

**GUSTAVO DOS SANTOS COURA**

**INVESTIGAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL COMO  
NICO DE CÉLULAS TRONCO ECTOMESENCQUIMAIS.**

Florianópolis  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO DOS SANTOS COURA

**INVESTIGAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL COMO  
NICO DE CÉLULAS TRONCO ECTOMESENQUIMAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Co-orientadora: Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Florianópolis  
2007

C858i Coura, Gustavo dos Santos

Investigação do ligamento periodontal como potencial nicho de células tronco da crista neural / Gustavo dos Santos Coura; orientador Ricardo de Souza Magini. – Florianópolis, 2007.

93 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Opção Implantodontia.

Inclui bibliografia.

1. Ligamento periodontal. 2. Células-tronco. 3. Crista neural. 4. Implantodontia. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

GUSTAVO DOS SANTOS COURA

## **INVESTIGAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL COMO NICO DE CÉLULAS TRONCO ECTOMESENCQUIMIAIS.**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor em Odontologia”, opção Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 31 de AGOSTO de 2007.

---

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira

*Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia*

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

*Presidente*

---

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Membro

---

Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Membro

---

Prof. Dr. Alberto João Zortéa Junior

Membro

---

Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva

Membro

## **DEDICATÓRIA**

*À DANIELLE SOARES DE ANDRADE. PACIÊNCIA, COMPREENSÃO E AMOR FORAM FUNDAMENTAIS PARA VIVERMOS E EDIFICARMOS NOSSAS UNIÕES PESSOAIS, FAMILIARES, PROFISSIONAIS E ESPIRITUAIS.*

*AO MEU SAUDOSO PAI, JOÃO MARCOS COURA. INTEGRIDADE E CARÁTER, MARCOS DESSA ALMA. GRANDES AMIGOS. INCENTIVADOR DE VÔOS.*

*À MINHA QUERIDA MÃE, CECÍLIA MARIA DOS SANTOS. COM SENSIBILIDADE E PERCEPÇÃO, NOS PROTEGE COM SABEDORIA. ESSE MOVIMENTO UNIVERSAL GRADUAL E CRESCENTE, INVOCADO PELOS NOSSOS CORAÇÕES, DEVE CONTINUAR...*

*À MARINA DOS SANTOS COURA, MINHA IRMÃ. DEDICADA E DETERMINADA. COMPANHEIRA. LEVE E ALEGRE. É MUITO BOM VER VOCÊ COREOGRAFANDO SUA VIDA. OBRIGADO PELOS ENSINAMENTOS.*

*À MINHA IRMÃ, FERNANDA DOS SANTOS COURA. GRANDES PODERES QUE PRECISAMOS DECIFRAR. INTELIGENTE. TE AMO.*

*AOS MEUS FAMILIARES E AMIGOS. PELA CONSTANTE RENOVAÇÃO E APRENDIZAGEM QUE TENHO COM VOCÊS.*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**. Visionário, sonhador e líder. Agradeço a oportunidade dada por você para a iniciação do sonho da Pós-Graduação.

À **Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin**, orientadora deste trabalho. Ser humano do bem com liderança silenciosa. Mestra e Amiga. Meu muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**. Autêntico e crítico. As quartas-feiras (or Wednesdays) foram importantes para meu desenvolvimento pessoal e científico.

A todos os professores, da área conexas e de concentração, do **Programa de Pós-Graduação em Implantodontia**. Todos foram importantes para formação de minha base científica.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Freitas**, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo incentivo constante. Sua forma de raciocínio faz abrir mentes inquietas. São sempre muito proveitosas nossas trocas de idéias.

Ao amigo e doutorando **Ricardo Castilho Garcez**. Seu apoio logístico nos experimentos e os seus ensinamentos relacionados à Biologia Celular e Molecular foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À doutoranda **Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar**. Sua disciplina e didática foram importantes para a compreensão e execução das técnicas bioquímicas empregadas neste trabalho.

Aos professores **Dr. Ronaldo Célio Mariano, Carlos Eduardo Gomes do Couto filho e Marcelo Taveira Barbosa**, da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-EFOA-MG), incentivadores da minha carreira acadêmica. Bons amigos.

Ao amigo **Prof. Dr. Alberto João Zortéa Jr.** Serenidade e integridade. As famílias **Santos, Coura e Zortéa**, “triade”, vieram para promover o bem do próximo nos três campos de desenvolvimento. O universo e a natureza, felizmente, conspiram a favor. Agradeço a Deus pelos nossos encontros.

Ao **Prof. Dr. José Nazareno Gil** e ao mestrando **Rodrigo Granato**, pelo auxílio na obtenção das amostras para a pesquisa.

Ao casal de amigos, **Mayra Cajueiro-Warren e Michael Warren**. Diversidade cultural. A pedra bruta é sempre fundamental! Obrigado pelas orientações inglesas.

Aos meus padrinhos, **Júlio Rodrigo Malva e Eleandra Marotta Malva**. Amantes da liberdade, considerando-a como a única condição sob a qual a inteligência, a dignidade e a felicidade humana podem se desenvolver e crescer. Essa convivência de maneira alegre e simples favoreceu o desenvolvimento harmônico deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva**, pelo incentivo e idéias, nesse meu processo de edificação.

Às funcionárias da Aquarela Sorriso, **Dayana, Fabíola, Gleice e Daiana**, por não medirem esforços para a concretização de sonhos profissionais humanísticos. Estamos formando um time competente.

Agradeço de forma especial à funcionária **Dayana Valéria Folster Antônio Schreiber**, pelo apoio logístico e cumplicidade.

À minha tia, **Terezinha Gomes dos Santos**, pelo pronto atendimento em muitos momentos durante a confecção desse trabalho.

Ao amigo **Prof. Nélon Dias**, pela preocupação e agilidade nas revisões e ensinamentos da língua inglesa.

Aos colegas do Mestrado e do Doutorado, **Adriana, Cimara, Dirce, Kávio, Otávio, Bianchini, Pontual, Zortéa, Nilo, Hiron, Titi, Cesar, Magalhães, Aline, Cleide, Angélica, Raul, China, Alemão, Rodrigo, Gisele, Gabriela, Elisa, Ricardo Dingo e João**. Aos estagiários e residentes, **Izabelle, Marcel e Ernesto**. Sempre foram bons encontros e boas trocas. Crescimento pessoal e profissional. Obrigado a todos.

Ao mestre e amigo, **Edival Magalhães Júnior**. Boa parceria de trabalho. A convivência na moradia do Canto da Lagoa foi importante para a continuidade do trabalho e da amizade.

Ao amigo e mestrando, **Leonardo Bez.** Batalhas semelhantes. Parceria profissional. Valeu cara! A busca pelo equilíbrio.

Ao mestre **Kávio Narciso Castro**, amigo desde a Residência no HRAC-USP de Bauru, pela tranquilidade, alegria e determinação compartilhada durante muitos momentos desse curso de Pós-Graduação. O Piauí ficou mais perto!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, **Maria Cecília, Mari, Meline, Irís, Ellen, Suélen, Bianka, Bianca, Ricardo New, Bruno, Rosana, Mariana, Talita, Ricardo Garcez e Cláudia**, pelo auxílio logístico para a realização dos experimentos. O ambiente de harmonia e seriedade resulta em um ilimitado crescimento.

A Prof. Dra. **Dircilene Colares de Souza**, pela seriedade e competência empregada sempre em nossos trabalhos. Bons vãos.

Ao amigo **Daniel de Aguiar Wilmers**, pela irmandade demonstrada. Nossos sonhos traçados juntos começam a se concretizar.

Aos amigos e irmãos, **Danilo Teixeira e Fábio Henrique Dias da Silva**. Nossas almas estão ligadas! Esse elo resulta no nosso crescimento pessoal, profissional e espiritual, continuamente. Em prol de uma humanidade harmônica.

Aos meus sogros, **Noel Júnior e Maria das Graças Soares**, pela confiança e estímulo constantes. Por me darem um grande presente!

Às funcionárias do CEPID, **Rose, Dolores, Gisela e Miriam**, pelo trabalho diário. Em especial a saudosa funcionária do Centro Cirúrgico, **Janete**, pela alegria e carinho.

Aos funcionários da Biblioteca Setorial, em especial, a **Sra. Vera Sovernigo**, pela presteza.

À funcionária **Ana Maria**, da secretária da Pós-Graduação, pela eficiência. Ao funcionário **Diego Caron**, pela alegria e determinação na resolução de problemas.

Aos **pacientes**, voluntários, também ansiosos pela concretização deste trabalho.

À **Deus**, pelo símbolo, figura, pessoa. Pelos ensinamentos. Um caminho. Uma luz. A todos seus auxiliares visíveis e invisíveis, vivos e inanimados, que trabalham por um universo semelhante ao mundo da cultura celular. Ajuda mútua para crescimento do todo. Paz.

Meus agradecimentos sinceros a todos que participaram da realização deste trabalho.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".

*Albert Einstein*

## **CAPÍTULO I**

COURA, Gustavo dos Santos. **Investigação do ligamento periodontal como nicho de células tronco ectomesenquimais**. 2007. 93f. Tese (Doutorado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado, derivado do folículo dental, originário das células da crista neural. As células da crista neural são progenitores multipotentes que seguem caminhos migratórios distintos e são responsáveis pela formação de uma importante variedade de tipos celulares do organismo adulto. Embora as células predominantes do ligamento periodontal sejam os fibroblastos periodontais, esse tecido apresenta uma população celular heterogênea e, adicionalmente, pode conter células indiferenciadas. Os verdadeiros mecanismos que contribuem para o desenvolvimento das linhagens celulares do ligamento periodontal são desconhecidos e a hierarquia dessas células de mamíferos adultos não está perfeitamente compreendida. A identificação de células tronco de adultos tem recebido grande atenção nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso terapêutico na regeneração de tecidos e órgãos lesados. O objetivo do presente trabalho foi verificar o ligamento periodontal humano como nicho de células tronco, com características da crista neural. Células do ligamento periodontal humano foram isoladas de 10 dentes de 7 indivíduos (grupo *PDL pool*) e também, de 4 dentes de um mesmo indivíduo (grupo *PDL single*), após digestão enzimática e cultivadas em meios de cultura indutivos específicos. Fenótipos celulares foram analisados por imunocitoquímica e RT-PCR. Foram identificados fenótipos mesodermis (adipogênico, osteogênico e miogênico). Adicionalmente, foram identificadas células positivas para nestina (marcador de células tronco neurais), células positivas para HNK1 e p75 (marcadores de células tronco da crista neural) e células que apresentaram marcadores de tipos celulares diferenciados como  $\beta$ -tubulinaIII, NF-M, periferina e MAP-2 (marcadores de neurônios), actina de músculo liso (SMA) e proteína zero (P0, marcador de célula glial). Os resultados encontrados foram similares nos 2 grupos de estudo (grupo *PDL pool* e grupo *PDL single*). De acordo com nossos resultados, o ligamento periodontal humano possui células que apresentaram marcadores de células tronco da crista neural, e células com capacidade de diferenciação em derivados mesodermis e neurais. Este relato científico investigou o ligamento periodontal humano como um nicho de células tronco, mais precisamente com características da crista neural. O ligamento periodontal mostra-se como uma fonte alternativa viável de células progenitoras para uso em terapias com células tronco.

Palavras-chave: células tronco, ligamento periodontal, crista neural.

COURA, Gustavo dos Santos. **Human ligament periodontal: a niche of ectomesenchymal cells.** 2007. 93f. Thesis (Doctor in Dentistry – Option Implant Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

The periodontal ligament (PDL) is a specialized connective tissue, derived from dental follicle, originary of the neural crest cells. The neural crest cells are multipotent progenitors which follow distinct migratory pathways and are responsible for the formation of an important variety of cellular types of the adult organism. Although the predominant cells of the PDL are the periodontal fibroblasts, this tissue presents cellular population heterogeneous and, moreover, can contain undifferentiated cells. The true mechanisms that contribute for the development of the cellular types of the periodontal ligament are unknown and the hierarchy of these cells in adult mammals is not understood. The identification of adult stem cells has received great attention in recent years based on its great potential from therapeutic use in the tissue regeneration. The objective of the present work was to verify the human periodontal ligament as a niche of stem cells, with characteristics of the neural crest. Cells from human periodontal ligament had been isolated from 10 teeth of 7 individuals (PDL pool group) and also, of 4 teeth of one same individual (PDL single group), after enzymatic digestion. The cells were cultured in specific inductive medium. Protein and gene expression were performed through immunocytochemistry and RT-PCR techniques. Mesodermal phenotypes had been identified (adipogenic, osteogenic, and myogenic), after culture in inductive medium. The cells presented the nestin marker of neural stem cells and also undifferentiated cells of neural crest (HNK1, p75), by immunocytochemistry. When cultured in inductive medium that allowed neural differentiation, cells showed markers for  $\beta$ -tubulina, NF-M, Peripherin, MAP-2 and Po. The results were similar between 2 groups (PDL pool group and PDL single group). According to our results, the human PDL cells showed positive markers of postnatal stem cells with similar features to the stem cells derived from neural crest, with differentiation capacity in mesodermal and neural progenitors. This research investigated the human PDL as a niche of cells derived from the neural crest, and possibly stem cells. The human PDL revealed itself as a viable alternative source for possible primitive precursors to be used in stem-cell therapies.

