

**LUCIANA OLIVEIRA PEREIRA**

**ESTUDO *IN VITRO* DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS DA POLPA DE  
DENTES PERMANENTES COM E SEM INFLAMAÇÃO:  
CARACTERIZAÇÃO E INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO**

**BRASÍLIA  
2012**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUCIANA OLIVEIRA PEREIRA**

**ESTUDO *IN VITRO* DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS DA POLPA DE  
DENTES PERMANENTES COM E SEM INFLAMAÇÃO:  
CARACTERIZAÇÃO E INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO**

**Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca**

**BRASÍLIA  
2012**

**LUCIANA OLIVEIRA PEREIRA**

**ESTUDO *IN VITRO* DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS DA POLPA DE  
DENTES PERMANENTES COM E SEM INFLAMAÇÃO:  
CARACTERIZAÇÃO E INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO**

**Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília**

**Aprovada em 25 / 05 / 2012**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo (presidente)  
Universidade de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Mara de Oliveira  
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco  
Universidade Federal de Pelotas**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Soraya Coelho Leal  
Universidade de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Ligia Vieira Mendes Soviero  
Universidade de Brasília**

**Suplente:**

**Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo  
Universidade de Brasília**

*Dedico este trabalho a meus pais,  
pelo exemplo e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Aos pais e irmãs, por formarem, com tantos valores, a melhor família a que eu poderia aspirar.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela grandiosa oportunidade de aprendizado, que foi muito além de orientações quanto à execução deste trabalho. Agradeço também os valiosos exemplos, a atenção e a amizade.

Ao meu querido co-orientador Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca, por seu grande investimento de tempo, dedicação e cuidado em minha formação científica desde a graduação. Sou muito grata por tantas orientações e incentivos.

A todos os pacientes que doaram as amostras de polpa dental para esta pesquisa.

Aos cirurgiões dentistas que realizaram as exodontias, especialmente, Leandro Bicalho, Paulo Sérgio Pereira, Gleiton Araújo e Reuben Lucena.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Soraya Leal pelas valiosas discussões durante a idealização deste projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Mara de Oliveira pelas fundamentais colaborações e discussões.

Ao Prof. Dr. João Paulo Longo, pelos conhecimentos compartilhados e pela colaboração nos experimentos com laser.

Ao Prof. Dr. Sebastião Willian, pela gentil colaboração com as medições de potência nos experimentos com laser.

Aos demais professores do Instituto de Biologia pelas solícitas colaborações.

À Dra Jaqueline Rodrigues pela grande colaboração na citometria de fluxo e nas discussões do trabalho.

À Dra Izabel Rodrigues pelas fundamentais colaborações nas análises estatísticas.

À Dra Tainá Alencar e Guilherme Ribeiro pela significativa colaboração nas análises de Bioinformática.

À Adriane Alves pela importante colaboração no sequenciamento automático.

À Clarissa Romez pela grande colaboração nos experimentos finais e análise das bibliotecas subtrativas.

Às colegas Leliane Sousa, Juliana Bittar, Daniela Araújo e Clarissa Romez e aos Profs. Dr. Orlando Ayrton de Toledo, Dra. Ana Cristina Barreto, Dr. Marcio Poças e

Dra. Soraya Leal pelo trabalho conjunto nesta linha de pesquisa na Universidade de Brasília.

Aos queridos colegas pertencentes e frequentadores do Laboratório de Nanobiotecnologia, Beatriz Ma, Camila Saldanha, Caroline Valois, Cláudio Cavalcanti, Diego Iocca, Graziela Joaniti, Jaqueline Rodrigues, Juliana Braz, Khélida Ramos, Larissa Naves, Leandro Bicalho, Lívia Matos, Luciana Landim, Ludmila Souza, Luís Muehlmann, Maria Luíza Fascinelli, Mayara Costa, Mariana Campos da Paz, Patrícia Cunha, Raphael Peixoto, Renata Carvalho, Samuel Mussi, Taynan Pereira, Vanessa Moreira e Victoria Fuentes pelas tantas colaborações, pela amizade e pelo ambiente de trabalho tão agradável. Sentirei muita saudade da convivência com todos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Calliandra Silva, Daniel Agostinho, Érica Cotica, Lorena Derengowski, Luana Duarte, Marciano Rubini, Miguel Ferraz, Natália Angarten, Robson Matos, Tatiane Costa e Thiago de Mello pelas solícitas colaborações. Em especial, à Calliandra, Érica e Lorena, pelas orientações nos experimentos de PCR em tempo real, e aos amigos Marciano e Robson pelo trabalho conjunto e por terem sido excelentes companhias nos demorados experimentos da biblioteca subtrativa.

Aos técnicos do Instituto de Biologia e Faculdade de Ciências da Saúde, Djalma, Fátima, Glória, Ingrid, Ivonilde, Karen, Lauro, Raphael, e Thompson pelo trabalho fundamental em nos laboratórios em que desenvolvi meu estudo.

À Sra Zélia Madeira pela colaboração na fotografia e pela competente e eficientíssima administração do nosso laboratório.

À Universidade de Brasília e a todos os mestres por minha formação acadêmica.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“O conhecimento amplia a vida.  
Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar.”*

*(Carlos Bernardo González Pecotche)*

## RESUMO

**Introdução:** As células-tronco da polpa dental (DPSC) têm se mostrado multipotentes e têm sido muito estudadas para engenharia de tecidos. Estudos recentes sugeriram a presença de células mesenquimais viáveis na polpa dental humana inflamada. **Objetivo:** a) Comparar células de polpas dentais normais e inflamadas quanto à presença de células-tronco, proliferação e potencial de diferenciação; b) Investigar se a irradiação com laser de baixa potência aumentaria o potencial de proliferação e diferenciação de DPSC isoladas a partir de polpas dentais normais (DPSC-N) e inflamadas (DPSC-I); c) Construir bibliotecas subtrativas de cDNA com células de polpas dentais normais e inflamadas para identificar possíveis transcritos diferencialmente expressos. **Métodos:** a) Células de polpas dentais humanas normais e inflamadas foram comparadas quanto à proliferação (MTT), morfologia, e expressão de STRO-1. Células STRO-1-positivas foram submetidas a ensaios de proliferação (MTT e contagem de UFC), a análises morfológicas e do perfil imunofenotípico e às diferenciações odonto-osteogênica, adipogênica e condrogênica. As células diferenciadas foram avaliadas quanto à morfologia e à expressão dos genes *BSP*, *LPL* e *SOX-9* por qRT-PCR. A quantidade de matriz mineralizada produzida após a diferenciação odonto-osteogênica também foi comparada. b) DPSC-N e DPSC-I foram irradiadas com um laser de baixa potência vermelho (660 nm) em quatro diferentes fluências de energia (0,05; 0,30; 7 e 42 J/cm<sup>2</sup>). As duas fluências menores foram produzidas por irradiação das duas fluências mais elevadas através de um disco de dentina, usado para simular uma condição clínica. A proliferação e a competência na diferenciação odonto-osteogênica foram comparadas. c) O cDNA de células de polpas dentais normais e inflamadas foi utilizado, após hibridações subtrativas, para a construção de duas bibliotecas enriquecidas com transcritos diferencialmente expressos em cada população. Amostras de cDNA das bibliotecas foram sequenciadas, comparadas às depositadas no banco de dados *Swiss-Prot* e funcionalmente classificadas, usando a ferramenta *KEGG Orthology*. **Resultados:** Não se observaram diferenças na morfologia e na proliferação de DPSC-N e DPSC-I antes ou depois da separação das STRO-1-positivas. Elas tiveram expressões semelhantes de STRO-1 e seus perfis imunofenotípicos foram compatíveis com o de células-tronco mesenquimais.



Tanto DPSC-N quanto DPSC-I foram capazes de se diferenciarem sob as três condições analisadas e apresentaram padrões semelhantes de expressão de *BSP*, *LPL* e *SOX-9*. A produção de matriz mineralizada também foi compatível. Em todos os experimentos quantitativos, houve diferenças entre as células de cada paciente, tanto de polpa normal como de inflamada, mas não houve diferença estatística entre os dois grupos. Após a irradiação com laser, não houve diferença significativa entre as taxas de proliferação e as produções relativas de nódulos mineralizados em comparação com os respectivos controles, tanto para DPSC-N quanto para DPSC-I. A análise das bibliotecas subtrativas de cDNA não revelou diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão gênica nas categorias funcionais.

**Conclusão:** Não foram identificadas diferenças significativas entre as propriedades das células da polpa dental normal e inflamada quanto à presença de células-tronco e seu potencial de proliferação e diferenciação, assim como em relação ao padrão de expressão gênica global. Além disso, o laser não intensificou as propriedades dessas células.

**Palavras-chave:** Células-tronco da polpa dental; células mesenquimais; pulpite irreversível; proliferação; diferenciação; laser de baixa potência; biblioteca subtrativa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Human dental pulp stem cells (DPSC) have shown multipotency and have been widely studied for tissue engineering. Recent studies have suggested the presence of viable mesenchymal cells in the inflamed human dental pulp. **Aim:** a) To compare cells from normal and inflamed human dental pulps regarding the presence of stem cells, their proliferation and differentiation potential; b) To investigate if low-level laser therapy could increase the proliferation and differentiation potential of DPSC isolated from normal dental pulps (DPSC-N) and from inflamed pulps (DPSC-I); and c) To construct subtractive cDNA libraries with cells from normal and inflamed dental pulps to identify potential differentially expressed transcripts. **Methodology:** a) Cells from human normal and inflamed pulps were compared in respect to proliferation (MTT assay), morphology and STRO-1 expression. STRO-1-positive cells were subject to proliferation assays (MTT and CFU counting), to morphological and immunophenotypic analyses and then submitted to odonto-osteogenic, adipogenic and condrogenic differentiation. Differentiated cells were evaluated concerning the morphology and the expression, by qRT-PCR, of *BSP*, *LPL* and *SOX-9* genes. The amount of mineralized matrix produced after odonto-osteogenic differentiation was also compared. B) DPSC-N and DPSC-I were irradiated with a red low-level laser (660 nm) in four different energy fluences (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>). The two lower fluences were produced by irradiating the two higher fluences through a dentin disc, which was used to simulate a clinical condition. The proliferation and the cell odonto-osteogenic differentiation competence were compared. c) cDNA of cells from normal and inflamed dental pulps were used, after subtractive hybridizations, to construct two libraries, enriched with differently expressed transcripts in each cell population. The cDNA samples were sequenced and compared to sequences which were deposited in the database *Swiss-Prot*. Then, they were functionally classified, using the tool *KEGG Orthology*. **Results:** No difference was observed in the morphology and in the proliferation rate of DPSC-N and DPSC-I either before or after separation of STRO-1-positive cells. They had similar expressions of STRO-1 and had mesenchymal immunophenotype. Both DPSC-N and DPSC-I were capable of differentiating under the three assayed conditions and presented similar patterns for *BSP*, *LPL* and *SOX-9* expression.

Mineralized matrix production was also compatible. In all the quantitative experiments, differences were found between cells from each patient, either from normal or inflamed pulps. Nonetheless, there was no statistical difference between these two groups. After laser irradiation, there was no statistically significant difference between the proliferation rates and the relative productions of mineralized nodules compared to the respective controls, either for DPSC-N or DPSC-I. The analysis of the subtractive cDNA libraries revealed no statistically significant difference in gene expression in the functional categories. **Conclusion:** No significant differences were found between the properties of cells from normal and inflamed dental pulps for the presence of stem cells and their proliferation and differentiation potentials, as well as in relation to global gene expression pattern. Furthermore, the laser did not increase the properties of these cells.

**Keywords:** Dental pulp stem cells; mesenchymal cells; irreversible pulpitis; proliferation; differentiation; low-level laser; subtractive library.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Diagrama geral do processo de hibridação subtrativa seguida por PCR	59
Figura 02	Diagrama esquemático da hibridação subtrativa seguida por PCR	60
Figura 03	Curvas de crescimento das células de polpa dental normal e inflamada em duas concentrações de soro fetal bovino (ensaio de MTT)	72
Figura 04	Crescimento das células de polpa dental normal e inflamada em duas concentrações de soro fetal bovino (ensaio de MTT)	73
Figura 05	Análise por citometria de fluxo da população de células da cultura multicelular de polpa dental	74
Figura 06	Perfil de expressão do marcador STRO-1 em células de polpa normal e inflamada	75
Figura 07	Percentual de células de polpa normal e inflamada que expressam STRO-1	77
Figura 08	Percentual de células STRO-1(+) separadas magneticamente da população multicelular de polpa normal e inflamada – contagem em câmara de Neubauer	78
Figura 09	Imunofenotipagem de DPSC-N1 e DPSC-I1 por citometria de fluxo	79
Figura 10	Células de polpa dental normal e inflamada em cultura	80
Figura 11	DPSC-N1 e DPSC-I1 coradas com Giemsa	81
Figura 12	Proliferação de DPSC-N e DPSC-I	82
Figura 13	Unidades formadoras de colônia (UFC) em DPSC-N e DPSC-I	83
Figura 14	Eficiência percentual de formação de colônias (UFC)	83
Figura 15	Ensaio de diferenciação odonto-osteogênica – análise morfológica	84
Figura 16	Ensaio de diferenciação odonto-osteogênica - quantificação do tecido mineralizado	85
Figura 17	Análise da indução de diferenciação odonto-osteogênica - expressão relativa de <i>BSP</i> por DPSC-N e DPSC-I	86
Figura 18	Ensaio de diferenciação adipogênica – análise morfológica	87

Figura 19	Análise da indução de diferenciação adipogênica - expressão relativa de <i>LPL</i> por DPSC-N e DPSC-I	87
Figura 20	Ensaio de diferenciação condrogênica – análise morfológica	88
Figura 21	Análise da indução de diferenciação condrogênica - expressão relativa de <i>SOX-9</i> por DPSC-N e DPSC-I	89
Figura 22	Proliferação de DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições	90
Figura 23	Proliferação média de DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições	91
Figura 24	Produção relativa de nódulos mineralizados por DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições e tratamento com meio indutor de diferenciação odonto-osteogênica	92
Figura 25	Produção média relativa de nódulos mineralizados por DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições e tratamento com meio indutor de diferenciação odonto-osteogênica	92
Figura 26	Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), das amostras de cDNA de PN e PI digeridas com a enzima <i>Rsa I</i>	93
Figura 27	Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), dos produtos da PCR para verificar a eficiência de ligação dos adaptadores às amostras de cDNA de PN e PI	94
Figura 28	Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5) µg/mL, dos produtos de PCR após as hibridações.	95
Figura 29	Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5) µg/mL, dos produtos da PCR de colônia de clones transformados	96
Figura 30	Classificação funcional dos genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal, segundo a ferramenta <i>KEGG Orthology (KO)</i>	97
Figura 31	Classificação funcional dos genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental inflamada, segundo a ferramenta <i>KEGG Orthology (KO)</i>	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Caracterização das amostras de tecido pulpar coletadas	40
Tabela 02	Oligonucleotídeos usados nos experimentos de RT-PCR em tempo real	54
Tabela 03	Parâmetros usados para a irradiação de células-tronco pulparem com o laser de baixa potência	56
Tabela 04	Percentual de células de polpa normal e inflamada marcadas positivamente para STRO-1 e detectadas por citometria de fluxo	76
Tabela 05	Contagem de células de polpa dental normal e inflamada após separação magnética das que expressavam o marcador de superfície STRO-1	78
Tabela 06	Genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal, classificados funcionalmente segundo a ferramenta <i>KEGG Orthology (KO)</i>	123
Tabela 07	Genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal, classificados funcionalmente segundo a ferramenta <i>KEGG Orthology (KO)</i>	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância ( <i>Analysis of variance</i> )
BSP	Sialofosfoproteína de osso ( <i>Bone sialophosphoprotein</i> )
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cm	Centímetro
CT	Ciclo limiar ( <i>cycle threshold</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>Desoxirribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxirribonuclease
DPSC	Células-tronco da polpa dental ( <i>Dental pulp stem cells</i> )
DPSC-I	Células-tronco da polpa dental inflamada
DPSC-N	Células-tronco da polpa dental normal
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido diaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
g	Gramma
<i>g</i>	Aceleração devida à gravidade na superfície da Terra
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	Hora
IgM	Imunoglobulina M
kb	Quilobases
L	Litro
LBP	Laser de baixa potência
LPL	Lipopoliproteína lipase
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

ng	Nanograma
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
PBS	Solução salina tamponada ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PI	Polpa dental inflamada
PN	Polpa dental normal
RNA	Ácido ribonucléico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
SFB	Soro fetal bovino
SOX-9	Região Y determinante do sexo – caixa 9 ( <i>(sex determining region Y)-box 9</i> )
pb	Pares de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAse	Ribonuclease
TGF-	Fator de transformação do crescimento ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TNF	Fator de necrose tumoral ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
UFC	Unidade formadora de colônia
X- GAL	5-bromo-4-cloro-3-inodoxil- -D-galactopiranosídeo
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
$\mu$ M	Micromolar
%	Por cento



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
1.1 CÉLULAS-TRONCO	22
1.2 CÉLULAS-TRONCO (CÉLULAS MESENQUIMAIS) DA POLPA DENTAL	23
1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM DPSC	30
1.4 USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA PARA BIOESTIMULAÇÃO DE DPSC	31
1.5 INFLAMAÇÃO PULPAR E DPSC	32
1.6 JUSTIFICATIVA	35
<b>2 OBJETIVOS</b>	36
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>3 MÉTODOS</b>	38
3.1 COLETA DE DENTES HUMANOS	39
3.2 CULTURA DE CÉLULAS PULPARES	40
3.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA	41
<b>3.3.1 Análise Estatística</b>	42
3.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA	42
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA MULTICELULAR DE POLPA DENTÁRIA NORMAL E INFLAMADA QUANTO À EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE STRO-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
<b>3.5.1 Análise Estatística</b>	44
3.6 SEPARAÇÃO MAGNÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO PULPARES (STRO-1-POSITIVAS)	44
<b>3.6.1 Análise Estatística</b>	45
3.7 IMUNOFENOTIPAGEM DE DPSC-N E DPSC-I POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
3.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE DPSC-N E DPSC-I	46
3.9 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE DPSC-N E DPSC-I	46
<b>3.9.3 Análise Estatística</b>	47
3.10 ENSAIO DE CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA	47

<b>3.10.1 Análise Estatística</b>	48
<b>3.11 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO</b>	48
<b>3.11.1 Indução de Diferenciação Odonto-osteogênica</b>	48
3.10.1.1 Análise Estatística	49
<b>3.11.2 Indução de Diferenciação Adipogênica</b>	50
<b>3.11.3 Indução de Diferenciação Condrogênica</b>	50
<b>3.11.4 Extração de RNA</b>	51
<b>3.11.5 Tratamento do RNA Total com DNase I</b>	52
<b>3.11.6 Síntese da Primeira Fita de cDNA</b>	52
<b>3.11.7 PCR em Tempo Real</b>	53
3.10.7.1 Análise Estatística	54
<b>3.12 ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER</b>	55
<b>3.12.1 Ensaio de Proliferação de DPSC-N e DPSC-I após Irradiação com Laser</b>	56
<b>3.12.2 Ensaio de Diferenciação Odonto-osteogênica de DPSC-N e DPSC-I após Irradiação com Laser</b>	57
<b>3.12.3 Análise Estatística</b>	57
<b>3.13 BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS</b>	57
<b>3.13.1 Extração do RNA Total</b>	61
<b>3.13.2 Purificação do mRNA</b>	61
<b>3.13.3 Hibridação Subtrativa Seguida por PCR</b>	61
<b>3.13.4 Purificação dos Produtos de PCR</b>	63
<b>3.13.5 Ligação do cDNA ao Vetor de Clonagem</b>	63
<b>3.13.6 Transformação Bacteriana por Eletroporação</b>	64
<b>3.13.7 PCR de Colônia dos Clones Transformantes</b>	65
<b>3.13.8 Minipreparação de DNA Plasmidial em Larga Escala</b>	65
<b>3.13.9 Amplificação e Sequenciamento das Bibliotecas Subtrativas de cDNA</b>	67
<b>3.13.10 Análise das Sequências de cDNA</b>	68
3.13.10.1 Análise Estatística	69
<b>4 RESULTADOS</b>	70
<b>4.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA</b>	71
<b>4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA</b>	71

4.3	CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA MULTICELULAR DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA QUANTO À EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE STRO-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO	73
4.4	SEPARAÇÃO MAGNÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO PULPARES (STRO-1-POSITIVAS)	77
4.5	IMUNOFENOTIPAGEM DE DPSC-N E DPSC-I POR CITOMETRIA DE FLUXO	78
4.6	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE DPSC-N E DPSC-I	80
4.7	PROLIFERAÇÃO DE DPSC-N E DPSC-I	82
4.8	EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (UFC)	83
4.9	ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO	84
	<b>4.9.1 Diferenciação Odonto-osteogênica</b>	84
	<b>4.9.2 Diferenciação Adipogênica</b>	86
	<b>4.9.3 Diferenciação Condrogênica</b>	88
4.10	ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER	89
	<b>4.10.1 Efeito da Irradiação com Laser na Proliferação de DPSC-N e DPSC-I</b>	89
	<b>4.10.2 Efeito da Irradiação com Laser na Diferenciação Odonto-Osteogênica de DPSC-N e DPSC-I</b>	91
4.11	BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS	93
	<b>4.11.1 Hibridação Subtrativa Seguida por PCR</b>	93
	<b>4.11.2 Transformação Bacteriana e PCR de Colônia dos Clones Transformantes</b>	95
	<b>4.11.3 Sequenciamento e Análise de Bioinformática</b>	96
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	99
5.1	ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA E COMPARAÇÃO ENTRE SUAS MORFOLOGIAS E SEUS POTENCIAIS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO	100
5.2	ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER	103
5.3	BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS	106
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	109
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	111
	<b>APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	122
	<b>APÊNDICE B - Tabela 06</b>	123
	<b>APÊNDICE C - Tabela 07</b>	130
	<b>APÊNDICE D - Artigo 1</b>	141

<b>APÊNDICE D - Artigo 2</b>	152
<b>ANEXO A</b> – Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília	166
<b>ANEXO B</b> - Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde – SES-DF	167

## **1. INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco se definem por seu potencial singular de originar diferentes tipos celulares no organismo durante e após seu desenvolvimento embrionário. Essas células se distinguem de outros tipos celulares principalmente por duas características importantes. Em primeiro lugar, elas são células não especializadas que se renovam por longos períodos por meio da divisão celular. A outra característica é a capacidade de, sob determinadas condições fisiológicas, patológicas ou experimentais, serem induzidas a se diferenciarem em células com funções específicas. Em muitos órgãos, como o intestino e a medula óssea, as células-tronco se dividem regularmente para reparar ou substituir tecidos desgastados ou danificados. Entretanto, em órgãos como o pâncreas e o coração, as células-tronco se dividem apenas sob condições especiais (1-4).

Existem dois tipos fundamentais de células-tronco, as embrionárias e as pós-natais, também conhecidas como somáticas ou adultas. As células-tronco embrionárias são células primitivas indiferenciadas presentes no embrião, capazes de se dividirem sem se diferenciarem por períodos prolongados e de serem induzidas a se diferenciarem em células e tecidos dos três folhetos germinativos primordiais. As células-tronco somáticas são células indiferenciadas encontradas, após o nascimento, em diversos tecidos do organismo, incluindo medula óssea, pele, cérebro, coração, músculo esquelético, intestino, fígado, ovário, testículo, dente, entre muitos outros. Possuem uma capacidade limitada de auto-renovação e diferenciação e podem permanecer quiescentes por longos períodos de tempo até que sejam ativadas para renovar os tecidos em condições fisiológicas ou patológicas (1-4).

De um modo geral, as células-tronco podem ser classificadas como (1):

- a) Totipotentes - São aquelas capazes de originar todos os tipos celulares do organismo e tecidos extraembrionários. São encontradas no embrião de até 32 células.

- b) Pluripotentes - São as que originam os tecidos do embrião. Encontram-se no embrião com 32 a 64 células, na massa interna do blastocisto.
- c) Multipotentes - São aquelas capazes de se diferenciarem em mais de um tipo celular do organismo, podendo dar origem a células de várias linhagens. São as células-tronco somáticas.

O amplo potencial de proliferação e a plasticidade apresentada pelas células-tronco tem atraído um número crescente de pesquisas no campo da bioengenharia visando ao desenvolvimento de terapias regeneradoras para tecidos e órgãos.

Apesar da totipotência ou pluripotência apresentada pelas células-tronco embrionárias, seu emprego em pesquisas e futuras terapias no campo da engenharia de tecidos é limitado pela maior escassez de fontes dessas células e pelos numerosos conflitos de ordem ética, religiosa e jurídica que seu uso implica. Tem-se relatado também, como desvantagem de sua utilização, a maior dificuldade de se controlar a proliferação e a diferenciação dessas células, que podem originar formações tumorais (5-7).

Por outro lado, as células-tronco somáticas, por serem muito mais acessíveis e por sua utilização não suscitar conflitos de ordem ética, têm sido ainda mais amplamente estudadas. Entre as células-tronco adultas, as mesenquimais se destacam em número de investigações devido ao seu considerável potencial terapêutico (8).

Entre as primeiras células-tronco adultas descobertas e investigadas, estão as células mesenquimais da medula óssea (BMSC). São amplamente reconhecidos seu alto poder proliferativo *ex vivo* e sua multipotência, sendo capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens de origem mesenquimal como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células musculares e nervosas (9).

## 1.2 CÉLULAS-TRONCO (CÉLULAS MESENQUIMAIS) DA POLPA DENTAL

Até o ano 2000, já se observava que células da polpa dentária, se mantidas em cultura, poderiam desenvolver uma aparência de odontoblastos e formar nódulos

mineralizados *in vitro*, o que era uma característica atribuída a culturas de osso ou de células de medula óssea. Por analogia, começou-se a especular que o tecido pulpar adulto deveria conter também uma população de células multipotentes (9).

Em 2000, Gronthos *et al.*(9) isolaram, da polpa de terceiros molares humanos, uma população de células mesenquimais, que se mostraram clonogênicas e altamente proliferativas. Elas foram por eles denominadas DPSC (células-tronco de polpa dental), sigla que passou a ser adotada, em numerosos estudos posteriores, para denominar células mesenquimais isoladas de dentes permanentes. Ao serem comparadas às BMSC, observou-se que, embora apresentassem imunofenótipos similares *in vitro*, eram funcionalmente diferentes. Enquanto as DPSC produziam nódulos apenas esporádicos, mas densamente calcificados, e não formavam adipócitos, as BMSC calcificavam-se frequentemente ao longo da camada de células aderentes à placa de cultura com aglomerados de adipócitos. Quando as DPSC foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos, geraram uma estrutura semelhante à dentina, com células semelhantes a odontoblastos alinhadas ao redor de um tecido intersticial semelhante à polpa. Por outro lado, as BMSC formaram osso lamelar contendo osteócitos e osteoblastos ao redor de um tecido fibroso vascular e adipócitos.

Em 2003, Miura *et al.* (10) isolaram uma população de células mesenquimais a partir do remanescente pulpar de dentes decíduos naturalmente esfoliados e as denominaram com a sigla SHED (células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados). Essas células se mostraram altamente proliferativas e capazes de se diferenciarem em uma variedade de tipos celulares, incluindo células neurais, adipócitos e odontoblastos. Se comparadas às DPSC, as SHED tiveram uma taxa de proliferação mais elevada, maior número de duplicações, formação de aglomerados esféricos e capacidade osteoindutora *in vivo*. As SHED não foram, entretanto, capazes de regenerar completamente o complexo dentina-polpa formado pelas células transplantadas *in vivo*, como fizeram as DPSC.

A localização das células-tronco na polpa dental tem sido descrita como perivascular (11, 12). Na polpa dental sadia, essas células são escassas, mas sua proliferação pode ser ativada em condições inflamatórias (13). Demonstrou-se, em terceiros molares humanos mantidos em cultura, que a injúria pulpar estimulou a proliferação de células-tronco localizadas na área perivascular e a migração para o



local do dano (14). A localização das SHED também foi descrita como em regiões perivasculares da polpa (10).

O isolamento das DPSC normalmente é realizado por duas metodologias a partir de dentes hígidos extraídos e seccionados para remoção do tecido pulpar. Na primeira delas, o tecido pulpar é digerido pelas enzimas dispase e colagenase tipo I para gerar suspensões celulares a serem passadas para a placa de cultura (9, 10). A segunda, conhecida como *outgrowth*, consiste na migração das células do fragmento amputado para a superfície da placa de cultura (15-18). Observou-se que este último método retardou o tempo para o estabelecimento da cultura e isolou células com uma taxa de proliferação mais baixa se comparadas às provenientes da digestão enzimática (17). Posteriormente, conseguiu-se o isolamento de DPSC a partir de dentes não extraídos, por meio da pulpectomia, realizada durante o tratamento endodôntico (19-21).

Quando foram descobertas, as DPSC foram isoladas a partir de indivíduos jovens, de até 29 anos de idade (9). Posteriormente observou-se, contudo, que 30 anos não deveria ser considerada uma idade limite para isolamento de DPSC, pois essas células foram isoladas com sucesso de pacientes com até 45 anos de idade (22).

Além disso, DPSC podem ser congeladas por longos períodos sem que percam seu perfil imunofenotípico nem suas propriedades de proliferação e diferenciação (22-24). DPSC induzidas à diferenciação osteogênica também preservaram suas características diferenciadas após congelamento e descongelamento (23).

Sabe-se, entretanto, que na polpa dental, não há apenas DPSC, mas uma população heterogênea de células com diferentes funções. Embora, por definição, as células pulpares intrínsecas sejam provenientes do ectomesênquima, células endoteliais e da crista neural penetram na polpa em desenvolvimento. Assim, na polpa adulta, é encontrada uma mistura de células que inclui células semelhantes a fibroblastos (também chamados pulpoblastos), células relacionadas a reações imunológicas (linfócitos, macrófagos e células dendríticas), células nervosas, células vasculares e perivasculares e células indiferenciadas (células-tronco). A maioria dessas células, com exceção das células nervosas, conserva seu potencial mitótico, mesmo no tecido adulto (15), embora um ensaio de formação de colônia tenha

demonstrado que, na polpa dentária, uma população muito pequena de células é clonogênica (9).

Dessa forma, multiplicam-se, em conjunto, diferentes tipos celulares numa cultura de células da polpa dental e, em cultura, a morfologia de todos eles é muito semelhante. Como muitos estudos de engenharia de tecidos buscam empregar uma população purificada de células-tronco pulpares, utilizam-se diferentes estratégias para sua separação. Entre elas, destacam-se a separação pelo reconhecimento dos antígenos da superfície celular por citometria de fluxo (10, 22) e a separação de células marcadas com anticorpos associados a microesferas magnéticas (21, 25, 26).

Diferentes marcadores de superfície já foram descritos para a identificação das células-tronco da polpa dental: STRO-1 (marcador de células-tronco de estroma de medula óssea), CD29 (integrina beta 1), CD44 (receptor de adesão celular), CD105 (o mesmo que SH2, receptor endoglina), CD73 (5'-ectonucleotidase, que contém as porções SH3 e SH4), CD90 (glicoproteína de superfície Thy-1), CD 146 (o mesmo que S-endo-1, P1H12, Mel-CAM, e MUC18, glicoproteína de adesão de células endoteliais), CD117(o mesmo que c-kit, receptor de tirosina quinase), CD166 (o mesmo que ALCAM, molécula de adesão de células leucocitárias ativadas) (9, 16, 19, 22, 27-30). Geralmente descreve-se que essas células não expressam os marcadores CD45 (proteína tirosina fosfatase, marcador de leucócitos), CD34 (glicoproteína hematopoiética de adesão intercelular, marcador de células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais), CD14 (co-receptor de moléculas associadas a patógenos, marcador de monócitos e macrófagos) ou CD11b (integrina beta-2, marcador de monócitos e macrófagos), CD31 (o mesmo que PECAM-1, molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais-1), CD106 (o mesmo que VCAM-1, molécula de adesão de células vasculares 1), CD133 (glicoproteína prominina), CD79 (imunoglobulina , marcador de células B) ou CD19 (imunoglobulina, marcador de células B) e HLA-DR (antígenos de leucócitos humanos, marcador de células-tronco mesenquimais estimuladas) (8, 30-32). O Comitê de Células-tronco Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs como critérios mínimos para a identificação de células-tronco mesenquimais, além da aderência a plásticos de cultura e a multipotência, a expressão dos antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90, e a ausência de

expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (8). Entre os marcadores descritos, STRO-1 destaca-se por ser um dos mais empregados na identificação de DPSC (9, 21, 25, 28).

*In vitro*, as células-tronco da polpa dental, além de se diferenciarem em odontoblastos, já foram induzidas, em diversos estudos, às diferenciações osteogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica (12, 16, 19, 20, 33, 34). Já se alcançou também a diferenciação endodérmica de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes e decíduos. Tratadas com meio indutor, essas células foram diferenciadas, *in vitro*, em hepatócitos, exibindo características morfológicas e funcionais desse tipo celular (35). Além disso, já se relatou diferenciação em tecidos epiteliais, como endoteliócitos (36) e epitélio da córnea (37).

Discute-se que, para a engenharia de tecidos, os elementos-chave seriam, além das células-tronco, um arcabouço ou matriz (*scaffold*) e os sinais morfogenéticos capazes de induzir a diferenciação celular (38). Esses arcabouços teriam as funções de promover a adesão das células, manter o espaço constante, determinar as características morfológicas e agir como um meio de difusão de oxigênio e outros nutrientes, sendo ao mesmo tempo, não imunogênicos e bioabsorvíveis (33). Entre os diversos materiais que têm sido estudados com esta finalidade, destacam-se o colágeno (17, 24, 39), o pó cerâmico de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) (9, 24, 40), os polímeros poliglicolato/poli-L-lactato (PLGA/PLLA) e de poli-L-lactato-co-glicolato (PLGA) (38, 41) e a matriz dentinária tratada (34, 42).

Presume-se que a regeneração pulpar será uma das primeiras terapias envolvendo engenharia de tecidos com células-tronco da polpa dental a ser mais largamente empregada. Isso se deve à menor complexidade da reconstrução do tecido pulpar que de um dente por completo por engenharia de tecidos e ao fato de que a nova polpa produzida permaneceria protegida da contaminação por estar posicionada dentro do dente (43).

Desde a descoberta das DPSC, já se tem conseguido induzir, experimentalmente a formação de estruturas semelhantes ao complexo dentina-polpa (9, 40). Mais estudos foram realizados na tentativa de desenvolver uma metodologia para produzir, *de novo*, um tecido que pudesse substituir o tecido pulpar

necrosado ou danificado, promovendo a revitalização pulpar (44-46). DPSC humanas foram crescidas em arca-bouços poliméricos, inseridas dentro de fragmentos de dentes humanos e transplantadas em camundongos. Formou-se um tecido vascularizado semelhante ao pulpar e houve contínua deposição de tecido dentinário sobre as paredes internas da raiz (44). Em estudo análogo, um tecido semelhante ao pulpar foi gerado *in vivo* após transplante de SHED em matrizes biodegradáveis associadas a fatias de dentina humana (47).

Alguns estudos já ensaiaram a bioengenharia de um órgão dental completo (38, 39, 41). Esses estudos sugerem que as células-tronco dentais, mesmo dissociadas e crescidas em cultura, mantêm a programação de se desenvolverem formando coroas com a forma do dente de que foram extraídas.

Empregando-se células-tronco dentais humanas associadas ao pó cerâmico de HA/TCP, obteve-se, num modelo suíno, a formação de raízes e seus complexos periodontais, funcionalmente capazes de suportar uma coroa de porcelana (48).

Utilizando-se células epiteliais e mesenquimais de um germe dental de camundongo no estágio de capuz, desenvolveu-se uma cultura tridimensional de germe dentário, sobre um gel de colágeno. Após transplante do conjunto para a cavidade bucal *in vivo*, formou-se um dente estruturalmente completo, com a penetração de vasos sanguíneos e fibras nervosas (39).

Germes dentais produzidos por bioengenharia também foram capazes de erupcionar depois de transplantados em alvéolo ósseo artificialmente produzido em diastema de camundongo. Para futuras utilizações desta metodologia ainda se necessita alcançar o controle preciso do crescimento radicular (49).

Os estudos envolvendo as DPSC, entretanto, não visam apenas à regeneração ou reconstrução de estruturas dentais e periodontais danificadas ou perdidas. Essas células têm sido estudadas para a regeneração de outros tecidos.

DPSC têm se mostrado uma fonte potencial para produção de osso. Essas células induzidas à diferenciação, quando transplantadas em modelos animais, formaram tecido ósseo de organização lamelar (18, 22). Células-tronco pulpares de dentes decíduos humanos aceleraram a formação de osso, reconstruindo grandes defeitos ósseos produzidos no crânio de ratos imunocompetentes (27). Também já se explorou o potencial das DPSC na engenharia de osseointegração. DPSC cultivadas sobre superfícies de titânio exibiram o fenótipo de osteoblastos e

produziram tecido calcificado de dureza 1,5 a 3 vezes maior que o formado sobre placas de cultura de poliestireno, favorecendo a osseointegração de implantes (50). Além disso, devido à rápida diferenciação das DPSC em osteoblastos e endoteliócitos sobre superfícies de titânio, especula-se que a utilização dessas células durante a instalação de implantes poderia diminuir o tempo de espera para aplicação de carga sobre os implantes instalados (36).

O transplante de uma camada de células-tronco pulpares isoladas de dentes decíduos humanos e cultivadas *in vitro* foi capaz de reconstruir o epitélio da córnea de coelhos experimentalmente danificado (37).

Conhecendo as similaridades existentes entre a morfogênese dentária e do folículo piloso, células pulpares humanas implantadas dentro de folículos pilosos inativados de rato foram capazes de regenerar os bulbos capilares (51).

Essas células também foram estudadas visando à regeneração cardíaca e, para isso, foram induzidas a se diferenciarem em cardiomiócitos (52). Observou-se também que as DPSC humanas, injetadas no coração de ratos com infarto agudo do miocárdio, melhoraram a função do ventrículo esquerdo, induziram a angiogênese e reduziram o tamanho do infarto (30). Especula-se também que elas seriam de grande utilidade para estimular a vasculogênese para tratar isquemias cardíacas e cerebrais (53).

Células-tronco pulpares isoladas de dentes decíduos humanos, já foram injetadas em cães que apresentavam distrofia muscular na tentativa de induzirem a regeneração do músculo esquelético. Especulou-se que a melhora observada em alguns animais estudados poderia estar relacionada às propriedades imunomodulatórias dessas células (29).

