas as fontes foi avaliada durante 24 horas em diferentes passagens, pela incorporação do nucleotídeo EdU no DNA das células em proliferação. Neste estudo não houve diferença significativa entre as fontes, pois as amostras apresentaram uma variabilidade nos resultados gerando um desvio padrão alto. Avaliando um período de proliferação diferente, Nakamura e colaboradores (2009) [118] compararam a proliferação de SHED, DPSC e MSC derivadas de medula óssea após 12 horas em cultivo através da incorporação do bromodesoxiuridina (BrdU), molécula análoga ao reagente utilizado neste trabalho, e observaram maior proliferação das SHED em relação as outras fontes estudadas. Com o aumento das passagens, tanto SHED quanto as DPSC exibiram uma perda progressiva da capacidade proliferativa conforme observado em MSC de medula óssea [119], porém esta perda progressiva é mais evidente nas DPSC quando comparadas as SHED. No nosso trabalho foi possível avaliar que não houve diferença estatística significativa na viabilidade celular entre as fontes durante a realização do experimento, demonstrando que as células estavam viáveis em todas as passagens.

Neste estudo foi avaliado a senescência celular de ambas as fontes, SHED e DPSC em diferentes passagens. A senescência celular está associada ao acúmulo de danos ao DNA e geralmente leva à apoptose celular [120]. Não foi observado diferença significativa na porcentagem de células senescentes entre as fontes durante o cultivo, corroborando com os resultados de Wang e colaboradores (2018) [75]; Os

resultados obtidos em nosso estudo, permite afirmar que as SHED podem ser utilizadas em estudos *in vitro* entre as passagens três e seis e as DPSC entre as passagens três e nove sem possuírem características senescentes, como mudança na morfologia [121], potencial reduzido de formação de colônia [122] e de duplicação [123]. Levando em consideração os resultados obtidos nos ensaios de proliferação e senescência, é possível concluir que há uma limitação no uso das SHED e DPSC em passagens altas, as SHED por expressarem níveis consideráveis da enzima  $\beta$ -galactosidase a partir da passagem 9 e as DPSC por diminuírem a proliferação a partir da passagem 7.

Após a marcação imunofluorescente das SHED e DPSC com o anticorpo anti- $\beta$ tubulina III (classe de tubulina específica de neurônios), foi possível observar a expressão  $\beta$ tubulina III nas amostras controle (mantidas apenas com o meio IMDM + 15% SBF), sem diferença significativa entre as fontes, corroborando com os estudos de Majumdar e colaboradores (2016) [71]. Pesquisadores já relataram a expressão da  $\beta$ tubulina III em SHED [57,87] e DPSC [71,72] em estado indiferenciado, o mesmo foi observado neste trabalho. Esta expressão da  $\beta$ tubulina III das SHED e DPSC, antes da indução à diferenciação neuronal, está relacionada com a origem embrionária destas células, a crista neural [101,124,125].

Após a indução à diferenciação neuronal, ambas as fontes continuaram expressando  $\beta$ tubulina III. Este aumento significativo da  $\beta$ tubulina III após a indução à diferenciação neuronal também foi observado, através das técnicas de imunohistoquímica e Western Blot por Nourbakhsh e colaboradores (2011) [101] em SHED e por Arthur e colaboradores (2008) [72] em DPSC, corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo. Utilizando meio de diferenciação neuronal diferente deste estudo, Majumdar e colaboradores (2016) [71] avaliaram a expressão de  $\beta$ tubulina III, por citometria de fluxo, em SHED e DPSC após a indução a diferenciação neuronal e não relataram diferença significativa entre as fontes, este resultado corrobora com os encontrados neste estudo.

A nestina e a  $\beta$ tubulina III são os marcadores mais estudados para avaliar a indução a diferenciação neuronal em SHED e DPSC [53]. Neste trabalho a expressão da nestina foi avaliada por citometria de fluxo nas amostras antes e após a indução a diferenciação neuronal. A expressão da nestina em SHED e DPSC indiferenciadas já

foi descrita por diversos pesquisadores [43,57,101,108]. Sakai e colaboradores (2012) [92] avaliaram que quando em estágio indiferenciado ambas as fontes, SHED e DPSC, tiveram diferença significativa na expressão de nestina em relação as MSC derivadas de MO, podendo esta ser uma vantagem em utilizar SHED e DPSC em terapia celular, pois pesquisadores já relataram que as células que expressam nestina têm características de células progenitoras, como alta proliferação, diferenciação em diversas linhagens celulares e capacidade de regeneração [88,89].

Nourbakhsh e colaboradores (2011) [101] relataram a intensa expressão de nestina nas SHED antes e após a indução à diferenciação neuronal, por citometria de fluxo, sem diferença estatística significativa após a diferenciação, o mesmo foi observado em nosso estudo. Utilizando meio de diferenciação neuronal diferente deste trabalho, Luziriaga e colaboradores (2019) comparam por imunofluorescência a expressão de nestina em DPSC e NSC, antes e após a indução a diferenciação neuronal e observaram que a expressão de nestina foi similar entre as fontes.

Neste trabalho foi realizado a caracterização imunofenotípica de marcadores relacionados a linhagem neuronal em ambas as fontes, SHED e DPSC controle e SHED e DPSC induzidas à diferenciação neuronal, por citometria de fluxo. A expressão dos marcadores da família SOX: SOX1 e SOX2, foi observada em ambas as fontes, em estágio indiferenciado e nas células induzidas a diferenciação neuronal. O fator de transcrição SOX1 atua principalmente na neurogênese é expresso em célula precursora neural e, como demonstrado neste trabalho, em SHED e DPSC. A expressão em DPSC já foi mostrada anteriormente por Li e colaboradores (2019) [126], porém a presença em SHED nunca foi antes observada.

A expressão do marcador SOX2, também conhecido como marcador de pluripotência, já foi relatado em SHED antes e após a indução a diferenciação neuronal por Gazarian e Ramírez-García (2017) [90] e Rafiee e colaboradores (2020) [127] em DPSC antes e após a indução à diferenciação neuronal, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. A expressão desta família de proteínas sustenta a ideia de que essas células-tronco mantem os marcadores de células precursoras da crista neural [90].