**Key words:** stem cell, periodontal ligament, neural crest.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análise morfológica das células derivadas do ligamento periodontal humano em cultura e visualizadas por microscopia de contraste de fase. Cultura realizada como descrito em materiais e métodos a partir de (A) um *pool* de ligamentos periodontais, na passagem 9, grupo *PDL pool* ou (B) dos ligamentos periodontais de um mesmo indivíduo, na passagem 4, *PDL single*. Barra de calibração = 50µm.....49
- Figura 2 – Diferenciação das células derivadas do ligamento periodontal humano cultivadas em meios indutivos específicos. (A) As células foram cultivadas em meio de cultura osteogênico conforme descrito em materiais e métodos. Os nódulos mineralizados (setas) corados pela técnica de Von Kossa. (B) As células foram cultivadas em meio de cultura adipogênico, conforme descrito em materiais e métodos. Células semelhantes a adipócitos contendo vacúolos lipídicos foram coradas com a solução de Oil-red (setas). Barra de calibração = 50µm.....50
- Figura 3 – Diferenciação das células do ligamento periodontal humano em derivados ectodermis e mesodermis pela presença de marcadores celulares protéicos, após serem cultivadas em meio para o crescimento de células da CN, conforme descrito em materiais e métodos. (A) As células derivadas do ligamento periodontal humano expressaram marcador neuronal, analisadas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti- $\beta$ tubulinaIII. (B) Células expressaram marcador de miofibroblasto, analisadas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti-SMA. (C) Células que expressaram marcação dupla, utilizando anticorpos anti-SMA e anti- $\beta$ tubulinaIII. (D) Análise por imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti-HNK-1, (E) anti-p75 e (F) anti-*nestina*. Barra de calibração = 50µm.....51

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Análise da expressão gênica para marcadores neurais (nestina, $\beta$ TubulinaIII, NF-M, MAP-2 e periferina), para marcadores gliais (P0 e GFAP) e para miofibroblastos (SMA-positivas), por RT-PCR..... | 47 |
| Tabela 2- Anticorpos primários utilizados para a técnica de imunocitoquímica.....  | 80 |
| Tabela 3 – Anticorpos Secundários utilizados para a técnica de imunocitoquímica.....   | 81 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |  |
|-----------------|---|--|
| °C              | - | graus Celsius                                      |
| cm <sup>2</sup> | - | centímetro quadrado                                |
| μM              | - | micromolar   |
| μl              | - | microlitro   |
| μg              | - | micrograma   |
| ml              | - | mililitro  |
| SFB             | - | soro fetal bovino                                  |
| PSA             | - | antibióticos/antifúngico                           |
| pH              | - | potencial hidrogeniônico                           |
| rpm             | - | rotações por minuto                                |
| CO <sub>2</sub> | - | gás carbônico                                      |
| O <sub>2</sub>  | - | oxigênio   |
| CEPID           | - | Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários |
| UFSC            | - | Universidade Federal de Santa Catarina             |
| min             | - | minutos  |
| h               | - | horas  |
| PBS             | - | solução salina de fosfato tamponada                |
| NaCl            | - | cloreto de sódio                                   |
| g               | - | grama  |
| CN              | - | crista neural                                      |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO II.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                   | <b>18</b> |
| <b>PROPOSIÇÃO.....</b>   | <b>26</b> |
| OBJETIVO GERAL.....  | 26        |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 26        |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO III – ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA.....</b>                           | <b>27</b> |
| <br>   |           |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>30</b> |
| CULTURA CELULAR.....   | 30        |
| DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....   | 31        |
| DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.....   | 31        |
| MEIO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS DERIVADAS<br>DA CRISTA NEURAL.....            | 32        |
| RT-PCR.....  | 32        |
| IMUNOCITOQUÍMICA.....  | 33        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>34</b> |
| CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES DE<br>LIGAMENTOS PERIODONTAIS HUMANOS..... | 34        |
| DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E ADIPOGÊNICA.....                                     | 35        |
| EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES CELULARES<br>POR RT-PCR.....                      | 35        |
| ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA POR<br>IMUNOCITOQUÍMICA.....                       | 36        |
| <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>TABELA 1.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>LEGENDAS DAS FIGURAS.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>FIGURAS.....</b>  | <b>49</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO III – ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA.....</b>                              | <b>52</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO IV.....</b>  | <b>70</b> |
| <br>   |           |
| <b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>  | <b>71</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO V.....</b>   | <b>75</b> |
| <br>   |           |
| <b>GLOSSÁRIO.....</b>  | <b>76</b> |
| <b>METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>  | <b>77</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| CULTURA CELULAR.....  | 77        |
| DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO DE VON KOSSA.....                      | 78        |
| DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO DE OIL-RED-O.....                      | 79        |
| DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA.....                 | 79        |
| DESCRIÇÃO DO RT-PCR.....                                      | 81        |
| <b>APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO .....</b>              | <b>85</b> |
| <b>APÊNDICE 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFSC.....</b> | <b>86</b> |
| <b>ANEXO 1 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS E</b>            |           |
| <b>ENVIADOS DURANTE O CURSO .....</b>                         | <b>88</b> |

## CAPÍTULO II

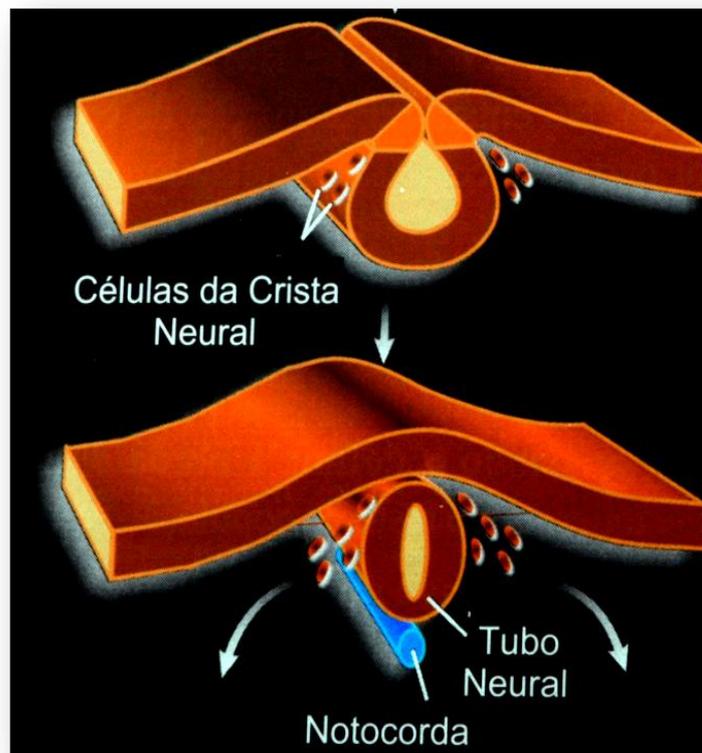
# INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO E O PAPEL DA CRISTA NEURAL

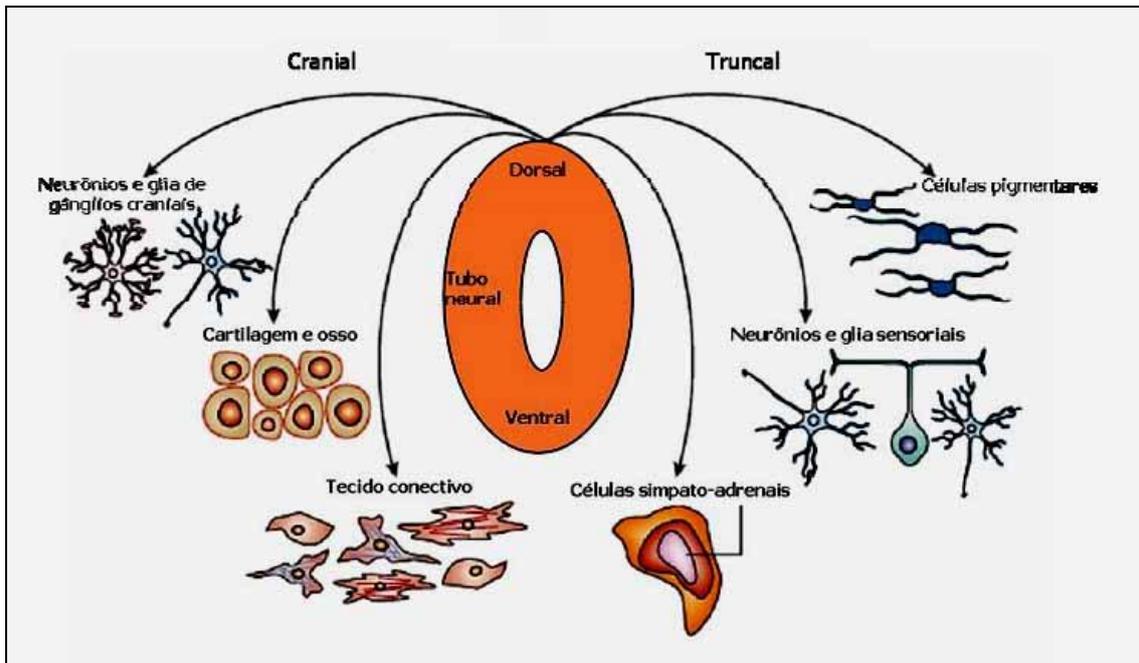
O desenvolvimento dentário pode ser dividido, didaticamente, em três fases que se sobrepõem: a iniciação, a morfogênese e a histogênese. Na fase de iniciação, os locais dos futuros dentes serão estabelecidos com o aparecimento de germes dentários ao longo da lâmina dental. Durante a morfogênese, a forma dentária é determinada por uma combinação de proliferação celular e de movimento celular. Durante a histogênese, a diferenciação dá origem aos tecidos dentários mineralizados (esmalte, dentina e cimento) e aos tecidos não-mineralizados (polpa dentária e ligamento periodontal). O desenvolvimento do dente e seus tecidos de suporte é caracterizado por interações complexas, denominadas epitélio-mesenquimais, através de sinais mútuos indutivos entre o epitélio oral e os tecidos ectomesenquimais (LUMSDEN, 1988). Essa interação recíproca resulta na formação do esmalte dentário, derivado das células do epitélio oral (os ameloblastos), e na formação da dentina mineralizada, derivada das células ectomesenquimais (odontoblastos). Adicionalmente, as células ectomesenquimais, originárias da crista neural, migram para os maxilares a partir da margem do tubo neural e formam a polpa dentária, o cimento, o osso alveolar e o ligamento periodontal.

A crista neural é uma estrutura embrionária transiente exclusiva de embriões vertebrados, derivada da ectoderme, embora Hall (2000) reconheceria essa estrutura como a quarta camada germinativa. Durante a neurulação, as extremidades da placa

neural se fundem, resultando na formação do tubo neural. No momento do fechamento do tubo neural, as células das bordas da placa neural sofrem uma transição do fenótipo epitelial para o mesenquimal (ectomesenquimais) e migram para vários órgãos e tecidos em desenvolvimento (Esquema 1). As células da crista neural são progenitores multipotentes que seguem caminhos migratórios distintos e são responsáveis pela formação de uma importante variedade de tipos celulares do organismo adulto (LE DOURAIN e KALCHEIM, 1999). A crista neural cefálica origina as células gliais, neurônios parassimpáticos e entéricos, auxiliando a formação do sistema nervoso periférico e entérico. Além disso, formam os melanócitos, as meninges cerebrais e vários tipos celulares ectomesenquimais, que abrangem células que irão formar o tecido conjuntivo, cartilaginoso, ósseo e dentário do crânio e da face (Esquema 2).



Esquema 1 – Esquema representando algumas etapas do processo de fechamento do tubo neural e origem da crista neural



Esquema 2 - **Derivados da crista neural.** As células da CN migram em direção ao corpo e diferenciam em muitos tipos celulares distintos. Apesar das células da CN serem pluripotentes, diferenças existem entre as células que são originadas de diferentes níveis antero-posteriores: células da CN truncal formam melanócitos e vários tipos de neurônios e células da glia, enquanto que células da CN cranial (região embrionária da cabeça) também têm o potencial de formar derivados mesenquimais, como osso, cartilagem e tecido conectivo. Adaptado de Knecht & Bronner-Fraser (2002).

## PERIODONTO: ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

A complexa estrutura dentária apresenta alta dureza e durabilidade, no entanto, suas rígidas estruturas são vulneráveis as injúrias causadas por traumas, agentes

químicos, cânceres, mutações genéticas e, principalmente, infecções bacterianas. A saúde periodontal é imprescindível para o suporte, a manutenção, a nutrição e a homeostase da fisiologia dentária adequada. As enfermidades periodontais, caracterizadas pela destruição do periodonto de proteção e inserção, estão entre as doenças crônicas mais comuns em humanos e afetam de 5 a 30% da população adulta entre 25 a 75 anos. Essas enfermidades são a principal causa de perdas dentárias após os 50 anos de idade (BROWN, LÖE, 1993) e, portanto, um grande desafio para a saúde pública mundial (PAGE et al., 1997; ELTER et al., 2003).

O tratamento de periodontites, durante os anos 50 e 60, consistia de terapias cirúrgicas ressectivas, concomitante ou não com as osteoplastias, realizadas com o objetivo de diminuir a profundidade de sondagem das bolsas periodontais. No entanto, essas terapias resultavam na perda de suporte ósseo e, em alguns casos, na perda do órgão dentário. Atualmente, o foco do tratamento periodontal está nos procedimentos reconstrutivos e regenerativos, que objetivam a recuperação do tecido periodontal perdido (BARTOLD et al., 2000). Inúmeras abordagens clínicas, que incluem os enxertos ósseos, o condicionamento da superfície radicular, as barreiras de membranas e os vários fatores de crescimento, são realizadas para a obtenção da regeneração periodontal (MACNEIL e SOMERMAN, 1999; GIANNOBILE, 1996). Entretanto, essas abordagens terapêuticas disponíveis são ainda limitantes e incapazes de obter uma regeneração periodontal previsível (GRZESIK e NARAYANAN, 2002).

A aplicabilidade da engenharia tecidual, baseada nas células tronco para obtenção da regeneração periodontal, é suportada por estudos animais que demonstraram que as células cultivadas do ligamento periodontal podem ser reimplantadas com sucesso, promovendo a regeneração tecidual (HASEGAWA et al., 2005). As estratégias para a reconstrução que explorem a capacidade regenerativa das

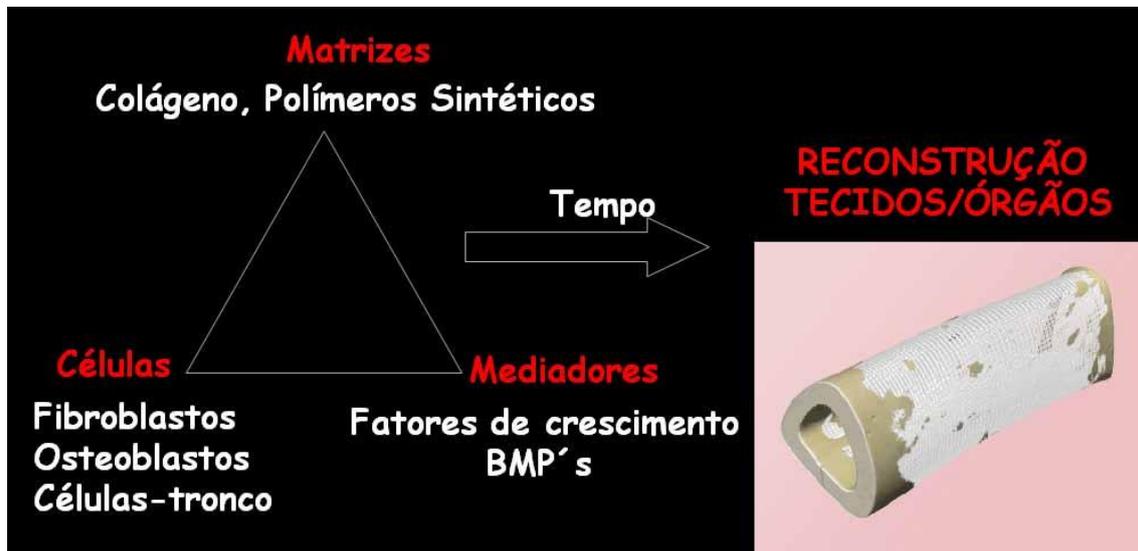
células tronco residentes no ligamento periodontal, o crescimento em arcações tridimensionais e, subseqüentemente, as implantações dentro dos defeitos ósseos podem contribuir de maneira significativa nos resultados limitantes das terapias atuais. Desse modo, a regeneração tecidual pode diminuir significativamente as perdas dentárias e, dessa forma, contribuir para a melhora da qualidade de vida humana.

## ENGENHARIA TECIDUAL

As estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica, que estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos e componentes cardiovasculares (FRESHNEY, 1999; MALEKZADEH et al., 1998), podem auxiliar na possibilidade efetiva de regeneração dos tecidos dentários. A pesquisa biomédica aplicada está atraindo significativa atenção de setores privados e governamentais pelo seu considerável potencial sócio-econômico.

Nesse campo emergente da ciência atual, a engenharia tecidual estabelece um campo multidisciplinar de estudos, que engloba principalmente os conhecimentos de engenharia de materiais e de ciências biomédicas. Essa área de conhecimento busca o desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos, com o objetivo de restabelecer a função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas.

Os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços, “scaffolds” ou carreadores) confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento (UEDA et al., 2000) (Esquema 3).



Esquema 3 – Princípios da engenharia tecidual. O cultivo celular apropriado em arcabouços (matrizes) tridimensionais concomitante ao emprego de fatores de crescimento, após determinado tempo, resultará na reconstrução de tecidos e órgãos em laboratórios.