Nesse contexto, uma das grandes vantagens apresentadas pelas células-tronco pulpares quanto ao seu emprego em futuras terapias regeneradoras, bem como na engenharia de tecidos, é sua propriedade imunomodulatória. As DPSC se mostraram imunossupressoras, sendo capazes de inibir a proliferação de células T (16, 54) em maior proporção que células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea (16). Outros estudos utilizaram células-tronco da polpa dental humana em animais não imunossuprimidos e não se verificaram sinais de rejeição (27, 29). Suspeita-se que os efeitos inibidores sobre as células T se devam à secreção parácrina de fatores solúveis e citocinas (55). Dessa forma, sua utilização não

levaria à rejeição mediada por células T em alotransplantes ou até em xenotransplantes.

### 1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM DPSC

Visando determinar as funções de múltiplos genes relevantes para a futura utilização terapêutica das DPSC, seus padrões de expressão gênica em comparação com os de células-tronco da medula óssea foram investigados. Em um primeiro estudo, DPSC e BMSC mostraram expressões similares de mais de 4000 genes humanos conhecidos. Identificaram-se poucos genes diferencialmente expressos, sendo mais expressos, em DPSC, o colágeno tipo VIII 1, o fator de crescimento 2 semelhante à insulina, o domínio discordina da tirosina quinase 2, a NAD(P)H menadiona oxirredutase, o homólogo 2 do disco largo de *Drosophila* e a quinase 6 dependente de ciclina. Foram menos expressos a proteína 7 ligante do fator de crescimento semelhante à insulina e o colágeno tipo I 2. Essas diferenças podem estar relacionadas a diferentes processos que levam naturalmente à formação de dentina e osso, respectivamente (56).

Estudo semelhante que comparou a expressão gênica de DPSC e BMSC, por meio de microarranjo de 12814 genes, mostrou a expressão de numerosos genes que codificam componentes da matriz extracelular, moléculas de adesão, fatores de crescimento e reguladores da transcrição. Comparando os padrões verificados para as DPSC com os de BMSC, observaram-se diferenças nos níveis de expressão de genes relacionados à sinalização, comunicação e metabolismo celular (57).

Um importante método para comparar expressões gênicas é a construção de uma biblioteca subtrativa. Ela consiste em uma biblioteca enriquecida de clones de cDNA que estão presentes em um tecido, população ou condição experimental e ausentes em outro. Uma estratégia de construção de uma biblioteca subtrativa é a hibridação subtrativa seguida por reação da polimerase em cadeia (PCR). Ela permite comparar duas populações de RNA mensageiro (mRNA) e obter clones de genes que são diferencialmente expressos em cada uma das populações.

#### 1.4 USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA PARA BIOESTIMULAÇÃO DE DPSC

Embora o alto poder de proliferação e diferenciação seja uma característica inerente às DPSC, alguns estudos visando à bioengenharia, pesquisam condições que favoreçam e intensifiquem essas propriedades. Com essa finalidade, o laser de baixa potência (LBP) tem sido investigado.

A irradiação LBP tem sido relatada como sendo responsável pela promoção de efeitos estimuladores e moduladores *in vitro* e *in vivo*, intensificando o crescimento celular, aumentando o metabolismo, melhorando a regeneração de células e invocando uma resposta anti-inflamatória (58). Um efeito modulador foi observado em dentes irradiados com LBP, que tiveram níveis mais baixos de dor pulpar em comparação com os dentes expostos ao tratamento placebo (59). O LBP também acelerou a regeneração da dentina após exposição da polpa dentária (60, 61).

Tem-se relatado a utilização do LBP para aumentar o número de células-tronco *in vitro* e para induzir sua diferenciação em certos tipos celulares (62). Já se observou também que células-tronco da polpa dental humana responderam positivamente à irradiação com LBP, aumentando a proliferação, quando cultivadas em condições de déficit nutricional (63). Já se havia previamente demonstrado que, assim como a dose de irradiação, a densidade de potência também influencia a bioestimulação promovida pelo laser em cultura de células (64).

Tem-se descrito que a irradiação com LBP modula a atividade celular por alguns mecanismos postulados. Propõe-se que ele excita moléculas da cadeia respiratória mitocondrial, intensificando a formação de um gradiente de prótons na membrana da mitocôndria. Ele aumenta a proliferação das células por meio do aumento da liberação de cálcio para o citoplasma, o que desencadeia a mitose. A mitose é desencadeada por um aumento de curto prazo no pH intracelular, o que desencadeia sinais mitogênicos e também aumenta a produção de ATP (65, 66).

Numa recente revisão de 32 estudos sobre laserterapia, concluiu-se que: a) para efeitos biológicos, os comprimentos de onda do laser devem ser vermelho ou infravermelho (600-1200 nm); b) para efeitos moduladores, as fluências de energia

entre 0,05 e 10 J/cm<sup>2</sup> induzem a proliferação enquanto energias superiores (> 10 J/cm<sup>2</sup>) produzem efeitos antiproliferativos (67).

## 1.5 INFLAMAÇÃO PULPAR E DPSC

Até 2010, todos os estudos realizados com DPSC as isolavam a partir de dentes hígidos, sem quaisquer sinais de inflamação pulpar. Até então, nunca se havia investigado o potencial dessas células extraídas de dentes que apresentavam quadro clínico de inflamação.

A inflamação pulpar constitui um mecanismo pelo qual o complexo dentina-polpa responde ativamente aos estímulos nocivos que afetam o dente. Entre os fatores nocivos a esse complexo, destacam-se o traumatismo dentário, a exposição a substâncias irritantes, as lesões de cárie, e formas de exposição direta ou indireta da polpa dentária ao meio bucal, considerado um meio essencialmente contaminado (68).

A interação entre a extensão da lesão tecidual e a resposta específica do hospedeiro dentro do ambiente inflexível da câmara pulpar resulta em um amplo espectro de eventos inflamatórios. A difusão dos ácidos, outros metabólitos bacterianos e compostos irritantes de outra natureza inicialmente é neutralizada pela solubilização de componentes da matriz dentinária. Os odontoblastos são ativados a produzir dentina terciária, reacional ou reparadora, como uma forma de reparar o dano causado e afastar a polpa do local de injúria. Quando os odontoblastos são danificados ou não são mais capazes de reparar sozinhos a lesão, células-tronco ou progenitoras são recrutadas para desempenhar esse papel (68).

Quando fatores irritantes provocam dano severo à polpa dental, o quadro inflamatório instalado pode ser irreversível, caracterizando-se por alterações no fluxo sanguíneo, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, aumento na pressão intrapulpar, função de células imunocompetentes e atividade neuronal. A irreversibilidade da inflamação está relacionada à incapacidade de os mecanismos de defesa do organismo reverterem esse processo, mesmo após a eliminação dos fatores causais. Até o momento, não se estabeleceu, para esses casos, um



tratamento adequado para induzir a regeneração pulpar e o tratamento recomendado é a remoção completa da polpa dental inflamada para tratamento endodôntico convencional (69-71).

Clinicamente, a pulpite irreversível é caracterizada por dor (sintomática) ou história recente (assintomática) de dor espontânea, dor intensa e prolongada a estímulos térmicos, verificação clínica ou radiográfica de exposição pulpar ou proximidade da polpa em cavidade aberta ou contendo restauração profunda, ausência de lesão periapical e ausência de sensibilidade à percussão e palpação (72). Entre os fatores algogênicos responsáveis pela intensa dor característica deste quadro clínico, destacam-se os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias ao fermentarem carboidratos (ácidos láctico, acético e propiônico), a amônia, a uréia, o indol e outros ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias proteolíticas. A liberação do lipopolissacarídeo e do ácido lipoteicoico pelas bactérias também leva a ativação de citocinas inflamatórias que sensibilizam intensamente as fibras nervosas. A sensibilização das terminações nervosas também ocorre por mecanismos físicos relacionados ao aumento da pressão intrapulpar resultante da inflamação (71).

Nem sempre é possível estabelecer um diagnóstico preciso da condição histopatológica da polpa a partir dos sinais e sintomas clínicos, que atualmente são a única forma de diagnosticá-la de forma não invasiva. Além disso, ainda pouco se conhece dos mecanismos que levam à irreversibilidade da pulpite.

Já se observou que o fator de necrose tumoral alfa (TNF), citocina pleiotrópica pró-inflamatória, está presente em maiores concentrações na polpa dental com pulpite irreversível sintomática, em concentrações um pouco menores na assintomática e em ainda menores concentrações na polpa normal. A expressão do gene dessa citocina também foi verificada em maior proporção em casos com pulpite irreversível que em casos de inflamação reversível, mostrando que a expressão de TNF seria um indicativo da severidade da inflamação (68). Em experimentos com ratos, detectou-se uma queda na expressão da proteína na fase tardia da pulpite irreversível, quando o tecido já estaria progredindo para necrose (73).

Especula-se que uma das possíveis causas da irreversibilidade da pulpite estaria relacionada ao fato de o TNF induzir um aumento nos níveis de fator de crescimento endotelial vascular e de ativador de plasminogênio tecidual nos

fibroblastos da polpa, o que poderia contribuir para a destruição dos tecidos pulpare (74, 75).

Tem-se descrito que a enzima óxido nítrico sintase, tipos endotelial e induzível, desempenha importante papel na patogênese da pulpíte. O óxido nítrico produzido por elas, quando expresso moderadamente, apresenta função antimicrobiana e de modulação imunológica. Em nível elevado, entretanto, pode ser tóxico aos tecidos pulpare e aumentar exageradamente a vasodilatação e a permeabilidade vascular. Embora o tipo epitelial esteja presente na polpa dental normal, sua elevação está relacionada a condições patológicas. O tipo induzível, não detectado em condições normais, encontra-se elevado em casos de inflamação aguda, podendo ser um dos fatores determinantes da pulpíte irreversível (69).

Embora a inflamação pulpar tenha sido considerada, por muitos anos como um efeito indesejável, levando à destruição desse tecido por necrose ou apoptose, estudos mais recentes sugerem que mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, regulem a proliferação e a sobrevivência de todos os tipos de células presentes na polpa dental, inclusive das células progenitoras. A reação inflamatória é considerada um pré-requisito para a ativação das células-tronco na reparação pulpar (13).

Demonstrou-se que o lipopolissacarídeo bacteriano e o fator de necrose tumoral (TNF) ativaram, nas DPSC, *in vitro*, a transcrição do fator nuclear kappa B, fator de transcrição que regula vários mediadores inflamatórios, incluindo TNF, e as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 (76).

Recentemente, alguns estudos, buscando outras possíveis fontes de célula-tronco para futuras aplicações em engenharia de tecidos, identificaram células mesenquimais viáveis na polpa dental inflamada. Esses estudos descreveram que essas células provavelmente apresentavam propriedades de células-tronco limitadas (20, 21). Células-tronco também têm sido identificadas em tecidos periapicais inflamados. (77).

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Embora o avançado desenvolvimento tecnológico no campo da Odontologia já permita substituir tecidos bucais por restaurações em diferentes materiais, implantes osteointegráveis, próteses que restabelecem função e estética, enxertos de variadas fontes, entre outras tecnologias, o conceito que mais se aproximaria da verdadeira reabilitação seria o de reconstituir a arquitetura original e a função biológica (78). O estudo das células-tronco, compreendendo seu potencial regenerador e dominando as técnicas de engenharia de tecidos possibilita exercer a reabilitação mais fisiológica.

Durante o quadro de pulpíte irreversível, as células da polpa podem entrar em gradual degeneração, mas pouco se conhece a respeito do comportamento das células-tronco presentes nesse tecido. A viabilidade das células-tronco estaria comprometida na pulpíte irreversível? Seriam essas células apropriadas para utilização em engenharia de tecidos? A irreversibilidade da pulpíte estaria associada ao comprometimento das células-tronco pulpares? A resposta a esses importantes questionamentos poderia ampliar as possibilidades de intervir nesse processo com a criação de possíveis terapias mais conservadoras.

Além disso, independentemente de futuras terapias que se possam desenvolver para pulpites, confirmando-se a viabilidade e o potencial das células-tronco em polpas dentais consideradas irreversivelmente inflamadas, estas, sendo removidas durante o tratamento endodôntico convencional, poderão constituir importante fonte de células-tronco para engenharia de tecidos e terapias regeneradoras.

## **2. OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar comparativamente as células da polpa dental normal e inflamada quanto à presença de células-tronco (mesenquimais), seu potencial de proliferação e diferenciação e quanto ao padrão de expressão gênica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar células-tronco (mesenquimais) de polpas de dentes normais (DPSC-N) e com inflamação (DPSC-I);
2. Comparar os perfis imunofenotípicos de DPSC-N e DPSC-I;
3. Comparar a proliferação e a morfologia de DPSC-N e DPSC-I;
4. Comparar seu potencial de diferenciação odonto-osteogênica, adipogênica e condrogênica de DPSC-N e DPSC-I;
5. Verificar o efeito do laser de baixa intensidade sobre a proliferação e a diferenciação de DPSC-N e DPSC-I;
6. Construir bibliotecas subtrativas de cDNA de células pulpares de dente normal e com inflamação, visando à identificação de possíveis transcritos diferencialmente expressos.

### **3. MÉTODOS**

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE DENTES HUMANOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília em 07 de abril de 2008, registro 023/2008, CAAE 0020.0.012.000-08 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal / SES-DF em 08 de março de 2010, registro 34/2010 (Anexos A e B).

A coleta de dentes para a pesquisa foi feita na Clínica Odontológica do Hospital Regional de Sobradinho e na Odonto Norte 712 Clínica Odontológica Ltda após ciência institucional.

Após consentimento livre e esclarecido dos indivíduos (formulário no Apêndice A), dentes permanentes hígidos extraídos por indicação ortodôntica ou como opção de tratamento em casos de inflamação pulpar (pulpite irreversível) foram doados para o estudo. Polpas dentais inflamadas foram coletadas de dentes com pulpite irreversível durante o tratamento endodôntico. Para serem incluídos na pesquisa, os indivíduos deveriam relatar ter boa saúde geral, não apresentando problemas sistêmicos.

Para seleção das amostras, o exame clínico dos pacientes doadores de tecidos pulpares foi realizado imediatamente antes da extração ou tratamento endodôntico. Foram considerados dentes hígidos aqueles que se apresentavam assintomáticos, com superfície íntegra e vitalidade pulpar, aferida com gás refrigerante (diclorotetrafluoroetano, Endo-Frost; Roeko, Langenau, Alemanha) aplicado em pontas de algodão na coroa dental. Eles não apresentavam lesões de cárie, erosão, abrasão nem fratura. Os dentes com pulpite aguda irreversível incluídos neste estudo apresentavam vitalidade pulpar e intensa dor espontânea associada a extensa lesão de cárie, muito próxima à polpa dental. Foram excluídos deste estudo dentes com pulpites crônicas (hiperplásica ou ulcerativa) ou que já apresentavam sinais de transição para necrose pulpar, como liquefação da polpa dental. Na Tabela 01 estão descritas as amostras de polpa dental coletadas.

**Tabela 01** - Caracterização das amostras de tecido pulpar coletadas

Grupo	Indivíduo	Sexo	Idade	Média (±DP)	Dente	Forma de coleta
PN	1	JNS	Feminino	17	28	Dente extraído
PN	2	KSM	Feminino	21	18	Dente extraído
PN	3	NRC	Feminino	17	22,67	Dente extraído
PN	4	AAG	Feminino	20	(±6,3)	Dente extraído
PN	5	FFM	Masculino	31	48	Dente extraído
PN	6	TBA	Feminino	30	38	Dente extraído
PI	1	CHCS	Feminino	26	26	Pulpectomia
PI	2	MG	Feminino	26	38	Pulpectomia
PI	3	TAA	Feminino	42	28,5	Pulpectomia
PI	4	CSBP	Feminino	38	(±11,2)	Dente extraído
PI	5	MAA	Feminino	29	24	Dente extraído
PI	6	RSO	Masculino	10	46	Dente extraído

PN: Polpa normal; PI: Polpa inflamada; DP: Desvio padrão

### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS PULPARES

Para a coleta de polpas dentais de dentes extraídos, imediatamente após a extração de cada dente, foi feito um sulco longitudinal no dente utilizando um disco diamantado dupla face (KG Sorensen ref. 7020) em baixa rotação de forma a evitar que se atingisse a cavidade pulpar. Em seguida, o dente foi fracionado e tecido pulpar coronário e radicular foi cuidadosamente removido utilizando curetas de dentina.

Para a coleta de polpas dentais de dentes submetidos a tratamento endodôntico, a cavidade pulpar foi acessada utilizando pontas diamantadas números 1012 e 3081 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação sob irrigação. O tecido pulpar foi coletado utilizando lima endodôntica tipo H de primeira série (Maillefer, Ballagues, Suíça). Os tecidos pulpares coletados foram imediatamente imersos em microtubo contendo meio de cultura ALPHA-MEM (GIBCO-BRL), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO-BRL) e 3% de solução de penicilina e estreptomicina (100 µg/mL) (GIBCO-BRL). O material, protegido do calor em caixa de isopor, foi imediatamente transportado ao Laboratório de



Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília para processamento.

As culturas de células de polpa dentária hígida e inflamada foram estabelecidas conforme descrito por Gronthos *et al.*(9). O tecido pulpar de 6 polpas híginas e 6 polpas inflamadas foi imerso em meio de cultura foi, em seguida, digerido enzimaticamente em solução de colagenase tipo I (3 mg/mL) (de *Clostridium histolyticum* – GIBCO-BRL) em meio de cultura suplementado (acima citado), durante 1 hora a 37° C. Em seguida, a suspensão de células obtida foi centrifugada a 750 x g por 5 minutos, lavada em meio de cultura e passada para placa de 6 poços contendo meio de cultura suplementado. As culturas de células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Para estabelecimento de subculturas, as células foram soltas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA (GIBCO-BRL) por três minutos a 37 °C. A suspensão de células era transferida para um tubo de centrífuga contendo meio de cultura com SFB para inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada a 750 x g por 5 minutos.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA

Para determinar se o meio e cultura para as células pulpares seria suplementado com 10% ou 20% de soro fetal bovino (SFB) e comparar a proliferação das células da polpa dental normal (3 amostras – PN4, PN5 e PN6) e inflamada (3 amostras – PI4, PI5 e PI6), na terceira passagem, foram passadas, em triplicata, para cada concentração de SFB, 2 x 10<sup>3</sup> células por poço de 3 placas de 48 poços. A avaliação do crescimento foi feito por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT formando o formazan, um produto de cor arroxeada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

Após os períodos de 48, 72 e 96 horas, o meio de cultura foi removido e 300 µL de meio de cultura contendo 5 mg/mL de reagente MTT (Invitrogen) foram adicionados e as placas de cultura foram incubadas por 3 horas na estufa de cultivo. Após esse período, o meio foi removido e foram adicionados 300 µL de DMSO (dimetilsulfóxido – Mallinckrodt Chemicals) por poço. Após 10 minutos, foi feita a leitura da absorbância das placas a 595 nm. Por meio da análise comparativa dos valores de absorbância, foi possível inferir sobre o crescimento celular em cada grupo e selecionar a concentração de soro utilizada no cultivo das células nos demais experimentos.

### 3.3.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad®. Para comparar o crescimento celular observado nas duas concentrações de soro empregadas, foi realizado, para as células de cada amostra e em cada tempo experimental, o teste t de *Student*. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 3.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA

As células de polpa dental normal (3 amostras – PN1, PN2 e PN3) e inflamada (3 amostras – PI1, PI2 e PI3), na terceira passagem, cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, foram observadas e fotografadas ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 32X e sistema de captura digital.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA MULTICELULAR DE POLPA DENTÁRIA NORMAL E INFLAMADA QUANTO À EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE STRO-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Essa caracterização celular foi feita conforme previamente descrito (21) com algumas modificações. As células de polpa dental normal (3 amostras – PN1, PN2 e PN3) e inflamada (3 amostras – PI1, PI2 e PI3), na terceira passagem, foram soltas do fundo do frasco utilizando-se solução de tripsina-EDTA, centrifugadas, ressuspendidas em meio de cultura, contadas em camada de Neubauer e ressuspendidas em PBS (solução salina tamponada, pH 7,2) numa densidade celular de  $5 \times 10^5$  células/mL. As células foram lavadas duas vezes para remover o meio de cultura, por meio de centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos e ressuspensão em 1 mL de PBS e bloqueadas em 1 mL de PBS contendo 10% de SFB (GIBCO-BRL) por 60 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e incubadas, por 60 minutos a 4°C, com 10 µL de anticorpo primário anti-STRO-1 (IgM monoclonal produzida em camundongo – Invitrogen, 39-8401), na concentração de 1:10 em PBS com 2% de SFB. Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes em PBS com 2% de SFB e incubadas por 30 minutos a 4 °C, protegidas da luz, com 25 uL do anticorpo policlonal secundário (anti-IgM de camundongo produzido em coelho e conjugado com isotiocianato de fluoresceína -FITC - FK Biotec) na concentração de 1:25 em PBS com 2% de SFB. Após a marcação secundária, as células foram lavadas três vezes e ressuspendidas em 1 mL de PBS. Foram preparados, na mesma densidade celular, dois controles negativos com as células de cada amostra. No primeiro controle não houve incubação com anticorpo, e no segundo, utilizou-se apenas o anticorpo secundário. Na etapa correspondente a cada marcação, as células dos controles foram incubadas com PBS com 2% de SFB. Imediatamente após o processamento descrito, as células, mantidas em gelo e protegidas da luz, foram levadas ao citômetro de fluxo Cyflow Space (Partec GmbH, Münster, Alemanha) e analisadas utilizando os programas Flowmax<sup>®</sup> e FlowJo<sup>®</sup>. Foram adquiridos 40.000 eventos. Consideraram-se marcadas as células que apresentavam fluorescência superior à detectada nos grupos controle.

### 3.5.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad<sup>®</sup>. O percentual considerado de células marcadas com anticorpo anti-STRO-1 foi obtido subtraindo dele o percentual de células com marcação inespecífica (marcadas apenas com o anticorpo secundário). Para comparar as médias percentuais de células marcadas entre as amostras de polpa normal e de polpa inflamada, foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 3.6 SEPARAÇÃO MAGNÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO PULPARES (STRO-1-POSITIVAS)

Considerando que STRO-1 é um importante marcador de superfície descrito em células-tronco pulpares (9, 21), buscou-se utilizar, nos experimentos seguintes, células que o expressavam. Para obter populações de células de polpa normal e inflamada enriquecidas de células que expressavam STRO-1, utilizou-se o método de isolamento magnético positivo *Dynabead* (Invitrogen) conforme descrito anteriormente(21) e recomendado pelo fabricante. As células de polpa dental normal (3 amostras – PN1, PN2 e PN3) e inflamada (3 amostras – PI1, PI2 e PI3), na terceira passagem, foram soltas do fundo do frasco utilizando-se solução de tripsina-EDTA. Após serem lavadas com PBS,  $8 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 800  $\mu$ L de tampão 1 (PBS contendo 0,1% de albumina sérica bovina e 2 mM de EDTA). Em seguida, adicionou-se 1  $\mu$ g de anticorpo anti-STRO-1 humano (IgM monoclonal produzida em camundongo – Invitrogen, número de catálogo 39-8401) diluído em tampão 1 e as células foram incubadas por 20 minutos a 4<sup>o</sup> C com leve agitação. Depois de lavadas com 2 mL de tampão 1 e centrifugadas a 300 x g por 8 min, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão 1 contendo  $10^7$  partículas ligadas a anticorpos anti-IgM de camundongo (*Dynabeads* – Invitrogen, cat. 11039D, Carlsbad, CA, EUA), sendo incubadas 20 minutos a 4<sup>o</sup> C com inclinação suave e rotação, o volume foi duplicado e as células ligadas à partículas magnéticas foram capturadas por uma estante magnética (Dynal MPC-E-

1, Invitrogen, n. 120.07) durante 2 minutos. As células do sobrenadante (STRO-1-negativas) foram coletadas para contagem em câmara de Neubauer. As populações enriquecidas de células STRO-1-positivas foram, então, gentilmente lavadas, quatro vezes, com tampão 1, ressuspensas em meio regular e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Antes de as células serem passadas para a garrafa de cultura, uma alíquota de 10 µL foi separada para contagem em câmara de Neubauer. As populações de células STRO-1-positivas foram consideradas neste estudo como células-tronco da polpa dental (DPSC).

### 3.6.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad<sup>®</sup>. Para se estimar o percentual de células de cada amostra marcadas com anticorpo anti-STRO-1, analisaram-se os valores obtidos na contagem em câmara de Neubauer ao final da separação magnética. Para comparar os percentuais de células STRO-1-positivas separadas entre as três amostras de polpa normal e as três de polpa inflamada, foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 3.7 IMUNOFENOTIPAGEM DE DPSC-N E DPSC-I POR CITOMETRIA DE FLUXO

Realizou-se a imunofenotipagem das células STRO-1-positivas usando um conjunto pré-definido de marcadores proteicos. DPSC-N1 e DPSC-I1, na passagem 3, foram colhidas por tratamento com *Tryple Express* 0,25% (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), lavadas com PBS (pH 7,4), coradas com os anticorpos monoclonais seleccionados e incubadas, no escuro, durante 30 minutos a 4 °C. As células foram, então, lavadas e fixadas com paraformaldeído a 1%. Os seguintes anticorpos anti-humano foram utilizados: CD14-FITC, CD29-PE, CD31-PE, CD34-PE, CD44-PE, CD73-PE, CD90-

APC, CD106-FITC, CD166-PE, CD117-APC (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), CD45-PerCP-Cy5, HLA-DR-PerCP-Cy5 (Biosciences, San Jose, CA, EUA), CD105-PE (Chemicon, Temecula, CA, EUA), CD133-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Anticorpos do mesmo subtipo foram utilizados como controles.

Foram adquiridos, aproximadamente, 12000 eventos, utilizando-se o citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA). As análises foram feitas com o programa FACSDIVA (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) ou FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

### 3.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE DPSC-N E DPSC-I

Para comparação morfológica, foram passadas DPSC-N (3 amostras – N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 amostras – I1, I2 e I3), na terceira passagem, para duas placas de 24 poços numa densidade celular de  $2 \times 10^4$  células por poço contendo 1 mL de meio de cultura.

Após 48 e 72 horas de cultura, as células foram fotografadas ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 32X e sistema de captura digital. Após essa primeira análise, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS, e coradas com 1 mL de corante de Giemsa (Dolex, Brasil) por 20 minutos. Após serem lavadas cinco vezes com PBS, 1 mL de PBS foi deixado sobre as células e elas foram imediatamente fotografadas ao mesmo microscópio.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE DPSC-N E DPSC-I

Para comparação do potencial proliferativo, foram passadas DPSC-N (3 amostras – N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 amostras – I1, I2 e I3), na terceira passagem, para quatro placas de 96 poços numa densidade celular de  $10^4$  células por poço

contendo 200 µL de meio de cultura. Após períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT, como descrito anteriormente (item 3.3). A viabilidade celular foi inferida pela medição da absorbância do lisado celular a 595 nm usando um espectrofotômetro (SpectraMax M2).

### 3.9.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad®. Os resultados foram analisados de forma individualizada e agrupada (considerando-se as médias de DPSC-N e DPSC-I). Para todos os experimentos, os valores de absorbância foram normalizados em percentuais dos observados no tempo de 24 horas. Para comparar os grupos na análise individualizada, foram empregados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn com  $P < 0,05$ . Na análise agrupada, obtiveram-se as médias dos percentuais de proliferação relativa no tempo de 96 horas (variação de percentual de 24 a 96 horas), que foram comparadas por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 3.10 ENSAIO DE CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

Como uma das formas de avaliar comparar o potencial proliferativo das células-tronco da polpa dental normal e inflamada, realizou-se o ensaio de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) conforme previamente descrito (19). As DPSC derivadas de polpa normal (3 amostras – DPSC-N1, N2 e N3) e inflamada (3 amostras – DPSC-I1, I2 e I3), na terceira passagem, foram passadas para placas de seis poços, em densidade de 40 células/poço, em quadruplicata. Depois de duas semanas em cultura, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% (Vetec) em PBS por 15 minutos e coradas com cristal

violeta 3% (Sigma) por 5 minutos. Após serem lavadas duas vezes com água destilada, foram contadas as colônias visíveis a olho nu, que apresentavam mais de 50 células.

### **3.10.1 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad®. As eficiências percentuais de formação de colônias das células de cada amostra foram expressas como o número total de colônias dividido pelo número inicial de células passadas por poço (40 células) e multiplicado por 100 (19). Esses dados foram comparados realizando-se uma ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey.

Os resultados também foram expressos de forma agrupada, considerando a média das eficiências observadas em DPSC derivadas de polpa dental normal e de polpa inflamada. Para comparar esses resultados, foi empregado o teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **3.11 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO**

### **3.11.1 Indução de Diferenciação Odonto-osteogênica**

O ensaio de diferenciação odonto-osteogênica foi realizado conforme protocolo já descrito (79). Foram passadas  $2 \times 10^4$  DPSC derivadas de polpa normal (3 amostras – DPSC-N1, N2 e N3) e inflamada (3 amostras – DPSC-I1, I2 e I3), na terceira passagem, para cada poço de cinco placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura. Após atingida a confluência celular, metade dos poços de cada placa foram mantidos como controle negativo, recebendo apenas 1 mL de meio de cultura. A outra metade passou a receber 1 mL de meio odonto-osteogênico (dexametasona 10 nM (Sigma), -glicerofosfato de sódio 10 mM (Sigma) e ácido



ascórbico 50 µg/mL (Sigma) em meio de cultura, que foi trocado a cada 3 dias.

Após 21 dias de indução de diferenciação, duas placas tiveram o meio de cultura removido, as células foram lavadas 3 vezes com 0,5 mL de PBS, fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 4% em PBS, lavadas 3 vezes com PBS, coradas por 10 minutos com 0,5 mL do corante pra tecidos calcificados vermelho de Alizarina 40 mM pH 4.2 (Sigma) à temperatura ambiente, lavadas 5 vezes com 1 mL de água destilada para remover o excesso de corante e lavadas por 15 minutos com 1 mL de PBS para reduzir a coloração inespecífica. Para quantificar o corante aderido ao tecido calcificado de cada amostra, foi feita uma descoloração com 0,5 mL de cloreto de cetilpiridínio 10% em solução de fosfato de sódio 10 mM pH 7 (Farmogral, Brasília) por 15 minutos à temperatura ambiente. A quantidade de corante presente na solução de descoloração foi determinada por meio da medida da absorbância a 562 nM e comparação com soluções-padrão com concentrações conhecidas de vermelho de Alizarina.

Uma placa teve as células fixadas e coradas com vermelho de Alizarina conforme descrito acima para análise morfológica ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 32X e sistema de captura digital.

Além disso, foi a extração de RNA total das células de duas placas para verificar, por reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, a expressão do gene da sialofosfoproteína de osso (*BSP*), evidenciando a diferenciação odontogênica e permitindo a quantificação e comparação dos resultados das diferentes amostras.

#### 3.11.1.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad®. Para comparar a produção de tecido calcificado pelas diferentes amostras de células, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn ( $P < 0,05$ ). Para comparação das médias dos valores obtidos para as células de polpa normal e de polpa inflamada, foi empregado o teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 3.11.2 Indução de Diferenciação Adipogênica

O ensaio de diferenciação adipogênica foi realizado conforme protocolo previamente descrito (19). Foram passadas  $2 \times 10^4$  DPSC derivadas de polpa normal (3 amostras – DPSC-N1, N2 e N3) e inflamada (3 amostras – DPSC-I1, I2 e I3), na terceira passagem, para cada poço de três placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura. Após atingida a confluência celular, metade dos poços de cada placa foram mantidos como controle negativo, recebendo apenas 1 mL de meio de cultura. A outra metade passou a receber 1 mL de meio adipogênico (insulina 5 mg/mL (Sigma), indometacina 50 mM (Sigma), dexametasona 1 mM (Sigma), isobutil-1-metil xantina 0,5 mM (Sigma), em meio de cultura). No grupo controle, apenas meio de cultura foi usado. O meio foi trocado a cada três dias.

Após 21 dias de indução de diferenciação, as células foram analisadas ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 32X e sistema de captura digital. Uma placa teve o meio de cultura removido, as células foram lavadas 3 vezes com 0,5 mL de PBS, fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 4% e coradas com óleo vermelho O (Sigma) (0,5% em etanol) por 60 minutos para visualização dos vacúolos com lipídeos. Após esse período, elas foram lavadas 2 vezes com 1 mL de água destilada para remover o excesso de corante. Após a secagem, as células foram analisadas ao mesmo microscópio invertido.

Além disso, foi realizada a extração de RNA total das células de duas placas para verificar, por PCR em tempo real, a expressão do gene da lipoproteína lipase (*LPL*), evidenciando a diferenciação adipogênica e permitindo a quantificação e comparação dos resultados das diferentes amostras.

### 3.11.3 Indução de Diferenciação Condrogênica

O ensaio de diferenciação condrogênica foi realizado conforme protocolo previamente descrito (80). Foram passadas  $2 \times 10^4$  DPSC derivadas de polpa normal (3 amostras – DPSC-N1, N2 e N3) e inflamada (3 amostras – DPSC-I1, I2 e I3), na

terceira passagem, para cada poço de três placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura. Após atingida a confluência celular, metade dos poços de cada placa foram mantidos como controle negativo, recebendo apenas 1 mL de meio de cultura. A outra metade passou a receber 1 mL de meio condrogênico (ácido ascórbico 50 µg/mL (Sigma), insulina 6,25 µg/mL (Sigma) e TGF- 10 ng/mL (R&D Systems, Indianópolis, EUA) em meio de cultura). No grupo controle, apenas meio de cultura foi usado. O meio foi trocado a cada três dias.

Após 21 dias de indução de diferenciação, as células foram analisadas ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 32X e sistema de captura digital. Uma placa teve o meio de cultura removido, as células foram lavadas 3 vezes com 0,5 mL de PBS, fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 4% e coradas com Azul de Alcian (Sigma) (1% em ácido acético 3% pH 2,5) por 2 horas para coloração da mucopolissacarídeos da matriz intracelular. Após esse período, elas foram lavadas com 1 mL de ácido clorídrico 0,1 M e duas vezes com PBS. As células foram analisadas ao mesmo microscópio invertido.

Além disso, foi realizada a extração de RNA total das células de duas placas para verificar, por PCR em tempo real, a expressão do gene da região Y determinante do sexo – caixa 9 (SOX-9), evidenciando a diferenciação condrogênica e permitindo a quantificação e comparação dos resultados das diferentes amostras.

#### **3.11.4 Extração de RNA**

As células de duas placas tiveram o RNA total extraído com 0,5 mL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) por poço, conforme as recomendações do fabricante. Os lisados celulares dos quatro poços de cada amostra foram reunidos em um tubo. Adicionaram-se 400 µL de clorofórmio a cada amostra, misturando-se vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 1 mL de isopropanol e, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (12.000 x g / 10 minutos / 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (7.500 x g / 5 minutos / 4°C). O

sedimento secou à temperatura ambiente e foi ressuspendido em 40 µL de água nanopura. A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em condição livre de RNase e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific).

### **3.11.5 Tratamento do RNA Total com DNase I**

Aproximadamente 10 µg de cada RNA total obtido foi tratado com DNase I livre de RNase (Promega), segundo as recomendações do fabricante, a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. A reação foi realizada a 37° C por 30 minutos com 10 µg de RNA, 10 µL de tampão de reação 10X (Promega), e 10 U da enzima DNase I livre de RNase (Promega), e água nanopura para um volume final de 100 µL. Após esse período, a reação foi parada pela adição de 10 µL do tampão de parada (Promega) e aquecendo-se a 65° C por 10 minutos.

Após a reação, o RNA foi precipitado adicionando-se 10 µL acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 250 µL de etanol e incubando a - 20° C por pelo menos 12h. Após esse período, a suspensão foi novamente centrifugada (12.000 x g / 30 minutos / 4°C), o sedimento foi lavado com etanol 75% (12.000 x g / 5 minutos / 4°C), seco à temperatura ambiente por 30 min e ressuspendido em 20 µL de água nanopura. Após esse procedimento, a integridade do RNA foi novamente verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em condição livre de RNase e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop<sup>®</sup> - Thermo Scientific).

### **3.11.6 Síntese da Primeira Fita de cDNA**

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA já tratado com DNase I, adicionado-se 1 µL de iniciador oligonucleotídeo (dT)<sub>20</sub> (Invitrogen) e água nanopura para um volume final de 13 µL. A mistura foi incubada

a 65° C por 10 minutos e imediatamente após foi colocada no gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão de primeira fita 5X; 1 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M; 1 µL de RNaseOUT® (Invitrogen) e 200 U da enzima transcriptase reversa (SuperScript® III, Invitrogen) incubando-se a 50°C por 60 minutos. Finalmente, a enzima foi desnaturada aquecendo-se a 70°C por 15 minutos.

### 3.11.7 PCR em Tempo Real

Para confirmação das diferenciações celulares e quantificação para comparação do potencial de diferenciação das diferentes amostras, foram realizados experimentos de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por SYBR Green®, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em reações de 10 µL contendo 0,25 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 02), 5 µL de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (Applied Biosystems) e 1 µL do cDNA sintetizado na reação descrita acima. Após a desnaturação inicial a 95°C por 20 s, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 3 s e 60°C por 20 s. A fim de confirmar a especificidade das amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à análise das respectivas curvas de desnaturação. O método de comparação do ciclo limiar (CT- "*cycle threshold*") (81) foi empregado para a avaliação da variação da expressão dos genes que evidenciavam a diferenciação, sendo utilizado o gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) para normalização. O CT é o número do ciclo no qual a quantidade do gene-alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida, definido pelo pesquisador. O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação  $2^{-CT}$ , onde  $CT = (CT_{\text{experimento}} - CT_{\text{controle}})$ , sendo que  $CT_{\text{experimento}} = CT$  do gene de interesse no experimento –  $CT$  do gene constitutivo no experimento e  $CT_{\text{controle}} = CT$  do gene de interesse no controle –  $CT$  do gene constitutivo no controle. O valor calculado nesta equação corresponde à expressão gênica relativa de um gene-alvo numa condição experimental (no caso, de diferenciação) em relação a uma condição controle. Os

experimentos foram realizados em triplicata para todos os genes analisados. Os pares de oligonucleotídeos empregados no experimento foram previamente utilizados em estudos anteriores (20, 82) e estão listados na Tabela 02.