A proteína GFAP (expressa em astrócitos e responsável pelas interações astrócito-neurônio) foi expressa nas SHED e DPSC antes e após a indução à

diferenciação neuronal, sem diferença estatística. A expressão de GFAP em SHED e DPSC, em seu estágio indiferenciado, já foi descrito por Sakai e colaboradores (2012) <sup>[92]</sup> e Gonmanne e colaboradores (2018) <sup>[128]</sup>. Miura e colaboradores (2003) <sup>[57]</sup> avaliaram o potencial neuronal das SHED e relataram a expressão do GFAP, antes e após a indução a diferenciação neuronal, sem diferença estatística após a diferenciação neuronal corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Sakai e colaboradores (2012) <sup>[92]</sup> já demonstraram através da caracterização por citometria de fluxo a expressão de GFAP nas DPSC em estágio indiferenciado, corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo. Entretanto, Király e colaboradores (2009) <sup>[78]</sup>, através da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RTq-PCR - do inglês *reverse transcription quantitative real time*), não conseguiram detectar expressão de GFAP nas DPSC em estágio indiferenciado, porém após dez dias de indução à diferenciação neuronal, utilizando protocolo e meio de diferenciação neuronal diferente do utilizado neste trabalho, foi detectado a expressão de GFAP nas DPSC.

A doublecortina é expressa em neurônios imaturos durante os estágios iniciais de desenvolvimento e, como demonstrado neste trabalho, em SHED e DPSC antes e após a indução à diferenciação neuronal. Sakai e colaboradores (2012) <sup>[92]</sup> compararam a expressão de marcadores neuronais em SHED, DPSC e MSC derivadas da medula óssea, e observaram que a expressão de doublecortina ocorreu apenas nas SHED e DPSC, sem diferença estatística significativa, corroborando com os resultados apresentados neste estudo. A expressão de doublecortina em SHED em estágio indiferenciada já foi mostrada anteriormente <sup>[92]</sup>, porém a presença em SHED após a indução à diferenciação neuronal não foi observada anteriormente. Luzuriaga e colaboradores (2019) <sup>[129]</sup> avaliaram a expressão de marcadores neuronais em DPSC induzidas à diferenciação neuronal com meio livre de soro e as compararam com NSC cultivadas com o mesmo meio, e relataram que não houve diferença significativa da expressão de doublecortina entre essas fontes; esse resultado diverge dos obtidos em nosso estudo.

Em nosso estudo, foi observado que ambas as fontes, SHED e DPSC, expressam marcadores de citoesqueleto de células da linhagem neuronal, como as proteínas de microtúbulos intracelulares ( $\beta$ tubulina III e doublecortina) e de filamento

intermediário (nestina) antes e após a indução à diferenciação neuronal, demonstrando uma semelhança estrutural às células dessa linhagem celular.

O marcador de superfície CD271 é uma proteína transmembrana capaz de se ligar a neurotrofina, contribui para a diferenciação múltipla e é expresso em células progenitoras neuronais, e como demonstrado neste trabalho, em SHED e DPSC antes e após a indução à diferenciação neuronal [66,90,130]. Neste trabalho não houve diferença significativa do marcador de superfície CD271 quando comparado SHED antes e após a indução à diferenciação neuronal, entretanto, houve redução na expressão deste marcador nas DPSC induzidas à diferenciação neuronal ( $p=0,0268$ ) quando comparadas as DPSC em estágio indiferenciado. Não foram encontrados estudos que descrevam a expressão do marcador de superfície CD271 em SHED e DPSC após a indução à diferenciação neuronal. Alraires e colaboradores (2017) [131] e Alvarez e colaboradores (2015) [132] também já descreveram a expressão de CD271 em DPSC. Estudos como de Barilani e colaboradores (2018) [130] avaliaram a expressão do marcador CD271 em diferentes fontes de MSC de origem mesodérmica, dentre elas: MSC derivadas de MO e cordão umbilical, cerca de 3,7% e <0,4% da população total, respectivamente, foram positivas ao marcador. Os resultados encontrados neste estudo, indicam que as SHED e DPSC (ambas de origem ectodermal) podem ter uma vantagem na indução à diferenciação neuronal quando comparadas as MSC derivadas da mesoderme [130,133].

O CD56, também conhecido molécula de adesão de células neurais (PSA-NCAM – do inglês *polysialic acid-neural cell adhesion molecule*), demonstrou uma expressão reduzida nas SHED antes e após a indução a diferenciação neuronal. A expressão reduzida deste marcador nas SHED antes a indução à diferenciação neuronal já foi observada por Gazarian e Ramírez-García (2017) [90] e Nourbakhsh e colaboradores (2011) [101]. Estes pesquisadores também avaliaram a expressão deste marcador em SHED após a indução à diferenciação neuronal e observaram aumento da expressão do CD56; esses resultados não corroboram com nosso estudo, pois não encontramos diferença estatística significativa ( $p=0,0939$ ), possivelmente por utilizarem fatores de indução a linhagem neuronal diferente deste estudo. Arthur e colaboradores (2008) [72] obtiveram resultados semelhantes da expressão deste marcador de superfície em DPSC em estágio indiferenciado, porém após a indução à



diferenciação neuronal observaram uma expressão reduzida deste marcador; os dados obtidos no nosso trabalho não corroboram com os obtidos nestes estudos possivelmente devido a divergência de alguns reagentes presentes no meio de diferenciação neuronal.

Em nosso estudo as DPSC em estágio indiferenciado apresentaram maior expressão de CD56 em relação as SHED em estágio indiferenciado, com diferença estatística significativa ( $p=0,0481$ ), esta diferença não foi observada em entre as fontes após a indução à diferenciação neuronal ( $p=0,3076$ ). Ducret e colaboradores (2016) <sup>[59]</sup> propõem que as células-tronco derivadas de polpa de dente permanente CD56<sup>+</sup> possuem uma maior capacidade de se diferenciar em células neuronais.