As células predominantes do ligamento periodontal são os fibroblastos periodontais, porém esse tecido apresenta uma população celular heterogênea (LEKIC et al., 2001; MURAKAMI et al., 2003). Osteoblastos e cementoblastos, osteoclastos e cementoclastos, células de defesa e células epiteliais estão presentes no ligamento periodontal. Além disso, o ligamento periodontal possui células mesenquimais e

ectomesenquimais indiferenciadas (células tronco) (TEN CATE, 1997; SEO et al., 2004; TECHAWATTANAWISAL et al., 2007; WIDERA et al., 2007), que poderão ser empregadas nas terapias celulares através dos princípios que norteiam a engenharia tecidual.

## CÉLULAS TRONCO

As células tronco de adultos (CTA) têm recebido grande atenção nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso terapêutico na regeneração de tecidos e órgãos lesados. Acredita-se que elas possam se alojar em áreas específicas de tecidos e permanecer quiescentes até serem ativadas por lesões ou doenças. As CTA foram encontradas no cérebro (QUINONES-HINOJOSA et al., 2006), no sangue periférico (ROCHEFORT et al., 2004), nos vasos sanguíneos (DORE-DUFFY et al., 2006), na pele (FERNANDES et al., 2004), na córnea (VASCOTTO e GRIFFITH, 2006), no coração (LERI et al., 2005), na polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; LAINO et al., 2006) e no ligamento periodontal (SEO et al., 2004).

Células da polpa dentária, tipo mesenquimais, foram isoladas dos terceiros molares, expandidas *in vitro* e reimplantadas em camundongos *nude* (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002). Estas células tronco da polpa dentária se diferenciaram em tecido semelhante à polpa dentária, tecido neural e adipócitos. O mesmo grupo de estudos mostrou que dentes decíduos exfoliados são uma fonte de células altamente proliferativas capazes de se diferenciar em células neurais, adipócitos

e osteoblastos *in vivo*. Essas células derivadas da denteição decídua, quando transplantadas em camundongos *nude*, produziram dentina, osso e expressaram marcadores neurais (MIURA et al., 2003). Os autores sugerem que colônias de células isoladas derivadas da polpa dentária de dentes, decíduos e permanentes, apresentam propriedades de células tronco. Além disso, este grupo de pesquisa estudou as células tronco do ligamento periodontal humano obtidas de terceiros molares (SEO et al., 2004). Quando transplantadas em camundongos *nude*, formaram estrutura semelhante ao cimento e contribuíram para o reparo do tecido periodontal. *In vitro*, as células tronco do ligamento periodontal se diferenciaram em células semelhantes a cementoblastos, adipoblastos e células formadoras de colágeno. O uso de células tronco derivadas do ligamento periodontal é promissor, especialmente pela demonstração de que estas células poderiam ser isoladas de ligamentos periodontais criopreservados (SEO et al., 2005). Estes pesquisadores sugeriram que as células tronco isoladas das estruturas dentárias sejam derivadas de pericitos. Acredita-se que os pericitos, células que circundam os vasos sanguíneos, sejam derivados da crista neural (ETCHEVERS et al., 2001). Shi e Gronthos (2003) mostraram que a maioria das células tronco da polpa dentária expressa marcadores para pericitos. Nagatomo et al. (2006) também identificaram células tronco mesenquimais em ligamentos periodontais humanos, apostando no uso dessas células em procedimentos periodontais regenerativos. Interessante salientar que na infância, geralmente são 20 os dentes decíduos exfoliados, enquanto que na vida adulta as extrações de pré-molares e terceiros molares são indicadas em muitos tratamentos ortodônticos, resultando em possíveis fontes para a coleta de células tronco.

Gronthos et al. (2000), Gronthos et al. (2002), Seo et al. (2004), Miura et al. (2003) e Nagatomo et al. (2006) utilizaram o marcador STRO-1 para identificar e

selecionar células tronco mesenquimais, entretanto, não existe um marcador específico para as células tronco mesenquimais. Desse modo, segundo esses pesquisadores, combinações de anticorpos devem ser utilizadas. As células STRO-1 positivas foram originalmente identificadas como precursores osteogênicos formadores de colônias isoladas da medula óssea, não reativos com progenitores hematopoiéticos (SIMMONS e TOROK-STORB, 1991). Outros marcadores de superfície, como o CD146 (antígeno associado aos pericitos), CD106, CD44 e VCAM-1, fosfatase alcalina e actina de músculo liso também foram identificados nas células STRO-1 positivas (SIMMONS e TOROK-STORB, 1991). Trubiani et al. (2005) isolaram e caracterizaram uma população de células tronco mesenquimais do ligamento periodontal, que expressaram uma variedade de marcadores de células de estroma (CD90, CD29, CD44, CD166, CD105, CD13). O marcador CD146 é também encontrado no músculo liso, endotélio, miofibroblasto, células de Schwann e em alguns neoplasmas humanos (SHIH, 1999). Dessa forma, embora separação celular usando STRO-1 e CD146 tem sido usada para isolar células com propriedades clonogênicas e potencial de multidiferenciação, é possível que essas células representem uma população de células tronco ou uma população de células progenitoras programadas para se diferenciarem em uma linhagem específica.

A identificação de populações de células tronco humanas de adultos nos tecidos dentários, originárias da crista neural, tem estimulado o interesse no potencial uso terapêutico dessas células nos tratamentos às injúrias causadas por traumas, cáries e doenças periodontais. A aplicabilidade terapêutica poderá ocorrer em outras áreas da medicina regenerativa, uma vez que as células derivadas da crista neural mostraram a capacidade de se diferenciar em tipos celulares das 2 camadas germinativas: ectoderma

e mesoderma (LE DOURAIN et al., 2004), desse modo, com promissora capacidade de reconstrução dos mais diversos órgãos através das estratégias da engenharia tecidual.

Techawattanawisal et al. (2007) e Widera et al. (2007) identificaram, em ligamentos periodontais de ratos e humanos, respectivamente, através da técnica de cultura em neuroesferas, células adultas multipotentes capazes de se diferenciar em progenitores neurais e mesodermais, indicando que o ligamento periodontal possui células tronco com características da crista neural. Ademais, células com potencial para diferenciação neuronal foram identificadas em polpas dentárias humanas de dentes permanentes e decíduos (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003; NOSRAT et al., 2004). Esses relatos são encorajadores para o emprego da engenharia tecidual com a utilização de células humanas obtidas de estruturas dentárias no tratamento de doenças neurodegenerativas.

## JUSTIFICATIVA

A reconstrução dos tecidos periodontais de suporte é o maior desafio da terapia periodontal, pois as abordagens terapêuticas disponíveis são limitantes. A aplicação da engenharia tecidual com o emprego de células tronco isoladas de tecidos periodontais é promissora. Ressalta-se o fato dessas células possuírem origem de crista neural com potencial de diferenciação para células nervosas, inferindo a possibilidade potencial de utilização em terapias neurodegenerativas. Dessa forma, baseado nos recentes avanços

da biologia das células tronco de adultos, essa pesquisa objetivou investigar o ligamento periodontal humano como nicho de células tronco, com características da crista neural.

# PROPOSIÇÃO

## OBJETIVO GERAL

-Investigar o ligamento periodontal humano como nicho de células tronco, com características da crista neural.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Obter a cultura de células aderentes, após o processo de digestão enzimática dos ligamentos periodontais humanos.

-Verificar a diferenciação em fenótipos mesodermis (osteogênico, adipogênico e miofibroblástico), com o uso de meios indutivos específicos.

-Analisar a expressão gênica e protéica para marcadores de tecidos de origem ectodermal (neuronal e glial).

-Verificar a nível protéico a presença de marcadores (nestina, p75 e HNK-1) para células progenitoras da crista neural.

**CAPÍTULO III**  
**(língua portuguesa)**

**LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO:**  
**NICHO DE CÉLULAS TRONCO DA CRISTA NEURAL**

Presença de células tronco no ligamento periodontal

Este artigo está formatado conforme as normas de  
elaboração de artigos da *Journal of Periodontal Research*

## RESUMO

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado, derivado do folículo dental, originário das células da crista neural. Entretanto, não está elucidado se o ligamento periodontal humano pode ser um potencial nicho de células tronco ectomesenquimais. Este é o objetivo do presente trabalho. Células do ligamento periodontal humano foram isoladas de 7 indivíduos (10 dentes, grupo *PDL pool*) e de um único indivíduo (4 dentes, grupo *PDL single*). Fenótipos celulares foram analisados por imunocitoquímica e RT-PCR. Foram identificados fenótipos mesodermiais (adipogênico, osteogênico e miogênico). Adicionalmente, foram identificadas células positivas para nestina (marcador de células tronco neurais), células positivas para HNK1 e p75 (marcadores de células tronco da crista neural) e células que apresentaram marcadores de tipos celulares diferenciados como  $\beta$ -tubulinaIII, NF-M, periferina e MAP-2 (marcadores de neurônios), actina de músculo liso (SMA, marcador de miofibroblasto/célula muscular lisa) e proteína zero (P0, marcador de célula glial). De acordo com nossos resultados, o ligamento periodontal humano possui células que apresentaram marcadores de células tronco da crista neural e células com capacidade de diferenciação em derivados mesodermiais e neurais. Este relato científico investigou o ligamento periodontal humano como um potencial nicho de células tronco, mais precisamente com características da crista neural. O ligamento periodontal mostra-se como uma fonte alternativa viável de células progenitoras para uso em terapias com células tronco.

**Palavras-chave:** crista neural, ligamento periodontal, células tronco

## INTRODUÇÃO

O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo denso localizado entre o cimento da raiz dentária e a parede interna do alvéolo ósseo. O ligamento periodontal constitui um mecanismo de suporte dentário, responsável pela nutrição, homeostase e reparo de estruturas dentárias e ósseas danificadas (Shimono et al., 2003). Embora as células predominantes sejam os fibroblastos periodontais, esse tecido apresenta uma população celular heterogênea composta de cementoblastos, osteoblastos, células endoteliais e células epiteliais (Lekic et al., 2003). Recentemente, células tronco humanas de origem mesenquimal foram identificadas neste tecido (Seo et al., 2004). Techawattcanawisal et al. (2007) e Widera et al. (2007) identificaram progenitores mesodermais e neurais em ligamentos periodontais de ratos e humanos, respectivamente. Sabe-se que o ligamento periodontal é derivado do folículo dental, originário da crista neural (CN) (Miletich e Sharpe, 2004). A CN corresponde a uma população heterogênea de células tronco multipotentes e de progenitores com potencialidade restrita, que apresentam a capacidade de se diferenciar em células ectodermais e mesodermais (Le Douarin et al., 2004). A CN é uma estrutura exclusiva de embriões de vertebrados que origina neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, células de pigmento e derivados mesectodermais que formam a maior parte da estrutura crânio facial, incluindo a maior parte do tecido dentário (Le Douarin e Kalchein, 1999; Miletich e Sharpe, 2004). Dessa forma, acredita-se que as células tronco do ligamento periodontal também possam ser derivadas da CN, no entanto, os verdadeiros mecanismos que contribuem para o desenvolvimento das linhagens celulares do ligamento periodontal são desconhecidos, adicionalmente, a hierarquia dessas células de mamíferos adultos não está perfeitamente compreendida (Ten Cate, 1997; Techawattcanawisal et al. 2007).

As doenças periodontais são infecções caracterizadas pela destruição do periodonto de proteção e inserção. A doença periodontal é a principal causa de perda dentária e, portanto, um grande desafio para a saúde pública mundial (Brown e Løe, 1993). A reconstrução desses tecidos danificados é o maior desafio da terapia periodontal (Bartold et al., 2000). Baseada nos recentes avanços do estudo da biologia das células tronco de adultos, essa pesquisa objetivou investigar e apontar o ligamento periodontal humano como um possível nicho de células tronco derivadas da CN.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cultura Celular**

Um total de 10 terceiros molares vitais foram extraídos de 7 indivíduos (18 a 25 anos), não fumantes, de ambos os sexos, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. De uma paciente de 14 anos, foram extraídos os 4 primeiros pré-molares (Projeto n.309/06 aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC). Após as exodontias, os dentes foram lavados com solução fisiológica estéril e armazenados em tubos de polipropileno com meio de cultura padrão  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) acrescido de 20% soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e antibióticos (100U/ml de penicilina e 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina). Os ligamentos periodontais do terço médio radicular foram removidos e imersos em uma solução de digestão enzimática (1:3) contendo 25g/l de pancreatina (Sigma) preparada em solução de NaCl a 8,5g/l e meio de cultura  $\alpha$ -MEM, por 25min, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foi acrescentada tripsina a 0,25% (Sigma) por 10min. A digestão enzimática foi paralisada em meio de cultura padrão, descrito acima. Após centrifugação (500Xg, 10min), os pellets celulares foram ressuspensos em 4ml do

meio de cultura e transferidos para garrafas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> (meio de cultura  $\alpha$ -MEM e 10% SFB). Dessa forma, obteve-se um *pool* de células dos ligamentos periodontais de 7 indivíduos, denominado grupo *PDL pool*. Foram obtidas ainda células periodontais isoladas de um único indivíduo, denominado grupo *PDL single*. As células proliferaram até a subconfluência (aproximadamente 70%) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, quando procedeu-se a tripsinização e re-plaqueamento para obtenção de culturas secundárias. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias. Os experimentos do grupo *PDL pool* foram realizados nas passagens 8 e 9 e os grupo *PDL single* foram realizadas nas passagens 3 e 4.

### **Diferenciação adipogênica**

Para indução da diferenciação adipogênica, 1x10<sup>4</sup> células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%, 10<sup>-6</sup>M dexametasona, 50 $\mu$ M indometacina e 10 $\mu$ g/ml insulina (todos provenientes da Sigma). Como controle, foi utilizado  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%. As células foram mantidas como descrito acima com troca do meio a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% paraformaldeído e coradas com a solução de Oil-Red-O (Sigma).

### **Diferenciação osteogênica**

Para indução da diferenciação osteoblástica, 1x10<sup>4</sup> células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%, 10<sup>-7</sup>M dexametasona, 50 $\mu$ g/ml ascorbato-2 fosfato e 20mM  $\beta$ -glicerofosfato

(todos provenientes da Sigma). Como controle, foi utilizado  $\alpha$ -MEM acrescido de SFB a 10%. As células foram mantidas como descrito acima, com troca do meio a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% paraformaldeído e coradas com a técnica de Von Kossa.

### **Meio para o crescimento de células derivadas da CN**

Para o crescimento e diferenciação em células semelhantes às da CN ou seus derivados, foram utilizadas condições de cultura descritas anteriormente (Trentin et al., 2004; Real et al., 2005). Brevemente, as células foram cultivadas em baixa densidade (100 células/poço em placas de 24 poços) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM acrescido de 10% SFB, 2% de extrato de embrião de galinha, hormônios e fatores de crescimento [transferrina (10mg/ml), hidrocortisona (0,1mg/ml), glucagon (0,01ng/ml), insulina (1ng/ml), T3 (triiodotironina, 0,4ng/ml), fator de crescimento epidermal (EGF, 0,1ng/ml) e fator de crescimento fibroblástico (FGF2, 1ng/ml). Todos os fatores de crescimento e hormônios foram adquiridos do fabricante Sigma. As células foram mantidas como descrito acima, com troca do meio a cada 3 dias. Após 15 dias, as culturas foram analisadas para a presença de marcadores celulares específicos por imunocitoquímica ou RT-PCR, como descrito abaixo.