**Tabela 02** - Oligonucleotídeos usados nos experimentos de RT-PCR em tempo real

Diferenciação	Gene		Sequência (5'-3')	Tamanho do produto
Odonto-osteogênica	<i>BSP</i> <sup>(20)</sup>	Senso	AAAGTGAGAACGGGGAACCT	161 pb
		Antissenso	GATGCAAAGCCAGAATGGAT	
Adipogênica	<i>LPL</i> <sup>(20)</sup>	Senso	AGTGGCCAAATAGCACATCC	186 pb
		Antissenso	CCGAAAGATCCAGAATTCCA	
Condrogênica	<i>SOX-9</i> <sup>(82)</sup>	Senso	CACACAGCTCACTCGACCTTG	76 pb
		Antissenso	TTCGGTTATTTTTAGGATCATCTCG	
Gene constitutivo	<i>GAPDH</i> <sup>(20)</sup>	Senso	CAAGGCTGAGAACGGGAAGC	194 pb
		Antissenso	AGGGGGCAGAGATGATGACC	

### 3.11.7.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad®. Os resultados dos experimentos de PCR em tempo real foram expressos como valores de expressão gênica relativa ( $2^{-CT}$ ) ( $\pm$  desvio padrão). Para comparar os dados obtidos para as células das diferentes amostras, foi realizada uma ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Os resultados também foram expressos de forma agrupada, considerando a média das expressões gênicas relativas ( $\pm$  desvio padrão) em DPSC-N e DPSC-I derivadas de polpa dental normal e de polpa inflamada. Para comparar esses resultados, foi empregado o teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 3.12 ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER

Para observar se o laser de baixa potência teria um efeito bioestimulatório, semelhante ao previamente descrito (63), sobre as células-tronco de polpa dental normal e inflamada, DPSC-N (3 amostras – PN1, PN2 e PN3) e DPSC-I (3 amostras – PI1, PI2 e PI3) suspensas em meio regular sem vermelho de fenol (GIBCO-BRL) ( $10^6$  células/mL em 200 mL) foram passadas para poços individuais de placa estéril de 96 poços com fundo em V (Greiner). Realizou-se irradiação com laser a partir do topo do poço a uma distância constante de 15 mm do fundo da placa, usando um laser diodo vermelho de baixa intensidade de InGaAlP (660 nm, MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil). Nos grupos experimentais L1 e L2, as células foram irradiadas com uma potência constante de 28 mW por 10 e 60 segundos, resultado nas fluências de energia de 7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Um potenciômetro (Spectra Physics) foi utilizado para confirmar a potência do laser. O tempo de exposição e os comprimentos de onda foram baseados em estudos anteriores (63, 67).

Para testar a influência do tecido dentinário remanescente numa possível situação clínica em que o laser seria aplicado através da parede pulpar de uma cavidade, foi utilizado um disco de dentina humana. Esse disco foi obtido cortando de um terceiro molar humano hígido, uma fatia horizontal, com espessura de 1 mm, próximo à cavidade pulpar, utilizando um disco diamantado de 300 µm de espessura (Extec Corporation, Enfield, EUA). Esse dente foi mantido em solução de timol 0,1% desde sua extração até o momento de ser cortado. Até a utilização no experimento, a fatia de dentina foi mantida imersa em solução de PBS estéril. Nos grupos experimentais D1 e D2, foram aplicadas as mesmas fluências de laser dos grupos anteriores (7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente), mas a irradiação ocorreu através do disco de dentina humana apoiado sobre o poço da placa, mantendo os mesmos 15 mm de distância entre o fundo da placa e a fonte irradiadora do laser. O potenciômetro mostrou que a interposição do disco de dentina nos grupos D1 e D2 diminuiu a potência total do laser para 0,2 mW e, conseqüentemente, as fluências de energia para 0,05 e 0,30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. No grupo controle negativo (C), as suspensões celulares foram tratadas da mesma forma descrita acima, mas não

foram irradiadas pelo laser. Os parâmetros experimentais descritos acima estão agrupados na Tabela 03.

**Tabela 03** - Parâmetros usados para a irradiação de células-tronco pulpare com o laser de baixa potência

Grupos*	Potência emitida <sup>a</sup> (mW)	Interposição de dentina	Potência final <sup>b</sup> (W)	Tempo de exposição (s)	Energia total <sup>c</sup> (J)	Fluência final (J/cm <sup>2</sup> )
D1	28,0	Sim	$0,2 \times 10^{-3}$	10	0,002	0,05
D2	28,0	Sim	$0,2 \times 10^{-3}$	60	0,012	0,30
L1	28,0	Não	$28,0 \times 10^{-3}$	10	0,280	7,00
L2	28,0	Não	$28,0 \times 10^{-3}$	60	1,680	42,00
C	-	Não	-	-	-	-

\*Grupos nos quais as células das seis amostras (N1, N2, N3, I1, I2, I3) foram distribuídas

<sup>a</sup> Potência do laser ajustada no equipamento;

<sup>b</sup> Potência do laser medida no potenciômetro;

<sup>c</sup> Energia calculada pela multiplicação dos valores de potência final pelo tempo de aplicação;

<sup>d</sup> Fluência final é a energia total emitida sobre uma área determinada.

### 3.12.1 Ensaio de Proliferação de DPSC-N e DPSC-I após Irradiação com Laser

Após a irradiação com o laser, as células de cada amostra (N1, N2, N3, I1, I2 e I3) de cada grupo experimental (L1, L2, D1, D2 e C) foram passadas para placas de cultura para confecção de curva de crescimento por meio do ensaio de MTT e para realização de ensaio de diferenciação odonto-osteogênica.

Para observar o crescimento celular, as células previamente irradiadas foram passadas, em triplicata, para quatro diferentes placas de 96 poços de cultura numa densidade celular de  $10^4$  células por poço. Após períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT, como descrito anteriormente (item 3.3). O número relativo de células viáveis foi determinado pela medição da absorbância do lisado celular a 595 nm usando um espectrofotômetro (SpectraMax M2).



### **3.12.2 Ensaio de Diferenciação Odonto-osteogênica de DPSC-N e DPSC-I após Irradiação com Laser**

Para o ensaio de diferenciação odonto-osteogênica, as células de cada amostra (N1, N2, N3, I1, I2 e I3) de cada grupo experimental (L1, L2, D1, D2 e C), previamente irradiadas, foram passadas, em triplicata, para quatro diferentes placas de 96 poços de cultura. Após atingida a confluência, elas foram cultivadas em meio de indução odonto-osteogênica, conforme descrito no item 3.11.1.

Após 21 dias de indução de diferenciação, a formação de nódulos mineralizados foi observada e quantificada pelo ensaio de coloração com vermelho de Alizarina, conforme descrito no item 3.11.1.

### **3.12.3 Análise Estatística**

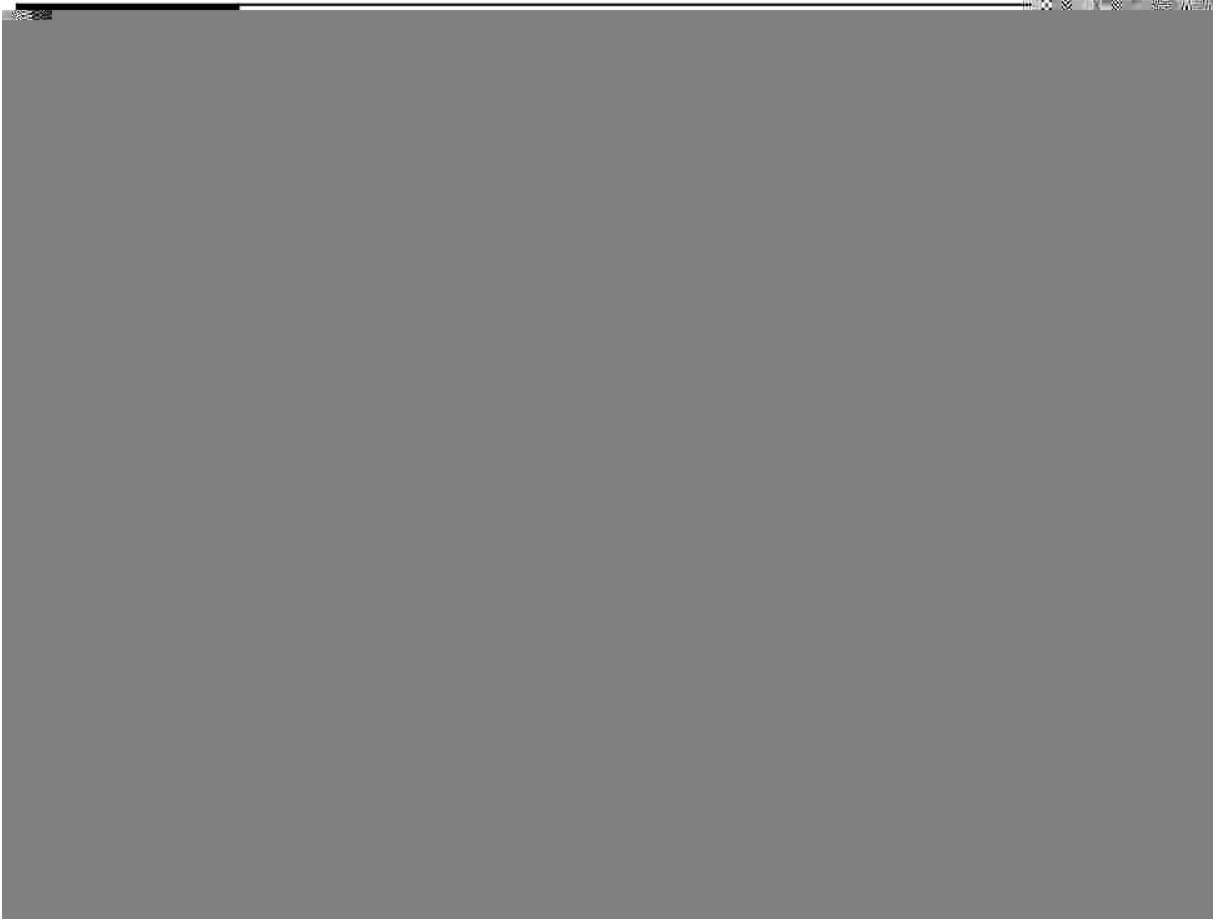
A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad<sup>®</sup>. Os resultados foram analisados de forma individualizada e agrupada (considerando-se as médias de DPSC-N e DPSC-I). Para todos os experimentos, os valores de absorbância foram normalizados em percentuais dos respectivos controles negativos. Para comparar os grupos, foram empregados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **3.13 BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS**

De modo a comparar a expressão gênica entre células de polpa dental normal e inflamada mantidas em cultura, foram produzidas, simultaneamente, duas bibliotecas subtrativas de cDNA utilizando-se o PCR-Select<sup>®</sup> cDNA Subtraction kit (n. 637401, Clontech, Mountain View, CA, USA), uma considerando como referência

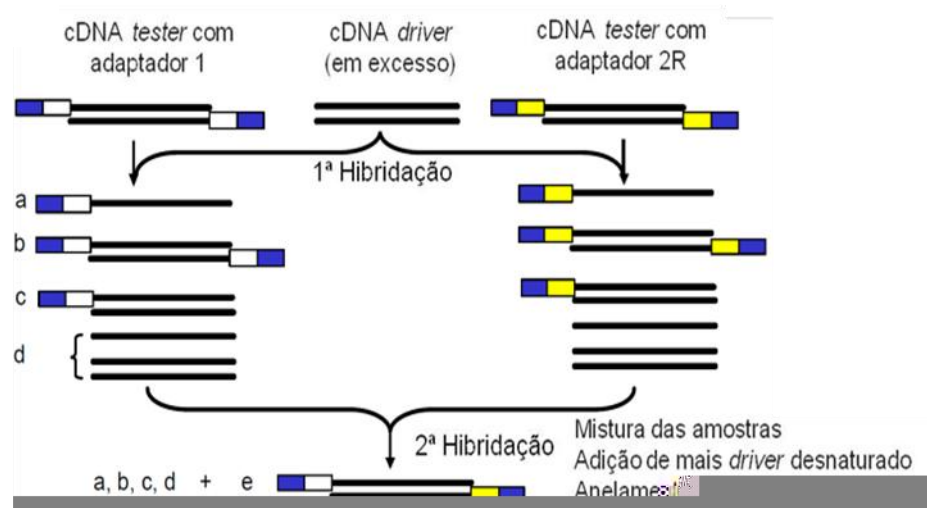
(*driver*) o cDNA de células de polpa dental normal e como *tester* o cDNA de células de polpa dental inflamada e a outra invertendo-se as populações de cDNA *tester* e *driver*.

As Figuras 01 e 02 ilustram os fundamentos e as etapas iniciais de técnica escolhida para construção das bibliotecas subtrativas. Primeiramente, ambas as populações de mRNA são convertidas em cDNA. Uma delas é considerada como referência para dirigir a subtração (*driver*) e a outra é a que contém os transcritos específicos a serem encontrados (*tester*). As duas amostras de cDNA, *tester* e *driver*, são digeridas com a enzima de restrição *Rsa I* para formação de extremidades abruptas. O cDNA *tester* é dividido em alíquotas iguais, permitindo a ligação de dois diferentes adaptadores, que são moléculas de DNA nas quais se anelam *primers* nas etapas finais do processo. Cada alíquota de cDNA *tester* é hibridada separadamente com cDNA *driver* em excesso. Dessa maneira, as moléculas que são expressas apenas na população *tester* ficam na condição de fita simples, enquanto as moléculas comuns às duas populações sofrem hibridação, formando dupla fita. As moléculas específicas da população *driver* também ficam na forma de fita simples, mas não têm os adaptadores ligados às suas extremidades, não podendo ser amplificadas por PCR nas etapas posteriores. Nessa etapa, as moléculas diferencialmente expressas na população *tester* encontram-se na condição de fita simples, porém com adaptadores diferentes em cada uma das duas alíquotas subdivididas inicialmente. O segundo passo de hibridação consiste em misturar as duas alíquotas de cDNA *tester* sem a etapa de desnaturação, de maneira que apenas as moléculas em fita simples e específicas possam hibridar-se formando fita dupla. Em seguida, a enzima DNA polimerase preenche as extremidades de todas as moléculas dupla fita, de maneira a se obterem extremidades abruptas. A posterior amplificação por PCR ocorre de forma exponencial apenas para as moléculas específicas com estrutura em dupla fita, pois são as que possuem os adaptadores diferentes em suas extremidades. As moléculas que possuem adaptadores iguais não são amplificadas por tenderem a formar estruturas em grampos, o que não ocorre quando os adaptadores são diferentes. Esse processo completo permite um enriquecimento da população de sequências de cDNA específicas da amostra *tester* (83).



**Figura 01. Diagrama geral do processo de hibridação subtrativa seguida por PCR**

O cDNA que contém os transcritos específicos a serem encontrados é conhecido como *tester* e o cDNA de referência é chamado de *driver*. (Adaptado do Manual do *PCR-Select<sup>®</sup> cDNA Subtraction Kit (83)*)



**Figura 02. Diagrama esquemático da hibridação subtrativa seguida por PCR**

Moléculas do tipo “e” são formados somente se a seqüência estiver mais expressa na população de cDNA *tester*. Linhas sólidas representam o cDNA *tester* ou *driver* digeridos com *Rsa I*. Caixas azuis representam a parte externa dos adaptadores 1 e 2R e correspondem à seqüência do *primer* externo. Caixas brancas representam as partes internas do adaptador 1 e a seqüência de um dos *primers* internos. Caixas amarelas correspondem às partes internas do adaptador 2R e à seqüência de um dos *primers* internos. “a” e “d” não amplificam por não terem sítio de anelamento do *primer*; “b” não amplifica por forma alças estáveis; “c” sofre amplificação linear e apenas “e” tem amplificação exponencial (Adaptado do Manual do *PCR-Select® cDNA Subtraction Kit* (83)).

### 3.13.1 Extração do RNA Total

Para esse ensaio, foi extraído o RNA total de células de polpa dental normal (aproximadamente  $10^7$  células de cada um dos 3 amostras – PN4, PN5 e PN6) e de polpa inflamada (aproximadamente  $10^7$  células de PI4, PI5 e PI6), na terceira passagem, cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante (item 3.11.4). As amostras de RNA tiveram sua integridade conferida em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific). Foram agrupadas em um mesmo tubo todas as amostras de RNA de polpa dental normal (PN) e, em outro tubo, todas as amostras de RNA de polpa dental inflamada (PI).

### 3.13.2 Purificação do mRNA

As frações de mRNA (poli(A)+) de PN e PI foram purificadas empregando-se o kit *Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Purification Kit* (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras de mRNA foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific) e concentradas por liofilização (Liofilizador L101 - LIOTOP). Em seguida, as amostras secas foram ressuspensas em água nanopura e quantificadas como descrito acima.

### 3.13.3 Hibridação Subtrativa Seguida por PCR

Os reagentes para as reações desta etapa foram providos pelo PCR-Select<sup>®</sup> cDNA Subtraction kit (n. 637401, Clontech, Mountain View, CA, USA) e utilizados segundo as orientações do fabricante, descritas abaixo em termos gerais.

Para síntese do cDNA (primeira e segunda fita), foram utilizados 2 µg de mRNA de PN e a mesma quantidade de mRNA de PI.

Em seguida, as amostras de cDNA de PN e PI foram digeridas com a enzima de restrição *Rsa* I para a obtenção de sequências menores e com extremidades abruptas, adequadas para ligação dos adaptadores. A digestão foi conferida em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Após a digestão, ambas as populações de cDNA *tester* foram divididas em duas alíquotas para ligação dos adaptadores 1 e 2R. A eficiência de ligação dos adaptadores foi conferida em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Posteriormente, foi realizada a primeira hibridação entre as duas populações de cDNA *tester* de cada biblioteca e seu respectivo cDNA *driver*. Após a adição de um excesso do respectivo *driver* a cada um dos *testers*, as misturas foram desnaturadas por calor (a 98°C por 1,5 minuto), e mantidas a 68°C por 8 horas para permitir o anelamento entre as sequências comuns. Com esse procedimento, foram equalizadas e enriquecidas as sequências (fitas simples) diferencialmente expressas.

Seguiu-se à segunda hibridação. Para cada biblioteca, as duas amostras *tester* provenientes da primeira hibridação foram misturadas e nova amostra de *driver* desnaturado (a 98 °C por 1,5 minuto) foi adicionada à mistura, que foi mantida a 68 °C durante uma noite para permitir o anelamento. Dessa forma, as sequências diferencialmente expressas formaram novas moléculas híbridas com um adaptador distinto em cada extremidade.

Antes das etapas de amplificação por PCR, as extremidades 3' dos novos híbridos foram completadas com sítios de ligação para o *primer* externo (que se liga às extremidades de ambos adaptadores). As amostras foram então submetidas a duas reações de polimerase em cadeia, nas condições recomendadas pelo fabricante. Na primeira, utilizando o *primer* externo, apenas as sequências diferencialmente expressas foram exponencialmente amplificadas. Na segunda, utilizando *primers* internos (que se ligam antes das extremidades dos adaptadores), visou-se à redução das ampliações inespecíficas, enriquecendo-se adicionalmente as sequências diferencialmente expressas. Após cada uma das PCRs, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de

etídio (0,5 µg/mL). Os produtos das PCRs foram quantificados por espectrofotometria (Nanodrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific) e mantidos a -20 °C até o momento de sua purificação. Os cDNAs obtidos após esse processo foram purificados e clonados em vetores T/A.

#### 3.13.4 Purificação dos Produtos de PCR

Para purificar dos produtos de PCR, removendo-se excesso de *primers* e nucleotídeos, foram utilizadas colunas Microcon<sup>®</sup> YM-30 (Millipore<sup>®</sup>), segundo as recomendações do fabricante. Essas colunas retêm sequências de DNA em fita dupla de até 50 pb e de DNA em fita simples de até 60 pb. Como os *primers* utilizados nas PCRs descritas no item anterior possuíam de 20 a 22 bases, a purificação por esse método garantiu a sua exclusão das amostras.

Após a purificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e precipitadas com acetato de amônio e etanol. Resumidamente, foi adicionado às amostras 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M, 2 volumes de etanol absoluto a -20 °C e glicogênio para uma concentração final de 50 µg/mL. As amostras foram incubadas a -20 °C durante a noite. Após esse período, elas foram centrifugadas a 14.000 x *g* por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos foram lavados duas vezes com etanol 70% a -20 °C em centrifugações de 14.000 x *g* por 5 min a 4 °C, secos por aproximadamente 20 min e ressuspendidos em 11 µL de água nanopura. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific) e mantidas a -20 °C.

#### 3.13.5 Ligação do cDNA ao Vetor de Clonagem

O vetor plasmidial utilizado para clonagem das sequências obtidas após as hibridações subtrativas (*driver* PN com *tester* PI e *driver* PI com *tester* PN) foi o pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). A ligação foi feita utilizando-se 167 ng de cDNA para 50

ng de vetor (proporção 1:5, aproximadamente). O sistema final de ligação foi composto de 5 µL de tampão de ligação rápida da T4 DNA ligase (2X); 1 µL de pGEM<sup>®</sup>-T Easy; 167 ng de cDNA; 1 µl de T4 DNA ligase e água nanopura para um volume final de 10 µl. A reação de ligação ocorreu a 4°C durante a noite.

### 3.13.6 Transformação Bacteriana por Eletroporação

Três µL de cada reação de ligação foram utilizados para transformar, por eletroporação, células de *Escherichia coli* eletrocompetentes ElectroMAX<sup>®</sup> DH10B (Invitrogen) (80 µL). Os parâmetros de eletroporação utilizados foram 2.0 kV, 200 , 25 µF, utilizando-se o eletroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System (Life Science Research, Bio-Rad) conforme as recomendações do fabricante.

Imediatamente após a eletroporação, as células transformadas foram coletadas e transferidas para tubo para centrifugação de 50 mL estéril contendo 1 mL de meio SOC (Invitrogen). Em seguida, foram colocadas sob agitação a 250 rpm, a 37°C por 1h. Para avaliação da eficiência da transformação, diferentes volumes dos transformantes (10 µL; 50 µL e 100 µL) foram semeados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio LB ágar (peptona de caseína 1%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 1%; ágar bacteriológico 1,4%; pH 7,0) acrescido de ampicilina (100 µg/mL) para a seleção dos transformantes. O restante das células transformadas de cada biblioteca foi semeado em duas placas de 20 x 20 cm contendo meio LB ágar com ampicilina. Todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C. Após 16 horas, a eficiência da transformação foi avaliada por meio da contagem dos clones visíveis nas placas preparadas com diferentes volumes de células. Os clones das placas maiores foram coletados por raspagem com o auxílio de um pequeno rodo estéril. Em seguida, os clones foram divididos em alíquotas de 500 µL em microtubos de 2 mL contendo glicerol estéril para uma concentração final de 35% e foram congelados a -80°C.



### 3.13.7 PCR de Colônia dos Clones Transformantes

Para avaliar o tamanho médio dos insertos de cDNA, foi feita uma PCR de colônia a partir de alguns clones de ambas as bibliotecas. Inicialmente, as células transformadas (10 µL da diluição 1:1000 em meio LB) foram semeadas em placas contendo LB ágar, ampicilina (100 µg/mL) e X-gal (50 µg/ml) e incubadas a 37°C durante a noite. As colônias brancas representam aquelas que foram transformadas com o vetor contendo o inserto, já que essa ligação interrompe, no vetor, a sequência que codifica a -galactosidase. As colônias azuis, por terem sido transformadas com o vetor não ligado a inserto, apresentam essa enzima funcional, que cliva o x-gal presente no meio de cultura, produzindo um composto azul insolúvel.

Após aproximadamente 16 horas, foram coletadas com ponteiros estéreis, de modo randômico, 15 colônias brancas da biblioteca que teve PI como *driver* e de 12 da que teve PN como *driver*, e foram passadas diretamente para o microtubo da PCR. A reação foi feita com dNTP (0,2 mM); MgCl<sub>2</sub> (2 mM); 2,5 µL de tampão de PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5); *primers* universal e reverso (0,2 µM); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e água nanopura para um volume final de 25 µL. Os parâmetros da PCR foram: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 30 ciclos com as etapas 94°C por 1 min; 48°C por 1min; 72°C por 1,5 min; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos dessa reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### 3.13.8 Minipreparação de DNA Plasmidial em Larga Escala

Visando ao sequenciamento, foi realizada a extração de DNA plasmidial dos clones crescidos em placas de poços profundos (10 placas de cada biblioteca). As células transformadas foram semeadas em placas de 20 x 20 cm contendo meio LB ágar acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e X-gal (50 µg/mL) e incubadas em estufa a 37°C durante a noite. Os clones brancos (transformados com plasmídeo contendo

o inserto) foram inoculados nos poços de placas de 96 poços profundos (Axygen, EUA) contendo, por poço, 1 mL de meio 2xYT (1,6% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,5% de cloreto de sódio) acrescido de glicose (0,5%) e ampicilina (100 µg/mL). As placas foram seladas com adesivos resistentes a álcool (Adhesive PCR Film N – 21950), que foram perfurados sobre cada poço com agulha estéril, para permitir sua aeração. As placas foram incubadas a 37°C por 22 h em agitador (250 rpm). Decorrido o tempo de crescimento, 100 µL das culturas de células foram congelados a -80°C em placas de poliestireno de 96 poços para cultura de células (TPP, Suíça) contendo, por poço, 100 µL de glicerol. As placas de poços profundos foram centrifugadas (2272 x g / 6 min / 4°C) para sedimentação dos clones. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados por inversão e os clones foram ressuspensos em 240 µL de solução I (Glicose 1%; EDTA 0,01 M; Tris-HCl 0,3M, pH 7,4) por poço, utilizando um agitador por 2 min. Após nova centrifugação (2272 x g / 9 min / 4°C), os sobrenadantes foram descartados (inversão da placa por 5 min) e as células foram ressuspensas em 60 µL de solução I por poço sob agitação por 2 min. As células foram então transferidas para novas placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Greiner), contendo 1,25 µL de RNase A (20 mg/mL - Promega) por poço e foram homogeneizadas. Para ruptura das células, adicionaram-se 60 µL de solução II preparada na hora (NaOH 0,2 M e SDS 1%) a cada poço. As placas foram seladas com novos adesivos e invertidas 30 vezes. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as placas foram submetidas a uma breve centrifugação e 60 µL de solução III (acetato de potássio 3 M e ácido acético 11,5 %) foram adicionados a cada poço. Após selamento com adesivo, as placas foram invertidas 30 vezes para homogeneização, incubadas por 10 min à temperatura ambiente e centrifugadas (2272 x g / 9 min / 4°C). Os sobrenadantes dos poços (evitando coletar o material precipitado) foram transferidos para placas de 96 poços com filtro (Millipore) fixadas com fita crepe sobre placas de 96 poços com fundo em “V” (Greiner). As placas acopladas foram centrifugadas (2272 x g / 6 min / 4°C), os filtros foram descartados e 100 µL de isopropanol (J T BAKER) foram adicionados a cada poço para precipitar o DNA plasmidial. As placas foram seladas com adesivo e novamente centrifugadas (2272 x g / 45 min / 4°C). Os sobrenadantes foram descartados, 200 µL de etanol 70% (J T BAKER) gelado foram adicionados e as placas foram centrifugadas (2272 x g / 5 min / 4°C). Após descarte

dos sobrenadantes, o etanol remanescente foi evaporado à temperatura ambiente por aproximadamente 60 min e as amostras de DNA foram ressuspensas em 50 µL de água nanopura. As placas foram seladas, mantidas a 4°C durante a noite e estocadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000<sup>®</sup> - Thermo Scientific).

### 3.13.9 Amplificação e Sequenciamento das Bibliotecas Subtrativas de cDNA

Considerando que se tem descrito que apenas 1000 transcritos, aproximadamente, são exclusivamente expressos em qualquer tecido (84), estimou-se que seria necessário sequenciar aproximadamente 1000 clones de cada uma das bibliotecas para que elas tivessem uma abrangência adequada. Foram sequenciadas 1040 amostras de DNA da biblioteca enriquecida de sequências de células de polpa dental inflamada e 1140 da enriquecida de sequências de células de polpa dental normal utilizando-se o *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Cada amostra foi diluída em água nanopura para um volume final de 4 µL, contendo, aproximadamente, 200-250 ng de DNA.

As reações para sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços para PCR, contendo, por poço, 4 µL de DNA plasmidial; 0,5 µL de *BigDye<sup>®</sup> Terminator*; 1,75 µL de tampão de sequenciamento *BigDye<sup>®</sup>*; 1,5 µL do *primers* M13 universal e reverso (2 µM) e 2,25 µL de água nanopura. Após selamento com adesivo, as placas foram agitadas para homogeneização dos reagentes e submetidas a uma breve centrifugação. Para amplificação das amostras, as placas foram levadas ao termociclador *Mastercycler Gradient<sup>®</sup>* (Eppendorf) e submetidas a 1 ciclo de 96°C de 1 min e 32 ciclos com as etapas de 96°C por 15 s, 50°C por 15 s, e 60°C por 4 min, sendo mantidas a 4°C ao final.

Após o término da amplificação, as placas foram brevemente centrifugadas e as amostras foram precipitadas com etanol e EDTA segundo as recomendações do fabricante do *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

As amostras precipitadas foram então desnaturadas adicionando-se 10 µL de tampão formamida Hi-Di (Applied Biosystems) por poço e incubando-as no termociclador a 96°C por 3 min e em gelo por 2 min. Em seguida, as placas foram levadas ao sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

### 3.13.10 Análise das Sequências de cDNA

As sequências de cDNA de ambas as bibliotecas foram agrupadas e analisadas com o programa CAP3 (disponível em: <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Esta ferramenta alinhou múltiplas sequências e montou aquelas que são relacionadas, formando os chamados *contigs*. As sequências únicas, que não se alinham com outras, são chamadas de *singlets*. *Singlets* e *contigs*, agrupados em um arquivo “.fasta”, foram submetidas a análises de similaridade com sequências humanas depositadas no banco de dados Swiss-Prot (disponível em: <http://www.uniprot.org>), empregando-se o programa BLASTX (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Nesta análise, determinou-se que o “valor e” (*e-value* – *expect value*, valor esperado) máximo seria de  $10^{-5}$ . Este valor é inversamente proporcional a uma pontuação atribuída à similaridade de cada sequência analisada em relação à do banco de dados, considerando os percentuais de identidade e similaridade e as lacunas entre os resíduos de aminoácidos alinhados. Quanto menor o valor e, mais significativa será a similaridade.

Os resultados obtidos nesta análise foram categorizados de acordo com a classificação funcional obtida pela ferramenta *KEGG Orthology (KO)* (“*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*” - <http://www.genome.jp/kegg/ko.html>).

### 3.13.10.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad<sup>®</sup>. As distribuições de genes em cada uma das categorias funcionais foram comparadas entre as bibliotecas, empregando-se a estatística qui-quadrado e, quando uma das frequências era inferior a 5, foi aplicado teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **4. RESULTADOS**

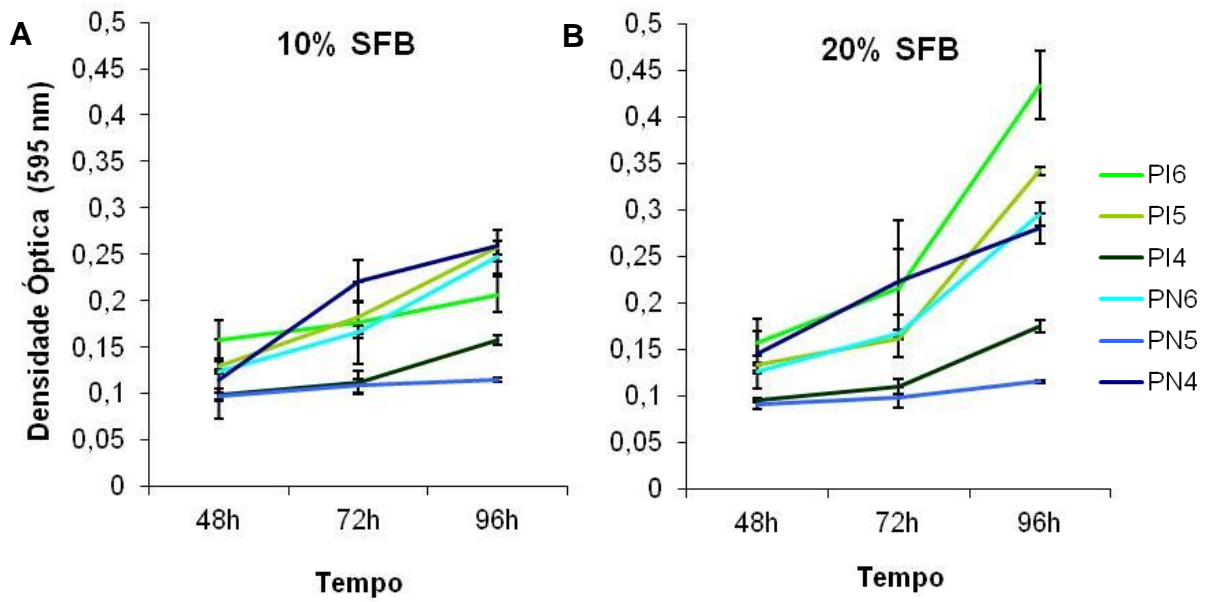
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA DE CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA

Com a metodologia empregada, foi possível estabelecer culturas de células de polpa dental normal e com inflamação. Considerando as amostras experimentais e os estudos-piloto previamente realizados, a taxa de sucesso no estabelecimento de cultura de polpas dentais normais era próximo a 100%, enquanto a das inflamadas era de, aproximadamente, 70% quando o dente era extraído e de 50% quando era realizada pulpectomia durante um tratamento endodôntico. Nesta última metodologia, observou-se que apenas com as polpas dentais mais volumosas (de dentes unirradiculares, de canais palatinos de molares superiores ou distais de molares inferiores) se obteve sucesso no estabelecimento de cultura.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA

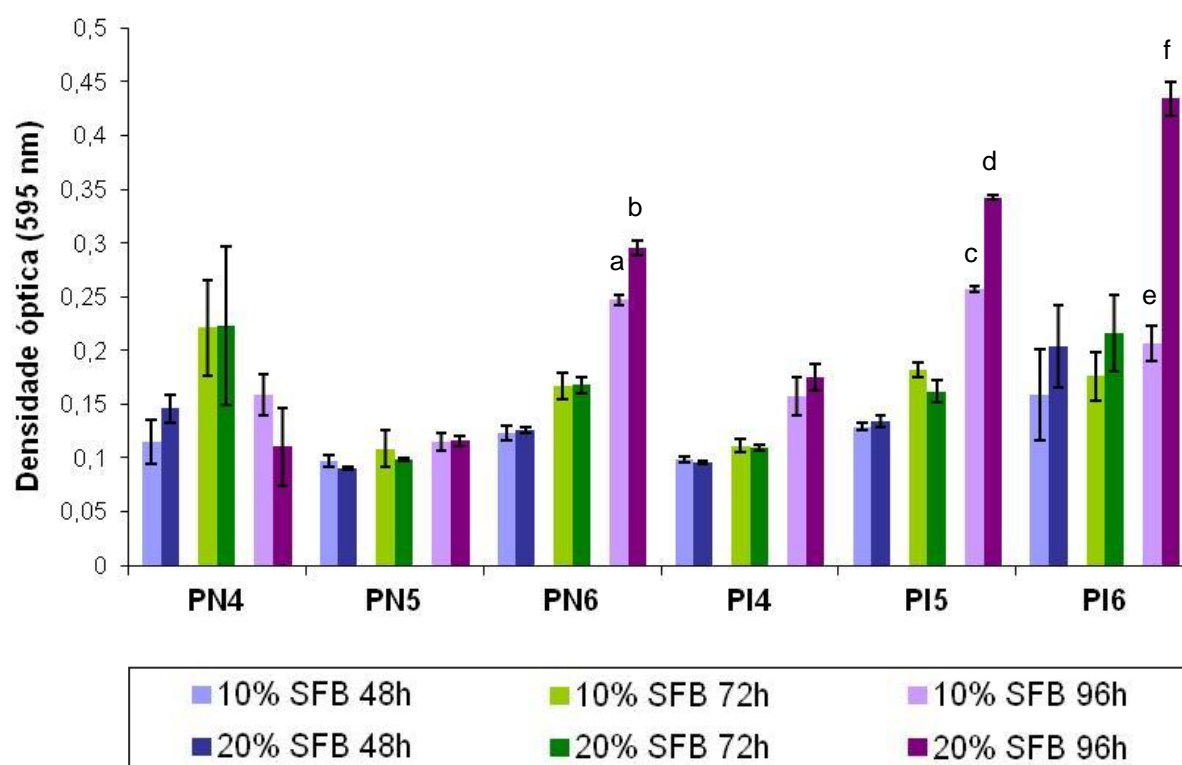
Na Figura 03, estão representados os resultados do ensaio de MTT, que determinou as curvas de crescimento das células de polpa dental normal (3 amostras – PN4, PN5 e PN6) e inflamada (3 amostras – PI4, PI5 e PI6) em duas concentrações de soro fetal bovino (SFB), 10% e 20%. Observou-se que as células de polpa dental normal e inflamada tiveram crescimento semelhante em ambas as concentrações de soro fetal bovino.



**Figura 03. Curvas de crescimento das células de polpa dental normal e inflamada em duas concentrações de soro fetal bovino (ensaio de MTT)** As células foram cultivadas com (A) 10% de SFB e (B) 20% de SFB. PN4, PN5 e PN6 são células de polpa normal e PI4, PI5 e PI6 são de polpa inflamada.

Na Figura 04, estão representados os mesmos resultados da Figura 03 na forma de gráfico de barras, permitindo a comparação das concentrações de soro em cada tempo experimental. Apenas se verificou diferença estatística significativa no crescimento celular com diferentes concentrações de soro após 96 horas de cultura e apenas para as amostras PN6, PI5 e PI6. Assim sendo, optou-se por utilizar, nos demais experimentos, a concentração de 10% de soro fetal bovino.