O marcador de membrana CD146, além de ser uma molécula de adesão celular <sup>[133]</sup>, sua expressão está relacionada a ativação de vias de sinalização intracelulares, influenciando as respostas comportamentais dos neurônios, e no desenvolvimento e plasticidade sináptica no cérebro <sup>[134]</sup>. Neste estudo, em estágio indiferenciado, uma parcela da população de SHED e DPSC apresentaram este marcador, corroborando com resultados obtidos por outros pesquisadores <sup>[101,108,135]</sup>. Já foi sugerido que uma população de MSC derivadas da polpa residem neste nicho perivascular dentro da polpa <sup>[42,103]</sup>. Sivasankar e Ranganathan (2016) <sup>[136]</sup> avaliaram que a positividade do marcador CD146 em SHED e DPSC diminui entre as passagens. Após a indução à diferenciação neuronal as células mantiveram o perfil para este marcador, sem diferença estatística significativa. Diversos trabalhos descrevem a presença do CD146 em SHED e DPSC, porém a presença em SHED e DPSC induzidas à diferenciação neuronal não foi observada anteriormente.

Este estudo demonstrou que as SHED e DPSC são uma ótima fonte alternativa para obtenção de MSC pois são células de fácil coleta e que geralmente são descartadas. A caracterização imunofenotípica demonstrou que as SHED e DPSC expressam os marcadores de superfície sugeridos pela ISCT para caracterização de MSC. As fontes não possuem diferença estatística significativa em relação a capacidade de proliferação e senescência durante o cultivo. Quando comparadas, as SHED possuem maior capacidade de formar colônias *in vitro* e maior expressão para o marcador STRO-1; em contrapartida, as DPSC possuem maior capacidade de diferenciação osteogênica. Além disso, SHED e DPSC expressão marcadores

neuronalis em estágio indiferenciado o que facilita sua diferenciação em células neuronais por terem a mesma origem embrionária. Os dados obtidos por imunofluorescência e citometria de fluxo confirmam que ambas as fontes, SHED e DPSC, continuam a expressar marcadores neuronais após a indução à diferenciação neuronal.

Apesar de serem consideradas mais jovens/imaturas e expressarem marcadores de proteínas neuroprogenitoras em estágio indiferenciado, as SHED não apresentaram vantagens na indução à diferenciação neuronal. Já é descrito que as SHED e DPSC possuem diferenças durante o desenvolvimento e sofrem com diferentes fatores genéticos e epigenéticos. Já é descrito que as DPSC extraídas do terceiro molares possuem um fenótipo mais imaturo quando comparadas as DPSC extraídas de outros dentes permanentes, entretanto, ainda não há estudos que relatam a diferença entre as células em relação a diferenciação neuronal.

Com o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que as SHED e DPSC não apresentaram diferença após serem induzidas à diferenciação neuronal, pois o perfil entre as células, em estágio indiferenciado e induzido à diferenciação neuronal, é muito semelhante. Entretanto, vale ressaltar que estudos devem ser realizados para comparar o comportamento dessas células *in vivo*, pois administrar uma célula com um fenótipo e genótipo mais comissionado à uma linhagem específica, pode resultar em diferentes efeitos parácrinos.

A expressão de marcadores neuronais nas SHED e DPSC indiferenciadas *in vitro* as tornam muito semelhantes as NSC encontradas no tecido neuronal, estimulando seu armazenamento em banco de células-tronco. A possibilidade de utilizar estas células como produto de terapia celular, sem a necessidade de induzir essas células durante 21 (vinte e um) dias na linhagem neuronal, proporciona uma vantagem econômica e logística, pois esta não necessita de indução à diferenciação neuronal, gerando uma diminuição no tempo de entrega deste produto de terapia celular, o que estimula estudos pré-clínicos e clínicos para uso futuro no tratamento de doenças neurodegenerativas.

## 7 CONCLUSÃO

- As SHED e DPSC foram capazes de se diferenciar nas linhagens osteogênica e condrogênica, porém não foi possível observar a diferenciação adipogênica nas SHED e DPSC. O perfil imunofenotípico das células isoladas e expandidas confirmou que as SHED e DPSC estavam de acordo com os critérios mínimos estabelecidos pela ISCT para MSC.
- As SHED demonstraram maior eficiência na formação de colônias fibroblastóides quando comparadas as DPSC.
- Não houve diferença estatística significativa entre as fontes nos ensaios de proliferação e senescência nas passagens analisadas.
- Ambas as fontes expressaram os marcadores neuronais:  $\beta$ tubulina III, SOX1, SOX2, GFAP, doublecortina, nestina, CD271, CD56 e CD146 antes e após a indução à diferenciação neuronal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *Journal of Pathology* 2009;217(2):144–60.
2. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem Cells: Hype and Reality I. THE TELOMERE CHECKPOINT 2002.
3. de Carvalho ACC, Goldenberg RC dos S. Células tronco mesenquimais: Conceitos, Métodos de Obtenção e Aplicações. São Paulo: 2012.
4. Han SW, de Souza CF, Carvalho AC de C. Células-tronco - Nova Perspectiva Terapêutica Em Cardiologia. 2011.
5. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica* 2015;62(3):329–37.
6. Jaenisch R, Young R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* 2008;132(4):567–82.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006;126(4):663–76.
8. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology* 2008;26(3):313–5.
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006;126(4):663–76.
10. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2015;3(FEB).
11. Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature Biotechnology* 2008;26(8):916–24.
12. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 2008;321(5889):699–702.