### **RT-PCR**

O RNA celular total foi isolado utilizando-se Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 $\mu$ g do RNA total, utilizando o kit para transcrição reversa ThermoScript RT-PCR (Promega), de acordo

com orientações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se primers sense e antisense (Integrated DNA Technologies, Inc.): nestina (sense, 5'-CAG-CTGGCGCACCTCAAGATG-3'; antisense, 5'AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'),  $\beta$ tubulinaIII (sense, 5'-AGATGTACGAAGACGACGAGGAG-3'; antisense, 5'-GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA-3'), neurofilamento M (NF-M) (sense, 5'-GAGCGCAAAGACTACCTGAAGA-3'; antisense, 5'CAGCGATTTCTATATCCAG-AGCC-3'), periferina (sense, 5'-ATGGCCGAGGCCCTCACCCAAGAG-3'; antisense, 5'-TAGGCGGGACAGAGTGGCGTCGTC-3'), proteína associada a microtúbulo 2 (MAP-2) (sense, 5'-CCATTTGCAACAGGAAGACAC-3'; antisense, 5'-CAGCTCA-AATGCTTTGCAACTAT-3'), proteína zero (P0) (sense, 5'-GCCCTGCTCTTCTC-TTCTTT-3'; antisense, 5'-CCAACACCACCCCATACCTA-3'), proteína glial fibrilar acidíca (GFAP) (sense, 5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTGATTCT-3'; antisense, 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3'), actina de músculo liso (SMA) (sense, 5'-CGATAGAACACGGCATCATC-3'; antisense, 5'-CATCAGGCAGTTCGTAGCTC-3'). Foi utilizada amplificação de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minutos), com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2min e uma etapa final de extensão de 72°C por 7min. As temperaturas de anelamento foram 64°C (nestina), 58,5°C ( $\beta$ tubulinaIII), 56°C (NF-M), 68°C (periferina), 55°C (MAP-2), 57 °C (P0), 65 °C (GFAP) e 51°C (SMA). Amplificação paralela de GAPDH (temperatura de anelamento 60°C) foi usada como controle (dado não mostrado). O produto do RT-PCR foi visualizado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, na luz ultravioleta. Foram realizados dois experimentos independentes para cada análise.

## **Imunocitoquímica**

As culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 min, lavadas em tampão fosfato salina (PBS) e permeabilizadas com PBS-Triton (0,25%) durante 15 minutos. As células foram submetidas à reação imunocitoquímica, analisando-se a presença de marcadores celulares específicos para músculo liso/miofibroblasto (anticorpo IgG2a de camundongo anti- $\alpha$ SMA, Sigma) e neurônio (anticorpo IgG1 de camundongo anti- $\beta$ TubulinaIII, Promega). Para a visualização das células da CN indiferenciadas foram utilizados anticorpos IgG de coelho anti-p75 (Promega), anti-HNK-1 (Abo e Balch, 1981) e anticorpo IgG1 de camundongo anti-nestina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). O núcleo das células foi corado DAPI (Sigma). Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongos ou coelhos, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC - Invitrogen), Texas Red (TXRD-Santa Cruz Biotechnology) ou biotina. Foi utilizado o kit de amplificação Tiramida (Tyramide Signal Amplification, TSA™ Fluorescein System), segundo orientações do fabricante. As marcações fluorescentes foram visualizadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX-40. Os experimentos foram feitos em duplicata em dois experimentos independentes.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização das culturas celulares de ligamentos periodontais humanos**

Após 35 dias de cultivo em meio de cultura padrão, foi observada nas culturas celulares obtidas de ligamentos periodontais humanos a presença de células com

morfologia fibroblastóide, tanto em culturas do grupo *PDL pool* quanto do grupo *PDL single*. Após esse período, observamos intenso crescimento celular com obtenção da subconfluência a cada 8 dias para ambas as culturas *PDL pool* e *PDL single*, com manutenção do fenótipo aderente e fibroblastóide, mesmo após várias passagens (Figuras 1A e 1B).

### **Diferenciação osteogênica e adipogênica**

Para analisar essa possibilidade, culturas celulares dos grupos *PDL pool* e *PDL single* foram mantidas em meios indutivos específicos para cada fenótipo. Após 30 dias em cultura com meio indutivo osteogênico, mais de 90% das células apresentaram morfologia fibroblastóide e produziram uma matriz extracelular densa, formando nódulos mineralizados, identificados pela técnica de Von Kossa e visualizados microscopicamente (Figura 2A). Culturas paralelas foram mantidas pelo mesmo período de tempo em meio indutivo adipogênico. Aproximadamente 20% das células apresentaram alteração da morfologia fibroblastóide para uma mais arredondada, semelhante a adipócitos, contendo vacúolos lipídicos corados pela solução Oil-red (Figura 2B).

### **Expressão gênica de marcadores celulares por RT-PCR**

A Tabela 1 mostra a expressão gênica das células derivadas do ligamento periodontal humano, após 15 dias de cultura em meio para o crescimento de células da CN. Os resultados foram positivos para a expressão de nestina, um achado indicativo da

presença de células precursoras neuronais. Adicionalmente, observamos expressão dos marcadores neuronais  $\beta$ -TubulinaIII, NF-M, MAP-2 e Periferina.

O potencial de diferenciação para células gliais foi analisado pela expressão do marcador para a proteína zero (P0) e proteína fibrilar acídica glial (GFAP) (Tabela 1). Verificamos reação positiva para P0, que representa expressão de marcadores de progenitores gliais, porém negativa para o marcador diferenciado GFAP. Adicionalmente, houve reação positiva para o mRNA de actina de músculo liso (SMA), indicando a presença de miofibroblastos.

Esses resultados sugerem que as células derivadas do ligamento periodontal humano apresentam potencial de diferenciação para fenótipos ectodermis e mesodermis. A expressão do mRNA de nestina (marcador de CN) e de periferina, (específica de neurônios periféricos), confirma a origem dessas células a partir da CN.

### **Análise da expressão protéica por imunocitoquímica**

Posteriormente, analisamos o potencial de diferenciação das células do ligamento periodontal humano em derivados ectodermis e mesodermis pela a presença de marcadores celulares protéicos (Figura 3). Observamos populações de células que expressam  $\beta$ Tubulina III (cerca de 80% das células) (Figura 3A) e SMA (cerca de 50 % das células) (Figura 3B), corroborando os resultados da detecção do mRNA por RT-PCR (Tabela 1). As células SMA-positivas apresentaram morfologia poligonal com fibras de estresse, compatível com células musculares lisas. Por outro lado, as células  $\beta$ TubulinaIII-positivas exibiram morfologia neuronal e fibroblastóide. Adicionalmente, aproximadamente 20% das células apresentavam marcação dupla para SMA e  $\beta$ TubulinaIII (Figura 3C). Observamos uma pequena proporção de células

(<10%) que expressam *human natural killer cell marker* (HNK1, Figura 3D), proteína p75 (p75, Figura 3E) e nestina (Figura 3F), todos marcadores das células tronco da CN.

## **DISCUSSÃO**

Muitos terceiros molares não erupcionam e permanecem impactados, como consequência de posição inadequada e indisponibilidade óssea para erupção. Aproximadamente 70% da população apresenta um terceiro molar impactado (Morris e Jerman, 1971; Hugoson e Kugelberg, 1988), com alto potencial de danos às estruturas circunjacentes. A extração preventiva é considerada uma solução aceitável, embora essa terapia seja alvo de divergências (Kaminishi e Kaminishi, 2004). Em tese, como último dente a erupcionar, o terceiro molar pode conter um tecido mais jovem, com uma maior quantidade de células não especializadas. Recentemente, foi mostrado que o ligamento periodontal poderia ser uma fonte alternativa e acessível de células tronco mesenquimais adultas (Seo et al., 2004; Gronthos et al., 2006). O uso de células tronco derivadas do ligamento periodontal é promissor, especialmente pela demonstração de que estas células poderiam ser isoladas de ligamentos periodontais criopreservados (Seo et al., 2005).

Durante a embriogênese, o ligamento periodontal é formado pelas células residentes do folículo dental. Estas células são consideradas ectomesenquimais derivadas da crista neural. As células da CN são pluripotentes e migram, durante o desenvolvimento embrionário, para o primeiro arco branquial, auxiliando na formação dentária. Essas células apresentam capacidade de se diferenciar em derivados ectodermis e mesodermis (Le Douarin et al., 2004). Em nossos experimentos, através de imunocitoquímica, identificamos nas culturas de ligamentos periodontais humanos

uma pequena proporção de células positivas para HNK-1 e p75, sugerindo a presença de células com características indiferenciadas e semelhantes às da CN. Esses marcadores foram utilizados para identificar as células tronco da crista neural em tecidos animais embrionários (Stemple e Anderson, 1992; Lin et al., 2006) e em tecidos humanos adultos (Wong et al., 2006). Adicionalmente, observamos marcação positiva, por imunocitoquímica e RT-PCR, das células derivadas do ligamento periodontal para nestina. A nestina corresponde a uma proteína do filamento intermediário expressa em células progenitoras neuroectodermas (Lobo et al., 2004; Sanchez-Ramos et al., 2000; Stemple e Anderson, 1992). Nossos achados indicaram a existência de uma população pequena de células que apresentam os marcadores da CN nestina, HNK-1 e p75, podendo corresponder a uma população de células tronco ou células progenitores pluripotentes residentes no ligamento periodontal humano.

Experimentos anteriores mostraram que a medula óssea, a polpa dentária e o ligamento periodontal possuem células tronco mesenquimais, identificadas com o uso do antígeno STRO-1 (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Seo et al., 2004). O antígeno STRO-1 foi relacionado inicialmente à identificação de células precursoras osteogênicas isoladas da medula óssea e, posteriormente, descrito como um promissor marcador para as células tronco mesenquimais (Gronthos et al., 1994; Gronthos et al., 1999). Entretanto, esse antígeno progressivamente deixa de ser expresso nas células em cultura (Stewart et al., 1999). O antígeno STRO-1 foi reportado ausente em células tronco mesenquimais da medula óssea (Baksh et al., 2004) e em células estromais derivadas de tecido adiposo (Gronthos et al., 2001). Estes achados divergentes indicam que não há consenso em validar o STRO-1 como marcador único de células tronco. Por outro lado, a associação de marcadores tem sido sugerida como um importante meio para a identificação de células tronco mesenquimais (Chen et al., 2006). A nossa

investigação teve como objetivo identificar marcadores de CN ou de seus derivados, e não apenas marcadores para células de origem mesenquimal. Investigações correlacionando células STRO-1 positivas e células p75, HNK-1 e nestina positivas serão realizadas em nosso laboratório.

Recentemente, Seo et al. (2004) e Nagatomo et al. (2006) demonstraram que as células tronco do ligamento periodontal formam nódulos mineralizados e células contendo vacúolos lipídicos Oil-red positivos, quando cultivadas em meios indutivos osteogênico e adipogênico, respectivamente. Com intuito de verificar o potencial de diferenciação das células derivadas do ligamento periodontal em linhagens celulares mesenquimais, utilizamos meios indutivos osteogênico e adipogênico. De fato, observamos a formação de nódulos mineralizados corados por Von Kossa e presença de células semelhantes a adipócitos coradas pela solução de Oil-red-O, nas condições de cultivo apropriadas, confirmando o potencial de diferenciação para osteoblasto e adipócito, respectivamente. Ademais, verificamos, por imunocitoquímica, a presença de células positivas para SMA, sugerindo a capacidade de diferenciação no fenótipo miofibroblástico. Em conjunto, esses resultados demonstraram que as células do ligamento periodontal humano apresentaram capacidade de diferenciação em diversas linhagens mesenquimais compatíveis com dados da literatura (Seo et al., 1994; Nagatomo et al., 2006).

Techawattanawisal et al. (2007) e Widera et al. (2007) identificaram, em ligamentos periodontais de ratos e humanos, respectivamente, células adultas multipotentes capazes de se diferenciar em progenitores neurais e mesodermiais, indicando que o ligamento periodontal possui células com características das células da CN. Adicionalmente, células com potencial para diferenciação neuronal foram identificadas em polpas dentárias humanas de dentes permanentes e decíduos (Gronthos

et al., 2002; Miura et al., 2003; Nosrat et al., 2004). Em nossos experimentos, verificamos que as células derivadas do ligamento periodontal humano, além de originar fenótipos mesodermais, apresentaram a capacidade de gerar fenótipos ectodermais. Observamos a expressão gênica positiva de nestina,  $\beta$ -tubulinaIII, NF-M, MAP-2 e periferina, indicando a diferenciação neuronal. A expressão de nestina e  $\beta$  tubulinaIII foi verificada também a nível protéico, por imunocitoquímica. A expressão dupla de  $\beta$  tubulinaIII e SMA (Figura 3C) pode indicar a presença de células contendo ambos os progenitores ou é possível que a expressão desses marcadores possa ocorrer devido a fenômenos de “reprogramação” ou “transdiferenciação” de células diferenciadas como miofibroblastos (SMA-positivos), uma vez que os derivados da CN apresentaram grande plasticidade *in vitro* (Dupin et al., 2000; Real et al., 2005, 2006; Dupin et al., 2007). Observamos, ainda, expressão gênica de P0, um marcador precoce de células gliais (Hagedorn et al., 1999) e, embora não tenhamos verificado a expressão gênica do marcador de célula glial diferenciada (GFAP), nossos dados indicam que as células derivadas de ligamento periodontal apresentaram também potencial de diferenciação para o fenótipo glial. É importante salientar que a periferina é uma proteína do filamento intermediário específica de neurônios periféricos, que são provenientes da CN (Parysek e Goldman 1988; Gorham, 1990), evidenciando mais uma vez a característica semelhante à CN das células obtidas do ligamento periodontal humano. Nossos resultados corroboram os achados de Techawattanawisal et al. (2007) e Widera et al. (2007), obtidos em ligamentos periodontais de ratos e humanos, respectivamente, e demonstraram que tecidos dentários originados a partir da CN podem ser possíveis fontes de células tronco ou células progenitoras multipotentes que mantêm características dessa estrutura embrionária.

Este relato científico investigou o ligamento periodontal humano como um potencial nicho de células tronco semelhantes às da CN. É importante ressaltar que o ligamento periodontal coletado de um único indivíduo é suficiente para originar uma população celular com características da CN ou de seus derivados e pode ser usada para a regeneração de tecidos periodontais e no tratamento de doenças neurodegenerativas. O ligamento periodontal mostra-se uma fonte alternativa viável de precursores primitivos possíveis em terapias com células tronco.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer aos professores Nicole Le Douarin e Vivaldo Moura Neto pelo incentivo e estímulo constante. Este trabalho foi suportado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil), PRONEX/CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo, T., Balch, C.M. (1981) A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* 127:1024-1029.
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and applications in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8:310-316.
- Bartold, P.M., McCulloch, C.A., Narayanan, A.S., Pitaru, S. (2000) Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000 24:253-269.
- Brown, L.J., Loe, H. (1993) Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2:57-71.
- Chen, S.C., Marino, V., Gronthos, S., Bartold, P.M. (2006) Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res* 41:547-553.
- Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Trentin, A.G., Le Douarin, N.M. (2007) Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biologies* (article in press).
- Dupin, E., Glavieux, C., Vaigot, P., Le Douarin, N.M. (2000) Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl acad sci USA* 97:7882-7887.
- Gorham, J.D., Baker, H., Kegler, D., Ziff, E.B. (1990) The expression of the neuronal intermediate protein in the rat embryo. *Dev Brain Res* 57:235-248.