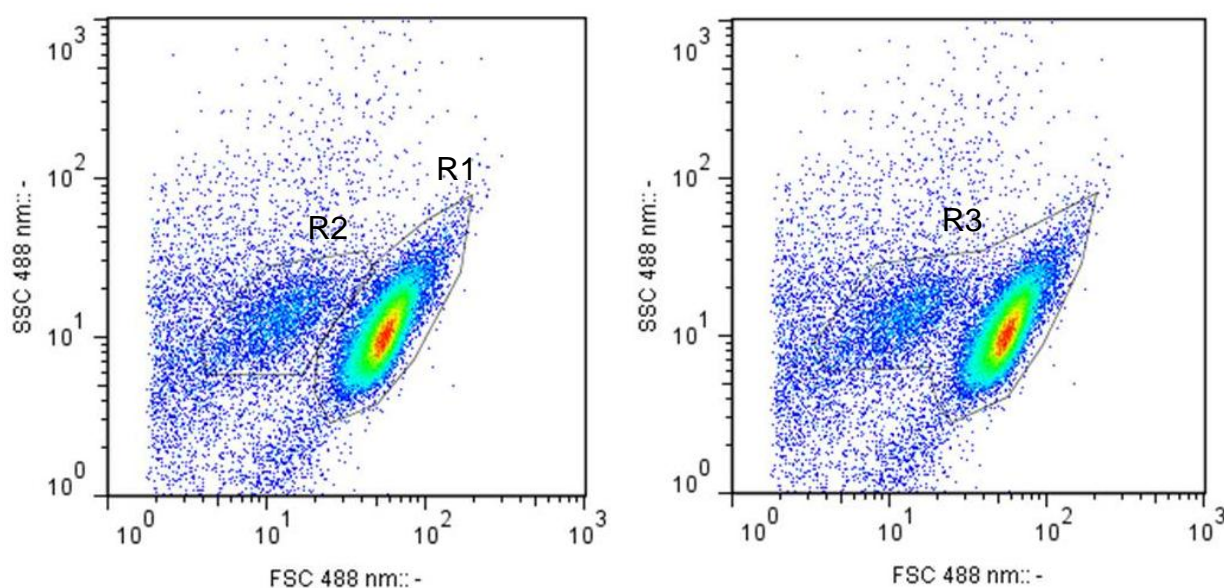


**Figura 04. Crescimento das células de polpa dental normal e inflamada em duas concentrações de soro fetal bovino (ensaio de MTT)**

PN4, PN5 e PN6 são células de polpa normal e PI4, PI5 e PI6 são de polpa inflamada. Letras diferentes denotam diferença estatística para as células da mesma amostra no mesmo tempo experimental ( $P < 0,05$ ).

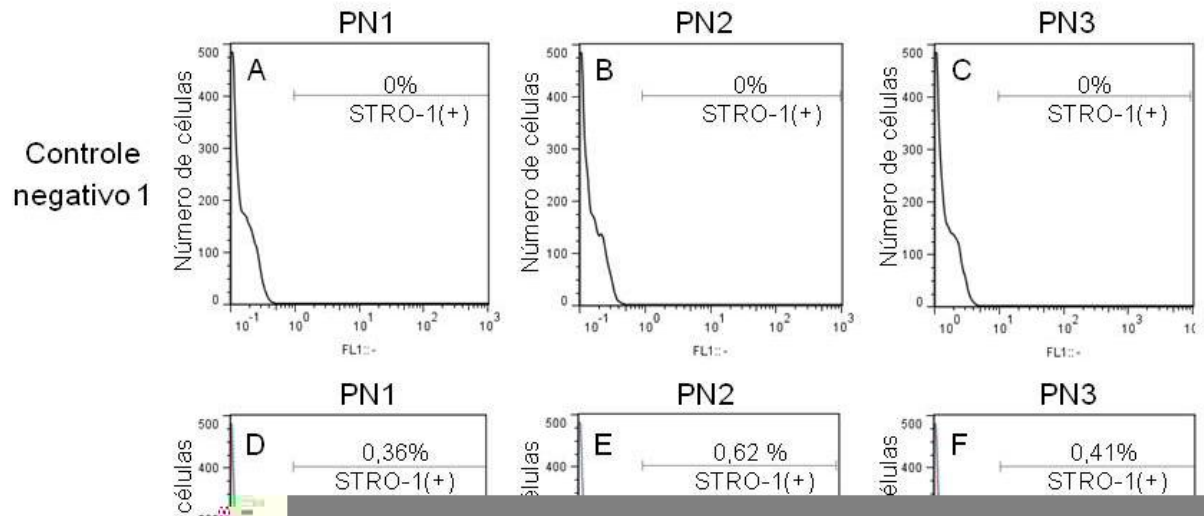
#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA MULTICELULAR DE POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA QUANTO À EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE STRO-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise por citometria de fluxo mostrou que a população de células da cultura multicelular de polpa dental, estabelecida tanto a partir do tecido em condição normal quanto em inflamação, se distribui em duas regiões mostradas na Figura 05: R1, que contém, em média, 77,75% ( $\pm 5,30$ ) das células analisadas pelo equipamento e R2, que contém 8,59% ( $\pm 2,33$ ). As células dessas regiões possuem granulósidades semelhantes, mas tamanhos diferentes. A região R3 foi delimitada agrupando as regiões R1 e R2 e contém, em média, 86,32% ( $\pm 3,44$ ) das células analisadas.



**Figura 05. Análise por citometria de fluxo da população de células da cultura multicelular de polpa dental (amostra PN3).** As células em estudo se localizam nas regiões R1, contendo, em média, 77,75% do total de eventos contados, e R2, contendo 8,59%. A região R3 é formada pelas regiões R1 e R2 agrupadas (86,32%).

Neste experimento, foi considerada como região de análise, a R3 (Figura 05). Na Figura 06, estão representados os perfis de expressão do marcador de superfície STRO-1, nas populações de células da polpa dental normal e inflamada isoladas (PN1, PN2, PN3, PI1, PI2 e PI3). A análise foi baseada no perfil do controle negativo (não incubado com anticorpos), que apresentava 0% de marcação para STRO-1 e foi quantificada pela diferença entre os valores obtidos no grupo experimental (Figura 06 - linha vermelha) e no grupo com marcação inespecífica gerada apenas pelo anticorpo secundário (Figura 06 – linha pontilhada azul).



**Figura 06. Perfil de expressão do marcador STRO-1 em células de polpa normal e inflamada** PN1, PN2 e PN3 são células de polpa normal e PI1, PI2 e PI3 são de polpa inflamada. A, B, C, G, H e I: controles negativos, não incubados com anticorpos. D, E, F, J, K e L: marcação com anticorpo anti-STRO-1. Linha vermelha: STRO-1(+). Linha pontilhada azul: marcação inespecífica gerada apenas pelo anticorpo secundário.

Como se pode observar na Tabela 04 e na Figura 07, o percentual médio de células da região R3 que apresentam o marcador de superfície STRO-1 dentro da população total de células de polpa dental normal e inflamada é de 0,46% ( $\pm 0,14$ ) e 0,43% ( $\pm 0,19$ ), respectivamente. Não há diferença estatística entre esses valores. Observando os dados da Tabela 04, também se pode concluir que a maioria das células marcadas encontra-se na região R2.

**Tabela 04** - Percentual de células de polpa normal e inflamada marcadas positivamente para STRO-1 e detectadas por citometria de fluxo.

Regiões		CN1 <sup>a</sup>	CN2 <sup>b</sup>	M <sup>c</sup>	STRO-1(+) <sup>d</sup>	Média	Desvio Padrão	Valor P*
R1	PN1	0	0,01	0,04	0,03	0,07	0,04	1,00
	PN2	0	0,01	0,09	0,09			
	PN3	0	0,03	0,13	0,10			
	PI1	0	0,02	0,07	0,05	0,10	0,08	
	PI2	0	0,04	0,09	0,05			
	PI3	0	0,03	0,22	0,19			
R2	PN1	0	0,8	2,0	1,1	2,80	1,46	0,40
	PN2	0	0,9	4,7	3,7			
	PN3	0	0,6	4,1	3,6			
	PI1	0	0,8	4,6	3,7	3,76	1,60	
	PI2	0	1,0	6,3	5,4			
	PI3	0	0,3	2,5	2,2			
R3	PN1	0	0,08	0,43	0,36	0,46	0,14	1,00
	PN2	0	0,12	0,74	0,62			
	PN3	0	0,08	0,49	0,41			
	PI1	0	0,06	0,31	0,25	0,43	0,19	
	PI2	0	0,11	0,75	0,64			
	PI3	0	0,06	0,47	0,41			

PN1, PN2 e PN3: células de polpa normal; PI1, PI2 e PI3: células de polpa inflamada

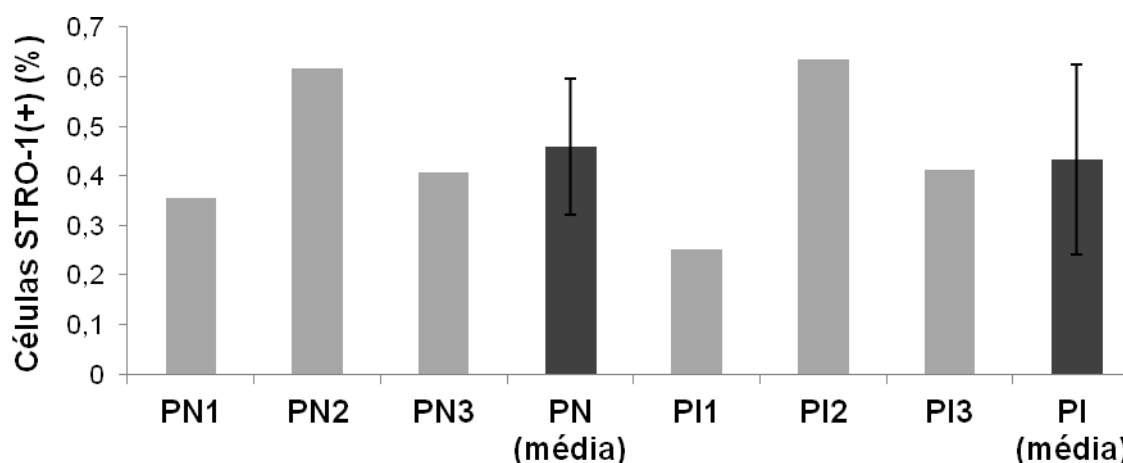
<sup>a</sup>: Grupo controle negativo 1 – não houve incubação com anticorpo

<sup>b</sup>: Grupo controle negativo 2 – incubação apenas com o anticorpo secundário, corresponde à marcação inespecífica

<sup>c</sup>: Grupo marcado - incubação com ambos anticorpos

<sup>d</sup>: STRO-1 (+): valor obtido subtraindo a marcação inespecífica do grupo marcado (M - CN2)

\*: Teste não paramétrico de Mann Whitney. Não há diferença estatística (P = 0,05).



**Figura 07. Percentual de células de polpa normal e inflamada que expressam STRO-1.** (Citometria de fluxo - região R3) PN1, PN2 e PN3 são células de polpa normal e PI1, PI2 e PI3 são de polpa inflamada. Não há diferença estatística entre as médias de PN e PI ( $P > 0,05$ ).

#### 4.4 SEPARAÇÃO MAGNÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO PULPARES (STRO-1-POSITIVAS)

As células STRO-1-positivas magneticamente separadas foram passadas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> em baixa densidade celular (em média, aproximadamente,  $6 \times 10^4$  células por garrafa) mas, em quase duas semanas, atingiram a confluência. As partículas magnéticas utilizadas no isolamento positivo permaneceram aderidas às células em cultura durante, aproximadamente, três semanas. Entretanto, à medida que as elas se dividiam, as partículas se soltavam eram eliminadas com as trocas de meio de cultura e passagens.

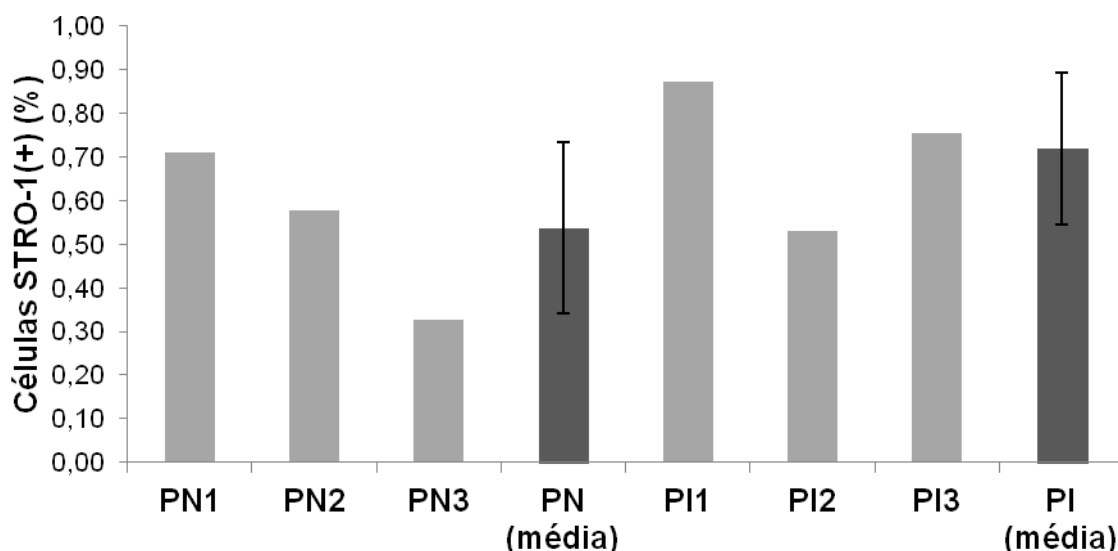
Os dados obtidos com as contagens celulares após a separação magnética estão descritos na Tabela 05 e na Figura 08. Do total de células de polpa dental normal, em média, 0,54% ( $\pm 0,20$ ) foram separadas por apresentarem o marcador de superfície STRO-1. Do total de células de polpa dental inflamada, foram separadas, em média, 0,72% ( $\pm 0,17$ ). Não há, porém, diferença estatística entre os grupos.

**Tabela 05** - Contagem de células de polpa dental normal e inflamada após separação magnética das que expressavam o marcador de superfície STRO-1

	STRO-1 (+) (x 10 <sup>4</sup> )	STRO-1(-) (x 10 <sup>6</sup> )	Total (x 10 <sup>6</sup> )	STRO-1 (+) (% do total)	Média (%)	Desvio padrão	Valor P*
PN1	9,0	12,6	10,4	0,71	0,54	0,20	0,40
PN2	3,2	5,5	12,7	0,58			
PN3	3,2	9,8	5,5	0,33			
PI1	7,3	8,3	9,8	0,87	0,72	0,17	
PI2	6,6	12,4	8,4	0,53			
PI3	7,9	10,4	12,5	0,75			

PN1, PN2 e PN3: células de polpa dental normal; PI1, PI2 e PI3: células de polpa dental inflamada

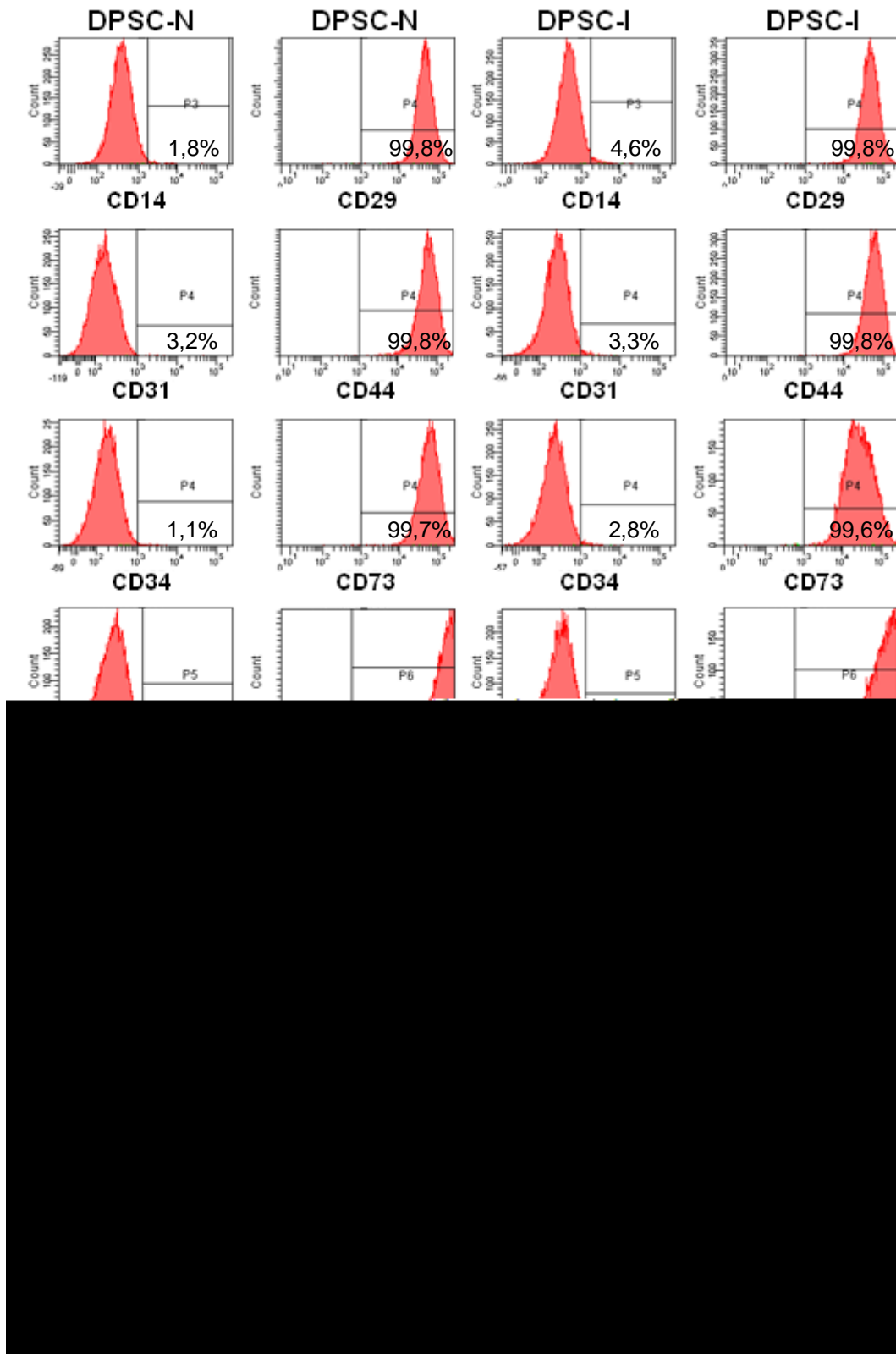
\* Teste não paramétrico de Mann Whitney. Não há diferença estatística (P = 0,05).



**Figura 08.** Percentual de células STRO-1(+) separadas magneticamente da população multicelular de polpa normal e inflamada- contagem em câmara de Neubauer. PN1, PN2 e PN3 são células de polpa normal e PI1, PI2 e PI3 são de polpa inflamada. Não há diferença estatística entre as médias de PN e PI (P = 0,05).

#### 4.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE DPSC-N E DPSC-I POR CITOMETRIA DE FLUXO

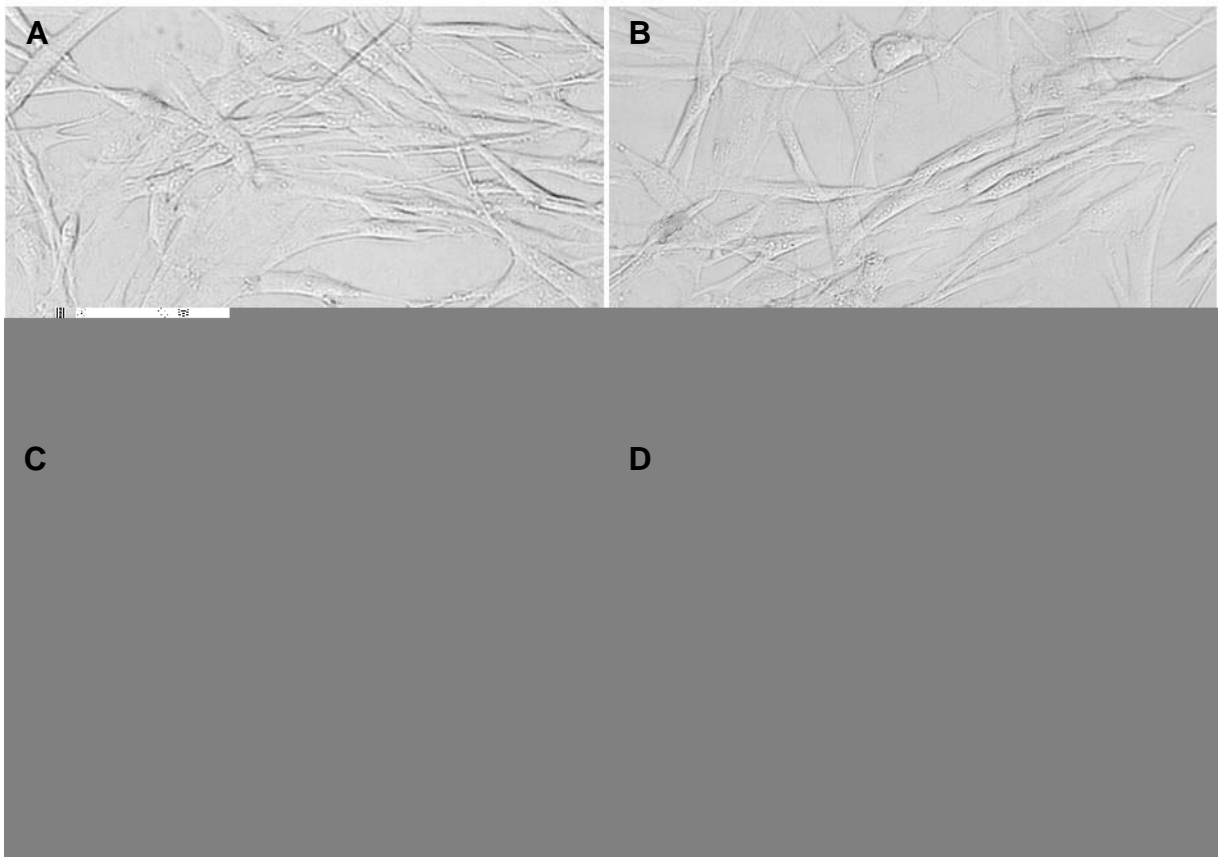
Tanto DPSC-N quanto DPSC-I, predominantemente, expressavam CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166, tiveram expressões moderadas de CD106 e quase não expressavam CD14, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133 e HLA-DR. (Figura 09).



**Figura 09. Imunofenotipagem de DPSC-N1 e DPSC-I1 por citometria de fluxo.** Ambas, predominantemente, expressavam CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166, tiveram expressão moderadas de CD106 e quase não expressavam CD14, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133 e HLA-DR.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE DPSC-N E DPSC-I

A Figura 10 permite observar que, em cultura, as células de polpa dental normal e inflamada apresentam morfologias semelhantes ao microscópio de luz, não se identificando diferença alguma entre elas. Tampouco se observou diferença morfológica entre essas mesmas células antes e após a separação magnética daquelas que expressavam o marcador de células-tronco STRO-1.



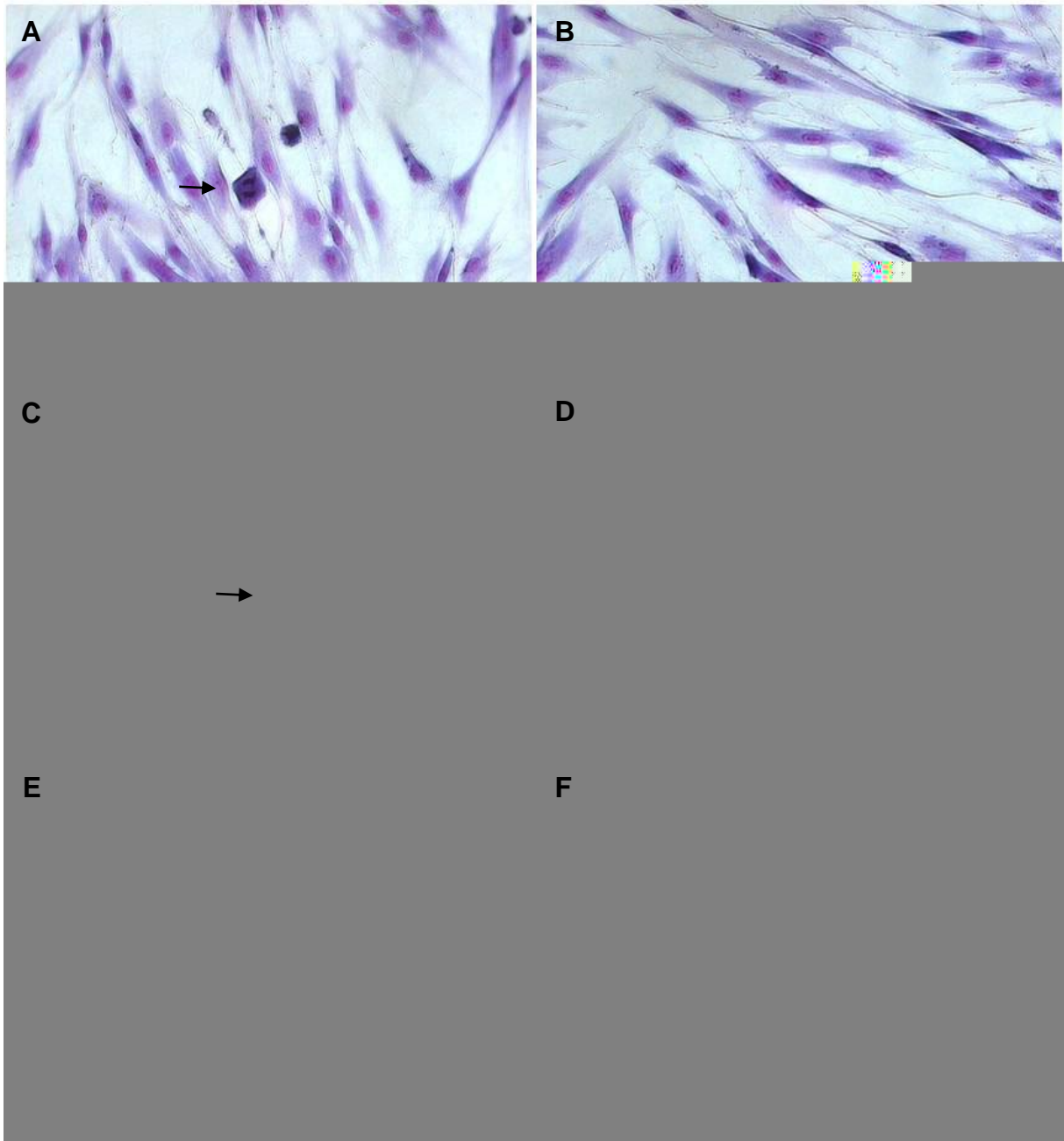
**Figura 10. Células de polpa dental normal e inflamada em cultura**

(A e B) Células de polpa dental normal (indivíduo PN1) e inflamada (PI1), respectivamente.  
(C e D) DPSC-N1 e DPSC-I1 STRO-1(+), obtidas após separação magnética. Barra = 50  $\mu$ m.

A maior parte das células-tronco derivadas tanto de polpa dental normal (DPSC-N) como de inflamada (DPSC-I) é fusiforme, mas há também algumas poligonais (Figuras 10 e 11). Principalmente quando a cultura está confluenta, predominam as fusiformes. Apresentam projeções citoplasmáticas, que ligam uma célula à outra. O núcleo é esférico ou ovóide e um ou mais nucléolos são evidentes.



O citossol tem aspecto relativamente homogêneo. Após atingida a confluência da cultura, as células ainda continuam a se dividir, umas sobre as outras, não apresentando inibição por contato (Figura 11E e F).



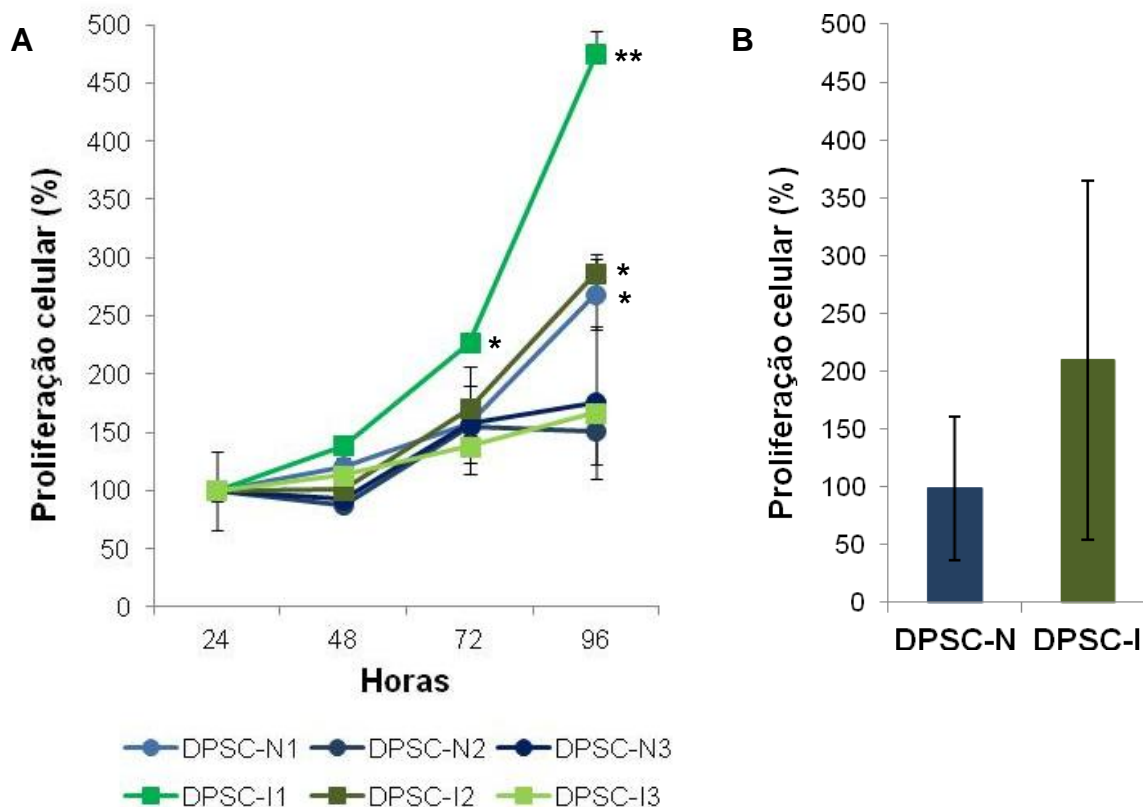
**Figura 11. DPSC-N1 e DPSC-I1 coradas com Giemsa**

(A, C e E) DPSC-N1, (B, D e F) DPSC-I1 STRO-1(+), (A e B) Culturas subconfluentes, (C e D) Culturas confluentes, (E e F) Culturas após a confluência, mostrando crescimento de umas sobre as outras. Em A e D evidenciam-se figuras mitóticas (setas). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7 PROLIFERAÇÃO DE DPSC-N E DPSC-I

Os resultados do ensaio de MTT para avaliar o potencial proliferativo de DPSC-N (3 amostras - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 amostras - I1, I2 e I3) estão expressos na Figura 12. Na análise individualizada (Figura 12A), pode-se observar que, no tempo de 48 horas, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes amostras de DPSC-N e DPSC-I. No tempo de 72 horas, apenas DPSC-I1 demonstrou crescimento estatisticamente superior aos demais, de 227,24% ( $\pm 5,37$ ). Após 96 horas, DPSC-I1, DPSC-I2 e DPSC-N1 tiveram percentuais proliferativos significativamente superiores aos demais, de respectivamente 475,12% ( $\pm 5,37$ ), 287,14% ( $\pm 15,71$ ) e 268,91% ( $\pm 29,92$ ).

Na análise agrupada, não se verificou diferença estatisticamente significativa no potencial proliferativo de DPSC-N e DPSC-I (Figura 12B).



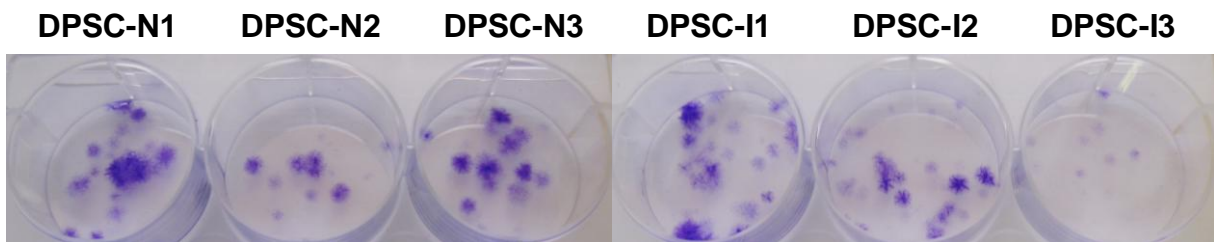
**Figura 12. Proliferação de DPSC-N e DPSC-I**

(A) DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa dentro do mesmo tempo experimental ( $P < 0,05$ ).

(B) Proliferação média após 96 horas. DPSC-N (média de N1, N2 e N3) e DPSC-I (média de I1, I2 e I3). Não se verificou diferença estatística ( $P = 0,05$ ).

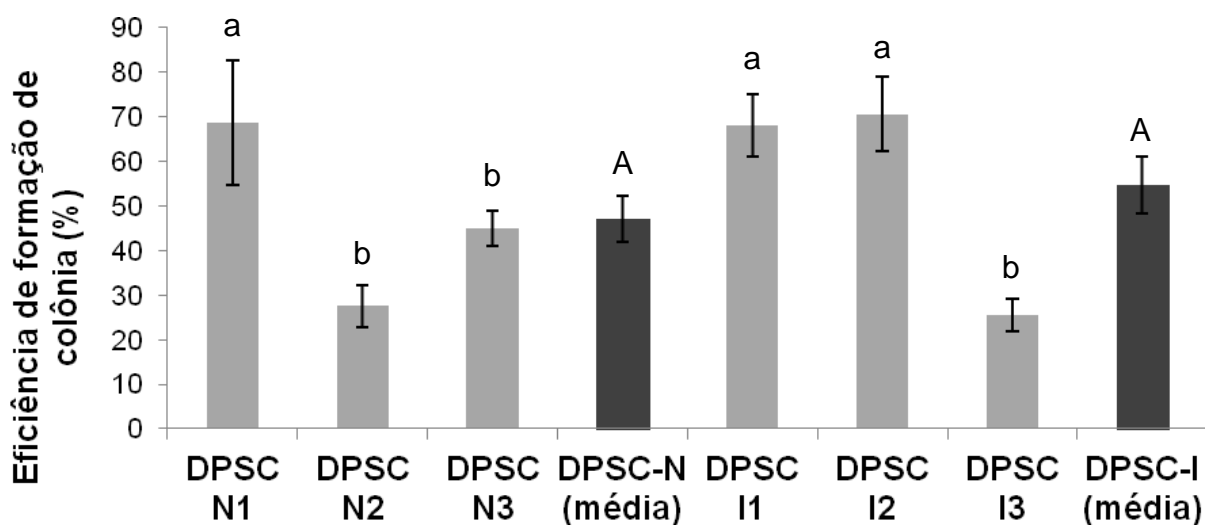
#### 4.8 EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (UFC)

Todas as amostras de células tanto derivadas de polpa dental normal quanto de inflamada começaram a formar colônias de células com morfologia semelhante a fibroblastos ao final da primeira semana após a passagem. Como se pode observar nas Figuras 13 e 14, as eficiências de formação de colônia variaram entre 25,63% (DPSC-I3) e 70,63% (DPSC-I1), sendo as amostras DPSC-N1, I1 e I2 estatisticamente equivalentes entre si e diferentes das amostras DPSC-N2, N3 e I3, que são equivalentes estatisticamente. Não se observou diferença estatística entre as médias dos resultados obtidos para DPSC derivadas de polpa normal ( $47,08\% \pm 5,18$ ) e de polpa inflamada ( $54,79\% \pm 6,32$ ).



**Figura 13. Unidades formadoras de colônia (UFC) em DPSC-N e DPSC-I**

DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Coloração com cristal violeta.



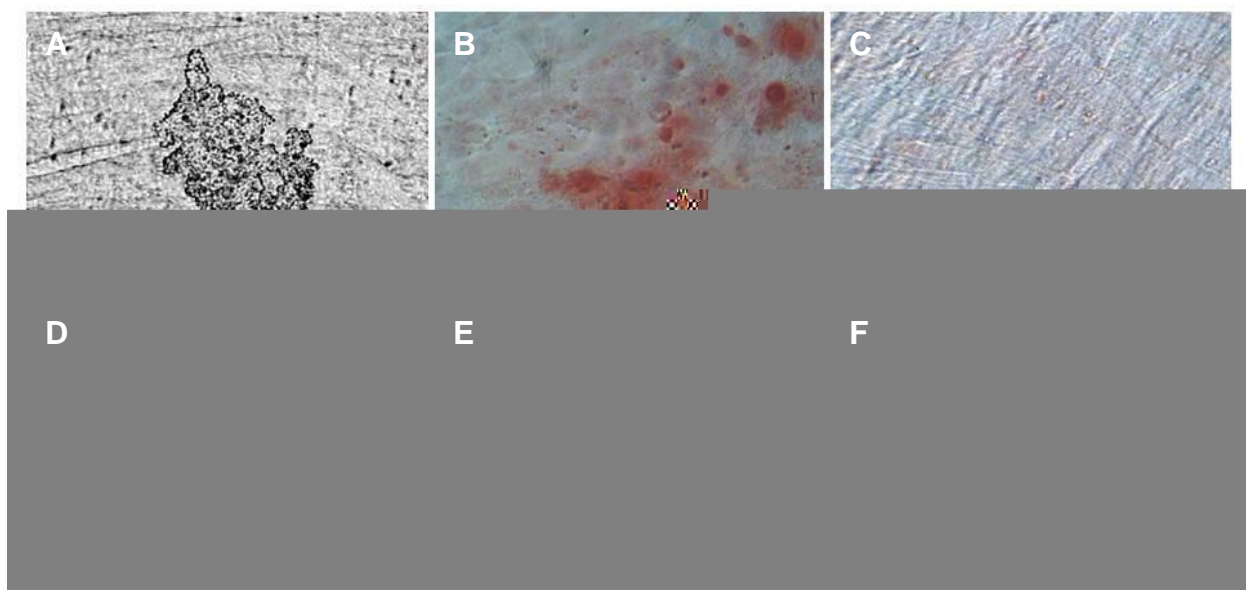
**Figura 14. Eficiência percentual de formação de colônias (UFC)**

DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Letras diferentes denotam diferença estatística entre as colunas de mesma cor. Minúsculas: ANOVA e pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Maiúscula: teste não paramétrico de Mann Whitney. Não houve diferença estatística entre as médias de DPSC-N e DPSC-I ( $P = 0,05$ ).