13. de Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 2007;25(1):100–6.
14. Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015;370(1680).
15. Shyh-Chang N, Ng HH. The metabolic programming of stem cells. *Genes and Development* 2017;31(4):336–46.
16. Zeitlin BD. Banking on teeth – Stem cells and the dental office. *Biomedical Journal* 2020;43(2):124–133.
17. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K v. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1966;16(3):381–90.
18. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. *Orthopaedic Research Society* 1991; 9(5):641-650.
19. Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology* 2009;217(2):318–24.
20. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine* 2019;4(1).
21. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–7.
22. Filip S, English D, Mokry J, Filip S. Stem cell plasticity: a new way? *Cell therapy and policy*; 2004; 37(1): 55–65.
23. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology* 2007;207(2):267–74.
24. Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *J Gastroenterol* 2004;10:3016–20.
25. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine* 2017;6(6):1445–51.

26. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009;31(SUPPL. 1):25–35.
27. Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 2010;1(1):43–52.
28. Salehi H, Amirpour N, Niapour A, Razavi S. An Overview of Neural Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 2016;12(1):26–41.
29. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation Research* 2004;95(1):9–20.
30. Väänänen HK. Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine* 2005;37(7):469–79.
31. Bianco P. Mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering: Principles and Practices* 2014;(August):10-1-10–4.
32. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International* 2012;2012.
33. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology* 1999;181(1):67–73.
34. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: Searching for the Identity of Mesodermal Progenitors. *Experimental Cell Research* 1999;251(2):257–63.
35. Kerkis I, Caplan AI. Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2012;18(2):129–38.
36. Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers* 2014;158(3):373–7.
37. Li J, Xu SQ, Zhao YM, Yu S, Ge LH, Xu BH. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Molecular Medicine Reports* 2018;18(6):4969–77.

38. von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and Tissue Research* 2007;329(3):409–20.
39. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Development/Plasticity/Repair Two Distinct Subpopulations of Nestin-Positive Cells in Adult Mouse Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience* 2003;23(17):6577–86.
40. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003;23(3):373–82.
41. Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *Journal of Neuroscience* 2005;25(47):10815–21.
42. Shi S, Miura M, Seo BM, Robey PG, Bartold PM, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics and Craniofacial Research* 2005;8(3):191–9.
43. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 2002;81(8):531–5.
44. Krivanek J, Adameyko I, Fried K. Heterogeneity and developmental connections between cell types inhabiting teeth. *Frontiers in Physiology* 2017;8(JUN):1–12.
45. Kulesa PM, Bailey CM, Kasemeier-Kulesa JC, McLennan R. Cranial neural crest migration: New rules for an old road. *Developmental Biology* 2010;344(2):543–54.
46. Marinkovic M, Dybdal-Hargreaves NF, Block TJ, Dean DD, Yeh C-K, Chen X-D. Oral and Craniofacial Stem Cells: An Untapped Source for Neural Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part A* 2020;(17-18):935-993.
47. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development (Cambridge)* 2016;143(13):2273–80.
48. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clinical Oral Investigations* 2010;14(4):433–440.

49. Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2005;23(3):299–305.
50. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, García-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells International* 2012;2012.
51. Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine* 2017;49(8):644–51.
52. Victor AK, Reiter LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Human Molecular Genetics* 2017;26(R2):R166–71.
53. Hochuli AHD, Senegaglia AC, Selenko AH, Fracaro L, Brofman PRS. Dental Pulp From Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stromal Cells With Demonstrated Neuronal Potential: In Vivo And In Vitro Studies. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2021;16.
54. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 2008;26(7):1787–95.
55. Janebodin K, Horst O V., Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS ONE* 2011;6(11).
56. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(25):13625–30.
57. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100(10):5807–12.
58. Xiao L, Ide R, Saiki C, Kumazawa Y, Okamura H. Human dental pulp cells differentiate toward neuronal cells and promote neuroregeneration in adult organotypic hippocampal slices in vitro. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(8).
59. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. *Frontiers in Physiology* 2016;7(NOV):1–10.



60. Kashyap R. SHED - Basic Structure for Stem Cell Research. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015;12(4):10–3.
61. Victor AK, Reiter LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Human Molecular Genetics* 2017;26(R2):R166–R171.
62. Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine* 2017;49(8):644–51.
63. Kunitatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow–derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;501(1):193–8.
64. Sunil PM, Manikandan R, Muthumurugan, Yoithapprahunath TR, Sivakumar M. Harvesting dental stem cells - Overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2015;7(6):S384–S386.
65. Turakhia H, Nayyar AS, Chawla S. Dental Stem Cell Banking, The Future is Here: A Case Report. *Journal of Dental and Oral Health* 2016;2(6):2–5.
66. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, et al. CD271/p75 NTR Inhibits the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic, and Myogenic Lineages. *Stem Cells and Development* 2011;20(5):901–13.
67. Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;386(1):135–9.
68. Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentim L, Bogo Chies JA, et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *Journal of Endodontics* 2011;37(7):973–9.
69. Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B, Xu Y, et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2013;33(8):1023–31.
70. Lee RTH, Nagai H, Nakaya Y, Sheng G, Trainor PA, Weston JA, et al. Cell delamination in the mesencephalic neural fold and its implication for the origin of ectomesenchyme. *Development (Cambridge)* 2013;140(24):4890–902.
71. Majumdar D, Kanafi M, Bhonde R, Gupta P, Datta I. Differential Neuronal Plasticity of Dental Pulp Stem Cells From Exfoliated Deciduous and Permanent Teeth Towards Dopaminergic Neurons. *Journal of Cellular Physiology* 2016;231(9):2048–63.

72. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 2008;26(7):1787–95.
73. Janebodini K, Horst O v, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS ONE* 2011;6(11).
74. Thesleff I, Åberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone* 1999;25(1):123–5.
75. Wang H, Zhong Q, Yang T, Qi Y, Fu M, Yang X, et al. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Molecular Medicine Reports* 2018;17(5):6551–9.
76. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* 2013;101(2):121–32.
77. D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, de Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death and Differentiation* 2007;14(6):1162–71.
78. Király M, Porcsalmy B, Pataki Á, Kádár K, Jelítai M, Molnár B, et al. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochemistry International* 2009;55(5):323–32.
79. Zipori D. Mesenchymal stem cells: Harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2004. page 211–5.
80. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2016;92(1–2):41–51.
81. Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2018; 12:165.
82. Kirkcaldie MTK, Dwyer ST. The third wave Intermediate filaments in the maturing nervous system. *Mol Cell Neuroscience* 2017;(84):68-76.
83. Pacheco A, Gallo G. Actin filament-microtubule interactions in axon initiation and branching. *Brain Research Bulletin* 2016;(126):300–10.
84. Menon S, Gupton SL. Building Blocks of Functioning Brain Cytoskeletal Dynamics in Neuronal Development. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016;(322):183-245.