- Gronthos, S., Brahim, J., Li, L., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., Denbesten, P., Robey, P.G., Shi, S. (2002) Stem cells properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81:531-535.
- Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., Gimble, J.M. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63.
- Gronthos, S., Grave, S.E., Ohta, S., Simmons, P.J. (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164-4173.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl acad Sci USA* 97:13625-13630.
- Gronthos, S., Mrozik, K., Shi, S., Bartold, M. (2006) Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Calcif Tissue Int* 79:310-317.
- Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., Simmons, P.J. (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47-56.
- Hagedorn, L., Suter, U., Sommer, L. (1999) P0 e PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF- $\beta$  family factors. *Development* 126:3781:3794.
- Hugoson, A., Kugelberg, C.F. (1988) The prevalence of third molars in a Swedish populations. An epidemiological study. *Community Dent Health* 5:121-138.

- Kaminishi, R.M., Kaminishi, K.S. (2004) New considerations in the treatment of compromised third molars. *J Calif Dent Assoc* 32:823-825.
- Le Douarin, N.M., Kalcheim, C. (1999) *The Neural Crest*, Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131:4637-4650.
- Lekic, P., Rojas, J., Birek, C., Tenenbaum, H., McCulloch, C.A. (2001) Phenotypic comparison of periodontal ligament cells *in vivo* and *in vitro*. *J Periodontal Res* 36:71-79.
- Lin, Y., Yan, Z., Liu, L., Qiao, J., Jing, W., Wu, L., Chen, X., Li, Z., Tang, W., Zheng, X., Tian, W. (2006) Proliferation and pluripotency potential of ectomesenchymal cells derived from first branchial arch. *Cell Prolif* 39:79-92.
- Lobo, M.V.T., Arenas, M.I., Alonso, F.J.M., Gómez, G., Bazan, E., Paino, C.L., Fernandez, E., Fraile, B., Paniagua, R., Moyano, A., Caso, E. (2004). Nestin, a neuroectodermal stem cell molecule, is expressed in Leydig cells of human testis and in some specific cell types from human testicular tumors. *Cell Tissue Res* 316:369-376.
- Miletich, I., Sharpe, P.T. (2004) Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72:200-212.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* 100:5807-5812.

- Morris, C.R., Jerman, A.C. (1971) Panoramic radiograph survey: a study of embedded third molars. *J Oral Surg* 29:122-125.
- Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Skaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S., Muneta, T., Ishikawa, I. (2006) Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 41:303-310.
- Nosrat, I.V., Smith, C.A., Mullally, P., Olson, L., Nosrat, C.A. (2004) Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *European Journal of Neurosci* 19:2388-2398.
- Parysek, L.M., Goldman, R.D. (1988) Distribution of a novel 57kDa intermediate filament protein in the nervous system. *J Neurosci* 8:555-563
- Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., Dupin, E. (2006) Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol* 300:656-669.
- Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., Le Douarin, N.M., Dupin, E. (2005) The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. *Int J Dev Biol* 49:151-159.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol* 164:247-256.

- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149-155.
- Seo, B., Miura, M., Sonoyama, W., Coope, C., Stanyon, R., Shi, S. (2005) Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 84:907-912.
- Shimono, M., Ishikawa, T., Ishikawa, H., Matsuzaki, H., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Shima, K., Matsuzaka, K., Inoue, T. (2003) Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* 60:491-502.
- Stemple, D.L., Anderson, D.J. (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from mammalian neural crest. *Cell* 71:973-985.
- Stewart, K., Walsh, S., Screen, J., Jefferiss, C.M., Chainey, J., Jordan, G.R., Beresford, J.N. (1999) Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14:1345-1356.
- Techawattanawisal, W., Nakahama, K., Komaki, M., Abe, M., Takagi, Y., Morita, I. (2007). Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Comm* 357:917-923.
- Ten Cate, A.R. (1997) The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000 13:9-19.
- Trentin, A.G., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M. Dupin, E. (2004) Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl acad Sci USA* 101:4495-4500.

Widera, D., Grimm, W.D., Moebius, J.M., Mikenberg, I., Piechaczek, C. Gassmann, G.,  
Wolff, N.A., Thävenod, F., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B. (2007) Highly efficient  
neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive  
periodontal surgery. *Stem Cells Dev* 16:447-60.

Wong, C.E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M.T., Rochat, A., Pietri, T., Suter, U.,  
Zimmermann, D.R., Dufour, S., Thiery, J.P., Meijer, D., Beermann, F., Barrandon,  
Y., Sommer, L. (2006) Neural crest-derived cells with stem cell features can be  
traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 175:1005-1015.

Tabela 1- Análise da expressão gênica para marcadores neurais (nestina,  $\beta$ TubulinaIII, NF-M, MAP-2 e periferina), para marcadores gliais (P0 e GFAP) e para miofibroblastos (SMA-positivas), por RT-PCR.

| <b>Marcadores</b>   | <b><i>PDL pool</i></b> | <b><i>PDL single</i></b> |
|---------------------|------------------------|--------------------------|
| Nestina             | ++                     | ++                       |
| $\beta$ TubulinaIII | +++                    | +++                      |
| NF-M                | ++                     | +                        |
| MAP-2               | ++                     | +                        |
| Periferina          | ++                     | ++                       |
| P0                  | +                      | +                        |
| GFAP                | -                      | -                        |
| SMA                 | +++                    | +++                      |

O cDNA foi obtido de culturas celulares provenientes do ligamento periodontal conforme procedimento descrito em materiais e métodos. *PDL pool*: cultura obtida dos ligamentos periodontais de 7 indivíduos (passagem 9). *PDL single*: cultura obtida dos ligamentos periodontais de um único indivíduo (passagem 4). + marcação fraca / ++ marcação regular / +++ marcação forte.

## Legendas da Figuras

Figura 1 – Análise morfológica das células derivadas do ligamento periodontal humano em cultura e visualizadas por microscopia de contraste de fase. Cultura foi realizada como descrito em materiais e métodos a partir de (A) um *pool* de ligamentos periodontais, na passagem 9, grupo *PDL pool* ou (B) dos ligamentos periodontais de um mesmo indivíduo, na passagem 4, *PDL single*. Barra de calibração = 50µm.

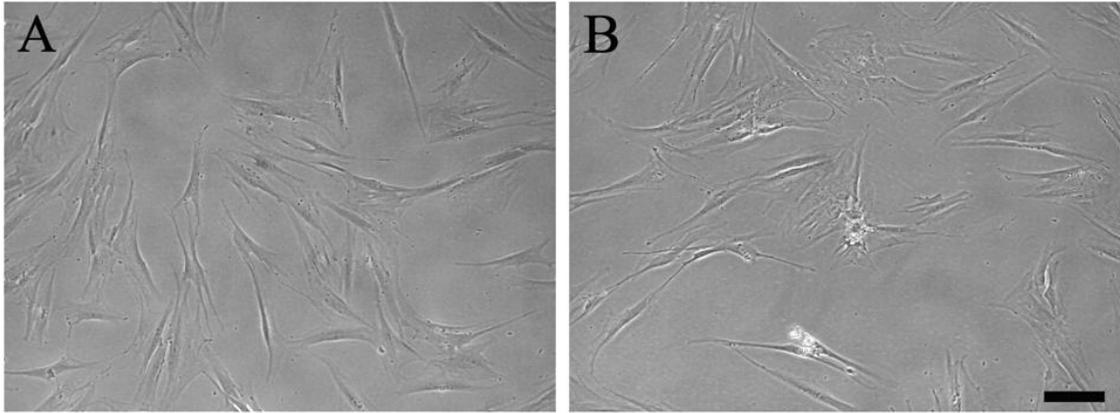
Figura 2 – Diferenciação das células derivadas do ligamento periodontal humano cultivadas em meios indutivos específicos. (A) As células foram cultivadas em meio de cultura osteogênico conforme descrito em materiais e métodos. Os nódulos mineralizados (setas) corados pela técnica de Von Kossa. (B) As células foram cultivadas em meio de cultura adipogênico, conforme descrito em materiais e métodos. Células semelhantes a adipócitos contendo vacúolos lipídicos foram coradas com a solução de Oil-red (setas). Barra de calibração = 50µm.

Figura 3 – Diferenciação das células do ligamento periodontal humano em derivados ectodermiais e mesodermiais pela a presença de marcadores celulares protéicos, após serem cultivadas em meio para o crescimento de células da CN, conforme descrito em materiais e métodos. (A) As células derivadas do ligamento periodontal humano expressaram marcador neuronal, analisadas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti-β tubulinaIII. (B) Células expressaram marcador de miofibroblasto, analisadas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti-SMA. (C) Células que expressaram marcação dupla, utilizando anticorpos anti-SMA e anti-βtubulinaIII. (D) Análise por

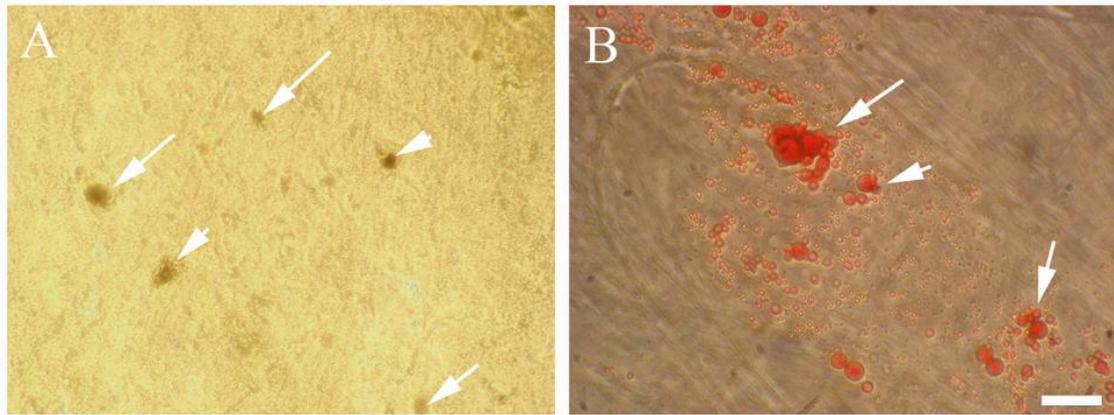
imunocitoquímica, utilizando anticorpos anti-HNK-1, (E) anti-p75 e (F) anti-nestina.

Barra de calibração = 50 $\mu$ m.

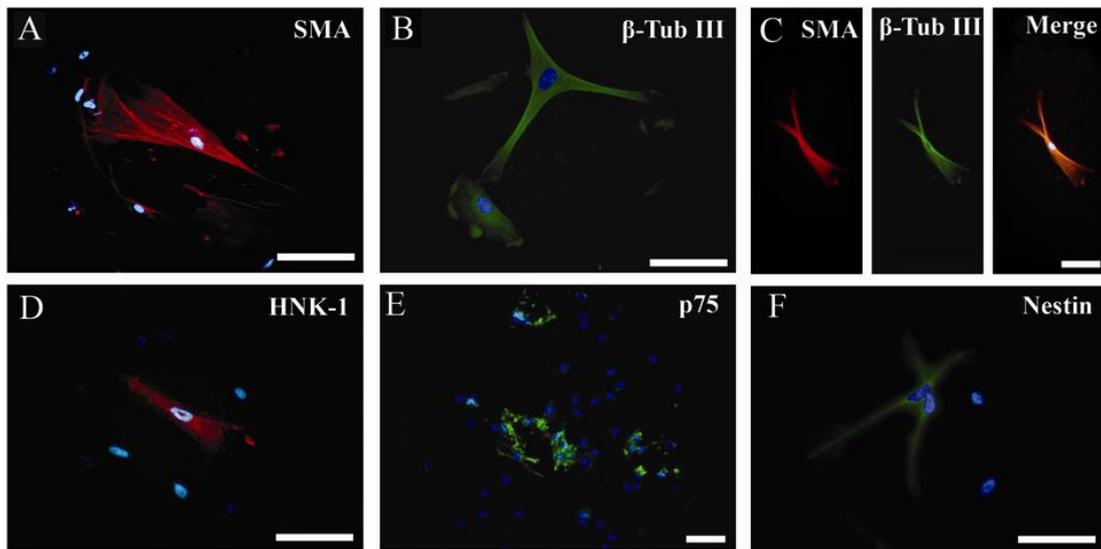
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**CAPÍTULO III**  
**(língua inglesa)**

**HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT:  
A NICHE OF NEURAL CREST STEM CELLS**

Stem cells in human periodontal ligament

Este artigo está formatado conforme as normas de  
elaboração de artigos da *Journal of Periodontal Research*

## **ABSTRACT**

*Background and Objective:* The periodontal ligament (PDL) is a specialized connective tissue, derived from dental follicle, originary of the neural crest (NC) cells. Recently, it has been demonstrated that human PDL could be a niche for NC stem cells. However, there is still little knowledge on the subject. The identification of NC adult stem cells has received great attention based on its great potential in the tissue regeneration. The objective of the present work was to verify the human PDL as a niche of NC stem cells.

*Material and Methods:* Cells from human PDL had been isolated from 10 teeth of 7 individuals (PDL pool group) and also, of 4 teeth of one same individual (PDL single group), after enzymatic digestion. The cells were cultured in specific inductive medium. Protein and gene expression were performed through immunocytochemistry and RT-PCR techniques.

*Results:* Mesodermal phenotypes had been identified (adipogenic, osteogenic, and myogenic), after culture in inductive medium. The cells presented the nestin marker of neural stem cells and also undifferentiated cells of neural crest (HNK1, p75), by immunocytochemistry. When cultured in inductive medium that allowed neural differentiation, cells showed markers for  $\beta$ -tubulina, NF-M, Peripherin, MAP-2 and Po. The results were similar between 2 groups (PDL pool group and PDL single group).

*Conclusion:* This research investigated the human PDL as a niche of cells derived from the neural crest, and possibly stem cells. The human PDL revealed itself as a viable alternative source for possible primitive precursors to be used in stem-cell therapies.

## **INTRODUCTION**

The periodontal ligament (PDL) is a specialized, vascular, and highly cellular connective tissue that plays an important role in supporting tooth function, maintaining homeostasis, and repairing damaged tissue in response to periodontal disease or mechanical trauma (1). PDL tissue is originated from neural crest (NC)-derived ectomesenchyme (2,3) and contains a heterogeneous population of cells, including periodontal fibroblasts, cementoblasts, osteoblasts, endothelial cells and epithelial cells (4). Recently, it has been suggested that human PDL contains mesenchymal stem cells (5). In addition, multipotent stem cells with mesodermal and neural potentiality were identified in rat and human PDL (6,7). However, the mechanisms that regulate the development of PDL lineages have not been fully elucidated (6).

Periodontal diseases correspond to a substantial worldwide public health burden (8). The regeneration of periodontal tissue is a major challenge for periodontal therapy (9). On the basis of recent advances in adult stem-cell biology, this research investigates the PDL tissue as a niche for NC stem-cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell Culture**

A total of 10 normal impacted third molars were collected from seven healthy subjects (18-25 years). Moreover, 4 pre-molars were extracted from one patient (14 years), following guidelines set approved by the Ethical Committee of Federal University of Santa Catarina (number 309/06). PDL was gently separated from middle root surface and then digested in a solution containing pancreatin (Sigma) and  $\alpha$ -MEM culture medium supplemented with antibiotics (100U/ml penicillin and 100 $\mu$ g/ml

streptomycin, Invitrogen) during 25min at 37°C. After that, 0.25% trypsin was added (Sigma) for 10min. The trypsin reaction was blocked in standard medium containing  $\alpha$ -MEM supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Cultilab) and antibiotics. Cell suspension was centrifuged (500Xg, 10min), and plated in 25cm<sup>2</sup> flasks in standard medium. PDL samples from different individuals were pooled, and then called PDL pool group. PDL sample collected from one individual were called PDL single group. Cells were grown in standard medium until confluence at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with medium changed every 4 days. The experiments of PDL pool group were performed in the passage 8-9 and the experiments of PDL single group in the passage 3-4.