## 4.9 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO

### 4.9.1 Diferenciação Odonto-osteogênica

Após 21 dias de tratamento com meio odonto-osteogênico, verificou-se a formação de nódulos de calcificação, mostrando que houve diferenciação de células de todas as amostras de ambos grupos experimentais (DPSC-N e DPSC-I), ao contrário do que ocorreu nos respectivos grupos controle negativo (Figura 15C e F). Na Figura 15, podem-se observar nódulos de calcificação formados sobre células diferenciadas (DPSC-N e DPSC-I), observando-se diretamente a cultura celular (A e D) e após a coloração com vermelho de Alizarina (B e E).



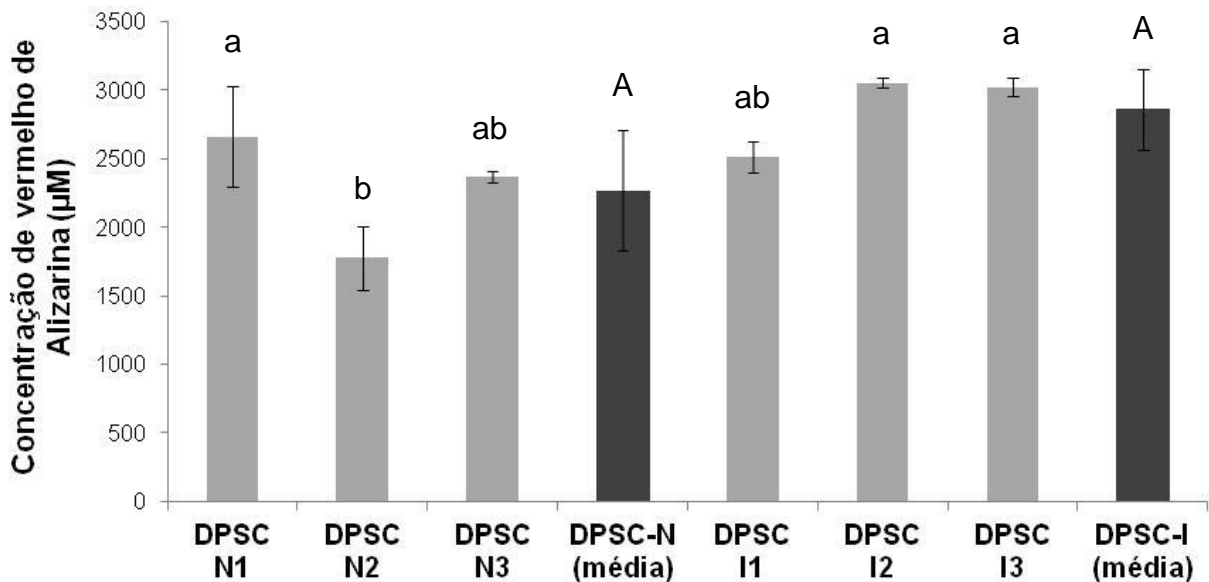
**Figura 15. Ensaio de diferenciação odonto-osteogênica - análise morfológica**

DPSC-N (indivíduo PN2) (A, B e C) e DPSC-I (PI2) (D, E e F) após 21 dias de indução da diferenciação odonto-osteogênica. A e D contêm células diferenciadas em cultura, observadas ao microscópio invertido, evidenciando-se a formação de nódulos mineralizados. B e E contêm nódulos mineralizados corados com vermelho de Alizarina. C e F são controles negativos corados com vermelho de Alizarina. Barra = 50  $\mu$ m.

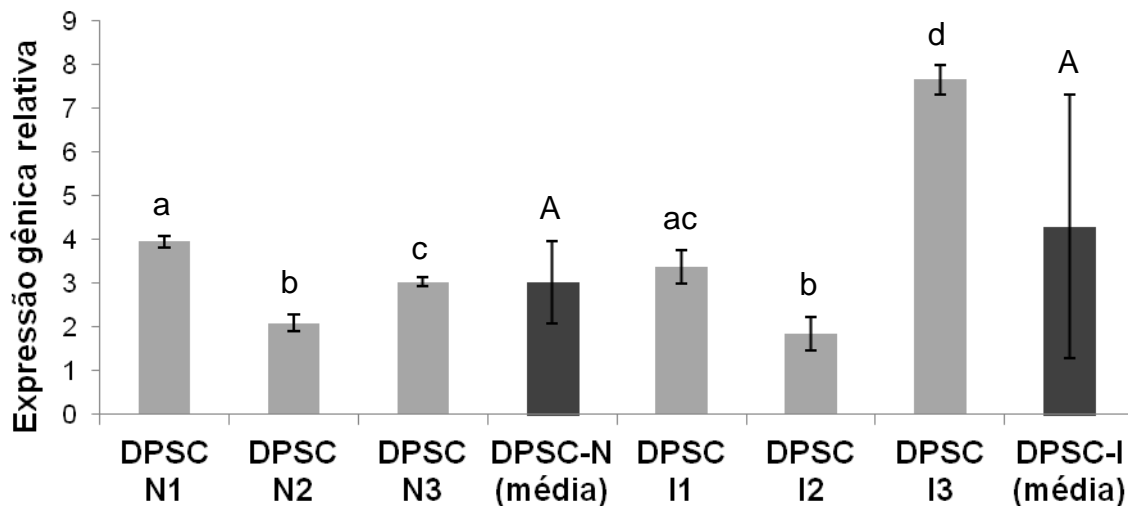
Quanto à concentração de vermelho de Alizarina absorvido pelos nódulos mineralizados produzidos pelas DPSC-N e DPSC-I diferenciadas, foi possível

observar diferença estatística entre algumas amostras (Figura 16). Considerando-se, contudo, as médias dos valores obtidos em DPSC-N ( $2.367,91 \pm 439,92$ ) e DPSC-I ( $2.861,60 \pm 69,80$ ), não se verificou diferença estatística significativa.

O aumento da expressão de RNA mensageiro do gene *BSP*, também evidenciou a diferenciação odonto-osteogênica de todas as amostras de DPSC. Observou-se diferença estatística entre os valores de expressão gênica relativa de diferentes amostras de DPSC (Figura 17). Entretanto, considerando-se as médias dos valores obtidos para DPSC-N ( $3,03 \pm 0,93$ ) e DPSC-I ( $4,29 \pm 3,02$ ), não se verificou diferença estatística significativa.



**Figura 16. Ensaio de diferenciação odonto-osteogênica – quantificação do tecido mineralizado.** Concentração de corante vermelho de Alizarina absorvido pelo tecido mineralizado produzido por DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-N (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Letras diferentes denotam diferença estatística entre as colunas de mesma cor. Minúsculas: Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn ( $P < 0,05$ ). Maiúscula: teste não paramétrico de Mann Whitney. Não houve diferença estatística entre as médias de DPSC-

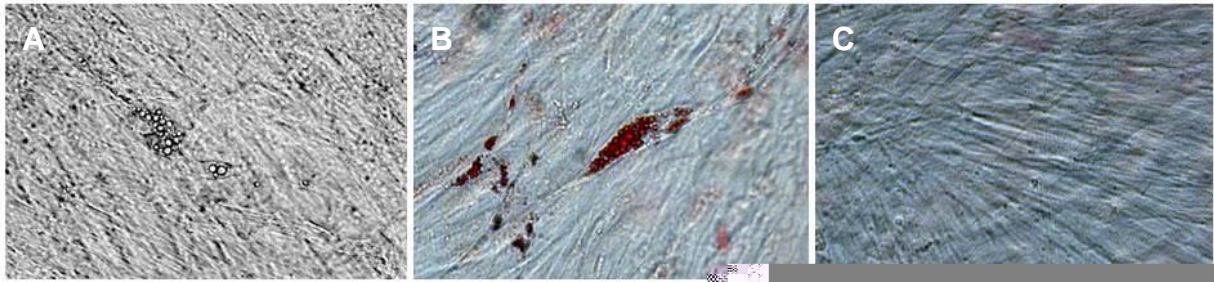


**Figura 17. Análise da indução de diferenciação odonto-osteogênica - expressão relativa de BSP por DPSC-N e DPSC-I.** DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Letras diferentes denotam diferença estatística entre as colunas de mesma cor. Minúsculas: ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni ( $P < 0,05$ ). Maiúscula: teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença estatística entre as médias de DPSC-N e DPSC-I ( $P = 0,05$ ).

#### 4.9.2 Diferenciação Adipogênica

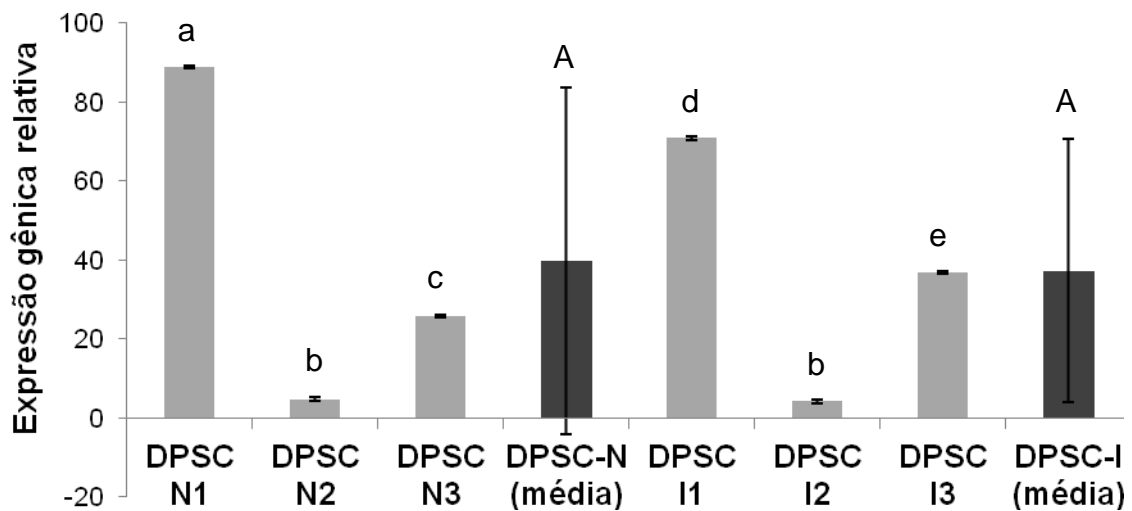
Após 21 dias de tratamento com meio adipogênico, verificou-se a presença de células contendo vacúolos de lipídios, mostrando que houve diferenciação de todas as amostras de células de ambos os grupos experimentais (DPSC-N e DPSC-I), ao contrário do que ocorreu nos respectivos grupos controle negativo (Figura 18C e F). Na Figura 18, podem-se observar vacúolos de lipídios em células diferenciadas a partir de DPSC-N e DPSC-I, observando-se diretamente a cultura celular (A e D) e após a coloração com óleo vermelho-O (B e E).

O aumento da expressão de RNA mensageiro do gene *LPL*, também evidenciou a diferenciação adipogênica de todas as amostras de DPSC. Observou-se diferença estatística entre os valores de expressão gênica relativa de diferentes amostras de DPSC (Figura 19). Entretanto, considerando-se as médias dos valores obtidos para DPSC-N ( $39,87 \pm 43,82$ ) e DPSC-I ( $37,35 \pm 33,33$ ), não se verificou diferença estatística significativa.



**Figura 18. Ensaio de diferenciação adipogênica – análise morfológica**

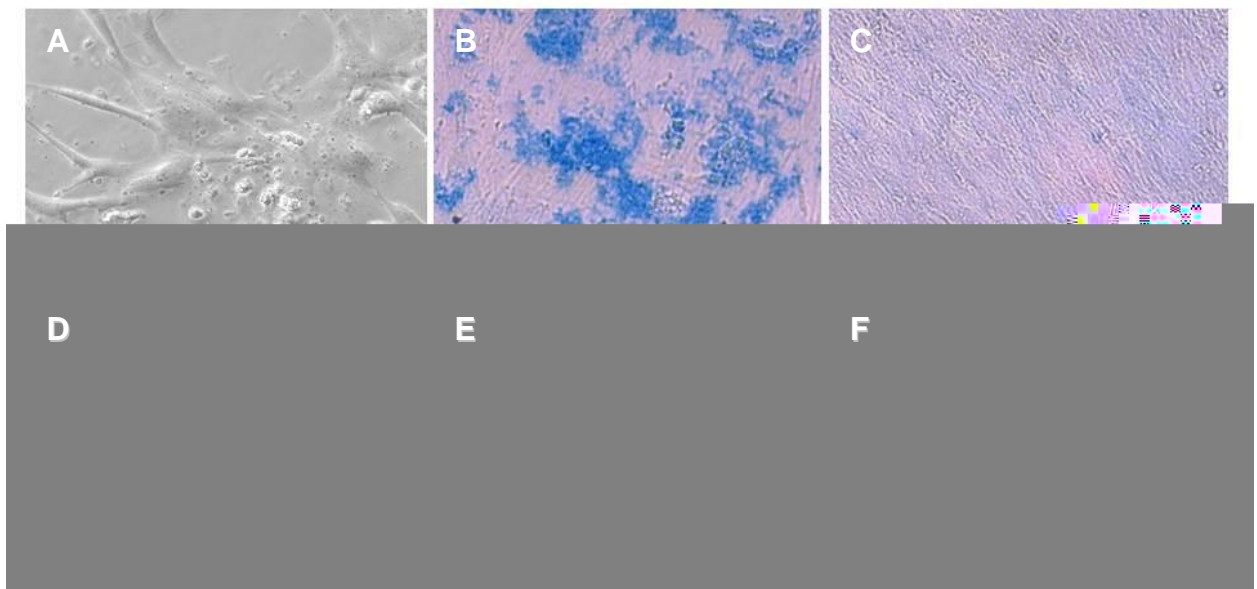
DPSC-N (indivíduo PN1) (A, B e C) e DPSC-I (PI1) (D, E e F) após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica. A e D contêm células diferenciadas em cultura, apresentando vacúolos lipídicos no citoplasma, observadas ao microscópio invertido. B e E contêm células diferenciadas coradas com óleo vermelho-O. C e F são controles negativos corados com óleo vermelho-O. Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura 19. Análise da indução de diferenciação adipogênica - expressão relativa de *LPL* por DPSC-N e DPSC-I.** DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Letras diferentes denotam diferença estatística entre as colunas de mesma cor. Minúsculas: ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni ( $P < 0,05$ ). Maiúscula: teste não paramétrico de Mann Whitney. Não houve diferença estatística entre as médias de DPSC-N e DPSC-I ( $P = 0,05$ ).

### 4.9.3 Diferenciação Condrogênica

Após 21 dias de tratamento com meio condrogênico, verificou-se, em ambos grupos experimentais (DPSC-N e DPSC-I), a coloração de algumas regiões das culturas celulares com azul de Alcian, diferentemente do observado nos respectivos grupos controle negativo, (Figura 20C e F). Tal coloração provavelmente se deve à formação de matriz de mucopolissacarídeos característica da diferenciação condrogênica.

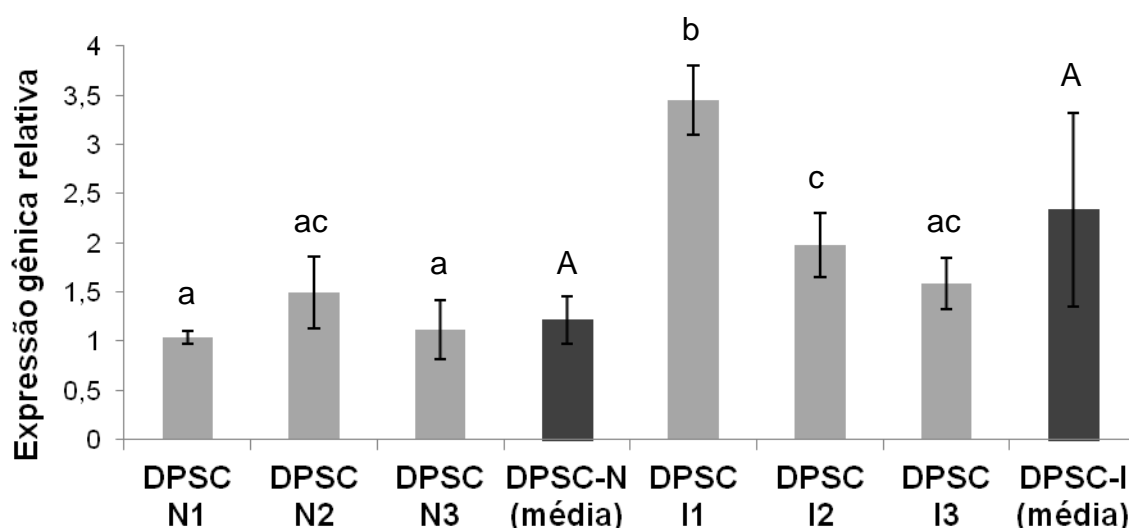


**Figura 20. Ensaio de diferenciação condrogênica – análise morfológica**

DPSC-N (indivíduo PN3) (A, B e C) e DPSC-I (PI3) (D, E e F) após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica. A e D contêm células em cultura após a indução de diferenciação condrogênica, observadas ao microscópio invertido. B e E contêm regiões de matriz de mucopolissacarídeos coradas com azul de Alcian. C e F são controles negativos corados com azul de Alcian. Barra = 50  $\mu$ m.

O aumento da expressão de RNA mensageiro do gene SOX-9, também evidenciou a diferenciação condrogênica de todas as amostras de DPSC. Observou-se diferença estatística entre os valores de expressão gênica relativa de diferentes amostras de DPSC (Figura 21). Entretanto, considerando-se as médias dos valores obtidos para DPSC-N ( $1,22 \pm 0,25$ ) e DPSC-I ( $2,34 \pm 0,98$ ), não se verificou diferença estatística significativa.



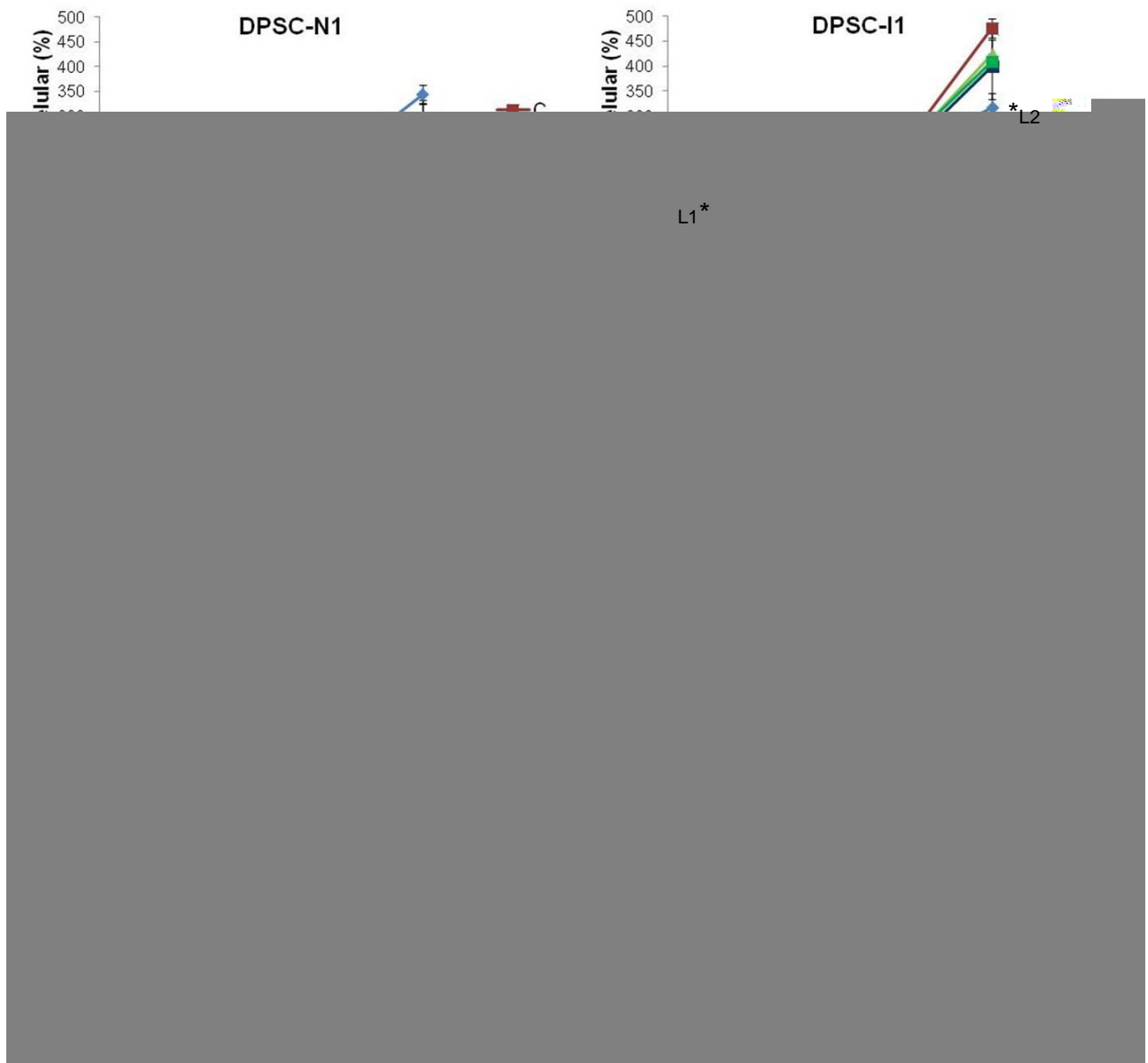


**Figura 21. Análise da indução de diferenciação condrogênica - expressão relativa de SOX-9 por DPSC-N e DPSC-I.** DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-N (3 indivíduos - I1, I2 e I3). Letras diferentes denotam diferença estatística entre as colunas de mesma cor. Minúsculas: ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni ( $P < 0,05$ ). Maiúscula: teste não paramétrico de Mann Whitney. Não houve diferença estatística entre as médias de DPSC-N e DPSC-I ( $P = 0,05$ ).

#### 4.10 ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER

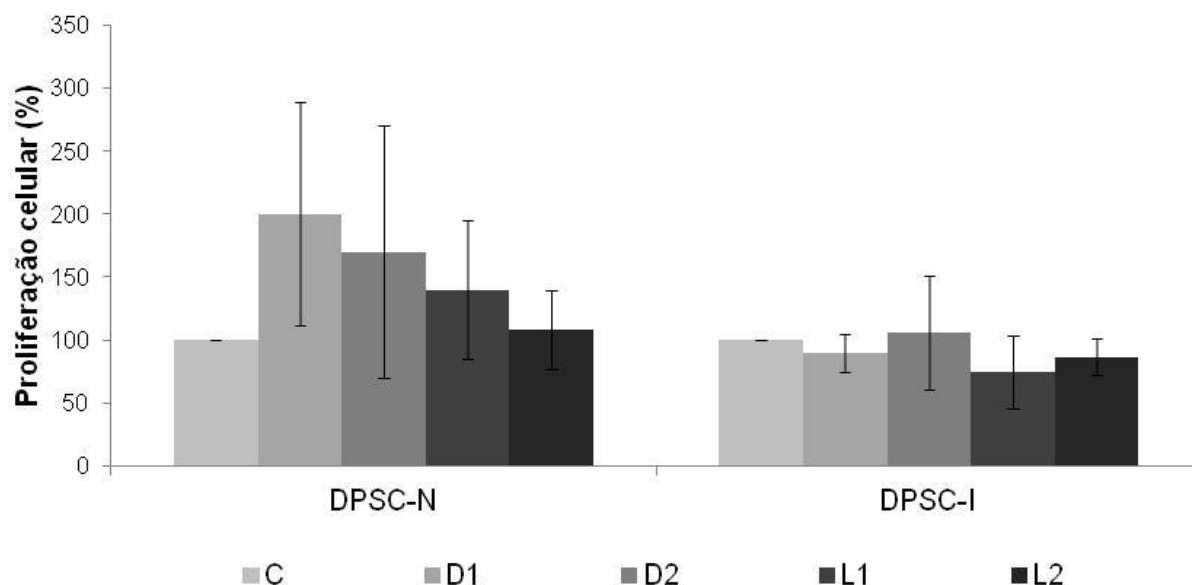
##### 4.10.1 Efeito da Irradiação com Laser na Proliferação de DPSC-N e DPSC-I

Os resultados da proliferação celular após irradiação com laser foram analisados individualmente e de forma agrupada (considerando-se as médias de DPSC-N e DPSC-I). Como se pode observar na Figura 22, na análise individualizada, os testes estatísticos, comparando os diferentes grupos em relação ao respectivo controle negativo em cada tempo experimental, mostraram diferença estatística apenas para DPSC-I1 (a proliferação aumentou no grupo L2 em 24 horas e diminuiu no grupo L1 em 96 horas). Não se verificou diferença estatística significativa na proliferação das demais amostras de DPSC em todos os outros tempos experimentais.



**Figura 22. Proliferação de DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições** DPSC-N (3 indivíduos - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 indivíduos - I1, I2 e I3) C: Controle negativo; D1 e D2: Células irradiadas com interposição de disco de dentina (0,05 e 0,30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente); L1 e L2: Células irradiadas diretamente (7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo e o respectivo controle negativo no mesmo tempo ( $P < 0,05$ ).

Na análise agrupada, não se observou diferença estatística significativa entre os percentuais de proliferação em relação aos respectivos controles negativos (Figura 23).

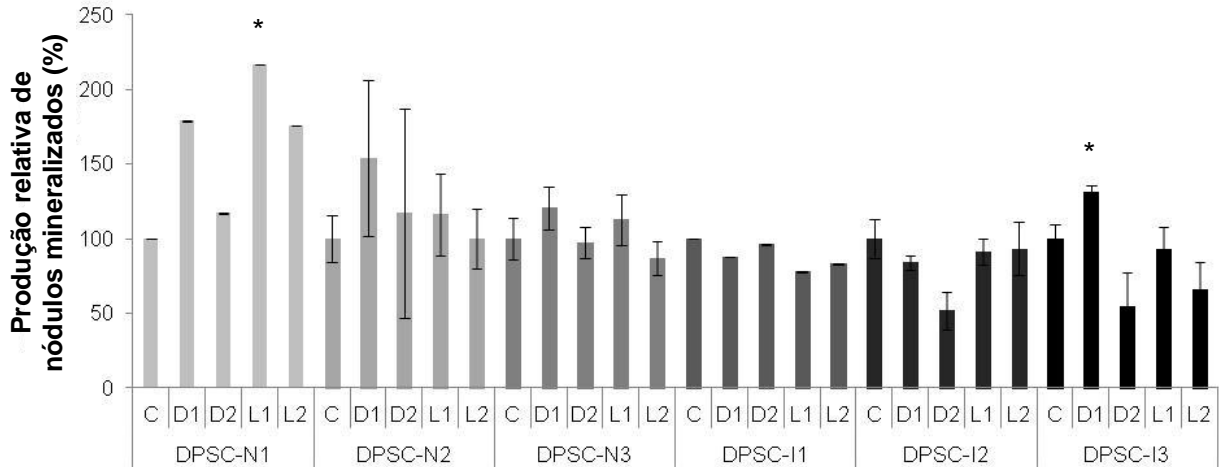


**Figura 23. Proliferação média de DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições** DPSC-N (média de N1, N2 e N3) e DPSC-I (média de I1, I2 e I3) C: Controle negativo; D1 e D2: Células irradiadas com interposição de disco de dentina (0,05 e 0,30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente); L1 e L2: Células irradiadas diretamente (7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Não se verificou diferença estatística entre os grupos e seu respectivo controle negativo (P = 0,05).

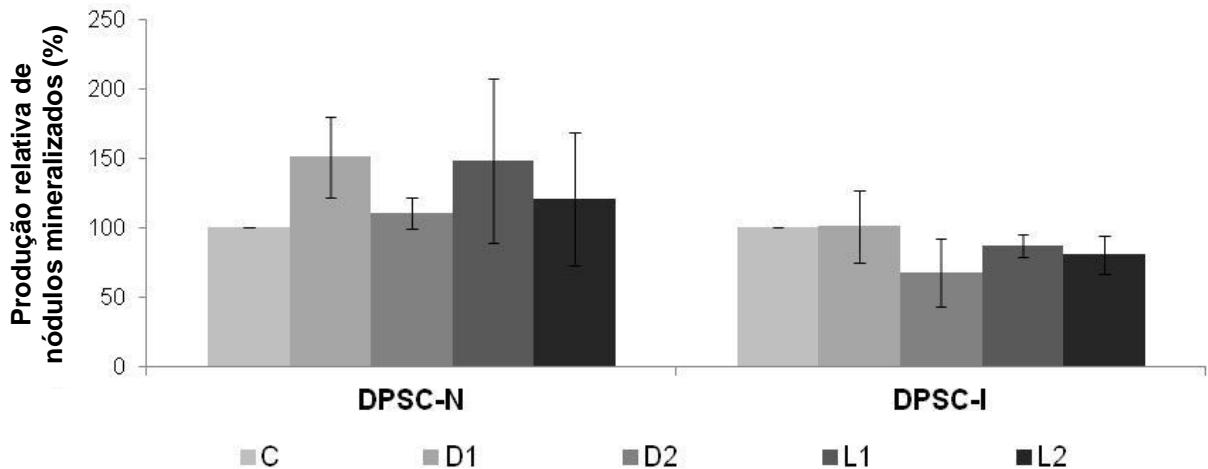
#### 4.10.2 Efeito da Irradiação com Laser na Diferenciação Odonto-osteogênica de DPSC-N e DPSC-I

Como se pode observar na Figura 24, na análise individualizada, os testes estatísticos, comparando os diferentes grupos em relação ao respectivo controle negativo em cada tempo experimental, mostraram diferença estatística apenas para DPSC-N1 e DPSC-I3 (a produção de nódulos mineralizados aumentou em L1 e D1, respectivamente). Não se verificou diferença estatística significativa na produção de nódulos mineralizados pelas células diferenciadas a partir das diferentes amostras de DPSC.

Na análise agrupada, não se observou diferença estatística significativa na produção relativa de nódulos mineralizados em relação aos respectivos controles negativos (Figura 25).



**Figura 24. Produção relativa de nódulos mineralizados por DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições e tratamento com meio indutor de diferenciação odonto-osteogênica DPSC-N (3 amostras - N1, N2 e N3) e DPSC-I (3 amostras - I1, I2 e I3) C: Controle negativo; D1 e D2: Células irradiadas com interposição de disco de dentina (0,05 e 0,30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente); L1 e L2: Células irradiadas diretamente (7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo e seu respectivo controle negativo (P < 0,05).**



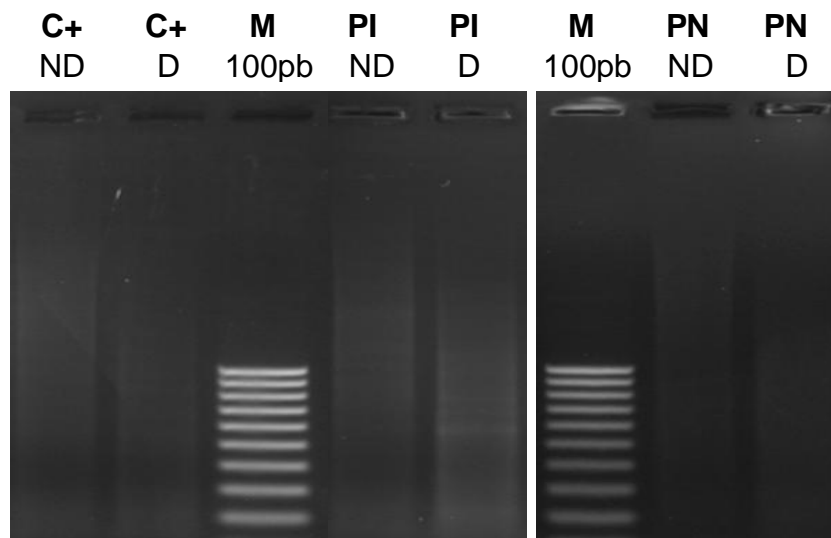
**Figura 25. Produção média relativa de nódulos mineralizados por DPSC-N e DPSC-I após irradiação com laser em diferentes condições e tratamento com meio indutor de diferenciação odonto-osteogênica DPSC-N (média de N1, N2 e N3) e DPSC-I (média de I1, I2 e I3) C: Controle negativo; D1 e D2: Células irradiadas com interposição de disco de dentina (0,05 e 0,30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente); L1 e L2: Células irradiadas diretamente (7 e 42 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Não se verificou diferença estatística entre os grupos e seu respectivo controle negativo (P > 0,05).**

## 4.11 BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS

### 4.11.1 Hibridação Subtrativa Seguida por PCR

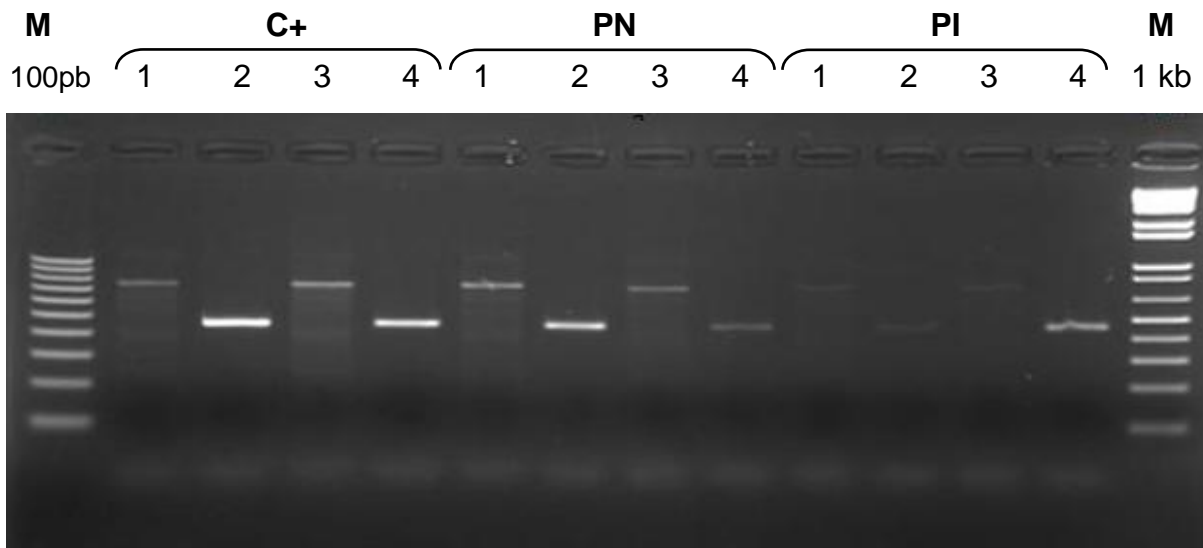
Conforme recomendações das instruções do PCR-Select<sup>®</sup> cDNA Subtraction kit, após algumas etapas experimentais, verificou-se a obtenção dos resultados esperados.

A Figura 26 mostra a imagem de um gel de agarose que confirma a digestão das amostras de cDNA de PN e PI pela enzima de restrição *Rsa* I.



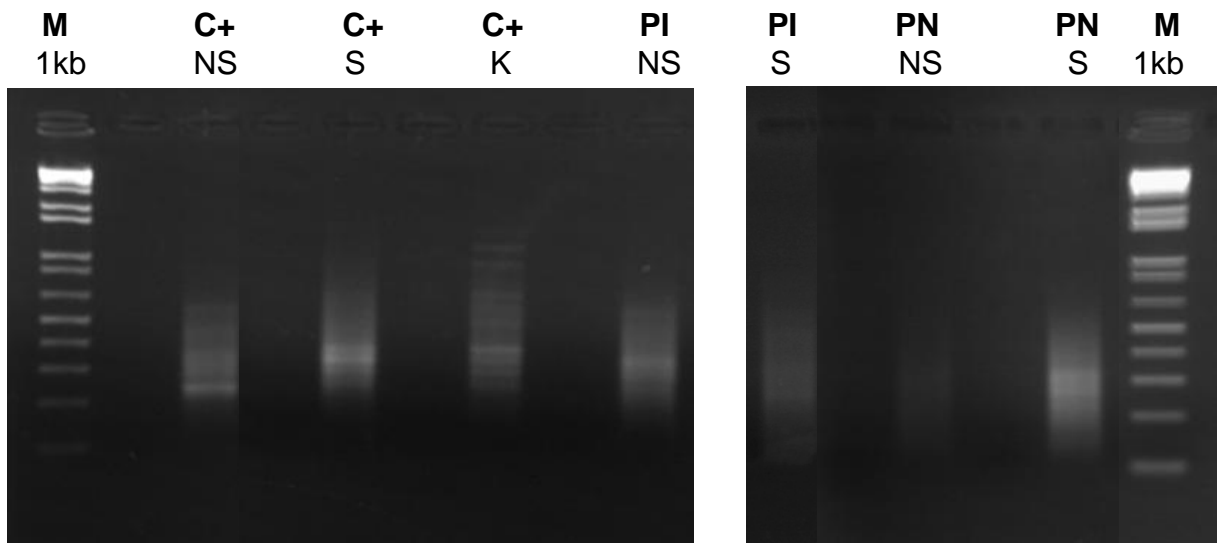
**Figura 26.** Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), das amostras de cDNA de PN e PI digeridas com a enzima *Rsa* I. M: Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); C+: cDNA de músculo esquelético humano provido pelo kit. PN: cDNA de células de polpa dental normal. PI: cDNA de células de polpa dental inflamada. ND: não digerido; D: digerido com *Rsa* I.

A verificação da eficiência de ligação dos adaptadores foi feita por meio de uma PCR, conforme recomendado pelo kit e os produtos dessa reação estão mostrados na Figura 27.



**Figura 27. Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), dos produtos da PCR para verificar a eficiência de ligação dos adaptadores às amostras de cDNA de PN e PI.** M 100pb: Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); M 1 kb: Marcador de massa molecular 1 kb (Invitrogen); C+: cDNA de músculo esquelético humano provido pelo kit. PN: cDNA de células de polpa dental normal. PI: cDNA de células de polpa dental inflamada. Linhas 1 e 2: produtos de PCR usando as amostras *tester* 1-1 ligadas ao adaptador 1 como molde. Linhas 3 e 4: produtos de PCR usando as amostras *tester* 1-2 ligadas ao adaptador 2R como molde. Nas linhas 1 e 3, as PCRs foram realizadas com o *primer* 3' de G3PDH 3' e o *primer* 5' se anelava nos adaptadores. Nas linhas 2 e 4, as PCRs foram realizadas com os *primers* 3' e 5' de G3PDH 3' (todos os *primers* foram fornecidos pelo kit). A eficiência da ligação ideal se verificaria com a intensidade das bandas 2 e 4 não ultrapassando 4 vezes a intensidade de 1 e 3 respectivamente.