85. Moore R, Theveneau E, Pozzi S, Alexandre P, Richardson J, Merks A, et al. Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development (Cambridge)* 2013;140(23):4763–75.
86. Chacon J, Rogers CD. Early expression of Tubulin Beta-III in avian cranial neural crest cells. *Gene Expression Patterns* 2019;34(July):119067.
87. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells and Development* 2010;19(9):1375–83.
88. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RDG, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of Cell Science* 1992;103(2):589–97.
89. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov K v, Tarasova Y, et al. Nestin expression - A property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004;61(19–20):2510–22.
90. Gazarian KG, Ramírez-García LR. Human deciduous teeth stem cells (SHED) display neural crest signature characters. *PLoS ONE* 2017;12(1):1–14.
91. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences* 1978;35(1):147–55.
92. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;122(1):80–90.
93. Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, et al. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *Stem Cells International* 2018;2018.
94. Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, Leitolis A, Boldrini-Leite LM, Rebelatto CLK, et al. The expression profile of dental pulp-derived stromal cells supports their limited capacity to differentiate into adipogenic cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(8).
95. Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, Bezooijen RL van, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;845–52.

96. Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT. Osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 2011;698:201–14.
97. Rebelatto CLK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine* 2008;233(7):901–13.
98. Su W-T, Shih Y-A, Ko C-S. Effect of chitosan conduit under a dynamic culture on the proliferation and neural differentiation of human exfoliated deciduous teeth stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2013;10(6):507–17.
99. Jensen EC. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anatomical Record* 2013;296(3):378–81.
100. Jensen EC. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anatomical Record* 2013;296(3):378–81.
101. Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi S, Talebi A, et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *International Journal of Developmental Biology* 2011;55(2):189–95.
102. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association* 2014;113(12):956–65.
103. Shi S, Gronthos S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18(4):696-704.
104. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1. *Blood* 1991;55–62.
105. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38(8):721–31.
106. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* 2005;23(2):220–9.

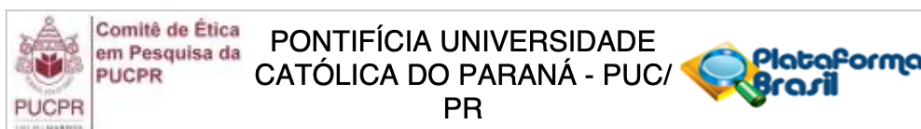
107. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. 2001;189(1):54-63.
108. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrichts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs* 2012;196(6):490–500.
109. Penfornis P, Pochampally R. Colony forming unit assays. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016. page 159–69.
110. Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS, et al. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Archives of Oral Biology* 2014;59(10):1013–23.
111. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* 2013;101(2):121–32.
112. Penfornis P. Colony Forming Unit Assays. *Mesenchymal Stem Cells* 2016;159-169.
113. Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2011;193(6):366–78.
114. Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, et al. Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007;299(1–2):99–107.
115. Zainuri M, Putri RR, Bachtiar EW. Establishing methods for isolation of stem cells from human exfoliated deciduous from carious deciduous teeth. *Interventional Medicine and Applied Science* 2018;10(1):33–7.
116. Zhang N, Chen B, Wang W, Chen C, Kang J, Deng SQ, et al. Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Molecular Medicine Reports* 2016;14(1):95–102.
117. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2016;45(1):124–31.

118. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. *Journal of Endodontics* 2009;35(11):1536–42.
119. Madeira A, da Silva CL, dos Santos F, Camafeita E, Cabral JMS, Sá-Correia I. Human mesenchymal stem cell expression program upon extended ex-vivo cultivation, as revealed by 2-de-based quantitative proteomics. *PLoS ONE* 2012;7(8).
120. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nature Medicine* 2015;21(12):1424–35.
121. Zhou X, Hong Y, Zhang H, Li X. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8.
122. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development* 2008;129(3):163–73.
123. Gaur M, Dobke M, Lunyak V v. Methods and Strategies for Procurement, Isolation, Characterization, and Assessment of Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. 2019;37–92.
124. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest. *Development* 2000;(127):1671–779.
125. Bronner-Fraser M. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *The FASEB Journal* 1994;8(10):699–706.
126. Li D, Zou XY, El-Ayachi I, Romero LO, Yu Z, Iglesias-Linares A, et al. Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Mesenchymal Stem Cells Display Action Potential Capacity In Vitro after Neuronogenic Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports* 2019;15(1):67–81.
127. Rafiee F, Pourteymourfard-Tabrizi Z, Mahmoudian-Sani MR, Mehri-Ghahfarrokhi A, Soltani A, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into neuron-like cells. *International Journal of Neuroscience* 2020;130(2):107–16.
128. Gonmanee T, Thonabulsombat C, Vongsavan K, Sritanaudomchai H. Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells. *Archives of Oral Biology* 2018;88(January):34–41.

129. Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, Unda F, Ibarretxe G, Pineda JR. Human dental pulp stem cells grown in neurogenic media differentiate into endothelial cells and promote neovasculogenesis in the mouse brain. *Frontiers in Physiology* 2019;10:347.
130. Barilani M, Banfi F, Sironi S, Ragni E, Guillaumin S, Polveraccio F, et al. Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific Reports* 2018;8(1):1–11.
131. Alraies A, Alaidaroos NYA, Waddington RJ, Moseley R, Sloan AJ. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biology* 2017;18(1):12.
132. Alvarez R, Lee HL, Hong C, Wang CY. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *International journal of oral science* 2015;7(4):205–12.
133. Pan W, Kremer KL, Kaidonis X, Ludlow VE, Rogers ML, Xie J, et al. Characterization of p75 neurotrophin receptor expression in human dental pulp stem cells. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2016;53:90–8.
134. Rønn LCB, Hartz BP, Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system 1998;33(7-8):853-64
135. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology* 2012;57(9):1231–40.
136. Sivasankar V, Ranganathan K. Growth characteristics and expression of CD73 and CD146 in cells cultured from dental pulp. *Journal of investigative and clinical dentistry* 2016;7(3):278–85.