### **Adipogenic Differentiation**

To induce adipogenic differentiation,  $1 \times 10^4$  cells/well were seeded on 24-well culture plates and cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS,  $10^{-6}$ M dexamethasone (Sigma), 50 $\mu$ M indomethacin (Sigma) e 10 $\mu$ g/ml insulin (Sigma). Medium was changed every 3 days. Control cells were cultured in standard medium. After 30 days, cells were fixed, and stained with fresh Oil-red-O solution (Sigma).

### **Osteogenic Differentiation**

To induce osteogenic differentiation,  $1 \times 10^4$  cells/well were seeded on 24-well culture plates and cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS,  $10^{-7}$ M dexamethasone, 50 $\mu$ g/ml L-ascorbic acid (Sigma), and 20mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma). Medium was changed every 3 days. Control cells were cultured in standard medium. After 30 days, cells were fixed, and subjected to Von Kossa staining.

## **Inductive medium for the growth of NC-derived cells**

The potential of PDL to differentiate in NC-derived cells was evaluated using culture conditions described for the growth of NC (10,11). Briefly, cells were cultured at low density (100cells/well in 24-wells plates) in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS, 2% chicken embryo extract, transferrin (10mg/ml), hydrocortisone (0,1mg/ml), glucagon (0,01ng/ml), insulin (1ng/ml), 0,4ng/ml T3 (triiodotironine), 0,1ng/ml EGF (epidermal growth factor), 1ng/ml FGF2 (fibroblastic growth factor) and antibiotics (all from Sigma). The culture medium was changed every 3 days. After 15 days, cells were analyzed by immunocytochemistry and RT-PCR as described below.

## **RT-PCR**

The total cellular RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen). The extracted RNA was reversed transcribed by following conventional protocols. Isolated RNA was used as a template for the cDNA synthesis, prepared using a ThermoScript RT-PCR first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen). PCR reactions were performed using the human-specific sense and antisense primers: nestin (sense, 5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3'; antisense, 5'AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'),  $\beta$ tubulinIII (sense, 5'-AGATGTACGAAGACGACGAGGAG-3'; antisense, 5'-GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA-3'), neurofilament M (NF-M) (sense, 5'-GAGC-GCAAAGACTACCTGAAGA-3'; antisense, 5'CAGCGATTTCTATATCCAGAGCC-3'), peripherin (sense, 5'-ATGGCCGAGGCCCTCACCCAAGAG-3'; antisense, 5'-TAGGCGGGACAGAGTGGCGTCGTC-3'), microtubule-associated protein 2 (Map-2) (sense, 5'-CCATTTGCAACAGGAAGACAC-3'; antisense, 5'CAGCTCAAATGCTTTGCAACTAT-3'), protein zero (Po) (sense, 5'-GCCCTGCTCTTCTCTTCTTT-3'; antisense, 5'CCAACACCACCCCATACCTA-3'), glial

fibrillary acidic protein (GFAP) (sense, 5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTGATTCT-3'; antisense, 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3'), smooth muscle actin (SMA) (sense, 5'-CGATAGAACACGGCATCATC-3'; antisense, 5'-CATCAGGCAGTTC-GTAGCTC-3'), according to the manufacturer's recommendations (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). Amplification reactions were performed in 35 cycles (denaturation step at 94°C for 1 min; annealing step for 1 min, and extension step at 72°C for 1.5 min) with a denaturation initial step at 94°C for 2 min, and a final seven-minute extension at 72°C. The annealing temperatures were 64°C (nestin), 58,5°C ( $\beta$ tubulinIII), 56°C (NF-M), 68°C (peripherin), 55°C (Map-2), 57 °C (P0), 65 °C (GFAP), and 51°C (SMA). GAPDH expression was used as an internal control RNA integrity and efficiency of the reverse transcription (RT) process. The PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and were visualized by ultraviolet-induced fluorescence. Two independent experiments were performed.

### **Immunocytochemistry**

The monolayers were fixed in 4% formaldehyde (30 min), washed in PBS and permeabilized (10 min) with 0.25% Triton X-100 in PBS (PBS-triton). Cells were incubated with primary antibodies (overnight, 4°C) and then with the secondary antibodies (90 min, room temperature). The following primary antibodies were used: anti- $\alpha$ SMA (Sigma), anti- $\beta$ tubulinIII (Promega), anti-nestin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-p75 (Promega), and anti-HNK-1 (12). Fluorescein isocyanate (FITC-Invitrogen), Texas red (TXRD-Santa Cruz Biotechnology), or biotin specific-secondary antibodies were used. The biotin reaction was revealed by the tyramide signal amplification kit (TSA) (Perkin-Elmer), according to the manufacturer's instructions. Cell nuclei were stained with DAPI (Sigma). Cells were visualized and photographed

under an Olympus BX-40 epifluorescence microscopy. The experiments were duplicated in two independent experiments.

## **RESULTS**

### **Cell culture**

Cells (PDL pool and single groups) displayed fibroblastic morphology after 35 days of culture in standard medium. Sub-confluence was observed after 8 days, in both experimental groups, suggesting intense cell proliferation. The same cell characteristics were observed in the secondary cultures (Figures 1A, B).

### **Osteogenic and adipogenic differentiation**

During the 30 days of culture in osteogenic medium, more than 90% of PDL cells (pool and single groups) proliferated and produced a dense extracellular matrix characterized by the presence of nodular structures stained by Von Kossa (Figure 2A). Moreover, after 30 days of culture in adipogenic medium, approximately 20% of cells in both experimental groups displayed enlarged cell body with oil red O -positive lipid droplets (Figure 2B).

### **Gene expression by means of RT-PCR**

Table 1 shows positive-gene expression of human PDL cells, after 15 days of culture in inductive medium for NC cells. Both PDL groups expressed mRNAs for markers of NC (nestin); neurons ( $\beta$ -TubulinIII, NF-M, MAP-2, and Peripherin) and undifferentiated glial cells (P0), suggesting ectodermal differentiation. However, the reaction was negative to the differentiated glial cell marker, GFAP. The positive

expression for peripherin, a specific protein of peripheral neurons, confirmed the NC origin of the human PDL. Moreover, SMA-positive expression was detected, indicating the presence of myofibroblastic cells.

### **Identification of NC-derived phenotypes by immunocytochemistry**

At the protein level, positive cells for NC-derived phenotypes were identified in both PDL groups after 15 days of culture in NC inductive medium, corroborating the RT-PCR results. We observed a great proportion (about 70%) of  $\alpha$ SMA-positive cells that displayed spread morphology with actin stress fibers similar to the morphology of NC-derived myofibroblasts in culture (Figure 3A). In addition, about 60% of cells were positive to  $\beta$ TubulinaIII also displaying spread morphology (Figure 3B). Interestingly, a small amount of cells (<20%) were double marked for this two antigens (Figure 3C).

### **Identification of NC-like stem cells by immunocytochemistry**

Both PDL groups presented, after 15 days of culture in the same inductive medium, a few proportion (<10%) of cells positives to the NC cell markers HNK-1, p75 and nestin (Figures 3D, E, F). This result suggests the existence of cells with similar characteristics of undifferentiated NC in PDL cultures, possibly stem cells.

## **DISCUSSION**

Several third molars do not erupt and remain impacted, as a consequence of inadequate positioning or osseous unavailability. Approximately 70% of the human population has impacted third molars (13), which result in a high probability of damaging the surrounding structures. Preventive extraction is considered as an acceptable solution, although there are controversies over this treatment (14). It has

been demonstrated that the PDL could be an alternative accessible source of adult mesenchymal stem cells (5,15) that also could be isolated from cryopreserved PDL (16).

During embryogenesis, the PDL consists of cells derived from the dental follicle which are considered NC-derived ectomesenchymal cells (17). The NC comprises a highly pluripotent cell population that migrates toward the first arch to participate in the formation of the teeth. The NC can differentiate in ectodermal and mesodermal cell types (18). In our experiments using human PDL cell cultures, we were able to identify by immunocytochemistry a slight proportion of cells positive for HNK-1 and p75, suggesting the presence of undifferentiated cells with similar characteristics to the NC cells. These markers were utilized to identify NC stem cells derived from animal embryonic tissue (19,20) and also from adult human tissue (21). Moreover, we observed nestin-positive marking in PDL cultures by immunocytochemistry and RT-PCR techniques. Nestin corresponds to an intermediate filament protein expressed in neuroectodermal progenitors cells (22) including the NC cells (19). Our findings indicated the existence of a small population of NC-like cells (<10%) that express nestin, HNK-1 and p75, possibly corresponding to a population of stem cells or multipotent progenitors residing in the human PDL.

Previous studies have shown that bone marrow, dental pulp and PDL tissues have mesenchymal stem cells, identified by the presence of STRO-1 antigen (23,24,5). STRO-1 was initially associated with the identification of osteogenic precursors isolated from bone marrow and later described as a promising marker for mesenchymal stem cells (25). However, cultured cells progressively lose the expression of this antigen (26). In addition, some studies have reported that STRO-1 was absent in bone marrow mesenchymal stem cells (27) and also in stromal cells derived from adipose tissue (28).

These controversial findings indicate the nonexistence of a consensus in validating STRO-1 as a single marker for stem cells. On the other hand, the association of a variety of markers has been suggested as important for the identification of mesenchymal stem cells (15). The objective of our investigation was to identify not only mesenchymal markers in PDL cultures, but markers of NC or its derivatives. Investigations correlating the expression of STRO-1 and p75 or HNK-1 have been carried out in our laboratory.

Recently, Seo *et al.* (5) and Nagatomo *et al.* (29) have demonstrated that PDL stem cells produce mineralized nodules or Oil-red positive lipidic vacuoles, when cultivated in osteogenic and adipogenic inductive environments, respectively. Under appropriate culture conditions, we observed the formation of mineralized nodules stained by Von Kossa or the presence of adipocyte-like cells presenting Oil-red-O stained vesicles, confirming the differentiation potential to osteoblast and adipocyte, respectively. In addition, we observed the presence of SMA-positive cells, suggesting the capacity for myofibroblastic differentiation. Taken together, these results demonstrated that the human PDL cells exhibit the capacity for differentiation in several mesenchymal lineages accordingly with previous studies (5,29).

Recently, Techwattanawisal *et al.* (6) and Widera *et al.* (7) have identified in PDL cultures of rats and human, respectively, multipotent adult cells capable of differentiating into neural and mesodermal progenitors, therefore, suggesting that PDL contain cells with NC characteristics. Moreover, cells with potential for neural differentiation were identified in deciduous and permanent dental pulps (24,30,31). In our experiments, we verified that cells derive from human PDL originated mesodermal and ectodermal phenotypes. We observed at mRNA level, positive gene expression for nestin,  $\beta$ -tubulinIII, NF-M, MAP-2 and peripherin, indicating neural differentiation. The

expression of nestin and  $\beta$ -tubulinIII was also confirmed at protein level. The double expression  $\beta$ -tubulinIII and SMA (Figure 3C) indicated the presence of cells with both progenitors or alternatively, it is possible, that the expression of those markers could be due to the phenomena of “reprogramming” or “transdifferentiation” of differentiated cells such as myofibroblasts (SMA+ cells), since the NC derivatives display great plasticity *in vitro* (11,32). In addition, we observed the gene expression of P0, a marker for glial progenitors (33). Although, the result was negative to the marker of differentiated glial cells (GFAP), our data indicated that the PDL derived cells also presented differentiation potential for glial phenotype. It is important to emphasize that peripherin is an intermediate filament protein associated with peripheral neurons which are NC-derived (34). These results corroborate the Techawattanawisal’s and Widera’s findings (6,7) obtained with rat and human PDL, respectively, suggesting that human isolated PDL may be a possible source of stem cells or multipotent progenitors with NC characteristics.

In conclusion, this research investigates the human PDL as a potential niche for stem cells which are similar to NC. It is important to highlight that PDL collected from one single individual was sufficient to obtain a cellular population with characteristics of NC or its derivatives so as to be used in the regeneration of periodontal tissues, or, since PDL-derived cells have neurogenic potential, those cells could also be useful for the treatment of neurodegenerative diseases. Thus, the periodontal ligament corresponds to a viable alternative source of primitive precursors for the use in cell-based therapies.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Professor Nicole Le Douarin and Professor Vivaldo Moura Neto for their constant encouragement. This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq/Brazil), PRONEX/CNPq and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil).

## Figures Legend

Figure 1 – Morphological analysis of human PDL cell cultures by phase contrast microscopy. Cell culture was performed as described in materials and methods and grown in standard medium. (A) PDL pool group (passage 9). (B) PDL single group, at the passage 4. Scale Bar = 50 $\mu$ m.

Figure 2 – (A) osteogenic and (B) adipogenic differentiation of PDL derived cells. (A) Cultured PDL cells formed Von Kossa positive mineralized nodules (arrows) and (B) oil O red positive lipid clusters (arrows) after 30 days of induction in osteogenic or adipogenic media, respectively. Scale Bar = 50 $\mu$ m.

Figure 3 – Differentiation of human PDL cells in ectodermal and mesodermal derivatives. Cells were cultured under inductive medium for the growth of NC cells as described in materials and methods. Immunocytochemical analysis was performed to assess the presence of cell specific protein markers as described in materials and methods section. (A)  $\beta$ tubulinIII-positive cells (neuronal marker). (B) SMA-positive cells (myofibroblast marker). (C) Double-positive cells for  $\beta$ tubulinIII (green) and SMA (red). Positive Cells for (D) HNK-1, (E) p75 and (F) nestin (NC markers). Scale Bar = 50 $\mu$ m.

## REFERENCES

1. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H *et al.* Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* 2003;**60**:491-502.
2. Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004;**72**:200-212.
3. Le Douarin NM, Kalcheim C. *The Neural Crest*, Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
4. Lekic P, Rojas J, Birek C *et al.* Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res* 2001;**36**:71-79.
5. Seo BM, Miura M, Gronthos S *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;**364**:149-155.
6. Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M *et al.* Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Comm* 2007;**357**:917-923.
7. Widera D, Grimm WD, Moebius JM *et al.* Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev* 2007;**16**:447-60.
8. Brown LJ, Loe H Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000* 1993;**2**:57-71.
9. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS *et al.* Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000* 2000;**24**:253-269.
10. Trentin AG, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM *et al.* Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl acad Sci USA* 2004;**101**:4495-4500.

11. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P *et al.* The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. *Int J Dev Biol* 2005;**49**:151-159.
12. Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* 1981;**127**:1024-1029.
13. Hugoson A, Kugelberg CF. The prevalence of third molars in a Swedish populations. An epidemiological study. *Community Dent Health* 1988;**5**:121-138.
14. Kaminishi RM, Kaminishi KS. New considerations in the treatment of compromised third molars. *J Calif Dent Assoc* 2004;**32**:823-825.
15. Gronthos S, Mrozik K, Shi S *et al.* Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Calcif Tissue Int* 2006;**79**:310-317.
16. Seo B, Miura M, Sonoyama W *et al.* Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005;**84**:907-912.
17. Ten Cate AR. The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000* 1997;**13**:9-19.
18. Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G *et al.* Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 2004;**131**:4637-4650.
19. Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from mammalian neural crest. *Cell* 1992;**71**:973-985.
20. Lin Y, Yan Z, Liu L *et al.* Proliferation and pluripotency potential of ectomesenchymal cells derived from first branchial arch. *Cell Prolif* 2006;**39**:79-92.
21. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT *et al.* Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 2006;**175**:1005-1015.