Após as hibridações, as moléculas foram amplificadas por PCR, utilizando *primers* que se ligam às extremidades dos adaptadores. Os produtos de amplificação estão mostrados na Figura 28.

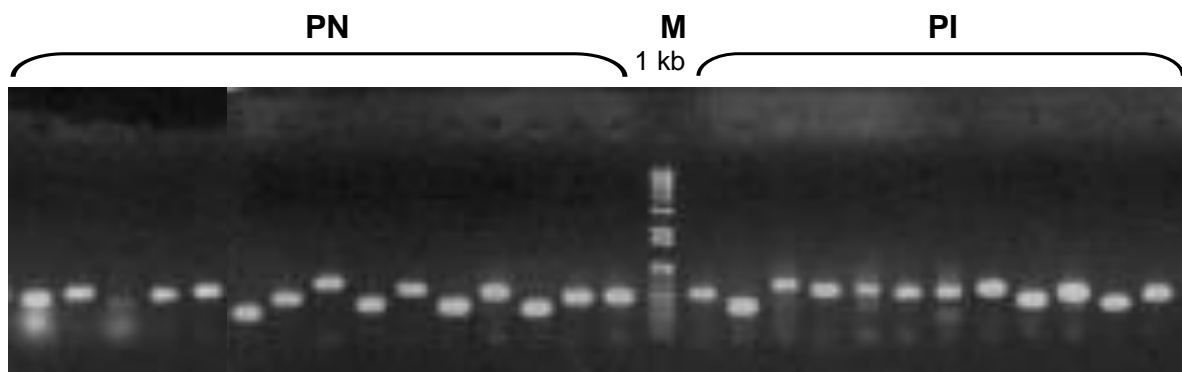


**Figura 28. Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5)  $\mu\text{g/mL}$ , dos produtos de PCR após as hibridações. M 100pb: Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); M 1 kb: Marcador de massa molecular 1 kb (Invitrogen); C+: cDNA de músculo esquelético humano provido pelo kit. PN: cDNA de células de polpa dental normal. PI: cDNA de células de polpa dental inflamada. NS: não subtraído (amostra de cDNA original); S: subtraído; K: controle da subtração fornecido pelo kit.**

#### 4.11.2 Transformação Bacteriana e PCR de Colônia dos Clones Transformantes

Obteve-se, nesta etapa, uma eficiência de transformação bacteriana de  $10^7 - 10^8$  clones/  $\mu\text{g}$  de DNA para ambas as bibliotecas.

Na Figura 29, estão mostrados os produtos da PCR de colônia de amostras de ambas as bibliotecas, evidenciando que os insertos clonados tiveram tamanhos aproximados entre 200 e 500 pb.



**Figura 29. Análise eletroforética, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5)  $\mu\text{g/mL}$ , dos produtos da PCR de colônia de clones transformados. M 1 kb: Marcador de massa molecular 1 kb; PN: clones da biblioteca enriquecida de seqüências de cDNA de células de polpa dental normal. PI: clones da biblioteca enriquecida de seqüências de cDNA de células de polpa dental inflamada.**

#### 4.11.3 Sequenciamento e Análise de Bioinformática

De aproximadamente 1000 amostras sequenciadas de ambas as bibliotecas, obtiveram-se, entre *singlets* e *contigs*, 599 seqüências de boa qualidade na biblioteca enriquecida de seqüências expressas nas células de polpa dental normal e 618 na biblioteca enriquecida de seqüências expressas nas células de polpa dental inflamada. Empregando-se o *valor*  $e < 10^{-5}$  e somando-se *singlets* e *contigs*, 193 seqüências de células de polpa dental normal e 294 de células de polpa dental inflamada apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados *Swiss-Prot*.

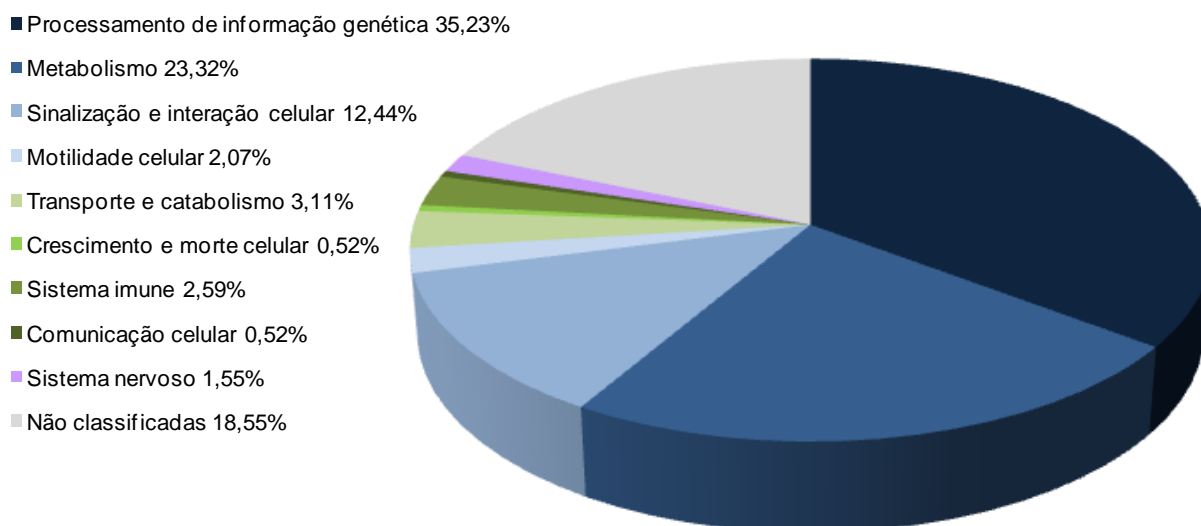
As Tabelas 06 e 07 (Apêndices B e C) mostram os dados relativos às seqüências apresentadas pelas bibliotecas subtrativas, com as respectivas classificações funcionais segundo a ferramenta *KEGG Orthology (KO)*.

Houve a coincidência de 39 genes entre as bibliotecas (44 seqüências da biblioteca enriquecida de transcritos de células polpa dental normal e 48 seqüências daquela enriquecida de transcritos de células polpa dental inflamada) (Tabelas 06 e 07 - Apêndices B e C).

Os genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal estão relacionadas principalmente ao processamento



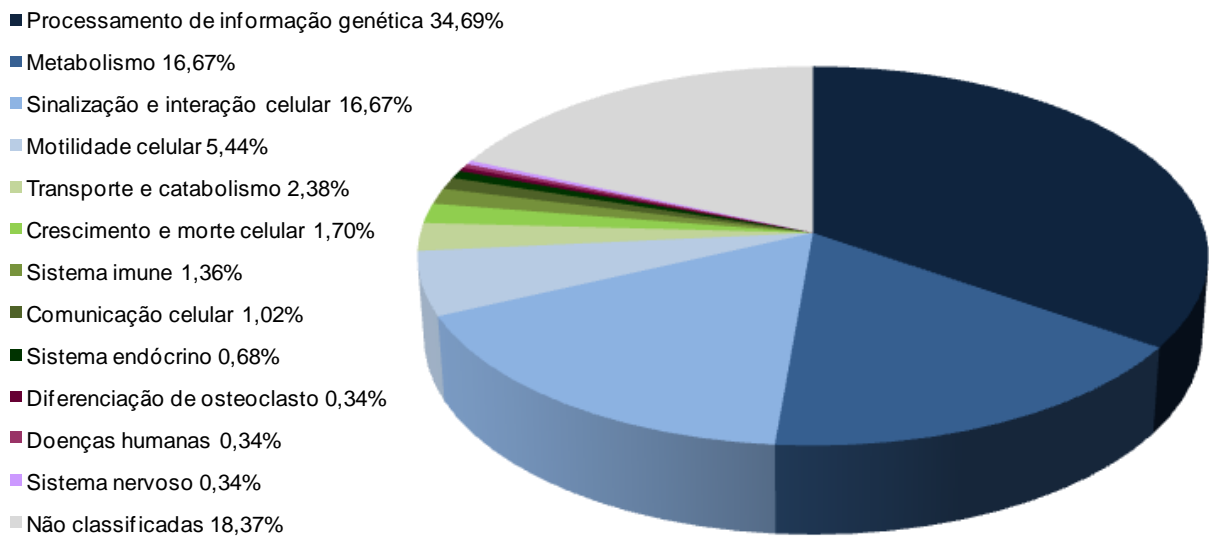
da informação genética (35,23%), ao metabolismo (23,32%) e à sinalização e interação celular (12,44%). Ainda não estão categorizados pela ferramenta *KEGG Orthology (KO)* 18,55% dos genes encontrados nesta biblioteca (Figura 30 e Tabela 06 - Apêndice B).



**Figura 30. Classificação funcional dos genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal, segundo a ferramenta *KEGG Orthology (KO)***

Os genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental inflamada estão relacionados principalmente ao processamento da informação genética (34,69%), ao metabolismo (16,67%), à sinalização e interação celular (16,67%) e à motilidade celular (5,44%). Ainda não estão categorizados pela ferramenta *KEGG Orthology (KO)* 18,37% dos genes encontrados nesta biblioteca (Figura 31 e Tabela 07 - Apêndice C).

A análise estatística que comparou, entre as bibliotecas, os percentuais de genes classificados em cada uma das categorias mostrou que as categorias funcionais são identicamente proporcionais nas duas bibliotecas.



**Figura 31. Classificação funcional dos genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental inflamada, segundo a ferramenta KEGG Orthology (KO)**

## **5. DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL NORMAL E INFLAMADA E COMPARAÇÃO ENTRE SUAS MORFOLOGIAS E SEUS POTENCIAIS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO

Neste estudo, isolaram-se com sucesso, células-tronco (mesenquimais) de polpas dentais humanas normais (DPSC-N) e inflamadas (DPSC-I). Embora se tenha empregado um número amostral pequeno em cada grupo experimental (n=3) e se considere que investigações posteriores utilizando mais amostras são recomendadas para aumentar a precisão das conclusões, demonstrou-se, neste estudo, que a morfologia, a proliferação e o potencial de diferenciação de DPSC-N e DPSC-I foram equivalentes, mostrando que a inflamação severa não afetou significativamente as propriedades destas células.

A taxa de sucesso no estabelecimento de uma cultura celular a partir de polpas dentais inflamadas foi mais baixo que o verificado em dentes normais. Da mesma forma, Wang *et al.* (21) relataram que células de polpa inflamada demonstravam um surgimento tardio de unidades formadoras de colônias em cultura. Esse fato provavelmente está associado ao menor volume de tecido que se obtém por meio da pulpectomia de dentes inflamados e não a uma possível condição doente dessas células. Como foi utilizado antibiótico em todas as soluções, essa taxa não foi afetada por contaminação por microrganismos e foi compatível com estudo de Alongi *et al.* (20).

Uma vez que STRO-1 é um dos marcadores de superfície mais estudados para DPSC (11, 28, 85), ele foi empregado neste estudo para caracterizar as amostras de células-tronco. Foi observado que essas células não são abundantes em culturas estabelecidas tanto a partir de polpas dentais normais como de inflamadas (Figuras 06 e 07). Os resultados de diferentes experimentos de citometria de fluxo foram sempre compatíveis com a contagem de células STRO-1(+) após a separação magnética (Figura 08). Esse baixo percentual encontrado está de acordo com observações prévias de que as células-tronco compreendem

menos de 1% da população total de células da polpa dental (86). O maior percentual de células STRO-1(+) encontradas em estudos recentes (20, 21) pode estar relacionado a diferentes delimitações da população total de células analisada. Uma vez que a população total observada no presente estudo apresentou-se como duas subpopulações (Figura 05), se os percentuais calculados neste estudo houvessem considerado apenas a subpopulação em que as células STRO-1(+) estão contidas, os resultados (variando entre 1,1 a 5,4%) teriam sido similares aos relatados nos estudos citados.

Embora, nos experimentos de citometria de fluxo, se tenham observado, em ambos os grupos, duas subpopulações de diferentes tamanhos, nenhuma diferença foi verificada na morfologia das células antes e depois da separação magnética das células STRO-1(+) (Figura 08), provavelmente devido à maior sensibilidade do citômetro a pequenas variações de tamanho, em relação à microscopia óptica. Além disso, DPSC-N e DPSC-I se mostraram morfologicamente idênticas, o que corrobora observações de estudos prévios (20, 21).

As células STRO-1(+) (DPSC-N e DPSC-I), além de apresentarem as características de morfologia, proliferação e diferenciação típicas de células mesenquimais, também apresentaram um perfil imunofenotípico compatível tal classificação (8). Embora geralmente se descreva que as células-tronco da polpa dental predominantemente expressam CD117 (22, 23, 30, 87), neste estudo, tanto DPSC-N quanto DPSC-I não expressaram CD117. Esse resultado pode indicar que as populações STRO-1(+) e CD117 (+) constituem diferentes subpopulações de células-tronco na polpa dental.

DPSC-N e DPSC-I não exibiram inibição por contato quando confluentes (Figura 11E e F). Essa característica é comumente descrita para células-tronco embrionárias (88), mas não para adultas (89). Entretanto, a inibição por contato tampouco foi descrita em diferentes células-tronco mesenquimais sob hipóxia (90) e células-tronco de polpas dentais imaturas (91).

Quando as diferentes amostras de DPSC-N e DPSC-I foram agrupadas para análise estatística, as taxas de proliferação e eficiências de formação de unidades formadoras de colônias foram similares (Figuras 12-14). Do mesmo modo, nos ensaios de diferenciação, observaram-se diferenças entre as amostras individuais mas não entre os dois grupos (DPSC-N e DPSC-I) (Figuras 16, 17, 19 e 21).

Estudos anteriores (20, 21) relataram taxas de proliferação e eficiências de formação de UFC mais baixas para DPSC-I quando comparadas com DPSC-N e também mostraram diferenças quanto ao potencial de diferenciação.

Muitos aspectos biológicos podem explicar as diferenças entre os resultados do presente estudo e os previamente relatados na literatura científica. Neste estudo, assim como nos outros estudos que isolam células de polpa dental inflamada (20, 21), o diagnóstico das condições pulpareas (normal e inflamada) foi baseado em parâmetros clínicos, que não consideram critérios moleculares. Considerando que as células-tronco podem atuar na fisiologia pulpar tanto na normalidade quanto na inflamação, as amostras de ambos os grupos estudados, quando isoladas, poderiam estar em diferentes estados de ativação, não detectáveis em testes clínicos, e levar a diferentes resultados experimentais. Adicionalmente, os resultados deste estudo podem ter sido influenciados por mudanças na expressão gênica em resposta ao cultivo *in vitro*, modificando as condições metabólicas que elas apresentavam *in vivo*. Outra possível explicação é que as diferenças encontradas podem refletir particularidades genéticas individuais e não estar relacionadas diretamente à presença ou ausência de inflamação. Assim, DPSC-I podem não haver tido suas propriedades alteradas conforme hipótese sugerida por Alongi *et al.* (20).

A inflamação é um complexo processo que compreende múltiplas etapas e cujos sintomas, duração e efeitos variam de forma significativa em diferentes indivíduos, de acordo com suas características particulares. Dependendo da fase ou da intensidade da inflamação, alguns estímulos nocivos podem ativar a expressão de algumas das propriedades das células-tronco, incluindo a proliferação e a diferenciação. Estudos prévios mostraram que a hipóxia aumentou a proliferação (92, 93) e o potencial angiogênico (94) de DPSC. Em polpas dentais irreversivelmente inflamadas, foi observado um aumento na expressão do fator transformador de crescimento - beta 1 (TGF- 1), que desempenha um importante papel na dentinogênese reparadora (95). Relatou-se que plaquetas ativadas, frequentes na inflamação pulpar, estimularam a proliferação de células pulpareas e a síntese protéica *in vitro*, não sendo impedidas por fatores inflamatórios como o fator de necrose tumoral- (TNF- ), interleucina-1 e 6 (IL-1 e 6) e a toxina bacteriana lipopolissacarídeo (60).

Considerando que, na polpa dental inflamada, existem células-tronco viáveis com potencial de proliferação e diferenciação preservado, a irreversibilidade da pulpíte pode estar relacionada a outros fatores causais. Pulpites irreversíveis clinicamente diagnosticadas, diferentemente das reversíveis, têm sido associadas com um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  na polpa dental (68) e da produção de óxido nítrico (69). Uma vez que o esmalte e a dentina formam uma rígida estrutura que confina a polpa dental, a pressão tecidual intrapulpar é de grande importância na fisiologia pulpar. A inflamação, circunferencialmente propagada a partir do sítio de dano inicial, aumenta a pressão interna, comprimindo os tecidos e excitando as fibras nervosas, o que causa intensa dor. O aumento da pressão interna pode restringir fisicamente a regeneração que poderia ser promovida pelas células-tronco (71, 96, 97). Além disso, a intensa dor torna a intervenção clínica urgente, limitando uma possível regeneração pulpar natural. Os resultados do presente estudo sugerem que essas células podem preservar suas propriedades de células-tronco mesmo em um ambiente físico desfavorável.

A partir da constatação de que a polpa dental inflamada contém células-tronco preservadas, ela pode ser considerada como uma fonte alternativa e acessível de DPSC a serem empregadas na regeneração da polpa dental ou outras aplicações na engenharia de tecidos e não apenas como um mero refúgio biológico proveniente dos tratamentos endodônticos.

Estudos adicionais precisam investigar os eventos moleculares que podem afetar a viabilidade das DPSC e seu potencial regenerador, para identificar os fatores determinantes da pulpíte irreversível para preveni-la ou revertê-la.

## 5.2 ENSAIO DE BIOESTIMULAÇÃO POR LASER

Uma vez que o efeito bioestimulatório do laser de baixa intensidade tem sido amplamente relatado (63, 98-100), buscou-se, neste estudo, investigar comparativamente seus possíveis efeitos sobre DPSC-N e DPSC-I. Utilizou-se um laser de baixa potência vermelho (660 nm) e quatro diferentes fluências de energia (0,05; 0,30; 7 e 42 J/cm<sup>2</sup>) sob a hipótese de que as três primeiras densidades de

energia promoveriam efeitos bioestimulatórios positivos (aumento da proliferação e diferenciação celular), enquanto a dose mais elevada induziria efeito inibitório (67).

No presente estudo, o campo de irradiação do laser, que é um dos aspectos mais sensíveis em estudos de cultura de células, foi cuidadosamente determinado. Como o laser é uma emissão colimada de luz, a área irradiada é semelhante à área local da saída do equipamento. A maioria dos estudos publicados que investigaram o efeito do laser sobre cultura de células, consideraram que o feixe de luz emitido era suficiente para irradiar a área bem maior ocupada pela monocamada de células aderentes em placas de cultura (63, 99, 101, 102). A fim de reduzir esse viés experimental, adaptamos um protocolo (103) segundo o qual as células foram agrupadas em um pequeno espaço, permitindo a irradiação de todas simultaneamente.

Não se observou, porém, o efeito bioestimulatório esperado nem na proliferação (Figuras 22 e 23) nem na diferenciação de DPSC-N e DPSC-I (Figuras 24 e 25), embora os protocolos de irradiação (com fluências de energia entre 0,05 e 10 J/cm<sup>2</sup>) estivessem dentro do intervalo terapêutico (67). Esses resultados corroboram os achados de outros estudos, nos quais não se verificou proliferação em células da polpa dental após irradiação com laser Nd:YAG (104) e na linhagem de fibroblastos L-929 após a irradiação com laser de diodo (680 nm) (105). Resultados similares também foram encontrados quando células-tronco mesenquimais da medula óssea de murino foram irradiadas com laser infravermelho (808 nm) a 4 J/cm<sup>2</sup> por 91 segundos, três vezes por semana (101).

A ausência de efeito estimulador da proliferação celular após irradiação com laser, diferentemente dos resultados obtidos por outro estudo com DPSC (63), pode ser explicado pela constatação de que diferentes linhagens do mesmo tipo celular podem ter diferentes sensibilidades à irradiação com laser (106). Além disso, a maioria dos estudos que mostraram um aumento na proliferação celular após irradiação com laser realizaram suas análises sobre um único isolado celular (63, 98-100). No presente estudo, trabalhando com três isolados de células diferentes em cada grupo (de polpa dental normal e inflamada) e realizando análises individuais e agrupadas, um outro viés foi evitado.

Como todas as amostras de células deste estudo já apresentavam inicialmente taxas de proliferação muito elevadas, a irradiação com laser pode não



ter sido capaz de elevá-las ainda mais, conforme discutido em estudo prévio (101). Alguns autores também sugeriram que o efeito bioestimulatório ocorre apenas quando as células estão em condições de estresse (62), tais como déficits nutricionais (98-100). Embora tenha sido demonstrado que, sob condições de déficit nutricional, a irradiação com laser tenha sido capaz de melhorar o crescimento de DPSC, esta taxa de crescimento celular foi inferior à taxa observada quando as células foram cultivadas sob condições nutricionais normais (63).

No presente estudo, a inflamação apresentada pela polpa dentária a partir da qual algumas amostras de DPSC foram isoladas poderia ser considerada uma condição de estresse, mas também não induziu efeitos bioestimulatórios. Estes resultados sugerem que as condições de estresse não são sempre determinantes de efeitos fotoestimulatórios. Um resultado semelhante também foi observado por Ferreira *et al.* (102), que mostraram que, sob deficiência nutricional, não se observou aumento da proliferação de mioblastos C2C12 em culturas irradiados com lasers de GaAAs (660 nm) e de GaAlP (780 nm) com diferentes potências.

Em estudos anteriores, a irradiação com laser de baixa intensidade acelerou a diferenciação celular (107-110), enquanto, no presente estudo, ele não induziu efeito significativo na diferenciação odonto-osteogênica, quantificada com base na quantidade de matriz mineralizada produzida. Da mesma forma, Bouvet-Gerbetaz *et al.* (101) não observaram efeito significativo na diferenciação de células-tronco mesenquimais murinas irradiadas três vezes por semana. Esses autores discutem que, conforme sugerido em vários estudos, o efeito da irradiação com laser sobre a mineralização pode estar relacionado a um aumento inicial na proliferação celular e não a um efeito direto sobre a via de diferenciação. Tal hipótese pode explicar também os resultados obtidos no presente estudo, em que não se verificou aumento precoce na proliferação celular e a formação de nódulos mineralizados foi equivalente no controle e nos grupos irradiados com laser. Além disso, alguns autores têm discutido que o efeito da irradiação do laser é imediata e não cumulativa, o que sugere que as células irradiadas respondem imediatamente, mas, em seguida, logo retornam ao seu estado original (99).

Como têm sido relatados resultados promissores do uso do laser de baixa intensidade no tratamento da hipersensibilidade dentinária, produzindo efeitos anti-inflamatórios em células da polpa dental *in vivo* (111-115), este estudo também

irradiou as células através do tecido dentinário, o que produziu um nível de energia muito baixo. Vários efeitos têm sido descritos após terapia com laser de intensidade ultra-baixa, que é uma modalidade terapêutica que utiliza novas potências de laser, inferiores a 3 mW. Em tais níveis de energia, não há efeito térmico e há evidências que sugerem que essa modalidade terapêutica pode afetar o estado de oxi-redução celular e suas propriedades mecânicas (rigidez, adesão celular, etc) (116). É possível que, no presente estudo, os efeitos da irradiação do laser sejam outros que não desencadeem aumento da proliferação e da diferenciação celular, o que exigiria mais investigações.

Com base na alta variabilidade dos resultados encontrados na literatura e considerando o fato de que a faixa de densidade de energia parece ser muito estreita, é altamente recomendável o uso de um potenciômetro para configurar protocolos de irradiação com laser. Neste estudo e em outro prévio (101), diferenças importantes foram encontradas entre a potência real emitida e a exibida pelo equipamento. Isto se deve, provavelmente, a alterações na transmissão de luz através da fibra óptica, bem como no sistema de desfocalização.

Como sugerido em algumas revisões (62, 67), os efeitos da irradiação de células em cultura com laser de baixa intensidade ainda são controversos. Os efeitos fotoquímicos da luz dependem da combinação de vários parâmetros, incluindo o comprimento de onda, a área do feixe, a potência, a densidade de potência, a energia, a densidade de energia, a duração e a frequência da irradiação, a absorção da luz pelo meio e pela placa, as condições nutricionais e o tipo de células submetidas à irradiação. Além disso, pode haver efeitos sobre outros processos celulares, diferentes de proliferação e diferenciação, que não foram avaliados neste estudo.

### 5.3 BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS

A escolha da construção de bibliotecas subtrativas de cDNA, como metodologia para a avaliação de expressão gênica diferencial, baseou-se na experiência e nas disponibilidades técnicas de nosso grupo de pesquisa para análises minitranscriptômicas. Esse método tem sido empregado em diversos tipos

de investigações, como para conhecer a expressão gênica em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (117, 118), caracterizar genes específicos de um tecido (119, 120), avaliar a alteração da expressão gênica em certas condições patológicas (121-124), identificar genes responsáveis por fenótipos diferentes em uma mesma doença (125), estudar modificações na expressão gênica após uma infecção (126, 127), entre outras.

Como alternativas para essa análise, poderiam ter sido empregadas outras técnicas como o microarranjo de RNA, o *RNA seq* e o *PCR array*. Entretanto, o microarranjo e o *PCR array* exigiriam a escolha prévia de genes candidatos a serem analisados quanto à expressão diferencial. Além disso, o microarranjo seria de maior custo e também exigiria validação dos dados seja por *Northern blot* ou PCR em tempo real. O *RNA seq* ainda tem custo muito elevado e está disponível em poucos centros de pesquisa do País.

Podemos observar que informações celulares como as relacionadas à integridade e processamento da informação genética, ao metabolismo geral e à sinalização e interação celular são as mais abundantes em ambas as bibliotecas (Figuras 30 e 31).

A análise estatística mostrou que as categorias funcionais dos genes descritos são identicamente proporcionais em ambas as bibliotecas. Face à origem das amostras, poder-se-ia esperar uma diferença entre as duas populações celulares, como, por exemplo, na categoria funcional de transcritos relacionados à resposta imune. Isso, no entanto, não foi verificado, possivelmente em razão da propagação das células *in vitro*. Esse resultado pode indicar que células isoladas a partir de polpas dentais em diferentes condições fisiológicas passam a ter, em cultura, perfis de expressão gênica semelhantes, o que corrobora os demais resultados deste estudo, já discutidos anteriormente.

A coincidência de 39 genes entre ambas as bibliotecas mostra que não houve hibridação completa entre todas as diferentes amostras de cDNA durante as etapas experimentais iniciais. Convém ressaltar, porém, que não há abordagem experimental para a análise de expressão gênica diferencial que seja 100% eficiente. Considerando que a maioria dos genes coincidentes em ambas as bibliotecas estão envolvidos em funções celulares básicas, essa sobreposição de dados verificada não invalida o caráter diferencial das bibliotecas construídas.

Contudo, essa coincidência também pode corroborar a hipótese que as células estudadas apresentam, em cultura, perfis de expressão semelhantes.

Devemos considerar que os dados gerados a partir da análise das bibliotecas construídas direcionarão a estratégia de confirmação de eventuais genes diferencialmente expressos por células da polpa normal e inflamada em cultura. Análises por RT-PCR em tempo real para verificação dos perfis de expressão de cada um dos genes mostrados se fazem necessárias para confirmação dos resultados obtidos com a metodologia empregada neste estudo.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados, pode-se concluir que não foram identificadas diferenças significativas entre as propriedades das células da polpa dental normal e inflamada quanto à presença de células-tronco e seu potencial de proliferação e diferenciação, assim como em relação ao padrão de expressão gênica global.

As conclusões deste estudo apontaram, de forma mais específica, que:

1. Células-tronco (mesenquimais) de polpa dental normal e inflamada foram isoladas com sucesso.
2. Os perfis imunofenotípicos de DPSC-N e DPSC-I foram semelhantes e compatíveis com o de células-tronco mesenquimais.
3. A morfologia e a proliferação de DPSC-N e DPSC-I foram semelhantes.
4. Tanto DPSC-N quanto DPSC-I foram induzidas com sucesso às diferenciações odonto-osteogênica, adipogênica e condrogênica. Não se observou diferença significativa entre os potenciais de diferenciação de DPSC-N e DPSC-I.
5. O laser de InGaAIP, nas condições estudadas, não potencializou a proliferação ou a diferenciação odonto-osteogênica de DPSC-N e DPSC-I;
6. A análise das bibliotecas subtrativas de cDNA não revelou diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão gênica nas categorizações estabelecidas em *KEGG Orthology*.

Tomados em conjunto, nossos resultados apontam para a utilização das células de polpa dental inflamada como fonte de células-tronco funcionais. Aponta, ainda, para futuras terapias que visem à regeneração da polpa dental considerada atualmente como irreversivelmente inflamada.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Institutes of Health. Stem Cell Basics [homepage da internet]. Bethesda, MD, EUA: National Institutes of Health, EUA; 2011 [Acesso 17 abr 2012] Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/>.
2. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: Review a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-55.
3. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg* 2004;139(1):93-9.
4. Weissman IL. Stem Cells: Units of Development, Review Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* 2000;100:157-68.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
6. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotech* 2000;18(4):399-404.
7. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000;227(2):271-8.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
9. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-30.
10. 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 U S A* 2003;100(10):5807-12.
11. 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.
12. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med* 2010;14(6b):1635-44.
13. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008;58(2):137-47.



14. Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005;50(2):103-8.
15. Stanislawski L, Carreau J, Pouchelet M, Chen Z, Goldberg M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig* 1997;1(3):131-40.
16. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42.
17. Huang GTJ, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006;324(2):225-36.
18. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int* 2007;31(10):1191-7.
19. Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod* 2009;35(5):673-81.
20. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010;5(4):617-31.
21. Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod* 2010;36(5):820-5.
22. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005;20(8):1394-402.
23. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006;208(2):319-25.
24. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006;12(10):2813-23.
25. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo B, Robey P, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):191-9.
26. Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell* 2007;99(8):465-74.

27. de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* 2008;19(1):204-10.
28. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007;13(4):767-73.
29. Kerkis I, Ambrosio C, Kerkis A, Martins D, Zucconi E, Fonseca S, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med* 2008;6(1):35-47.
30. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 2008;26(3):638-45.
31. Yalvac M, Ramazanoglu M, Rizvanov A, Sahin F, Bayrak O, Salli U, et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J* 2009;10(2):105-13.
32. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368(2):329-35.
33. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005;31(10):711-8.
34. Yang B, Chen G, Li J, Zou Q, Xie D, Chen Y, et al. Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix-based scaffold. *Biomaterials* 2011;33(8):2449-61.
35. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod* 2010;36(3):469-74.
36. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, et al. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials*. 2010;31(13):3543-51.
37. Gomes JÁP, Geraldês Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1408-14.
38. Young C, Terada S, Vacanti J, Honda M, Bartlett J, Yelick P. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002;81(10):695-700.

39. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 2007;4(3):227-30.
40. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531-5. .
41. Duailibi M, Duailibi S, Young C, Bartlett J, Vacanti J, Yelick P. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004;83(7):523-8.
42. Li R, Guo W, Yang B, Guo L, Sheng L, Chen G, et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials* 2011;32(20):4525-38.
43. Garcia-Godoy F, Murray PE. Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem Cells Dev* 2006;15(6):881-7.
44. Huang GTJ, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2009;16(2):605-15.
45. Srisuwan T, Tilkorn D, Al-Benna S, Vashi A, Penington A, Messer H, et al. Survival of rat functional dental pulp cells in vascularized tissue engineering chambers. *Tissue Cell* 2012;44:111-21.
46. Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *J Am Dent Assoc* 2008;139(4):457-65.
47. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008;34(8):962-9.
48. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006;1(1):e79.
49. Yen AHH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008;331(1):359-72.
50. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K, Ogawa T. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res* 2005;84(6):515-20.
51. Reynolds AJ, Jahoda CAB. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation* 2004;72:566-75.
52. Armiñán A, Gandía C, Bartual MC, García-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2. 5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009;18(6):907-18.

53. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 2008;26(9):2408-18.
54. Tang R, Ding G, editors. Swine Dental Pulp Stem Cells Inhibit T-Cell Proliferation. *Transplant Proc* 2011;43(10):3955-9
55. Demircan PC, Sariboyaci AE, Unal ZS, Gacar G, Subasi C, Karaoz E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* 2011(0):1-16.
56. Shi S, Robey P, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;29(6):532-9.
57. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials* 2006;27(20):3766-81.
58. Kneebone WJ, Cnc DIH, Fiama D. Practical applications of low level laser therapy. *Pract Pain Manag* 2006;6(8):34-40.
59. Kotlow L. Photobiomodulating Lasers and Children's Dental Care. *J Laser Dent* 2009;17(3):125-30.
60. Agis H, Stampfl B, Watzek G, Gruber R. Activated platelets increase proliferation and protein synthesis of human dental pulp-derived cells. *Int Endod J* 2010;43(2):115-24.
61. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Nunez SC, Ribeiro MS. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol* 2007;52(9):899-903.
62. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2010;28 Suppl 1:S3-40.
63. Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2008; 40:433–8.
64. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers Medi Sci* 2006;21(2):86-9.
65. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B* 1989;3(4):638-40.
66. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 1991;11(1):87-91.

67. Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2011;27(1):237-49.
68. Kokkas A, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression in human pulp. *Int Endod J* 2007;40(3):198-203.
69. Di Maio FDN, Lohinai Z, D'arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis M, et al. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *J Dent Res* 2004;83(4):312-6.
70. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(2):179-200.
71. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 2007;33(3):213-9.
72. Pezelj-Ribaric SA, I.; Brekalo, I.; Miletic, I.; Hasan, M.; Simunovic-Soskic, M. Detection of Tumor Necrosis Factor in Normal and Inflamed Human Dental Pulp. *Arch Med Res* 2002;33:482-4.
73. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10(4):213-9.
74. Chang YC, Yang SF, Huang FM, Tai KW, Hsieh YS. Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod* 2003;29(2):114-7.
75. Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF, Hsieh YS, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod* 2004;30(10):704-7.
76. Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF- $\kappa$ B activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* 2005;84(11):994-8.
77. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GTJ. Cells Isolated from Inflamed Periapical Tissue Express Mesenchymal Stem Cell Markers and Are Highly Osteogenic. *J Endod* 2011;37(9):1217-24.
78. Lin L, Rosenberg P. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J* 2011;44(10):889-906.
79. Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *J Dent Res* 2004;83(6):496-9.
80. Sibov TT, Pavon LF, Oliveira DM, Marti LC, Guilhen DD, Amaro Jr E, et al. Characterization of Adherent Umbilical Cord Blood Stromal Cells Regarding Passage, Cell Number, and Nano-biomarking Utilization. *Cell Reprogram* 2010;12(4):391-403.

81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
82. Kim HJ, Im GI. Chondrogenic differentiation of adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res* 2009;27(5):612-9.
83. Clontech. PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual Cat. No. 637401. Mountain View, CA, USA: Clontech Laboratories, Inc.; 2008.
84. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999;23(4):387-8.
85. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007;14(6):1162-71.
86. Smith AJ, Patel M, Graham L, Sloan AJ, Cooper PR. Dentine regeneration: key roles for stem cells and molecular signalling. *Oral Biosci Med* 2005;2:127-32.
87. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006;17(3):511-5.
88. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 2002;12(9):432-8.
89. Young HE, Black Jr AC. Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276(1):75-102.
90. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358(3):948-53.
91. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006;184(3-4):105-16.
92. Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod* 2009;35(6):818-23.
93. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 2010;55(9):648-54.
94. Aranha AMF, Zhang Z, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, Nör JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* 2010;36(10):1633-7.

95. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Tripodi D, Strocchi R. Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J* 2004;37(2):114-9.
96. Van Hassel HJ. Physiology of the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971;32(1):126-34.
97. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J Endod* 1990;16(2):48-53.
98. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):179-84.
99. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007;39(4):365-72.
100. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, et al. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci* 2010;25(4):559-69.
101. Bouvet-Gerbetaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med* 2009;41(4):291-7.
102. Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg* 2009;27(6):901-6.
103. Gulsoy M, Ozer GH, Bozkulak O, Tabakoglu HO, Aktas E, Deniz G, et al. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Photochem Photobiol B* 2006;82(3):199-202.
104. Shiba H, Tsuda H, Kajiya M, Fujita T, Takeda K, Hino T, et al. Neodymium-doped yttrium-aluminium-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. *J Endod* 2009;35(3):373-6.
105. Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. *J Oral Sci* 2010;52(1):33-8.
106. Renno AC, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg* 2010;28(1):131-3.
107. Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, et al. Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *J Cell Biochem* 2010;111(6):1445-52.

108. Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol Pharm Bull* 2007;30(1):27-31.
109. Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J* 2010;21(6):491-8.
110. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005;23(2):161-6.
111. Corona SAM, Nascimento TN, Catirse ABE, Lizarelli RFZ, Dinelli W, Palma Dibb RG. Clinical evaluation of low level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. *J Oral Rehabil* 2003;30(12):1183-9.
112. Dilsiz A, Aydin T, Canakci V, Gungormus M. Clinical evaluation of Er:YAG, Nd:YAG, and diode laser therapy for desensitization of teeth with gingival recession. *Photomed Laser Surg* 2010;28 Suppl 2:S11-7.
113. Marsilio AL, Rodrigues JR, Borges AB. Effect of the clinical application of the GaAlAs laser in the treatment of dentine hypersensitivity. *J Clin Laser Med Surg* 2003;21(5):291-6.
114. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of laser in dentinal hypersensitivity treatment: a systematic review. *J Endod* 2011;37(3):297-303.
115. Todea CDM, Miron MI, Filip LM, Petre A. The Efficiency of Laser in the Hypersensitivity Therapy in Cervical Erosion. *Timisoara Med.* 2003;52:176-80.
116. Baratto L, Calza L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, et al. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* 2011;26(1):103-12.
117. Hemberger M, Himmelbauer H, Ruschmann J, Zeitz C, Fundele R. cDNA subtraction cloning reveals novel genes whose temporal and spatial expression indicates association with trophoblast invasion. *Dev Biol* 2000;222(1):158-69.
118. Oh B, Hwang SY, Solter D, Knowles BB. Spindlin, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. *Development* 1997;124(2):493-503.
119. Escribano J, Ortego J, Coca-Prados M. Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *J Biochem* 1995;118(5):921-31.
120. Swaroop A, Xu J, Agarwal N, Weissman SM. A simple and efficient cDNA library subtraction procedure: isolation of human retina-specific cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 1991;19(8):1954.
121. Hatano N, Nishikawa NS, McElgunn C, Sarkar S, Ozawa K, Shibanaka Y, et al. A comprehensive analysis of loss of heterozygosity caused by hemizygous



- deletions in renal cell carcinoma using a subtraction library. *Mol Carcinog.* 2001;31(3):161-70.
122. Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, et al. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 2000;60(6):1677-82.
  123. Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110(3):374-81.
  124. Wang T, Hopkins D, Schmidt C, Silva S, Houghton R, Takita H, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 2000;19(12):1519.
  125. Sifringer M, Uhlenberg B, Lammel S, Hanke R, Neumann B, Moers A, et al. Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 2004;114(2):149-56.
  126. Duguid JR, Dinauer MC. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic acids Res* 1990;18(9):2789-92.
  127. Coro ES, Chang WLW, Baumgarth N. Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol* 2006;176(7):4343-51.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

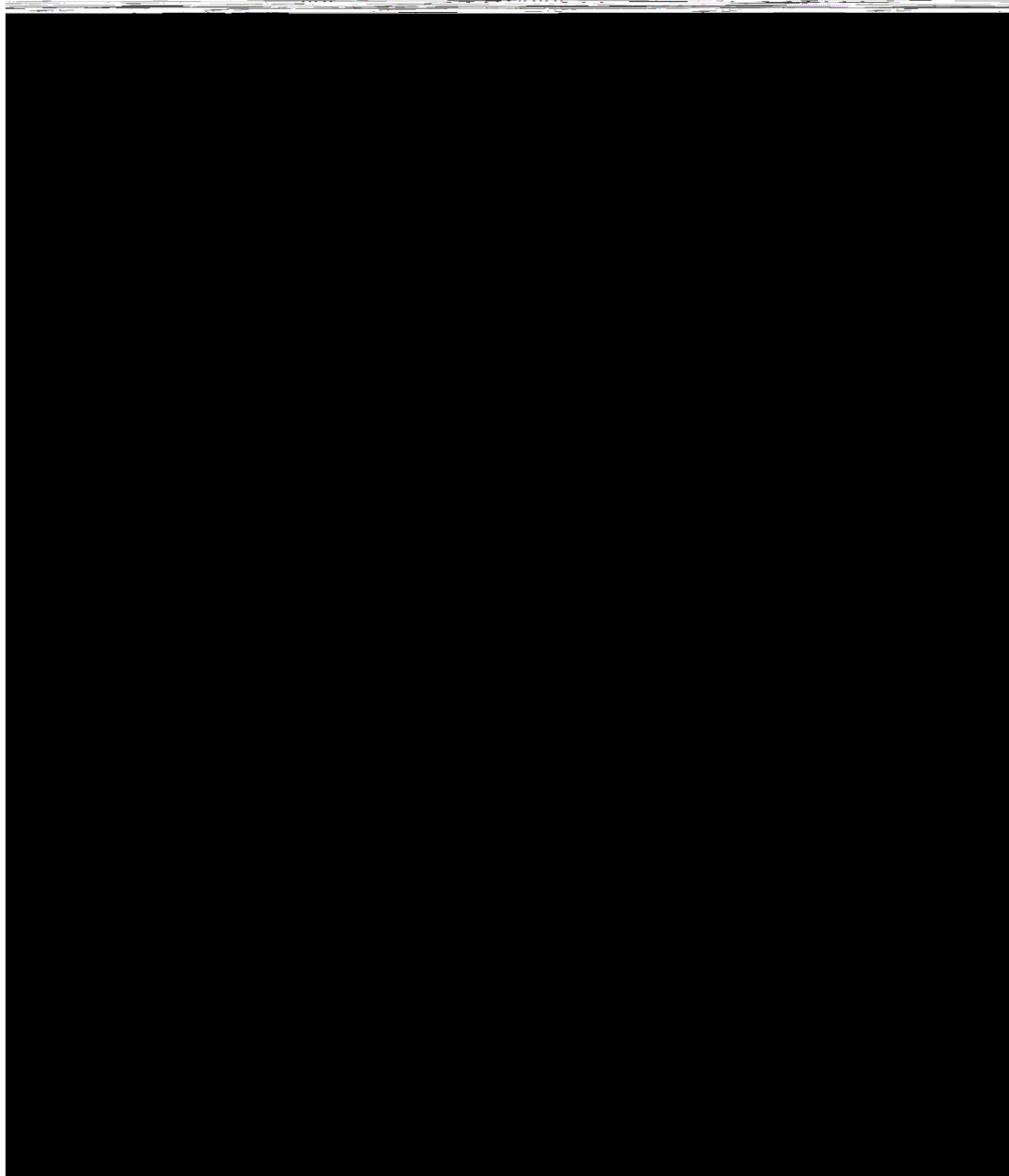
**Universidade de Brasília - UnB**

**Título do Projeto:** Estudo *in vitro* de células-tronco pulpare de dentes com e sem inflamação: caracterização e indução de regeneração

**Pesquisadora Responsável:** Luciana Oliveira Pereira

**Telefones para contato:** (61) 32740035 - (61) 33471480 - (61) 84154534

**e-mail:** luciana1212@unb.br



**APÊNDICE B - Tabela 06** - Genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental normal classificados funcionalmente segundo a ferramenta *KEGG Orthology (KO)*

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
C02 (1)	sp P46777 RL5	Proteína L5 da subunidade maior do ribossomo	100,00	100,00	101	1e-63	K02932	PIG
C03 (1)	sp O43663 PRC1	Proteína 1 reguladora da citocinese	96,43	96,43	56	4e-24	**	-
D10 (1)	sp Q04446 GLGB	Enzima 1,4- alfa-glicana ramificada	100,00	96,30	54	7e-27	K00700	M
E03 (1)	sp P21266 GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 3	90,00	90,00	30	1e-09	K04097	M
F04 (1)	sp P08473 NEP	Neprilisina	92,31	87,18	39	1e-13	K01389	M
F10 (1)	sp P06733 ENOA	Enolase alfa	97,73	96,59	88	3e-48	K01689	M
G03 (1)	sp P08240 SRPR	Receptor de partículas para reconhecimento de sinal - subunidade alfa	100,00	100,00	23	7e-07	K13431	SIC
G05 (1)	sp Q96CG8 CTHR1	Proteína 1 de colágeno tripla hélice contendo repetições	100,00	100,00	45	6e-25	K06236	SIC
H02 (1)	sp P09936 UCHL1	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase isozima L1	100,00	98,08	52	8e-15	K05611	M
H03 (1)	sp O15213 WDR46	Proteína 7 associada a pequeno RNA nucleolar U3	93,44	91,80	61	1e-27	K14768	PIG
H04 (1)	sp P13693 TCTP	Proteína de tumor controlada traducionalmente	100,00	100,00	50	1e-25	**	-
H07 (1)	sp Q8TCT8 PSL2	Proteína 2 semelhante a peptidase sinal	100,00	100,00	56	4e-27	K09596	M
B06 (2)	sp Q6P158 DHX57	Putativa helicase de RNA DHX57 dependente de ATP	98,15	98,15	54	7e-25	K14777	PIG
C05 (2)	sp P21781 FGF7	Fator de crescimento fibroblástico 7	96,36	94,55	55	1e-29	K04358	SIC
C06 (2)	sp O75533 SF3B1	Fator de <i>splicing</i> 3B - subunidade 1	100,00	100,00	61	1e-30	K12828	PIG
C08 (2)	sp Q8WYP5 ELYS	Proteína ELYS	98,75	97,50	80	3e-40	**	-
E06 (2)	sp Q6P1N9 TATD1	Putativa deoxirribonuclease TATDN1	94,92	93,22	59	2e-25	K01150	PIG
F05 (2)	sp P00395 COX1	Citocromo C oxidase - subunidade 1	93,75	92,19	64	1e-30	K02256	M
H06 (2)	sp P04406 G3P	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	97,87	95,74	94	1e-54	K00134	M
A04 (3)	sp Q9UIV1 CNOT7	Complexo de transcrição CCR4-NOT- subunidade 7	100,00	98,04	51	4e-26	K12581	PIG
A06 (3)	sp P00414 COX3	Citocromo C oxidase - subunidade 3	93,83	92,59	81	2e-43	K02262	M
B08 (3)	sp P00403 COX2	Citocromo C oxidase - subunidade 2	98,68	94,74	76	5e-07	K02261	M
C04 (3)	sp Q8IUR7 ARMC8	Proteína 8 contendo repetições ARM – isoforma 3	100,00	100,00	39	4e-15	**	-
C07 (3)	sp P00156 CYB	Citocromo b	96,23	88,68	53	1e-10	K00412	M
C10 (3)	sp Q9HAD4 WDR41	Proteína 41 contendo repetições WD	100,00	96,72	61	5e-32	K11803	PIG
D05 (3)	sp Q9Y3V2 RWDD3	Proteína 3 contendo o domínio RDW	97,62	95,24	42	7e-17	**	-
D09 (3)	sp P00403 COX2	Citocromo C oxidase - subunidade 2	97,65	94,12	85	4e-47	K02261	M

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
D11 (3)	sp Q86VP6 CAND1	Proteína 1 dissociada de NEDD8 associada à culina	100,00	100,00	87	3e-45	K07472	PIG
D12 (3)	sp Q14493 SLBP	Proteína de ligação a <i>hairpin</i> de histona de RNA	97,22	97,22	36	5e-15	K11659	PIG
E02 (3)	sp P19338 NUCL	Nucleolina	100,00	97,78	45	2e-19	K11294	PIG
F10 (3)	sp P26358 DNMT1	DNA (citosina-5-)-metiltransferase 1	98,15	96,30	54	3e-15	K00558	PIG
G06 (3)	sp Q9UEE5 ST17A	Serina/treonina-proteínaquinase 17a	100,00	100,00	116	3e-70	K02861	M
G10 (3)	sp Q13454 TUSC3	Candidato a supressor de tumor 3	100,00	100,00	55	1e-29	**	-
H09 (3)	sp P78417 GSTO1	Glutathiona S-transferase ômega-1	98,51	98,51	67	3e-37	K04097	M
H11 (3)	sp P00403 COX2	Citocromo c oxidase- subunidade 2	100,00	96,15	26	2e-09	K02261	M
A03 (4)	sp Q9BRT6 LLPH	Proteína homóloga a LLP	100,00	100,00	53	1e-26	**	-
B03 (4)	sp P02792 FRIL	Cadeia leve da ferritina	100,00	96,30	27	4e-10	K13625	M
C05 (4)	sp O95166 GBRAP	Proteína associada ao receptor de ácido gama-aminobutírico	100,00	100,00	91	4e-57	K08341	TC
C12 (4)	sp Q13263 TIF1B	Fator de transcrição intermediário 1-beta	100,00	100,00	49	4e-24	K08882	PIG
D02 (4)	sp O43505 B3GN1	N-acetil-actosaminida beta-1 ,3-N-acetilglicosaminiltransferase	93,33	93,33	60	2e-28	K00741	M
D04 (4)	sp P07686 HEXB	Beta-hexosaminidase - subunidade beta	100,00	100,00	45	6e-21	K01207	M
D07 (4)	sp Q99460 PSMD1	Subunidade regulatória 1 do proteossoma 26 S não-ATPase	100,00	100,00	33	4e-13	K03032	PIG
D08 (4)	sp A6NMY6 AXA2L	Putativa proteína semelhante à anexina A2	88,46	86,54	52	3e-20	**	-
E04 (4)	sp P07900 HS90A	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	100,00	100,00	54	6e-27	K04079	PIG
G01 (4)	sp Q9BZG8 DPH1	Proteína 1 de biossíntese da diftamida	96,23	96,23	53	8e-25	K15455	PIG
G02 (4)	sp Q4G0F5 VP26B	Proteína 26B associada à separação de proteína vacuolar	98,57	97,14	70	2e-37	K12479	TC
G04 (4)	sp P06703 S10A6	Proteína S100-A6	100,00	100,00	68	5e-27	K04507	SIC
B07 (5)	sp P49662 CASP4	Caspase 4	100,00	100,00	34	3e-13	K04394	M
C01 (5)	sp Q13490 BIRC2	Proteína 2 contendo repetição IAP baculoviral	100,00	100,00	64	4e-36	K04725	PIG
C02 (5)	sp O15258 RER1	Proteína RER1	100,00	97,30	37	2e-17	K03485	PIG
C04 (5)	sp P78383 S35B1	Membro B1 da família 35 de carreador de soluto	94,44	91,67	36	9e-14	K15275	SIC
D01 (5)	sp P80303 NUCB2	Nucleobindina-2	100,00	100,00	34	1e-13	**	-
D05 (5)	sp O14757 CHK1	Serina/treonina-proteína quinase Chk1	98,59	98,59	71	3e-40	K02216	M
D07 (5)	sp Q6UX73 CP089	UPF0764 proteína C16orf89	71,70	62,26	53	1e-13	**	-
E02 (5)	sp P50995 ANX11	Anexina A11	100,00	100,00	54	1e-25	**	-
E05 (5)	sp P30533 AMRP	Proteína associada ao receptor de alfa-2-macroglobulina	100,00	100,00	28	3e-11	K12474	TC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
H03 (5)	sp Q14568 HS902	Putativa proteína de choque térmico HSP 90-alfa A2	97,25	97,25	109	3e-61	**	-
H04 (5)	sp Q712K3 UB2R2	Enzima E2 R2 conjugadora à ubiquitina	100,00	100,00	94	2e-31	K02207	PIG
H05 (5)	sp Q16891 IMMT	Proteína da membrana interna da mitocôndria	100,00	97,44	39	3e-15	K07301	TC
H10 (5)	sp Q8IYT2 FTSJ1	Proteína 1 contendo domínio domínio FtsJ de metiltransferase	100,00	100,00	69	6e-37	K14590	-
A02 (6)	sp Q9H0D6 XRN2	5'-3' exorribonuclease 2	97,83	93,48	46	1e-06	K12619	PIG
A03 (6)	sp P63244 GBLP	Proteína 1 semelhante à de ligação à guanina - subunidade beta-2	100,00	100,00	57	2e-31	K07972	SIC
A08 (6)	sp P49721 PSB2	Proteassoma tipo 2 - subunidade beta	100,00	100,00	41	2e-18	K02734	PIG
A10 (6)	sp Q9Y3A5 SBDS	Proteína SBDS de maturação do ribossomo	98,85	96,55	87	3e-37	K14574	PIG
C04 (6)	sp Q9P0U1 TOM7	Homólogo do receptor mitocondrial de importação – subunidade TOM7	100,00	100,00	55	2e-31	**	-
C05 (6)	sp Q63HN8 RN213	E3 ubiquitina-proteína ligase RNF213	100,00	99,20	125	1e-73	K10629	PIG
E02 (6)	sp Q86VP1 TAXB1	Proteína 1 de ligação a Tax1	100,00	100,00	33	2e-14	**	-
E06 (6)	sp P46199 IF2M	Fator IF-2 mitocondrial de iniciação da tradução	100,00	100,00	24	8e-07	K02519	PIG
F07 (6)	sp Q9Y277 VDAC3	Proteína 3 de canal dependente de voltagem seletivo para ânion	81,43	72,86	70	6e-33	K15041	SIC
G04 (6)	sp Q15018 F175B	Complexo BRISC - subunidade Abro1	100,00	100,00	28	1e-09	**	-
G06 (6)	sp P62191 PRS4	Protease 26S – subunidade regulatória 4	93,33	93,33	30	2e-09	K03062	PIG
H01 (6)	sp Q8TB22 SPT20	Proteína 20 associada à espermatogênese	100,00	100,00	30	3e-12	**	-
H09 (6)	sp Q9BUT1 BDH2	3-hidroxibutirato desidrogenase tipo 2	94,87	89,74	39	2e-12	K00019	M
A01 (7)	sp P05161 ISG15	Proteína ISG15 semelhante à ubiquitina	100,00	97,14	35	1e-15	K12159	PIG
A09 (7)	sp O00264 PGRC1	Componente 1 do receptor de progesterona associado à membrana	100,00	100,00	41	2e-20	**	-
B07 (7)	sp P09132 SRP19	Proteína de 19 kDa de particular de reconhecimento de sinal	100,00	100,00	38	1e-16	K03105	PIG
C02 (7)	sp Q9Y5V3 MAGD1	Antígeno D1 associado a melanoma	98,44	96,88	64	4e-31	K12464	SN
C10 (7)	sp P00846 ATP6	ATP sintase - subunidade a	90,91	79,80	99	5e-30	K02116	M
D01 (7)	sp P00558 PGK1	Fosfoglicerato quinase 1	100,00	92,31	26	2e-07	K05715	M
D05 (7)	sp O43181 NDUS4	Proteína 4 mitocondrial [ubiquinona] ferro-enxofre NADH desidrogenase	100,00	100,00	53	2e-30	K03937	M
D11 (7)	sp P29692 EF1D	Fator de alongação 1-delta	96,55	86,21	29	2e-07	K15410	PIG
E04 (7)	sp Q99829 CPNE1	Copina-1	100,00	97,50	40	3e-19	K01292	M

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
F04 (7)	sp Q7Z2Z2 ETUD1	Proteína 1 contendo do domínio de ligação ao fator de alongação Tu GTP	100,00	99,31	145	2e-88	**	-
F07 (7)	sp Q16531 DDB1	Proteína 1 de ligação a dano ao DNA	100,00	97,18	71	3e-36	K10610	PIG
F08 (7)	sp P61769 B2MG	Microglobulina beta-2	100,00	100,00	52	4e-29	K08055	SI
F09 (7)	sp O15118 NPC1	Proteína1C1 de Niemann-Pick	100,00	100,00	56	2e-27	K12385	TC
G06 (7)	sp Q8WZT3 YS049	Proteína ENSP00000375192 com dedos de zinco	59,74	49,35	77	1e-10	K06230	PIG
G10 (7)	sp P07093 GDN	Nexina derivada da glia	100,00	100,00	32	3e-14	K09501	PIG
G11 (7)	sp Q9Y3E5 PTH2	Peptidil-tRNA hidrolase 2 mitocondrial	90,00	80,00	30	8e-09	K04794	PIG
H04 (7)	sp Q8N8R7 CK046	Proteína efetora ARF7	100,00	100,00	151	3e-84	**	-
A01 (8)	sp O00462 MANBA	Manosidase beta	98,18	98,18	55	6e-28	K01192	M
A02 (8)	sp Q8TCE6 FA45A	Proteína FAM45A	98,44	96,88	64	7e-35	**	-
A07 (8)	sp Q5T4S7 UBR4	E3 ubiquitina-proteína ligase UBR4	100,00	100,00	27	7e-08	K10691	PIG
A10 (8)	sp O60231 DHX16	Putativa helicase de RNA DHX16 dependente do fator ATP de pré- <i>splicing</i> de mRNA	100,00	100,00	26	3e-07	K12813	PIG
A11 (8)	sp P08253 MMP2	Colagenase tipo IV de 72 kDa	100,00	100,00	29	7e-14	K01398	M
B08 (8)	sp Q9H3C7 GGNB2	Proteína 2 de ligação à gametogenetina	100,00	98,41	63	6e-37	**	-
B10 (8)	sp Q9NQA3 WASH6	Homólogo 6 da família de proteínas WAS	100,00	100,00	60	3e-31	K06220	MC
C10 (8)	sp Q15165 PON2	Paraoxonase /arilesterase de soro 2	98,33	98,33	60	2e-30	K01045	M
D09 (8)	sp Q96CB5 CH044	Putativa proteína não caracterizada C8orf44	88,37	83,72	43	6e-19	**	-
D12 (8)	sp Q92499 DDX1	Helicase de RNA DDX1 dependente de ATP	100,00	100,00	107	1e-57	K13177	PIG
E04 (8)	sp Q9NWS1 PARI	Par de interação com PCNA	99,13	99,13	115	2e-71	K04802	PIG
F02 (8)	sp Q9NXR5 ANR10	Proteína q0 contendo o domínio de repetição anquirina	100,00	100,00	34	1e-14	K10520	PIG
F05 (8)	sp Q5T5P2 SKT	Homólogo de proteína "rabo de foice"	100,00	100,00	87	9e-50	**	-
H05 (8)	sp Q02809 PLOD1	Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 1	100,00	98,48	66	2e-38	K00473	M
H06 (8)	sp P24539 AT5F1	ATP sintase mitocondrial – subunidade b	100,00	100,00	35	8e-17	K02127	M
H07 (8)	sp P42704 LPPRC	Proteína mitocondrial contendo motivo PPR rico em leucina	100,00	100,00	43	1e-19	K05060	SIC
H10 (8)	sp P63261 ACTG	Actina citoplasmática 2	100,00	100,00	32	8e-13	K12315	MC
A11 (9)	sp Q9Y4K0 LOXL2	Homólogo 2 da lisil oxidase	100,00	98,81	84	1e-48	K00280	M
A12 (9)	sp P17041 ZNF32	Proteína 32 com "dedos de zinco"	100,00	100,00	54	5e-31	K13204	PIG
B07 (9)	sp Q9UKY1 ZHX1	Proteína 1 com "dedos de zinco" e "homeoboxes"	65,43	60,49	81	5e-09	K09299	PIG
C04 (9)	sp Q9GZP0 PDGFD	Fator de crescimento D derivado de plaquetas	100,00	100,00	92	2e-53	K05450	SIC
C06 (9)	sp O43684 BUB3	Proteína BUB3 "checkpoint" mitótico	100,00	100,00	40	1e-18	K02180	CMC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
C07 (9)	sp P12111 CO6A3	Cadeia alfa-3(VI) de colágeno	100,00	100,00	36	1e-15	K06238	SIC
D07 (9)	sp Q9Y6D6 BIG1	Proteína q de troca de guanina inibida por brefeldina A	98,59	97,18	71	4e-36	**	-
D09 (9)	sp Q9Y3B7 RM11	Proteína L11 mitocondrial do ribossomo 39S	100,00	100,00	49	3e-21	K02867	PIG
E02 (9)	sp P03901 NU4LM	Cadeia 4L da NADH-ubiquinona oxirredutase	100,00	90,79	76	4e-38	K03882	M
E04 (9)	sp Q06323 PSME1	Complexo de ativação de proteassoma - subunidade 1	100,00	100,00	41	1e-18	K06696	PIG
E06 (9)	sp Q13439 GOGA4	Membro 4 da subfamília A de Golgin	65,28	48,61	72	4e-09	**	-
G06 (9)	sp Q9Y620 RA54B	Proteína RAD54B de reparo e recombinação de DNA	100,00	100,00	72	1e-39	K10877	PIG
H01 (9)	sp Q86UA6 RIP	Proteína de interação com RPA	98,99	97,98	99	3e-46	**	-
H02 (9)	sp P12956 XRCC6	Proteína cruzada complementar 6 de reparo a raio X	100,00	98,61	72	1e-26	K10884	PIG
H07 (9)	sp P13073 COX41	Citocromo c oxidase mitocondrial – subunidade 4 isoforma 1	100,00	100,00	95	1e-60	K02263	M
H10 (9)	sp P33241 LSP1	Proteína 1 específica de linfócito	100,00	96,97	33	9e-13	K14957	SI
A06 (10)	sp P40429 RL13A	Proteína L13a do ribossomo 60S	100,00	100,00	60	8e-34	K02872	PIG
A11 (10)	sp P06576 ATPB	ATP sintase mitocondrial - subunidade beta	94,44	88,89	36	2e-12	K02133	M
B12 (10)	sp P51531 SMCA2	Provável ativador de transcrição global SNF2L2	100,00	100,00	47	2e-19	K11647	PIG
C07 (10)	sp Q99942 RNF5	E3 ubiquitina-proteína ligase RNF5	100,00	100,00	32	7e-16	K10666	PIG
C12 (10)	sp P03915 NU5M	Cadeia 5 da NADH-ubiquinona oxirredutase	98,11	96,23	53	1e-22	K03883	M
D05 (10)	sp O00300 TR11B	Membro 11B da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral	100,00	100,00	24	7e-08	K05148	SIC
D11 (10)	sp P84077 ARF1	Fator 1 de ribosilação de ADP	100,00	100,00	58	3e-30	K07937	SIC
E07 (10)	sp P48047 ATPO	ATP sintase mitocondrial - subunidade O	76,67	71,67	60	1e-16	K02137	M
F04 (10)	sp Q86U44 MTA70	N6-adenosina-metiltransferase – subunidade de 70 kDa	95,35	90,70	43	3e-18	K05925	M
F05 (10)	sp P11021 GRP78	Proteína de 78 kDa regulada por glicose	100,00	100,00	63	2e-32	K09490	PIG
F06 (10)	sp P53618 COPB	Coatômero - subunidade beta	100,00	100,00	134	3e-67	K05236	SIC
G11 (10)	sp O43852 CALU	Calumenina	92,31	90,77	65	7e-33	**	-
H02 (10)	sp P09486 SPRC	SPARC	100,00	100,00	24	2e-08	K08136	M
H05 (10)	sp O15439 MRP4	Proteína 4 associada a resistência a multidrogas	100,00	98,31	59	5e-28	K05673	SIC
H11 (10)	sp P53618 COPB	Coatômero - subunidade beta	98,18	98,18	55	1e-23	K05236	SIC
D07 (11)	sp Q9NRN9 METL5	Proteína 5 semelhante à metiltransferase	100,00	100,00	64	7e-37	**	-
D09 (11)	sp Q15582 BGH3	Proteína ig-h3 induzida por fator de crescimento transformante beta	98,44	95,31	64	9e-31	K13375	SIC
D11 (11)	sp P27635 RL10	Proteína L10 do ribossomo 60S	98,00	96,00	50	4e-26	K02866	PIG
D12 (11)	sp P56589 PEX3	Factor 3 da biogênese peroxissomal	100,00	100,00	79	2e-44	K13336	TC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
E02 (11)	sp Q07960 RHG01	Proteína 1 de ativação à GTPase Rho	100,00	100,00	36	1e-13	K13709	CC
E03 (11)	sp P36578 RL4	Proteína L4 do ribossomo 60S	100,00	100,00	48	1e-23	K02930	PIG
E08 (11)	sp Q12974 TP4A2	Proteína tirosina fosfatase tipo IVA 2	100,00	100,00	34	1e-16	K01104	SIC
F03 (11)	sp O94855 SC24D	Proteína de transporte de proteínas Sec24D	100,00	100,00	35	2e-13	K14007	PIG
F05 (11)	sp P16152 CBR1	Carbonil redutase [NADPH] 1	96,30	96,30	27	9e-10	K00079	M
F09 (11)	sp O00233 PSMD9	Subunidade 9 regulatória do proteassoma 26S não-ATPase	100,00	100,00	44	4e-22	K06693	PIG
G03 (11)	sp Q03518 TAP1	Transportador 1 de peptídeo de antígeno	98,98	97,96	98	2e-41	K05653	SI
G08 (11)	sp P63092 GNAS2	Proteína G(s) de ligação a guanina – subunidade menor alfa	98,61	98,61	72	3e-39	K04632	SIC
H08 (11)	sp P62987 RL40	Ubiquitina-proteína L40 do ribossomo 60S	100,00	100,00	44	7e-21	**	-
E02 (12)	sp O43167 ZBT24	Proteína 24 contendo domínio “dedos de zinco” e BTB	86,36	81,82	66	2e-25	K10503	PIG
E04 (12)	sp Q9Y5V3 MAGD1	Antígeno D1 associado a melanoma	100,00	100,00	27	3e-08	K12464	SN
E08 (12)	sp Q9BQ70 TCF25	Fator de transcrição 25	100,00	100,00	48	3e-22	K13423	PIG
F02 (12)	sp O00622 CYR61	Proteína CYR61	100,00	100,00	97	2e-59	K06829	SIC
F03 (12)	sp Q13530 SERC3	Incorporador 3 de serina	100,00	100,00	43	3e-20	**	-
Contig 2	sp Q9Y5T5 UBP16	Hidrolase carboxi-terminal da ubiquitina 16	100,00	98,31	59	2e-34	K11874	PIG
Contig 4	sp P62829 RL23	Proteína L23 do ribossomo 60S	98,68	98,68	76	2e-39	K02893	PIG
Contig 6	sp P00414 COX3	Citocromo c oxidase - subunidade 3	94,00	92,00	50	6e-26	K02262	M
Contig 7	sp Q14956 GPNMB	Glicoproteína transmembrana NMB	97,90	97,20	143	2e-75	**	-
Contig 9	sp Q9NRX5 SERC1	Incorporador 1 de serina	100,00	100,00	63	1e-36	**	-
Contig 10	sp Q9Y2A7 NCKP1	Proteína 1 associada a NCK	98,21	98,21	56	2e-28	K05750	MC
Contig 13	sp Q12791 KCMA1	Canal de cálcio ativado por potássio - subunidade alfa-1	100,00	100,00	107	3e-66	K04936	SIC
Contig 15	sp P10619 PPGB	Proteína protetora lisossomal (Catepsina A)	98,21	98,21	56	7e-33	K13289	M
Contig 17	sp Q6P3S6 FBX42	Proteína 42 F-box	98,41	98,41	63	5e-36	K10317	PIG
Contig 18	sp P01024 CO3	Complemento C3	100,00	100,00	56	3e-34	K03990	SI
Contig 21	sp P07093 GDN	Nexina derivada da glia	99,01	99,01	101	3e-66	K05452	SIC
Contig 29	sp P55268 LAMB2	Laminina - subunidade beta 2	100,00	100,00	23	5e-09	K06243	SIC
Contig 37	sp P62826 RAN	Proteína nuclear Ran de ligação a GTP	100,00	100,00	38	2e-20	K07936	PIG
Contig 38	sp P07686 HEXB	Beta-hexosaminidase - subunidade beta	93,10	89,66	29	2e-12	K12373	M
Contig 42	sp Q9GZR7 DDX24	Helicase de RNA DDX24 dependente de ATP	100,00	100,00	88	1e-53	K14805	PIG
Contig 46	sp Q8IVG9 HUNIN	Putativo peptídeo de humanina	100,00	100,00	24	3e-10	**	-
Contig 47	sp P62854 RS26	Proteína S26e da subunidade menor do ribossomo	97,96	97,96	49	2e-27	K02976	PIG

(Continua)



(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
Contig 48	sp P02792 FRIL	Cadeia leve da ferritina	100,00	100,00	25	2e-27	K13625	M
Contig 56	sp P11142 HSP7C	Proteína de choque térmico - cognata de 71 kDa	100,00	98,70	77	3e-46	K03283	PIG
Contig 58	sp P63261 ACTG	Actina citoplasmática 2	100,00	100,00	44	2e-22	K05692	MC
Contig 59	sp P55884 EIF3B	Fator 3 de iniciação da tradução - subunidade B	100,00	100,00	80	1e-49	K03253	PIG
Contig 60	sp P03905 NU4M	Oxirredutase ubiquinona de NADH - cadeia 4	95,45	89,77	88	4e-25	K03881	M
Contig 61	sp O43432 IF4G3	Fator 4 gama 3 eucariótico de iniciação da tradução	92,71	91,67	96	7e-49	K03260	PIG
Contig 63	sp P51114 FXR1	Proteína 1 associada à síndrome de retardo mental do X frágil	100,00	100,00	40	2e-34	K15516	PIG
Contig 67	sp O94829 IPO13	Importina 13	100,00	100,00	106	5e-56	**	-
Contig 68	sp P61353 RL27	Proteína L27Ae da subunidade maior do ribossomo	100,00	100,00	68	2e-31	K02900	PIG
Contig 71	sp Q9NZ45 CISD1	Proteína 1 contendo o domínio de ferro-enxofre CDGSH	91,38	87,93	58	2e-15	**	-
Contig 76	sp Q9Y5V3 MAGD1	Antígeno D1 associado a melanoma	100,00	98,44	64	8e-36	K12464	SN
Contig 79	sp Q99615 DNJC7	Homólogo de Dna J - subfamília C membro 7	100,00	100,00	48	1e-26	K09527	PIG
Contig81	sp Q14674 ESPL1	Separase	100,00	100,00	64	1e-26	K02365	PIG
Contig 85	sp O00303 EIF3F	Fator 3 de iniciação da tradução - subunidade F	100,00	100,00	44	2e-22	K03249	PIG
Contig 90	sp P61254 RL26	Proteína L26 da subunidade maior do ribossomo	100,00	100,00	39	3e-21	K02898	PIG
Contig 92	sp Q9UBB9 TFP11	Proteína 11 de interação com a tuftelina	100,00	100,00	52	1e-28	K13103	PIG
Contig 98	sp P05141 ADT2	Translocador 2 de adenina	100,00	100,00	25	2e-10	K05863	SIC
Contig 100	sp P19883 FST	Folistatina	98,25	95,61	114	3e-82	K04661	SIC
Contig 101	sp P10768 ESTD	Hidrolase S-formilglutaciona	100,00	98,31	59	2e-34	K01070	M
Contig 103	sp P09871 C1S	Complemento - subcomponente 1S	96,30	96,30	54	6e-30	K01331	SI

**Seq.:** Sequência analisada**Posit. (%):** Percentual de alinhamentos com pontuação positiva**Ident. (%):** Percentual de identidade entre as sequências analisadas e as do banco de dados**Tam. (pb):** Tamanho do alinhamento, em pares de base**Entrada KO:** Código de registro da proteína na ferramenta *KEGG Orthology*\*\* Classificação funcional não descrita pela ferramenta *KEGG Orthology (KO)*, porém descrita em *Proteína KnowledgeBase (UniProtKB)***Categ.:** Categorias descritas na ferramenta *KEGG Orthology* (CC: Comunicação celular; CMC: Crescimento e morte celular; M: Metabolismo; MC: Motilidade celular; PIG: Processamento da informação genética; SI: Sistema imune; SIC: Sinalização e interação celular; SN: Sistema Nervoso; TC: Transporte e catabolismo).

As sequências destacadas coincidiram nas duas bibliotecas.