## 9. ANEXOS

Anexo A – Termo de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CD271+ DERIVADAS DE POLPA DE DENTE DECÍDUO E PERMANENTE

**Pesquisador:** Letícia Fracaro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 09537119.0.0000.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.355.573

#### Apresentação do Projeto:

Segundo o relato da pesquisadora:

As doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela perda da estrutura e função neuronal, vem crescendo em todo o mundo, tornando-se um grave problema social e econômico. Já é conhecido o potencial das células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente decíduo (SHED) e permanente (DPSC) em se diferenciar em células do tecido nervoso como neurônios e células gliais. Já descrita por pesquisadores, as células que expressam positivamente o receptor CD271 (fator de crescimento neuronal) possuem maior capacidade de se aglomerar em neuroesferas e se diferenciar em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos. Método: Serão coletados seis dentes decíduos de crianças entre cinco e dez anos e seis dentes permanentes (3º molar) de adultos com indicação de extração por motivo ortodôntico. Será desenvolvido no Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

O estudo se dará pela caracterização das SHED e DPSC como células-tronco pela diferenciação em 3 linhagens (adipogênica, osteogênica e condrogênica), caracterização imunofenotípica e o ensaio de unidade formadora de colônia – fibroblastóide (CFU-F). Em relação as células que serão induzidas a diferenciação neuronal, serão caracterizadas por imunofluorescência, reação de cadeia da

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155  
**Bairro:** Prado Velho **CEP:** 80.215-901  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 3.355.573

polimerase com primers específicos de linhagens neuronais e o perfil imunofenotípico com marcadores específicos neuronais. Resultados Esperados: Se comprovada uma maior capacidade de diferenciação neuronal das subpopulações SHED e DPSC CD271+, pode-se estimular a utilização destas células para tratamento de doenças neurodegenerativas, auxiliando no processo de regeneração tecidual.

**Objetivo da Pesquisa:**

Comparar as subpopulações CD271+ das CTM de polpa de dente decíduo e polpa de dente permanente em relação ao potencial de diferenciação neuronal.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos que se aplicam aos participantes da pesquisa são inerentes aos procedimentos de coleta de material e não à pesquisa. Dessa forma, os riscos não se aplicam diretamente a pesquisa.

Benefícios:

Os benefícios não se aplicam diretamente aos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo proposto é pertinente e de valor científico. Os métodos estão adequados aos objetivos desejados e os riscos aos participantes são reduzidos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos de apresentação obrigatória adequados

**Recomendações:**

Na página 2/2 do TCLE para menores de 18 anos diz "telefones", mas apresenta apenas um número, deve ser acrescentado o segundo número de celular como apresentado no Termo de Assentimento.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas. Atentar para a recomendação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

<b>Endereço:</b> Rua Imaculada Conceição 1155 <b>Bairro:</b> Prado Velho <b>UF:</b> PR <b>Município:</b> CURITIBA <b>Telefone:</b> (41)3271-2103 <b>Fax:</b> (41)3271-2103 <b>E-mail:</b> nep@pucpr.br	<b>CEP:</b> 80.215-901
---	------------------------

Continuação do Parecer: 3.355.573

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1305877.pdf	21/05/2019 12:01:38		Aceito
Outros	Certificado_MenorDe18_21052019.pdf	21/05/2019 12:01:07	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
Outros	Carta_anuencia_21052019.pdf	21/05/2019 12:00:37	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Leticia_Fracaro_21052019.pdf	21/05/2019 11:58:59	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_7_a_18_anos_incompletos_e_legalmente_incapaz_21052019.pdf	21/05/2019 11:58:46	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEparamaioresde18anos_21052019.pdf	21/05/2019 11:58:39	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para_menores_de_18_anos_pais_21052019.pdf	21/05/2019 11:58:30	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3231992.pdf	21/05/2019 11:52:38	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Leticia_Fracaro_ComitedeEtica.pdf	14/03/2019 16:39:31	AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 29 de Maio de 2019

---

**Assinado por:  
NAIM AKEL FILHO  
(Coordenador(a))**

<b>Endereço:</b> Rua Imaculada Conceição 1155	<b>CEP:</b> 80.215-901
<b>Bairro:</b> Prado Velho	
<b>UF:</b> PR	<b>Município:</b> CURITIBA
<b>Telefone:</b> (41)3271-2103	<b>Fax:</b> (41)3271-2103
	<b>E-mail:</b> nep@pucpr.br

## Anexo B – ARTIGOS PUBLICADOS

Artigo publicado a revista “*Biomaterials*” em parceria com a Universidade de Pádua.