22. Lobo MVT, Arenas MI, Alonso FJM *et al.* Nestin, a neuroectodermal stem cell molecule, is expressed in Leydig cells of human testis and in some specific cell types from human testicular tumors. *Cell Tissue Res* 2004;**316**:369-376.
23. Gronthos S, Mankani M, Brahim J *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:13625-13630.
24. Gronthos S, Brahim J, Li L *et al.* Stem cells properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;**81**:531-535.
25. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE *et al.* Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 1999;**14**:47-56.
26. Stewart K, Walsh S, Screen J *et al.* Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1999;**14**:1345-1356.
27. Baksh, D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and applications in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;**8**:310-316.
28. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;**189**:54-63.
29. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2006;**41**:303-310.
30. Miura M, Gronthos S, Zhao M *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:5807-5812.
31. Nosrat IV, Smith CA, Mullally P *et al.* Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro;

implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004;**19**:2388-2398.

32. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM *et al.* Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol* 2006;**300**:656-669.
33. Hagedorn L, Suter U, Sommer L. P0 e PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF- $\beta$  family factors. *Development* 1999;**126**:3781:3794.
34. Parysek LM, Goldman RD. Distribution of a novel 57kDa intermediate filament protein in the nervous system. *J Neurosci* 1988;**8**:555-563

Table 1 – Gene expression profile of periodontal ligament (PDL) cells.

| <b>Markers</b>     | <b>PDL pool group</b> | <b>PDL single group</b> |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|
| Nestin             | ++                    | ++                      |
| $\beta$ TubulinIII | +++                   | +++                     |
| NF-M               | ++                    | +                       |
| MAP-2              | ++                    | +                       |
| Peripherin         | ++                    | ++                      |
| P0                 | +                     | +                       |
| GFAP               | -                     | -                       |
| SMA                | +++                   | +++                     |

PDL cells were cultured in inductive medium for the growth of NC cells as described in materials and methods. RT-PCR were performed as described in materials and methods using primers for markers of neural stem cells (nestin), neurons ( $\beta$ TubulinIII, NF-M, MAP-2, and peripherin), glial cells (Po and GFAP) and smooth muscle cells/myofibroblasts (SMA). PDL pool: human periodontal ligament cell culture from 7 individuals (passage 9). PDL single: human periodontal ligament cell culture from only one individual (passage 4). (+) weak expression; (++) regular expression; (+++) strong expression; (-) negative.

## **CAPÍTULO IV**

## **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol.* 1981;127:1024-29.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000.* 2000;24:253-69.

Brown LJ, Löe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993;2:57-71.

DoreDuffy P, Katychev A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(5):613-24.

Elter JR, Offenbacher S, Toole JF, Beck JD. Relationship between periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. *J Dent Res.* 2003;82:998-1001.

Etchevers HC, Vicent C, Le Douarin NM, Couly GF. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development.* 2001;128:1059-68.

Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1082-93.

Freshney RI. *Culture of animal cells. A multimedia guide.* Wiley-Liss;1999. CD.

Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone.* 1996;19:23S-37S.

Gronthos S, Brahim J, Li L, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-35.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625-30.

Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:474-84.

Hall BK. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev.* 2000;2(1):3-5.

Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol Res.* 2005;40:245-51.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Áquino R, Lanza V, Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg.* 2006;17(3):511-55.

Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development.* 2004;131:4637-50.

Le Douarin NM, Kalcheim C. *The Neural Crest.* Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontol Res* 2001;36:71-9.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1373-1426.

Lillie RD, Ashburn LL. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Archs.Path.* 1943;36:432-37.

Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development.* 1988;103:155-69.

MacNeil RI, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol* 2000. 1999;19:8-20.

Malekzadeh R, Hollinger JO, Buck D, Adams DF, McAllister BS. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J. Periodontol.* 1998;69:1256-62.

Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72:200-12.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:5807-12.

Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2003;74:780-86.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cells properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2006;41:303-10.

Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004;19:2388-98.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997;14:216-48.

Quinones-Hinojosa A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006;494(3):415-434.

Rocheffort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells*. 2006;24(10):2202-08.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364:149-55.

Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coope C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005;84:907-12.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.

Shih I. The role of CD146(Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol*. 1999;189:4-11.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78:55-62.

Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Comm*. 2007;357:917-23.

Ten Cate AR. The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000. 1997;13:9-19.

Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piatelli A, et al. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18(2):213-21.

Ueda M, Sumi Y, Mizuno H, Honda M, Oda T, Wada K, et al. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Mater Sci Eng*. 2000;13:7-14.

Vascotto SG, Griffith M. Localization of candidate stem and progenitor cell markers within the human cornea, limbus, and bulbar conjunctiva in vivo and in cell culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288(8):921-31.

Von Kossa J. Ueber die im Organismus kunstlich. Erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr Path Anat.* 1901;29:163-202.

Widera D, Grimm WD, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, et al. Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev.* 2007;16(3):447-60.

## **CAPÍTULO V**

## GLOSSÁRIO

Capela de fluxo laminar: câmara com aspiração constante de oxigênio utilizada para manipulação asséptica dos procedimentos laboratoriais.

Confluência celular: quando todo o substrato está integralmente forrado por células. Diz-se 100% de confluência.

Cultura celular *in vitro*: cultivo de células em meio e garrafas de cultura.

Estufa de CO<sub>2</sub>: equipamento que promove a manutenção da temperatura e gás carbônico constantes para o crescimento celular.

Garrafa ou frasco de cultura: dispositivo em forma de garrafa contendo um filtro em sua tampa utilizado para cultura celular.

Linhagem celular: mesma família de células com tempo de vida teoricamente infinita.

Meio de cultura: solução contendo todos os nutrientes necessários para a manutenção e proliferação celular.

Subconfluência celular: Numa razão de 70%, entende-se que o substrato está tomado por células em 70% de sua área.

Subcultura ou passagem: indica o número de vezes que foi realizada a tripsinização das garrafas de cultura.

Substrato: A face inferior da garrafa de cultura onde há formação de uma monocamada celular.

Tripsinização: ação que resulta em células soltas de seu substrato e individualizadas.

## METODOLOGIA EXPANDIDA

### Cultura Celular

Um total de 10 terceiros molares vitais foram extraídos de 7 indivíduos (18 a 25 anos), não fumantes, de ambos os sexos, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. De uma paciente de 14 anos, foram extraídos os 4 primeiros pré-molares. Os indivíduos foram informados sobre a pesquisa e optaram pela participação por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (Projeto n.309/06 aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC). Após as exodontias, os dentes foram lavados com solução fisiológica estéril e armazenados em tubos de polipropileno com meio de cultura  $\alpha$ -MEM adicionado a 20% SFB. Os ligamentos periodontais, do terço médio radicular, foram coletados com o uso de curetas periodontais do tipo Gracey e imersos em uma solução de digestão enzimática (1:3) contendo 25g/l de pancreatina (Sigma) preparada em solução de NaCl a 8,5g/l e meio de cultura  $\alpha$ -MEM, por 25min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A seguir, foi acrescentada tripsina a 0,25% (Sigma) por 10 minutos. A digestão enzimática foi paralisada em meio de cultura padrão, descrito acima. Após centrifugação (500Xg, 10min), os pellets celulares foram ressuspensos em 4ml do meio de cultura  $\alpha$ -MEM adicionado a 20% SFB, 100U/ml penicilina e 100µg/ml estreptomicina (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e transferidos para garrafas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>. Dessa forma obteve-se uma garrafa com o *pool* de células dos ligamentos periodontais de 7 indivíduos (grupo *PDL pool*) e uma garrafa com células periodontais isoladas de um mesmo indivíduo (grupo *PDL single*). Quando a subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas e re-plaqueadas para obtenção de culturas secundárias. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias substituindo-se apenas a metade do conteúdo das garrafas de cultura, ou seja, 2ml de meio de cultura novo. A alteração de coloração

do meio de cultura, que indica atividade metabólica e alteração de pH, foi controlada diariamente. Os experimentos do grupo *PDL pool* de células do ligamento periodontal foram realizados nas passagens 8 e 9. Os experimentos do grupo de células periodontais isoladas de um indivíduo (grupo *PDL single*) foram realizadas nas passagens 3 e 4.

### **Descrição do protocolo de Von Kossa**

Para indução da diferenciação osteoblástica,  $1 \times 10^4$  células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de cultura  $\alpha$ -MEM adicionado a 10% SFB,  $10^{-7}$ M dexametasona, 50 $\mu$ g/ml ascorbato-2 fosfato (Sigma) e 20mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma). O meio de mineralização foi trocado a cada 3 dias. A revelação dos nódulos de mineralização foi determinada no dia 30, através da técnica de coloração de Von Kossa (Von Kossa, 1901). Primeiramente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em paraformaldeído (Vetec) a 4% por 40min, lavadas uma vez com água e serialmente desidratadas em EtOH a 70%, 95% e 100%, por 5 minutos em cada concentração. As placas foram reidratadas de EtOH a 100%, 95% e 70%. Após a lavagem, solução de nitrato de prata 2% (Odontofarma) foi adicionada e a placa foi exposta ao sol, por 40min. Posteriormente, tiosulfato de sódio a 5% (Odontofarma) foi adicionado por 5 min. As placas foram lavadas e secadas para a análise de imagens. Os nódulos de mineralização foram observados através de microscopia de luz e contraste de fase (microscópio Olympus modelo CK 40), em campo claro e as imagens foram fotografadas através de máquina digital Olympus modelo C-5060, em aumentos de 100X e 400X. Os experimentos foram feitos em duplicata com 2 repetições em cada linhagem estabelecida.

### **Descrição do protocolo Oil red-O**

Para indução da diferenciação adipogênica,  $1 \times 10^4$  células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) com meio de cultura  $\alpha$ -MEM adicionado a 10% SFB,  $10^{-6}$ M dexametasona (Sigma),  $50 \mu\text{M}$  indometacina (Sigma) e  $10 \mu\text{g/ml}$  insulina (Sigma). A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% paraformaldeído, por 30min. Posteriormente, foi realizada a lavagem com PBS 1x e com H<sub>2</sub>O destilada, por 2 vezes. Em cada poço, foi colocado 500 $\mu\text{l}$  da solução de trabalho Oil-Red (6ml da solução de estoque + 4ml de H<sub>2</sub>O). A solução de estoque foi preparada com 0,7g de Oil red-O (Sigma) em 200ml de isopropanol (Merck) e armazenada a 4°C (Lillie e Ashburn, 1943). As placas foram incubadas, por 50min, em temperatura ambiente e lavadas com H<sub>2</sub>O destilada. A leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, com aumentos de 100x e 400x. Os experimentos foram feitos em duplicata com 2 repetições em cada linhagem estabelecida.

### **Descrição da técnica de imunocitoquímica**

A seqüência de etapas utilizada para a técnica de imunocitoquímica realizada nas placas de 24 poços é descrita a seguir: 1- Fixação das células com paraformaldeído a 4% por 30min; 2- Impermeabilização das células com PBS-Triton 0,25% por 10-15min; 3- Três lavagens de 5min cada com PBS; 4- Incubação com os anticorpos primários segundo diluições descritas na Tabela 2, durante 90min, à temperatura ambiente; 5- Três lavagens de 5min cada com PBS-Tween 0,05%; 6- Incubação com os anticorpos secundários segundo diluições descritas na Tabela 3, durante 1h, à temperatura ambiente; 7- Três lavagens de 5min cada com PBS-Tween; 8- Coloração dos núcleos com DAPI (1:2000), durante 20s; 9- Três lavagens de 5min cada com PBS-Tween; 10-

Inserção do tampão  $\text{NaHCO}_3$  (100 $\mu\text{l}$ ) e leitura em microscópio de epifluorescência Olympus BK-40.

Quando as reações de imunocitoquímica previam o uso de anticorpo conjugado à biotina, algumas etapas adicionais foram realizadas. Previamente à incubação do anticorpo secundário (etapa 9), foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com 50 $\mu\text{l}$  do Tampão TNB (0,1M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15M NaCl e 0,5% *Blocking Reagent*, PerkinElmer Life Sciences Inc.), por 30 min, à temperatura ambiente. Após incubação com anticorpo secundário (etapa 12), foram realizadas 4 lavagens com PBS-Tween e a seguir nova incubação com 40 $\mu\text{l}$  de streptavidina (HRP), na diluição de 1:150 em PBS, durante 30min, à temperatura ambiente. Após 3 novas lavagens em PBS-Tween, a reação foi revelada por incubação com 40 $\mu\text{l}$  de tiramida, na diluição de 1:200 em PBS, durante 30min. Após a lavagem com PBS-Tween, por 3 vezes, procedeu-se a marcação com DAPI, dos núcleos celulares (etapa 13).

Os experimentos foram realizados em 2 estudos independentes com 2 repetições cada.

Tabela 2- Anticorpos primários utilizados para a técnica de imunocitoquímica.

| <b>Anticorpos 1<sup>os</sup></b> | <b>Descrição</b>              | <b>Diluição</b> | <b>Fabricante</b>   |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------|
| anti- $\alpha$ SMA               | anticorpo IgG2a de camundongo | 1:800           | Sigma               |
| anti- $\beta$ TubulinaIII        | anticorpo IgG1 de camundongo  | 1:2000          | Promega             |
| anti-p75                         | anticorpo IgG de coelho       | 1:500           | Promega             |
| anti-nestina                     | anticorpo IgG1 de camundongo  | 1:100           | Santa Cruz Biotech. |
| anti-HNK-1                       | Hibridoma                     | 1:5             | (Abo e Balch, 1981) |

Tabela 3 – Anticorpos Secundários utilizados para a técnica de imunocitoquímica.

| <b>Anticorpos 2<sup>os</sup></b> | <b>Fluorescência</b> | <b>Diluição</b> | <b>Fabricante</b>   |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|
| anti-IgG2a de camundongo         | Texas Red            | 1:300           | Santa Cruz Biotech. |
| anti-IgG1 de camundongo          | FITC                 | 1:75            | Invitrogen          |
| anti-IgG total de coelho         | Biotina              | 1:1000          | Sigma               |
| anti-IgG de camundongo           | Texas Red            | 1:100           | Santa Cruz Biotech. |