Biomaterials 269 (2021) 120653



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)



### Muscle functional recovery is driven by extracellular vesicles combined with muscle extracellular matrix in a volumetric muscle loss murine model

Fabio Magarotto<sup>a,b</sup>, Alberto Sgrò<sup>b</sup>, Agner Henrique Dorigo Hochuli<sup>c</sup>, Marina Andreetta<sup>b</sup>, Michele Grassi<sup>b</sup>, Mattia Saggiaro<sup>a</sup>, Leonardo Nogara<sup>d,e</sup>, Anna Maria Tolomeo<sup>b,j</sup>, Riccardo Francescato<sup>a</sup>, Federica Collino<sup>k</sup>, Giuseppe Germano<sup>e</sup>, Federico Caicci<sup>f</sup>, Edoardo Maghin<sup>b,g</sup>, Martina Piccoli<sup>g</sup>, Marcin Jurga<sup>h</sup>, Bert Blaauw<sup>d,i</sup>, Piergiorgio Gamba<sup>b</sup>, Maurizio Muraca<sup>b,e,j</sup>, Michela Pozzobon<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Stem Cells and Regenerative Medicine Lab, Institute of Pediatric Research Città Della Speranza, Padova, Italy

<sup>b</sup> Department of Women and Children Health, University of Padova, Italy

<sup>c</sup> Pontifical University of Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Biomedical Sciences Department, University of Padova, Italy

<sup>e</sup> Institute of Pediatric Research Città Della Speranza, Padova, Italy

<sup>f</sup> Department of Biology, University of Padua, Italy

<sup>g</sup> Tissue Engineering Lab, Institute of Pediatric Research Città Della Speranza, Padova, Italy

<sup>h</sup> The Cell Factory BVBA (Esperite NV), Italy

<sup>i</sup> Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy

<sup>j</sup> L.I.f.e.L.a.b. Program, Consorzio per La Ricerca Sanitaria (CORIS), Veneto Region, Padova, Italy

<sup>k</sup> Laboratory of Translational Research in Paediatric Nephro-urology, Fondazione Ca' Granada IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Volumetric muscle loss  
Functional tissue regeneration  
Extracellular matrix  
Extracellular vesicles

#### ABSTRACT

Biological scaffolds derived from decellularized tissues are being investigated as a promising approach to repair volumetric muscle losses (VML). Indeed, extracellular matrix (ECM) from decellularized tissues is highly biocompatible and mimics the original tissue. However, the development of fibrosis and the muscle stiffness still represents a major problem. Intercellular signals mediating tissue repair are conveyed via extracellular vesicles (EVs), biologically active nanoparticles secreted by the cells. This work aimed at using muscle ECM and human EVs derived from Wharton Jelly mesenchymal stromal cells (MSC EVs) to boost tissue regeneration in a VML murine model. Mice transplanted with muscle ECM and treated with PBS or MSC EVs were analyzed after 7 and 30 days. Flow cytometry, tissue analysis, qRT-PCR and physiology test were performed. We demonstrated that angiogenesis and myogenesis were enhanced while fibrosis was reduced after EV treatment. Moreover, the inflammation was directed toward tissue repair. M2-like, pro-regenerative macrophages were significantly increased in the MSC EVs treated group compared to control. Strikingly, the histological improvements were associated with enhanced functional recovery. These results suggest that human MSC EVs can be a naturally-derived boost able to ameliorate the efficacy of tissue-specific ECM in muscle regeneration up to the restored tissue function.

REVIEW ARTICLE

## Dental Pulp from Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stromal Cells Demonstrated Neuronal Potential: *In Vivo* and *In Vitro* Studies

Agner Henrique Dorigo Hochuli<sup>1</sup>, Alexandra Cristina Senegaglia<sup>1,\*</sup>, Ana Helena Selenko<sup>1</sup>, Letícia Fracaro<sup>1,#</sup> and Paulo Roberto Slud Brofman<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>Core for Cell Technology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

**Abstract: Background:** Mesenchymal stromal cells (MSC) have the potential for self-renewal and differentiation in different tissues, characteristics that encourage their use in regenerative medicine. Dental tissue MSCs are easy to collect, have the same embryonic origin as neurons and have neuronal markers that allow their use in treating neurodegenerative diseases. Human exfoliated deciduous teeth (SHED)-derived stromal cells are considered immature and present positive expression of pluripotency and neuronal markers. Studies have shown that after the induction of neuronal differentiation *in vitro*, SHED increased the expression of neuronal markers, such as  $\beta$ III-tubulin, nestin, GFAP, NeuN, and NFM, demonstrating the potential use of these cells in preclinical studies. The results of this review reflect the consensus that in diseases such as spinal cord injury, cerebral ischaemia, and Alzheimer's and Parkinson's disease, SHED could function in the suppression of the inflammatory response, neuroprotection, and neuronal replacement.

**Conclusion:** For these cells to be used in large-scale clinical trials, standardization of the isolation techniques and the neuronal induction medium are necessary. The potential of SHED to induce neuronal differentiation is evident, demonstrating that this resource is promising and shows great potential for use in future preclinical and clinical trials of neurodegenerative diseases.

### ARTICLE HISTORY

Received: May 28, 2020  
Revised: October 13, 2020  
Accepted: October 28, 2020

DOI:  
10.2174/1574888X16666210215160402

**Keywords:** Mesenchymal stromal cells, dental tissue, SHED, neural differentiation, neuronal markers, neurons.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. Mesenchymal Stromal Cells

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are adult cells that are multipotent and functionally defined as having self-renewal capacity, differentiation capacity in several cell lines, and extensive paracrine and immunomodulatory activity [1-4]. The primary function of MSCs is to act in the repair and maintenance of adult tissues. These cells secrete several paracrine-soluble factors that can decrease inflammation and increase the repair of the damaged tissue. Additionally, they have anti-apoptotic effects and function as inhibitors of scar formation and stimulators of angiogenesis. MSCs have low or no expression of MHC class II molecules and co-stimulating molecules, demonstrating their reduced immunogenicity, avoiding the use of immunosuppressants after an allogeneic transplant [1, 5-9].

Due to the need for the standardization of MSCs, The International Society for Cellular Therapy (ISCT) established standards for the characterization of MSCs, which are adhesion to plastic, fibroblast-like morphology, differentiation

into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages, and immunophenotypic characterization, in which MSCs should express the markers CD105, CD73 and CD90 and show reduced expression of CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 or CD19 and HLA-DR [3, 10, 11].

Several sources of MSCs have been described; the most well-studied source is bone marrow (BM), but its collection is a painful procedure with a low yield, which results in 0.01 - 0.001% MSCs [12-14]. Due to the low number of obtained cells and the difficulty in collecting BM, other sources of MSCs have been further studied, such as the umbilical cord, adipose tissue, and dental tissues, which are easily accessible sources [13, 15-17]. Dental tissue seems to have a higher cell proliferation ability, a significant advantage for osteogenic differentiation and expression of pluripotent markers compared to BM [18-20].