### **Descrição do RT-PCR**

O meio de cultura foi retirado das placas de 24 poços, lavando-as com PBS 1x, removendo-o em seguida. Para cada linhagem estabelecida, haviam 4 poços de cultura celular. Adicionou-se 500µl do reagente Trizol (Invitrogen) para cada poço da placa de 24 poços. Homogeneizou-se com auxílio de pipeta automática (Eppendorf) e o conteúdo de 2 poços (total de 1ml) foi transferido para um tubo de 1,5ml (Eppendorf). Como os experimentos foram feitos em duplicata, resultaram 2 tubos com 1ml para cada um dos grupos *PDL pool* e *PDL single*. O protocolo foi realizado, conforme especificações do fabricante, para o volume de 1ml de Trizol em cada um dos tubos, que permaneceram, em temperatura ambiente, por 5min. Posteriormente, acrescentou-se 200µl de clorofórmio (Merck), agitando-os rigorosamente, por 15s. Para a fase de separação, os tubos permaneceram em temperatura ambiente, por 2-3min. A centrifugação foi realizada a 12000g/15min/4°C (Hettich, Zentrifugen, Alemanha). Com cuidado, a fase aquosa transparente (aproximadamente 400µl) foi transferida para outro tubo de 1,5ml (Eppendorf). A fase de precipitação iniciou-se com o acréscimo de 500µl de álcool isopropílico (Vetec), deixando o conteúdo por 10min, em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000g/10min/4°C. Descartou-se 400µl do sobrenadante e acrescentou-se 500µl EtOH 75% (Merck), homogeneizando levemente. Novamente, os

tubos foram centrifugados a 12000g/10min/4°C. Por inversão, retirou-se lentamente, todo o conteúdo dos tubos. Acrescentou-se 1ml de EtOH 75% e nova homogeneização foi realizada. Após centrifugação a 12000g/10min/4°C, retirou-se todo o EtOH 75% por eversão, cuidadosamente, para não remover o precipitado. Deixou-se secar, a temperatura ambiente, por aproximadamente 30-60min, na capela de fluxo de laminar (Veco). O conteúdo foi ressuspensão em 15µl de H<sub>2</sub>O tridestilada (mili-Q, Millipore). Para o preparo do cDNA, coletou-se 9µl da amostra de RNA diluído em H<sub>2</sub>O tridestilada em novo tubo de 0,5ml de parede fina (Eppendorf). Adicionou-se 1µl do primer poli-T (Improm II, Promega) e os tubos foram agitados no vortex (AP56, Phoenix). Os tubos foram colocados no termociclador (Matercycle gradient, Eppendorf) a 70°C, por 5min. Os tubos foram removidos do termociclador e colocou-se 10µl da solução Mix previamente preparada. Essa solução Mix consistia de 4µl Tampão 5x (ImProm-II TM, 5x reaction buffer, Promega), 2,4µl MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1µl dNTP mix (Promega), 1µl inibidor de RNase (Promega), 1 µl enzima transcriptase reversa (ThermoScript, Invitrogen) e 0,6µl H<sub>2</sub>O RNase free (Promega). Os tubos foram colocados novamente, no termociclador, e o programa cDNA<sub>3</sub> completo foi realizado. Esse programa consistia de uma etapa inicial de 70°C, por 5min. Posteriormente, 25°C por 5min, 40°C por 60min e 70°C por 15min. Ao final do programa, acrescentou-se 80µl de H<sub>2</sub>O mili-Q e os tubos foram congelados com o cDNA diluído obtido. Para as reações de PCR, foram usados novos tubos de parede fina de 0,5ml com 2,5µl da amostra de cDNA obtido, 1µl do primer sense (10µM), 1µl do primer anti-sense (10µM), 8µl de H<sub>2</sub>O RNase free (Promega) e 12,5µl Mix (PCR Master Mix, Promega). O PCR foi realizado com o Kit PCR Master Mix (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se primers sense e antisense (Integrated DNA Technologies, Inc.): nestina (sense, 5´-

CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3'; antisense, 5'-AGGGAAGTTGGGCTC-AGGACTGG-3'),  $\beta$ tubulinaIII (sense, 5'-AGATGTACGAAGACGACGAGGAG-3'; antisense, 5'-GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA-3'), NF-M (sense, 5'-GAGCGCAA-AGACTACCTGAAGA-3'; antisense, 5'CAGCGATTTCTATATCC-AGAGCC-3'), *periferina* (sense, 5'-ATGGCCGAGGCCCTCACCCAAGAG-3'; antisense, 5'-TAGGCGGGACAGAGTGGCGTCGTC-3'), MAP-2 (sense, 5'-CCA-TTTGCAACAGGAAGACAC-3'; antisense, 5'-CAGCTCAAATGCTTTGCAACTAT-3'), P0 (sense, 5'-GCCCTGCTCTTCTCTTCTTT-3'; antisense, 5'-CCAACAC-CACCCCATACCTA-3'), GFAP (sense, 5'-GTG-GGCAGGTGGGAGCTTGATTCT-3'; antisense, 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3'), SMA (sense, 5'-CGATA-GAACACGGCATCATC-3'; antisense, 5'CATCAGGCAGTTCGTAGCTC-3'). Foi utilizada amplificação de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minutos) com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2min e uma etapa final de extensão de 72°C por 7min. As temperaturas de anelamento foram 64°C (*nestina*), 58,5°C ( $\beta$ tubulinaIII), 56°C (NF-M), 68°C (*periferina*), 55°C (MAP-2), 57 °C (P0), 65 °C (GFAP) e 51°C (SMA). Amplificação paralela de GAPDH (temperatura de anelamento 60°C) foi usada como controle (dado não mostrado). Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Primeiramente, dissolveu-se a agarose a 2%, em microondas, tomando-se o cuidado para não ferver. A solução de agarose foi resfriada a aproximadamente 40°C. Colocou-se a solução na cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia), devidamente preparada. Os pentes da cuba de eletroforese foram inseridos, ainda com a solução de agarose em forma líquida. À temperatura ambiente, ocorreu a geleificação gradual da solução de agarose, removendo-se os pentes. A solução de TAE (Tris-acetato-EDTA) 1x foi colocada, até cobrir o gel de agarose. Após, 2,5 $\mu$ l do corante (10x

Blue Juice™, Invitrogen) foi colocado em cada produto de PCR. Posteriormente, 10µl do produto de PCR corado foi inserido no gel de agarose, tomando-se o cuidado de não perfurá-lo. A cuba de eletroforese foi ligada para a realização da eletroforese (Gibco BRL Electrophoresis Power Supply, 90V, 500mA e 40min). Depois, o gel de agarose foi imerso no brometo de etídeo a 4% (Sigma) por 15min. Após a lavagem em água, as bandas foram reveladas na câmara escura de luz ultra-violeta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia).

## Apêndice I – Termo de Consentimento



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

#### Informação e consentimento pós-informação para pesquisa

Meu nome é Gustavo dos Santos Coura, aluno do curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Implantodontia e estou desenvolvendo a pesquisa “Investigação da presença de células tronco em tecidos humanos periodontais e pulpares”, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, com o objetivo de realizar a cultura, em laboratório da própria Universidade Federal de Santa Catarina, de células progenitoras (“as chamadas células-tronco”) derivadas de seus dentes que foram indicados para serem removidos (extraídos). Este estudo é necessário porque as mais variadas pesquisas podem ser realizadas com essas células de dentes e estas pesquisas diminuem o número de pesquisas realizadas nos animais e nos homens. Para isto, serão utilizados dentes de leite e dentes permanentes, com indicação para ser removido (extraído). Isto não traz riscos, pois os dentes extraídos normalmente são jogados fora (lixos hospitalares), mas algum incômodo e desconforto na região da área operada podem permanecer por alguns dias. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone 48 33319077. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho.

Assinatura \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_

#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_,

fui esclarecido sobre a pesquisa “Investigação da presença de células tronco em tecidos humanos periodontais e pulpares” e concordo que meus dentes extraídos sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

## Apêndice II – Aprovação do Comitê de Ética UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEP  
PARECER CONSUBSTANCIADO – PROJETO Nº 309/2006

**Título do Projeto:** INVESTIGAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE CÉLULAS EM TECIDOS HUMANOS PERIODONTAIS E PULPARES

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

**Instituição onde será realizado o estudo:** Departamento de Estomatologia - UFSC

**Data da apresentação ao CEP:** 24/10/2006

**Objetivo:** Investigar a potencialidade de células-tronco nos tecidos humanos pulpares e periodontais, derivados de dentes extraídos de crianças e adultos.

### PARECER

Esse parecer trata do projeto de doutorado intitulado “INVESTIGAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE CÉLULAS EM TECIDOS HUMANOS PERIODONTAIS E PULPARES” que deu entrada no CEP em 24/10/2006, tendo como pesquisador responsável o Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini do departamento Estomatologia da UFSC, e como pesquisador principal o mestre em odontologia e doutorando do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Gustavo dos Santos Coura.

De acordo com o requerimento para parecer do CEP, esta pesquisa será realizada entre dezembro de 2006 a fevereiro de 2008.

A documentação apresentada traz a folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável, bem como assinada e carimbada pelo chefe do Departamento de Estomatologia da UFSC representando a instituição onde a pesquisa será realizada.

A pesquisa, orçada em 1109,50 reais, em materiais que serão disponibilizados pelo Laboratório de Hematologia e Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini Logia Celular para Projetos-Piloto, exceto as enzimas que serão adquiridas pelo pesquisador principal, surge da preocupação em investigar a presença de células-tronco, nos tecidos humanos pulpares e periodontais. Sendo que sua finalidade é o uso terapêutico de células-tronco em tratamento de doenças periodontais.

O pesquisa inclui o uso de técnica de as células serão obtidas e cultivadas em placas de 24 poços, com meio de cultura a-MEM adicionado a 20% de soro fetal bovino (SFB) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) serão acrescentados ao meio de cultura para estímulo do crescimento das células-tronco. Análise microscópica da formação de colônias; análise bioquímica com marcador slug para células-tronco de origem crista neural; e indução da diferenciação dos fenótipos osteoblástico e adipogênico. Serão comparada as colônias coradas positivas com as do grupo de controle que será cultivada sem adição de agentes indutivos.

A amostra do estudo será composta de 30 dentes de 30 pacientes com idade variando entre 08 a 35 anos, que serão submetidos às cirurgias com indicações da exodontia. Tais sujeitos, não fumantes, doarão seus dentes para a pesquisa. Os dentes pesquisados serão aqueles extraídos por motivos ortodônticos.

Dentre os itens que compõe a documentação, constam: folha de rosto, declaração do pesquisador principal e do pesquisador responsável de que cumprirão os termos da resolução CNS 196/96 e suas complementares; declaração do chefe do Departamento de Estomatologia dando ciência de que aquela instituição está de acordo com a pesquisa e todas as exigências legais.

O TCLE está escrito de **forma** técnica inacessível ao leitor leigo, de vendo ser reescrita.

Do ponto de vista formal o projeto apresenta - se bem estruturado e fundamentado, apresentado todos os protocolos de pesquisa.

O currículo dos pesquisadores mostra que os mesmos têm formação e produção na área da odontologia estando, portanto, qualificados à execução da pesquisa.

A investigação é pertinente e contribui para a busca de tratamento na área da saúde bucal e regeneração da estrutura dentária, porém, pelos motivos apontados em relação ao TCLE e outras questões, somos de parecer que o projeto fique em pendência.

**Motivos da pendência:**

- O TCLE precisa ser reescrito de formas que fique acessível ao leitor leigo;
- Necessidade de precisar melhor o número de sujeitos da pesquisa, posto que à contradição entre o projeto e o resumo do projeto;

**Parecer do CEP:**

(X) com pendência

Data da Reunião:

Florianópolis, 27 de novembro de 2006.

Vera Lúcia Bosco  
Coordenadora

**Parecer Final :  
APROVADO**

Data da Reunião:

Florianópolis, 07 de maio de 2007.



*Prof. Washington Porteira de Souza*  
Coordenador CEP\_UFSC

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

## **ANEXO I**

### **Relação de trabalhos publicados e enviados durante o curso de Doutorado**

#### **Artigos completos enviados para periódicos**

COURA, G.S.; AGUIAR, C.B.N.M.; GARCEZ, R.C.; MAGINI, R.S.; TRENTIN, A.G.  
Human ligament periodontal: A potential niche of neural crest stem cells. **Enviado**  
**Journal of Periodontal Research 2007.**

COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S.  
protocolo de cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade  
celular e dos possíveis danos causados ao DNA. **Enviado Revista Periodontia**  
**Sobrape 2007.**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

ANDRADE, D.S.; COURA, G.S. Miniimplantes para ancoragem ortodôntica. **Revista**  
**Clínica de Ortodontia Dental Press**, Maringá, v.6, n.2, p.98-104, 2007.

COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S.  
Bioengenharia Tecidual: Histórico e Perspectivas. **Revista Brasileira de**  
**Implantodontia e Prótese sobre Implante**, Curitiba, v.13, n.52, p.170-175, 2006.

OGATA, D.V.G.; COURA, G.S.; DEMCHUK, C.A.R.L.; ZORTÉA JR, AJ.  
Biossegurança em bancos de ossos no Brasil. **Implant News**, São Paulo, v.3, n.4, p.363-  
367, 2006.

CARMO FILHO, L.C.; ZORTÉA JR, A.J.; COURA, G.S.; FRANZON FILHO, P.R. Análise de osseointegração primária de 396 implantes osseointegráveis do Sistema Neodent. **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implante**, Curitiba, v.12, n.47/48, p.206-214, 2005.

COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S. Protocolo preliminar de cultura de fibroblastos gengivais humanos. **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implante**, Curitiba, v.12, n.47/48, p.190-196, 2005.

#### **Capítulo de livros publicados**

COURA, G.S.; MAGINI, R.S. Anatomia e Fisiologia dos seios maxilares. In: MAGINI, R.S. (Org.). **Enxerto ósseo no seio maxilar: Função e Estética**. São Paulo, 2005.

MAGINI, R.S.; BENFATTI, C.A.M.; ZENDRON, M.V.; FERREIRA, C.F.; COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SCHOICHETT, C.; CASTRO, K.N.O. Bioengenharia aplicada a Implantodontia. In: TODESCAN, F.F.; BECHELLI, A.; ROMANELLI, H. (Org.). **Implantodontia Contemporânea – Cirurgia e Prótese**. São Paulo, 2005. Cap.21.

MAGINI, R.S.; BENFATTI, C.A.M.; ZENDRON, M.V.; FERREIRA, C.F.; COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SCHOICHETT, C.; CASTRO, K.N.O. Bioingeniería aplicada a la Implantología. In: TODESCAN, F.F.; BECHELLI, A.; ROMANELLI, H. (Org.). **Implantología Contemporânea – Cirugía y Prótesis**. São Paulo, 2005. p. 467-495.

ZORTÉA JR, A.J.; SIMÕES, C.M.O.; COURA, G.S.; SAVI, L.A.; MAGINI, R.S. Engenharia Tecidual – Cultura de Células. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. (Org.). **Plasma Rico em Plaquetas e Fatores de Crescimento – das pesquisas científicas à Clínica Odontológica**. São Paulo, 2004, p.260-270.

SILVA, A.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, D.C.; ALDECOA, E.A.; COURA, G.S.; CASTRO, K.N.O.; PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S.; MAGNANI, O. Protocolo de obtenção e aplicações clínicas do PRP. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. (Org.). **Plasma Rico em Plaquetas e Fatores de Crescimento – das pesquisas científicas à Clínica Odontológica**. São Paulo, 2004, p.187-230.

#### **Artigos resumidos publicados em periódicos**

COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; SAVI, L.A.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S. Cell Viability and Genotoxicity of fibroblasts for tissue engineering purpose. **Journal of Dental Research**, v.85, Spec Issue B, 2006.

ZORTÉA JR, A.J.; COURA, G.S.; GARCEZ, R.C.; BOABAID, F.; MAGINI, R.S.; SIMÕES, C.M.O. Harvesting and culturing human osteoblast-like cells. **Journal of Dental Research**, v.85, Spec Issue B, 2006.

ZORTÉA JR, A.J.; COURA, G.S.; BOABAID, F.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S.; A particulated bone harvest model: cell viability and DNA damage. **Journal of Dental Research**, v.84, Spec Issue, 2005.

COURA, G.S.; ZORTÉA JR, A.J.; MAGINI, R.S.; FREITAS, S.F.T.; CALVO, M.C.M.

Cluster assignments and multivariate analysis in implant dentistry. **Journal of Dental**

**Research**, v.83, Spec Issue, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)