### 1.2. Dental Tissue Mesenchymal Stromal Cells

Mammalian teeth are considered tissue of ectodermal origin. During development, the ectoderm gives rise to a neural crest at the margins of the neural tube and contributes to various neural and non-neural tissues. The tissue derived from the neural crest includes the pulp, periodontal ligament, and tissues that support the root and its apex, including the following cell types: odontoblasts, periodontal ligament cells, glial cells, and dental pulp stromal cells. The real origin of

\* Address correspondence to this author at the Core of Cell Technology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, P.O. Box: 80215-901, Curitiba, Brazil; Tel: +55 41 32712219; E-mail: [alexandra.senegaglia@pucpr.br](mailto:alexandra.senegaglia@pucpr.br)  
# These authors contributed equally for this work.

Anexo C – ARTIGO SUBMETIDO

Artigo submetido à revista “*Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*”. Fator de impacto: 1.56. Fator Scimago: Q2

**Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**

**Stromal cells from exfoliated deciduous teeth can be stored in cell banks as a strategy for treat neuronal diseases**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Keywords:</b>	SHED; Regenerative medicine; Dental tissues; Neuronal Markers; Cell Banks
<b>Corresponding Author:</b>	Leticia Fracaro, Ph.D. Pontificia Universidade Catolica do Parana BRAZIL
<b>First Author:</b>	Leticia Fracaro, Ph.D.
<b>Order of Authors:</b>	Leticia Fracaro, Ph.D. Agner Henrique Dorigo Hochuli, BSc Ana Helena Selenko Luiz Guilherme Achcar Capriglione, PhD Paulo Roberto Slud Brofman, PhD Alexandra Cristina Senegaglia, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>Objective: This study aimed to characterize and standardize methodologies to obtain SHED and confirm the positive expression for neuronal markers. Materials and Method: The local Research Ethics Committee approved this study (CAAE: 09537119.0.0000.0020). Healthy primary teeth were collected from children. SHED was isolated by enzymatic digestion with collagenase. To assess these cells' potential and efficiency, SHED was subjected to the testing of colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F). Following the guidelines of the International Society for Cellular Therapy (ISCT), the cells were characterized by flow cytometry and differentiated into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages. To elucidate the neuronal potential of SHED, we examined the immune-expression of nestin and <math>\beta</math>III-tubulin by immunofluorescence. Results: SHED showed MSC characteristics, such as adhesion to plastic, positive immunophenotypic profile for CD105, CD73, CD56, CD90, CD29, CD166, CD44, and reduced expression for CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR and differentiation in three lineages suggested by ISCT. The average efficiency of colony formation was 16.69%. SHED expressed the neuronal markers nestin and <math>\beta</math>III-tubulin; the fluorescent signal intensity was significantly higher in <math>\beta</math>III-tubulin (<math>p &lt; 0.0001</math>) compared to nestin. Final Considerations: SHED have easily obtained cells, non-invasive collection, have MSC characteristics according to ISCT criteria, and expresses the neuronal markers nestin and <math>\beta</math>III-tubulin. SHED may be used as a new therapeutic strategy in the regeneration and repair of neuronal cells and tissues.</p>



Anexo D – Participação em eventos

Certificado de apresentação de pôster online no III Simpósio Brasileiro de Neurociências.

# CERTIFICADO

Certifico que o trabalho intitulado “COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE POLPA DE DENTE DECÍDUO E PERMANENTE”, do(s) autor(es) Agner Henrique Dorigo Hochuli | Ana Helena Selenko | Alexandra Cristina Senegaglia | Paulo Roberto Slud Brofman | Letícia Fracaro, foi apresentado durante o III Simpósio Brasileiro de Neurociências. O evento foi realizado entre os dias 9 e 12 de dezembro de 2020, de forma inteiramente online, no *Portal de Cursos do Ciências e Cognição*.

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2020.



SIMPÓSIO  
BRASILEIRO DE  
NEUROCIÊNCIAS

**Dr. Alfred Sholl-Franco**  
Coordenador

Simpósio Brasileiro de Neurociências



UFRRJ  
100  
ANOS  
1920 | 2020



Certificado de apresentação de oral no XXVIII Seminário de Iniciação Científica da PUCPR.



Declaramos que o(a) estudante **Agner Henrique Dorigo Hochuli** apresentou o projeto **ANÁLISE DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DA POPULAÇÃO TOTAL E SUBPOPULAÇÃO CD271+ DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO** sob orientação do(a) Professor(a) **Paulo Roberto Slud Brofman** no XXVIII Seminário de Iniciação Científica PUCPR, realizado nos dias 20, 21 e 22 de outubro de 2020.



CURITIBA, 22 DE OUTUBRO DE 2020.

Coordenação da IC da PUCPR



Certificado de apresentação de pôster no XI *Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting - ABTCel-Gen | ISCT South & Central America Regional Forum | III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine | I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry.*

**CERTIFICATE**

This is to certify that the abstract

**NEURONAL IMMUNOPHENOTYPIC PROFILE OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DECIDUOUS TOOTH-DERIVED AND PERMANENT PULP TOOTH-DERIVED**

Of the authors: **AGNER HENRIQUE DORIGO HOCHULI; LETÍCIA FRACARO; ANA HELENA SELENKO; ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA; PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN**, has been presented in the modality of Electronic Poster, in the XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting - ABTCel-Gen | ISCT South & Central America Regional Forum | III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine | I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry, online, that was held from Apr 28 to May 01, 2021.

May 01, 2021

**Paulo Roberto Slud Brofman**  
President of ABTCel-Gen and XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting

**Antônio Carlos Campos de Carvalho**  
Scientific director of Brazilian Association of Cell and Gene Therapy

Promoted by  
ISCT South & Central America Regional Forum  
Support  
CNPq

XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting  
ISCT South & Central America  
III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine  
I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry  
2021