**APÊNDICE C - Tabela 07** - Genes identificados na biblioteca enriquecida por transcritos expressos por células de polpa dental inflamada classificados funcionalmente segundo a ferramenta *KEGG Orthology (KO)*

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
B06 (1)	sp P0C0S5 H2AZ	Histona H2A.Z	98,46	96,92	65	3e-33	K11251	PIG
B08 (0)	sp Q9Y6A5 TACC3	Proteína transformante ácida 3 contendo domínio "coil-coiled"	100,00	100,00	70	2e-35	K14283	PIG
C10 (0)	sp O95235 KI20A	Proteína semelhante à cinesina KIF20A	100,00	100,00	38	3e-17	K10402	MC
D03 (0)	sp Q96IX5 USMG5	Proteína 5 superexpressa durante o crescimento do músculo esquelético	100,00	100,00	21	6e-07	**	-
D04 (0)	sp Q9BV57 MTND	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metilpenteo dioxigenase	98,18	98,18	55	4e-31	K08967	M
D07 (0)	sp O00231 PSD11	Proteassoma 26S não regulatória de ATPase - subunidade 11	96,92	95,38	65	3e-30	K03036	PIG
D10 (0)	sp Q16698 DECR	2,4-dienoil-CoA redutase mitocondrial	94,37	94,37	71	1e-36	K13236	M
E03 (0)	sp Q04721 NOTC2	Proteína 2 homóloga a notch de locus neurogênico	100,00	95,45	44	1e-16	K02599	SIC
E04 (0)	sp P49454 CENPF	Proteína de centrômero F	100,00	97,83	46	1e-18	K11499	PIG
E08 (0)	sp P62805 H4	Histona H4	100,00	100,00	67	5e-37	K11254	PIG
F01 (0)	sp P62854 RS26	Proteína S26e da subunidade menor do ribossomo	100,00	100,00	47	3e-24	K02976	PIG
F03 (0)	sp P05141 ADT2	Translocador 2 de adenina	95,83	95,83	24	1e-06	K05863	SIC
F08 (0)	sp Q15041 AR6P1	Proteína 1 que interage com a proteína 6 semelhante ao fator de ribosilação de ADP	96,23	92,45	53	2e-14	K07951	SIC
F09 (0)	sp O15118 NPC1	Proteína C1 de Niemann-Pick	100,00	100,00	65	4e-34	K12385	TC
G01 (0)	sp Q9UNF1 MAGD2	Antígeno D2 associado a melanoma	95,06	95,06	81	5e-40	K12464	SN
G06 (0)	sp P39656 OST48	Dolichil-difosfo-oligossacarídeo glicosil-transferase - subunidade de 48 kDa	92,63	91,58	95	8e-51	K07151	M
G07 (0)	sp Q9HD67 MYO10	Miosina X não convencional	100,00	100,00	50	4e-24	K12559	MC
G08 (0)	sp Q6UWL2 SUSD1	Proteína 1 contendo domínio Sushi	90,00	86,67	30	2e-08	**	-
A03 (1)	sp O00303 EIF3F	Fator 3 de iniciação da tradução - subunidade F	93,18	90,91	44	7e-16	K03249	PIG
A06 (1)	sp Q9NV96 CC50A	Proteína 50A de controle do ciclo celular	95,00	92,50	40	9e-18	K10994	PIG
A07 (1)	sp P53992 SC24C	Proteína de transporte proteico Sec24C	100,00	100,00	57	6e-12	K14007	PIG
A11 (1)	sp Q16394 EXT1	Exostosina-1	100,00	97,56	41	4e-19	K02366	M
B12 (1)	sp Q96B26 EXOS8	Componente RRP43 do complexo do exossomo	93,62	93,62	47	3e-21	K12586	PIG
C02 (1)	sp P08865 RSSA	Proteína AS do ribossomo 40S	89,44	88,73	142	5e-79	K02945	PIG

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
C03 (1)	sp O00299 CLIC1	Proteína 1 do canal intracelular de cloreto	98,15	98,15	54	2e-26	K05021	SIC
D03 (1)	sp Q9UBE0 SAE1	Enzima ativadora de SUMO – subunidade 1	96,30	88,89	27	7e-08	K10684	PIG
D05 (1)	sp P12268 IMDH2	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase 2	100,00	98,36	61	2e-30	K00088	M
D11 (1)	sp P35221 CTNA1	Catenina alfa-1	97,50	95,00	40	8e-15	K05691	CC
E03 (1)	sp Q13418 ILK	Proteína quinase ligada à integrina	100,00	100,00	63	1e-31	K06272	M
E06 (1)	sp P60903 S10AA	Proteína S100-A10	100,00	100,00	33	3e-15	**	-
E11 (1)	sp O14936 CSKP	Proteína periférica CASK de membrana plasmática	100,00	99,29	141	3e-89	K06103	CC
F09 (1)	sp P54727 RD23B	Homólogo B da proteína RAD23 de reparo de excisões por UV	95,06	95,06	81	3e-40	K10839	PIG
G01 (1)	sp Q07866 KLC1	Cadeia leve 1 da cinesina	97,37	94,74	38	2e-16	K10407	MC
G02 (1)	sp Q9NR30 DDX21	Helicase 2 de RNA nucleolar	97,60	96,80	125	5e-67	K13131	PIG
G05 (1)	sp Q712K3 UB2R2	Enzima E2 R2 conjugadora à ubiquitina	100,00	100,00	25	2e-08	K02207	PIG
H06 (1)	sp P35555 FBN1	Fibrilina-1	100,00	100,00	139	2e-95	K06825	SIC
H07 (1)	sp Q9Y4K0 LOXL2	Homólogo 2 da lisil oxidase	100,00	100,00	56	1e-31	K00280	M
H09 (1)	sp Q96GE9 CI123	Proteína transmembrana C9orf123	86,79	86,79	53	2e-23	**	-
A06 (2)	sp Q08431 MFGM	Lactaderina	100,00	98,08	52	3e-28	**	-
A08 (2)	sp P43308 SSRB	Proteína associada a translocon- subunidade beta	100,00	100,00	30	6e-11	K13250	PIG
A11 (2)	sp P00156 CYB	Citocromo b	97,59	92,77	83	3e-16	K00412	M
B06 (2)	sp O43852 CALU	Calumenina	97,53	97,53	81	1e-45	**	-
B11 (2)	sp Q14697 GANAB	Alfa-glucosidase neutra AB	96,08	96,08	51	7e-24	K05546	M
C06 (2)	sp Q08050 FOXN1	Proteína M1 da "Forkhead Box"	100,00	100,00	73	1e-40	K09406	PIG
D05 (2)	sp P63261 ACTG	Actina citoplasmática 2	100,00	100,00	51	4e-28	K05692	MC
D06 (2)	sp P43686 PRS6B	Protease regulatória 26S - subunidade 6B	100,00	100,00	31	2e-11	K03063	PIG
E08 (2)	sp Q14094 CCNI	Ciclina-I	100,00	98,18	55	9e-28	K02220	CMC
F09 (2)	sp P41252 SYIC	Ligase citoplasmática de isoleucina--tRNA	98,88	97,75	89	1e-47	K01870	PIG
F12 (2)	sp P27635 RL10	Proteína L10 do ribossomo 60S	95,24	92,06	63	2e-30	K02866	PIG
G09 (2)	sp P55345 ANM2	Proteína arginina N-metiltransferase 2	100,00	100,00	44	3e-21	K11435	PIG
H04 (2)	sp Q8IW41 MAPK5	Proteína quinase 5 ativada pela MAP quinase	91,91	91,18	136	1e-74	K04442	SIC
A05 (3)	sp Q15365 PCBP1	Proteína 1 de ligação a Poli(rC)	100,00	100,00	39	1e-16	K12889	PIG
A06 (3)	sp Q6UX73 CP089	Proteína UPF0764 C16orf89	71,43	71,43	35	8e-07	**	-
A07 (3)	sp P84243 H33	Histona H3.3	95,74	95,74	47	8e-22	K11253	PIG
B09 (3)	sp Q9ULC3 RAB23	Proteína Rab-23 relacionada a Ras	98,77	98,77	81	1e-44	K06234	SIC
B12 (3)	sp Q8IXH7 NELFD	Fator de alongação negativo C/D	98,61	98,61	72	2e-36	K15181	PIG
C02 (3)	sp Q5GLZ8 HERC4	Provável proteína ligase HERC4 a ubiquitina E3	98,80	97,59	83	2e-43	K10615	PIG

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
C07 (3)	sp P63261 ACTG	Actina citoplasmática 2	100,00	97,50	40	2e-18	K05692	MC
D04 (3)	sp P50914 RL14	Proteína L14 do ribossomo	86,79	77,36	53	4e-28	K02875	PIG
D06 (3)	sp Q9BZG8 DPH1	Proteína 1 de biosíntese da diftamida	97,83	97,83	46	3e-22	K15455	PIG
D11 (3)	sp P14635 CCNB1	Ciclina B1 específica de G2/mitose	100,00	100,00	87	1e-47	K05868	CMC
D12 (3)	sp Q92747 ARC1A	Complexo proteico 2/3 relacionado à actina – subunidade 1A	91,67	91,67	24	3e-07	K05757	MC
E01 (3)	sp P08962 CD63	Antígeno CD63	100,00	100,00	123	6e-68	K06497	SIC
E05 (3)	sp Q7Z6Z7 HUWE1	E3 ubiquitina-proteína ligase HUWE1	98,15	96,30	54	1e-23	K10592	PIG
E06 (3)	sp O60427 FADS1	Desaturase 1 de ácidos graxos	100,00	100,00	54	3e-31	K10224	M
E09 (3)	sp P50897 PPT1	Palmitoil-proteína tioesterase 1	98,95	98,95	95	1e-57	K01074	M
E11 (3)	sp P63092 GNAS2	Proteína G(s) de ligação a guanina – subunidade menor alfa	100,00	100,00	39	9e-20	K04632	SIC
E12 (3)	sp O00469 PLOD2	Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 2	60,61	59,09	66	1e-13	K13645	M
F02 (3)	sp P61204 ARF3	Fator 3 de ribosilação de ADP	100,00	98,98	98	1e-62	K07938	SIC
G05 (3)	sp P67809 YBOX1	Proteína 1 de ligação a elemento sensível a nuclease	100,00	96,61	59	2e-32	K09276	PIG
H01 (3)	sp P55795 HNRH2	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea H2	100,00	100,00	23	1e-07	K12898	PIG
H03 (3)	sp Q15582 BGH3	Proteína ig-h3 induzida pelo fator de crescimento transformante beta	100,00	100,00	81	1e-34	K13375	SIC
H04 (3)	sp Q96EY8 MMAB	Ácido cob(I)irínico a,c-diamida adenosiltransferase mitocondrial	100,00	100,00	26	2e-08	**	-
A08 (4)	sp P61586 RHOA	Proteína transformante RhoA	100,00	100,00	38	1e-16	K04513	SIC
A09 (4)	sp P08174 DAF	Fator acelerador do decaimento do complemento	100,00	100,00	75	2e-46	K04006	SI
A10 (4)	sp P03915 NU5M	Cadeia 5 da NADH-ubiquinona oxirredutase	100,00	96,05	76	7e-39	K03883	M
A12 (4)	sp Q9H0R3 TM222	Proteína transmembrana 222	100,00	97,92	48	1e-28	**	-
B03 (4)	sp P05388 RLA0	Proteína acídica P0 do ribossomo 60S	100,00	98,11	53	8e-26	K02941	PIG
B12 (4)	sp P25705 ATPA	ATP sintase mitocondrial – subunidade alfa	100,00	100,00	60	1e-28	K02132	M
C02 (4)	sp Q86WV5 TEN1L	Complexo CST - subunidade TEN1	100,00	100,00	32	1e-12	K11116	PIG
C07 (4)	sp Q14591 ZN271	Proteína 271 com dedos de zinco	100,00	100,00	65	1e-34	K10501	PIG
C10 (4)	sp O00622 CYR61	Proteína CYR61	88,89	80,56	36	1e-10	K06829	SIC
D01 (4)	sp Q96KA5 CLP1L	Proteína semelhante à proteína transmembrana 1 de fissura de lábio e palato	100,00	100,00	80	7e-47	**	-
D02 (4)	sp P02751 FINC	Fibronectina	98,15	96,30	54	2e-15	K05717	SIC
D03 (4)	sp P17480 UBF1	Fator de transcrição nucleolar 1	100,00	100,00	50	8e-25	K09273	PIG
D04 (4)	sp Q5T4S7 UBR4	E3 ubiquitina-proteína ligase UBR4	100,00	100,00	28	2e-09	K10691	PIG

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
E02 (4)	sp P32969 RL9	Proteína L9 do ribossomo 60S	100,00	100,00	33	4e-06	K02940	PIG
E03 (4)	sp P84098 RL19	Proteína L19 do ribossomo 60S	100,00	100,00	38	3e-07	K02885	PIG
E04 (4)	sp P62316 SMD2	Pequena ribonucleoproteína Sm D2	100,00	96,43	28	2e-09	**	-
E05 (4)	sp P31948 STIP1	Fosfoproteína 1 induzida por stress	100,00	100,00	57	2e-26	K09553	PIG
E08 (4)	sp P48454 PP2BC	Serina/treonina-proteína fosfatase 2B – subunidade catalítica – isoforma gama	100,00	100,00	83	8e-51	K15423	PIG
E09 (4)	sp O15258 RER1	Proteína RER1	100,00	100,00	61	1e-34	K03485	PIG
F04 (4)	sp P06576 ATPB	ATP sintase mitocondrial - subunidade beta	86,67	86,67	30	9e-10	K02133	M
F05 (4)	sp P19404 NDUV2	NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 2 mitocondrial	100,00	100,00	76	2e-45	K03943	M
F07 (4)	sp Q13308 PTK7	Tirosina-proteína quinase 7 inativa	100,00	100,00	45	1e-23	K05127	SIC
F12 (4)	sp P07858 CATB	Catepsina B	97,26	94,52	73	9e-43	K01363	TC
G02 (4)	sp P43308 SSRB	Proteína associada a translocon- subunidade beta	100,00	99,21	127	2e-84	K13250	PIG
G05 (4)	sp Q9BWL3 CA043	Proteína não caracterizada C1orf43	70,73	65,85	41	2e-07	**	-
G07 (4)	sp Q96SA4 SERC2	Incorporadora de serina 2	97,37	97,37	76	2e-33	**	-
G09 (4)	sp Q14145 KEAP1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch	100,00	100,00	53	1e-26	K10456	PIG
H01 (4)	sp O43889 CREB3	Proteína 3 de ligação a elemento responsivo a AMP cíclico	97,50	96,25	80	1e-39	K09048	PIG
H06 (4)	sp Q9Y2D5 AKAP2	Proteína de ancoragem à quinase A	94,87	92,31	39	9e-13	**	-
H09 (4)	sp P10606 COX5B	Citocromo c oxidase subunidade 5B, mitocondrial	96,67	96,67	30	7e-11	K02265	M
H11 (4)	sp Q969G3 SMCE1	Regulador de cromatina dependente de actina associado a matriz relacionado a SWI/SNF - subfamília E - membro 1	100,00	97,83	46	2e-10	K11651	PIG
A09 (5)	sp P26447 S10A4	Proteína S100-A4	81,48	74,07	54	2e-17	K08617	M
A12 (5)	sp P07437 TBB5	Cadeia beta da tubulina	100,00	100,00	71	2e-40	K07375	MC
B06 (5)	sp Q9BVK8 TM147	Proteína transmembrana 147	100,00	97,30	37	1e-17	**	-
B08 (5)	sp Q969Q0 RL36L	Proteína semelhante à L36a do ribossomo 60S	100,00	100,00	26	1e-11	K02920	PIG
B10 (5)	sp Q9H9T3 ELP3	Proteína 3 do complexo de alongação	100,00	98,59	71	4e-38	K07739	PIG
B11 (5)	sp P02751 FINC	Fibronectina	98,61	98,61	72	4e-20	K05717	SIC
B12 (5)	sp P51665 PSD7	Subunidade regulatória 7 do proteassoma 26S não ATPase	100,00	97,06	34	2e-13	K03038	PIG
C04 (5)	sp Q8ND56 LS14A	Homólogo A da proteína LSM14	100,00	100,00	50	1e-27	**	-
C11 (5)	sp P16070 CD44	Antígeno CD44	76,27	70,34	118	3e-29	K06256	SIC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
D03 (5)	sp O14979 HNRDL	Proteína semelhante à ribonucleoproteína heterogênea D	97,67	97,67	43	4e-19	K13044	PIG
D04 (5)	sp P63000 RAC1	Substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionado a Ras	98,06	98,06	103	8e-64	K04392	SIC
D05 (5)	sp Q5TI25 NBPFE	Membro 14 da família de proteínas "breakpoint" de neuroblastoma	96,10	90,91	77	8e-38	**	-
D06 (5)	sp Q9BUI4 RPC3	RNA polimerase III dirigida por DNA – subunidade RPC3	98,36	98,36	61	2e-29	K03023	PIG
E03 (5)	sp P02452 CO1A1	Cadeia alfa-1(I) de colágeno	84,21	81,58	38	3e-13	K06236	SIC
E06 (5)	sp P08758 ANXA5	Anexina A5	95,45	93,18	44	4e-17	**	-
F01 (5)	sp Q99618 CDCA3	Proteína 3 associada ao ciclo de divisão celular	100,00	100,00	58	4e-32	K03364	CMC
F03 (5)	sp P26038 MOES	Moesina	100,00	100,00	49	4e-23	K05763	MC
F07 (5)	sp P35579 MYH9	Miosina-9	97,70	93,10	87	2e-41	K10360	MC
F08 (5)	sp P35579 MYH9	Miosina-9	95,08	93,44	61	2e-29	K10360	MC
F11 (5)	sp Q8WVK7 SKA2	Proteína 2 associada ao fuso e ao cinetócoro	71,11	60,00	45	9e-08	K02537	CMC
G02 (5)	sp Q9H2D6 TARA	Proteína de ligação a TRIO e F-actina	100,00	96,43	28	2e-09	**	-
G06 (5)	sp P22392 NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	88,61	87,34	79	9e-38	K00526	PIG
G07 (5)	sp P51665 PSD7	Subunidade regulatória 7 do proteassoma 26S não ATPase	100,00	100,00	40	1e-17	K03038	PIG
G09 (5)	sp P13693 TCTP	Proteína de tumor controlada traducionalmente	100,00	100,00	50	2e-25	**	-
H02 (5)	sp P14314 GLU2B	Glicosidase 2 – subunidade beta	93,75	93,75	32	5e-13	K08288	SIC
A02 (6)	sp Q5T013 HYI	Putativa hidroxipiruvato isomerase	90,00	86,67	60	5e-25	K01816	M
A08 (6)	sp P04632 CPNS1	Calpaína – subunidade menor 1	100,00	100,00	83	2e-48	K08583	M
A09 (6)	sp O00461 GOLI4	Proteína 4 da membrana integral de Golgi	85,71	78,57	28	9e-07	**	-
B02 (6)	sp Q9BZE1 RM37	Proteína mitocondrial L37 do ribossomo 39S	100,00	100,00	173	4e-118	K02921	PIG
B04 (6)	sp Q96GC9 VMP1	Proteína 1 de membrana de vacúolo	100,00	100,00	58	9e-30	**	-
B06 (6)	sp Q14152 EIF3A	Fator eucariótico 3 de iniciação de tradução - subunidade A	100,00	100,00	44	2e-18	K03254	PIG
B11 (6)	sp Q8TAD7 OCC1	Proteína 1 superexpressa em carcinoma de cólon	100,00	100,00	42	1e-20	**	-
C04 (6)	sp Q09666 AHNK	Proteína AHNK associada à diferenciação do neuroblasto	100,00	100,00	28	8e-10	**	-
D12 (6)	sp P39019 RS19	Proteína S19 do ribossomo 40S	97,56	97,56	41	2e-20	K02966	PIG
E01 (6)	sp Q9UBU8 MO4L1	Proteína 1 semelhante ao fator de mortalidade 4	100,00	100,00	55	6e-28	K11339	PIG
E02 (6)	sp Q9Y3B8 ORN	Oligorribonuclease mitocondrial	98,86	98,86	88	1e-55	K13288	PIG

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
E04 (6)	sp O60524 NEMF	Fator NEMF mediador da exportação nuclear	98,48	98,48	66	2e-35	**	-
F02 (6)	sp P17655 CAN2	Calpaína 2 – subunidade catalítica	98,59	97,18	71	2e-36	K03853	M
G03 (6)	sp P11940 PABP1	Proteína 1 de ligação ao poliadenilato	96,30	96,30	54	8e-27	K13126	PIG
G04 (6)	sp Q92902 HPS1	Proteína 1 da síndrome de Hermansky-Pudlak	95,83	89,58	48	5e-20	**	-
G06 (6)	sp Q9UBL6 CPNE7	Copina 7	98,99	98,99	99	1e-59	**	-
H02 (6)	sp Q5TAG4 NBPFC	Membro 12 da família de proteínas “ <i>breakpoint</i> ” de neuroblastoma	100,00	98,46	65	4e-36	**	-
H09 (6)	sp Q9BWG6 SCNM1	Modificador 1 do canal de sódio	90,53	88,42	95	4e-49	**	-
A05 (7)	sp Q01469 FABP5	Proteína epidérmica de ligação a ácido graxo	98,36	98,36	61	3e-35	K08754	SE.
A11 (7)	sp P12814 ACTN1	Actinina alfa 1	66,67	62,50	72	2e-09	K05699	MC
B04 (7)	sp Q71U36 TBA1A	Cadeia 1A da tubulina alfa	100,00	100,00	153	2e-101	K07374	MC
B09 (7)	sp Q15785 TOM34	Receptor de importação mitocondrial – subunidade TOM34	100,00	100,00	73	4e-31	**	-
B10 (7)	sp P15954 COX7C	Citocromo c oxidase mitocondrial - subunidade 7C	100,00	100,00	44	9e-24	K02272	M
C03 (7)	sp Q12905 ILF2	Fator 2 de ligação ao potencializador de interleucina	100,00	99,63	272	0	K13089	PIG
C11 (7)	sp Q9H9S3 S61A2	Proteína Sec61 de transporte proteico – subunidade alfa isoforma 2	100,00	100,00	43	1e-18	K10956	TC
D06 (7)	sp Q96NF6 CH049	Putativa proteína não caracterizada C8orf49	84,00	80,00	25	2e-07	**	-
D12 (7)	sp P62899 RL31	Proteína L31 do ribossomo 60S	100,00	100,00	97	4e-61	K02910	PIG
E02 (7)	sp Q9BW61 DDA1	Proteína 1 associada a DET1 e DDB1	100,00	100,00	41	1e-21	K11792	PIG
E03 (7)	sp P52435 RPB11	RNA polimerase II dirigida por DNA – subunidade RPB11	100,00	100,00	79	6e-47	K03008	PIG
E05 (7)	sp Q92664 TF3A	Fator de transcrição IIIA	100,00	100,00	51	6e-16	K09191	PIG
E07 (7)	sp P51149 RAB7A	Proteína Rab-7a relacionada a Ras	100,00	100,00	58	5e-31	K07897	TC
E08 (7)	sp Q9GZU0 CF062	Proteína não caracterizada C6orf62	100,00	100,00	74	3e-40	**	-
E12 (7)	sp P31948 STIP1	Fosfoproteína 1 induzida por stress	98,54	97,08	137	6e-87	K09553	PIG
F04 (7)	sp P17301 ITA2	Integrina alfa-2	100,00	100,00	32	8e-11	K06481	SIC
F05 (7)	sp Q9P2P6 STAR9	Proteína 9 de transferência lipídica relacionada a StAR	100,00	100,00	68	2e-35	**	-
F08 (7)	sp P55081 MFAP1	Proteína 1 associada a microfibrilar	100,00	100,00	52	9e-25	K13110	PIG
G02 (7)	sp P56134 ATPK	ATP sintase mitocondrial - subunidade f	100,00	97,56	41	5e-21	K02130	M
G03 (7)	sp Q9UDW1 QCR9	Complexo do citocromo b-c1 – subunidade 9	100,00	100,00	53	1e-30	K00419	M
G12 (7)	sp P24311 COX7B	Citocromo c oxidase mitocondrial - subunidade 7B	100,00	100,00	41	3e-22	K02271	M
H04 (7)	sp P55795 HNRH2	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea H2	99,23	99,23	130	7e-69	K12898	PIG

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
H08 (7)	sp Q9H0U6 RM18	Proteína mitocondrial L18 do ribossomo 39S	100,00	100,00	58	3e-31	K02881	PIG
H09 (7)	sp P53621 COPA	Coatômero – subunidade alfa	83,87	80,65	93	7e-42	K05236	SIC
A02 (8)	sp P02751 FINC	Fibronectina	98,45	97,93	193	2e-115	K05717	SIC
A05 (8)	sp P49207 RL34	Proteína L34 do ribossomo 60S	100,00	100,00	102	1e-64	K02915	PIG
A06 (8)	sp Q9BQ61 CS043	Proteína não caracterizada CS043	100,00	96,97	33	3e-13	**	-
A07 (8)	sp O15118 NPC1	Proteína C1 de Niemann-Pick	100,00	100,00	25	5e-09	K12385	TC
A11 (8)	sp Q13501 SQSTM	Sequestossomo-1	100,00	100,00	44	8e-20	K14381	DO
B03 (8)	sp Q7Z6Z7 HUWE1	E3 ubiquitina-proteína ligase HUWE1	100,00	100,00	72	2e-40	K10592	PIG
B07 (8)	sp Q99541 PLIN2	Perilipina-2	100,00	100,00	25	1e-06	K08768	SE.
B11 (8)	sp Q9GZR1 SENP6	Protease 6 específica de sentrina	98,10	98,10	158	7e-78	K08595	PIG
C01 (8)	sp Q12923 PTN13	Tirosina-proteína fosfatase não receptora – tipo 13	100,00	100,00	57	5e-28	K02374	SIC
C02 (8)	sp P05141 ADT2	Translocador 2 de adenina	100,00	100,00	47	7e-25	K05863	SIC
C08 (8)	sp P62826 RAN	Proteína nuclear Ran de ligação a GTP	93,94	90,91	33	2e-11	K07936	PIG
C10 (8)	sp P62875 RPAB5	RNA polimerase I, II e III dirigida por DNA, subunidade RPABC5	89,66	89,66	29	1e-10	K03007	PIG
D10 (8)	sp P52907 CAZA1	Proteína de capeamento de actina F – subunidade alfa-1	100,00	100,00	75	6e-41	K10364	MC
E01 (8)	sp P53618 COPB	Coatômero – subunidade beta	90,77	86,15	65	6e-24	K05236	SIC
E02 (8)	sp P02792 FRIL	Cadeia leve da ferritina	100,00	100,00	25	2e-07	K13625	M
E03 (8)	sp Q15238 PSG5	Glicoproteína 5 beta 1 específica de gravidez	93,42	90,79	76	5e-40	K06500	SIC
E10 (8)	sp P14324 FPPS	Farnesil pirofosfato sintase	92,86	91,07	56	4e-24	K00787	M
E11 (8)	sp Q8NBZ0 INO80E	Complexo INO80 – subunidade E	100,00	100,00	60	2e-21	K11669	PIG
F01 (8)	sp P33991 MCM4	Fator MCM4 de licenciamento da replicação do DNA	100,00	98,86	88	1e-47	K02212	PIG
F09 (8)	sp P63244 GBLP	Proteína 1 semelhante à de ligação à guanina – subunidade beta 2	100,00	100,00	89	2e-58	K07972	SIC
F12 (8)	sp Q9P0V9 SEP10	Septina 10	100,00	100,00	140	4e-87	**	-
G03 (8)	sp P38646 GRP75	Proteína mitocondrial stress-70	100,00	100,00	62	5e-31	K09491	PIG
G06 (8)	sp P62136 PP1A	Fosfatase PP1serina/treonina-proteína – subunidade catalítica	93,62	91,49	47	1e-19	K15427	PIG
H01 (8)	sp P05556 ITB1	Integrina beta-1	100,00	98,54	137	2e-99	K05719	SIC
H03 (8)	sp Q16795 NDUA9	Subcomplexo mitocondrial 1 alfa de NADH desidrogenase [ubiquinona] - subunidade 9	99,00	97,00	100	4e-51	K03953	M
A04 (9)	sp Q14766 LTBP1	Proteína latente 1 de ligação ao fator de crescimento transformante beta	97,50	97,50	40	2e-19	K08023	SIC

(Continua)



(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
A09 (9)	sp Q9Y4D7 PLXD1	Plexina D1	100,00	98,94	94	2e-54	K06822	SIC
A11 (9)	sp O43488 ARK72	Aflatoxina B1 aldeído redutase - membro 2	49,21	41,27	63	7e-07	K15303	M
A12 (9)	sp Q14444 CAPR1	Caprina-1	99,20	99,20	125	8e-58	**	-
B02 (9)	sp O43920 NDUS5	Proteína 5 de ferro-enxofre NADH desidrogenase [ubiquinona]	100,00	100,00	78	4e-51	K03938	M
B04 (9)	sp Q14019 COTL1	Proteína semelhante à coactosina	98,00	98,00	50	2e-24	**	-
B10 (9)	sp P51784 UBP11	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase1	100,00	100,00	70	1e-38	K11835	PIG
C07 (9)	sp O43491 E41L2	Proteína 2 semelhante à Band 4.1	100,00	100,00	49	3e-21	K06107	CC
C12 (9)	sp Q9NZM1 MYOF	Mioferlina	100,00	100,00	32	7e-12	**	-
D01 (9)	sp P29401 TKT	Transquetolase	100,00	100,00	32	4e-11	K00615	M
D06 (9)	sp P48729 KC1A	Caseína quinase 1 – isoforma alfa	100,00	100,00	29	1e-09	K08957	SIC
D10 (9)	sp P08758 ANXA5	Anexina A5	100,00	100,00	97	1e-56	**	-
D11 (9)	sp Q6UX73 CP089	UPF0764 proteína C16orf89	74,29	71,43	35	1e-07	**	-
D12 (9)	sp O75964 ATP5L	ATP sintase mitocondrial – subunidade g	93,90	91,46	82	7e-42	K02140	M
E03 (9)	sp P00414 COX3	Citocromo c oxidase – subunidade 3	92,59	90,12	81	3e-42	K00406	M
E04 (9)	sp Q16543 CDC37	Hsp90 co-chaperona Cdc37	100,00	100,00	53	7e-27	K09554	PIG
E08 (9)	sp Q15363 TMED2	Proteína 2 contendo domínio transmembrana emp24	100,00	97,62	42	3e-21	**	-
E10 (9)	sp P78347 GTF2I	Fator de transcrição geral II-I	100,00	100,00	48	6e-22	K03121	PIG
E11 (9)	sp Q96CB5 CH044	Putativa proteína não caracterizada C8orf44	72,88	59,32	59	2e-15	**	-
E12 (9)	sp Q12769 NU160	Proteína Nup160 do complexo do poro nuclear	100,00	100,00	78	2e-42	K14303	PIG
F04 (9)	sp P62249 RS16	Proteína R16 do Ribossomo 40S	100,00	100,00	49	7e-26	K02960	PIG
F06 (9)	sp Q13263 TIF1B	Fator de transcrição intermediário 1-beta	100,00	100,00	28	3e-12	K08882	PIG
F12 (9)	sp Q14011 CIRBP	Proteína de ligação ao RNA induzível pelo frio	97,73	97,73	44	2e-20	K13195	PIG
G03 (9)	sp O14974 MYPT1	Proteína regulatória 1 – subunidade regulatória 12A	100,00	98,04	51	5e-24	K06270	MC
G04 (9)	sp P61313 RL15	Proteína L15 do ribossomo 60S	100,00	96,15	26	3e-10	K02877	PIG
H01 (9)	sp P63279 UBC9	Enzima UBC9, conjugadora a SUMO	90,00	85,00	60	1e-27	K10577	PIG
H02 (9)	sp O95235 K120A	Proteína semelhante à cinesina KIF20A	97,22	95,83	72	2e-34	K10402	MC
H03 (9)	sp Q8N2A0 CX062	Putativa proteína não caracterizada codificada por LINC00269	90,32	74,19	31	3e-07	**	-
H07 (9)	sp P14625 ENPL	Endoplasmina	96,55	96,55	29	2e-08	K08784	M
H11 (9)	sp P00395 COX1	Citocromo C oxidase - subunidade 1	97,62	90,48	42	1e-15	K02256	M
A06 (10)	sp P15018 LIF	Fator inibidor da leucemia	96,15	96,15	52	3e-24	K05419	SIC
A11 (10)	sp P30626 SORCN	Sorcina	100,00	100,00	72	7e-43	**	-
B02 (10)	sp O14817 TSN4	Tetraespanina 4	86,96	80,43	46	2e-17	**	-

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
C02 (10)	sp Q9NZM1 MYOF	Mioferlina	98,98	97,96	98	1e-48	**	-
C04 (10)	sp Q9UN70 PCDGK	Protocaderina gama-C3	92,31	89,74	39	6e-15	**	-
C12 (10)	sp P13693 TCTP	Proteína de tumor controlada traducionalmente	100,00	95,24	21	7e-07	**	-
D04 (10)	sp O75083 WDR1	Proteína 1 contendo repetições WD	94,44	91,67	36	6e-13	**	-
A05 (11)	sp Q5VTE0 EF1A3	Putativo fator de alongação 3 semelhante ao alfa	72,50	67,50	40	9e-08	**	-
A09 (11)	sp Q04446 GLGB	Enzima 1,4- alfa-glicana ramificada	100,00	97,73	44	1e-20	K00700	M
A10 (11)	sp P09871 C1S	Complemento - subcomponente 1S	96,30	96,30	54	2e-27	K01331	SI
B04 (11)	sp Q9UKG9 OCTC	Carnitina O-octanoiltransferase peroxissomal	99,15	99,15	117	3e-72	K05940	TC
B08 (11)	sp P60002 ELOF1	Homólogo do fator de alongação da transcrição 1	97,22	94,44	36	2e-17	K03145	PIG
B10 (11)	sp P01024 CO3	Complemento C3	87,76	85,71	49	3e-18	K03990	SI
B12 (11)	sp Q16181 SEPT7	Septina 7	100,00	100,00	53	4e-26	K06639	CMC
C02 (11)	sp Q13618 CUL3	Culina 3	97,40	96,10	77	3e-37	K03869	PIG
C03 (11)	sp P05455 LA	Proteína La de Lupus	100,00	100,00	91	4e-52	K11090	D
C09 (11)	sp P02794 FRIH	Cadeia pesada da ferritina	100,00	100,00	108	2e-72	K00522	M
Contig 2	sp P02751 FINC	Fibronectin	97,10	97,10	69	2e-44	K05717	SIC
Contig 3	sp P62906 RL10A	60S ribosomal protein L10a	100,00	100,00	70	1e-42	K02865	PIG
Contig 5	sp Q9Y277 VDAC3	Proteína 3 de canal dependente de voltagem seletivo para ânion	100,00	100,00	99	2e-68	K15041	SIC
Contig 7	sp P03915 NU5M	Cadeia 5 da NADH-ubiquinona oxirredutase	99,19	96,75	123	8e-57	K03883	M
Contig 9	sp P06733 ENOA	Enolase alfa	99,29	99,29	140	7e-92	K01689	M
Contig 10	sp Q9H2H9 S38A1	Transportador 1 de aminoácidos neutros acoplado a sódio	97,87	97,87	47	6e-25	K14990	SIC
Contig 12	sp O75843 AP1G2	Complexo AP-1 - subunidade 2 semelhante à gama	98,65	98,65	74	2e-30	K12394	TC
Contig 13	sp P31749 AKT1	Serina/treonina-proteína quinase RAC-alfa	95,65	94,20	69	8e-37	K02861	M
Contig 14	sp Q3YEC7 RBEL1	Proteína 1 semelhante a Rab	100,00	100,00	66	6e-40	K07932	SIC
Contig 17	sp Q9H857 NT5D2	Proteína 2 contendo o domínio 5'-nucleotidase	100,00	100,00	72	7e-45	K01081	M
Contig 20	sp Q9NS18 GLRX2	Glutaredoxina-2 mitocondrial	100,00	100,00	37	7e-21	K03676	PIG
Contig 21	sp O00767 ACOD	Acil-CoA desaturase	100,00	100,00	98	6e-69	K00507	M
Contig 22	sp P46777 RL5	Proteína L5 da subunidade maior do ribossomo	100,00	100,00	101	5e-68	K02932	PIG
Contig 23	sp Q9Y5R8 TPPC1	Complexo de tráfico de partículas proteicas - subunidade 1	100,00	100,00	33	1e-19	K08520	PIG
Contig 24	sp P00156 CYB	Citocromo b	94,44	94,44	36	3e-15	K00412	M
Contig 26	sp Q9BQP7 CT072	Proteína C20orf72 não caracterizada	98,18	96,36	55	5e-33	**	-
Contig 27	sp P12110 CO6A2	Cadeia alfa-2(VI) de colágeno	100,00	100,00	38	2e-18	K06238	SIC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
Contig 29	sp Q06481 APLP2	Proteína 2 semelhante à amiloide	98,33	98,33	60	1e-17	K08117	M
Contig 32	sp P11940 PABP1	Proteína 1 de ligação ao poliadenilato	100,00	100,00	62	9e-37	K13126	PIG
Contig 35	sp P19338 NUCL	Nucleolina	100,00	98,18	55	2e-30	K11294	PIG
Contig 36	sp P11940 PABP1	Proteína 1 de ligação ao poliadenilato	95,00	95,00	80	2e-29	K13126	PIG
Contig 37	sp P55268 LAMB2	Laminina - subunidade beta-2	100,00	100,00	23	5e-09	K06243	SIC
Contig 38	sp P68104 EF1A1	Fator 1 de elongação 1-alfa	100,00	100,00	173	2e-118	K03231	PIG
Contig 39	sp P46782 RS5	Proteína S5 do ribossomo 40S	100,00	100,00	50	1e-29	K02989	PIG
Contig 40	sp Q99985 SEM3C	Semaforina-3C	95,74	95,74	47	2e-24	K06840	SIC
Contig 41	sp P00414 COX3	Citocromo c oxidase – subunidade 3	95,45	88,64	44	1e-19	K00406	M
Contig 43	sp Q9UNX3 RL26L	Proteína semelhante à L26 do ribossomo 60S	100,00	100,00	88	1e-42	K14817	PIG
Contig 44	sp P02751 FINC	Fibronectina	97,87	97,87	94	2e-54	K05717	SIC
Contig 45	sp P00414 COX3	Citocromo c oxidase – subunidade 3	97,37	93,86	114	9e-65	K00406	M
Contig 46	sp Q5VTE0 EF1A3	Putativo fator de elongação 3 semelhante ao alfa-1	100,00	100,00	73	2e-44	**	-
Contig 47	sp Q9HCN3 TMM8A	Proteína transmembrana 8A	97,14	94,29	35	2e-15	K12654	SI
Contig 50	sp Q12974 TP4A2	Proteína tirosina fosfatase tipo IVA 2	100,00	100,00	34	3e-19	K04458	SIC
Contig 51	sp P16234 PGFRA	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta	89,80	85,71	49	9e-22	K04363	SIC
Contig 52	sp P18621 RL17	Proteína L17 do ribossomo 60S	100,00	100,00	59	9e-37	K02880	PIG
Contig 54	sp Q9BV94 EDEM2	Proteína 2 semelhante à alfa-manosidase amplificadora de degradação no retículo endoplasmático	100,00	98,94	94	7e-57	K10085	SIC
Contig 55	sp P52292 IMA2	Importina – subunidade alfa-2	97,64	96,85	127	7e-70	K15043	PIG
Contig 57	sp P19883 FST	Folistatina	95,93	94,31	123	1e-87	K04661	SIC
Contig 58	sp P07355 ANXA2	Anexina A2	100,00	100,00	75	2e-45	**	-
Contig 59	sp P18621 RL17	Proteína L17 do ribossomo 60S	95,00	95,00	80	2e-32	K02880	PIG
Contig 63	sp Q9BTT4 MED10	Mediador da subunidade 10 de transcrição da RNA polimerase II	100,00	100,00	64	3e-40	K15151	PIG
Contig 64	sp O15357 SHIP2	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 5-fosfatase 2	94,66	93,89	131	6e-74	K15909	M
Contig 65	sp O43847 NRDC	Nardilisina	100,00	98,88	89	5e-55	K01411	M
Contig 66	sp P02751 FINC	Fibronectina	100,00	98,99	99	2e-69	K05717	SIC
Contig 67	sp P62987 RL40	Ubiquitina-proteína L40 do ribossomo 60S	96,30	94,44	54	1e-28	**	-
Contig 68	sp P51114 FXR1	Proteína 1 associada à síndrome de retardo mental do X frágil	100,00	100,00	40	2e-34	K15516	PIG
Contig 70	sp P02751 FINC	Fibronectina	89,80	87,76	49	2e-20	K05717	SIC

(Continua)

(Continuação)

Seq.	Anotação Blastx	Proteína	Posit. (%)	Ident. (%)	Tam. (pb)	Valor e	Entrada KO	Categ.
Contig 72	sp P14625 ENPL	Endoplasmina	100,00	98,06	103	2e-52	K08784	M
Contig 73	sp P84243 H33	Histona H3.3	100,00	100,00	37	7e-19	K11253	PIG
Contig 74	sp P63261 ACTG	Actina citoplasmática 2	100,00	100,00	33	8e-16	K05749	MC
Contig 75	sp O43663 PRC1	Proteína 1 reguladora da citocinese	96,43	96,43	56	1e-27	K11238	SIC
Contig 77	sp P02751 FINC	Fibronectina	95,45	95,45	88	3e-57	K05717	SIC

**Seq.:** Sequência analisada

**Posit. (%):** Percentual de alinhamentos com pontuação positiva

**Ident. (%):** Percentual de identidade entre as sequências analisadas e as do banco de dados

**Tam. (pb):** Tamanho do alinhamento, em pares de base

**Entrada KO:** Código de registro da proteína na ferramenta *KEGG Orthology*

\*\* Classificação funcional não descrita pela ferramenta *KEGG Orthology (KO)*, porém descrita em *Proteína KnowledgeBase (UniProtKB)*

**Categ.:** Categorias descritas na ferramenta *KEGG Orthology* (CC: Comunicação celular; CMC: Crescimento e morte celular; D: Doenças; DO: Diferenciação do osteoclasto; M: Metabolismo; MC: Motilidade celular; PIG: Processamento da informação genética; SE: Sistema endócrino; SI: Sistema imune; SIC: Sinalização e interação celular; SN: Sistema Nervoso; TC: Transporte e catabolismo).

As sequências destacadas coincidiram nas duas bibliotecas.

## APÊNDICE E – ARTIGO 1

Elsevier Editorial System(tm) for Archives of Oral Biology

Manuscript Draft

Manuscript Number: AOB-D-11-00389R1- doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.012

Title: Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp

Article Type: Original Paper

Keywords: Human dental pulp stem cells; irreversible pulpitis; low-level laser therapy; proliferation; differentiation

Corresponding Author: Dr Luciana Oliveira Pereira, MSC

Corresponding Author's Institution: University of Brasília

First Author: Luciana Oliveira Pereira, MSC

Order of Authors: Luciana Oliveira Pereira, MSC; João Paulo F Longo, PhD; Ricardo B Azevedo, PhD

### ABSTRACT

#### Objectiv

Low-level laser therapy (LLLT) has been reported to be responsible for promoting photostimulatory and photobiomodulatory effects *in vivo* and *in vitro*, stimulating cell growth, increasing cell metabolism, improving cell regeneration and invoking an anti-inflammatory response. This study was performed in order to investigate whether low-level laser therapy could increase the proliferation and differentiation potentials of hDPSC isolated from healthy dental pulps and from inflamed pulps.

#### Design

Human dental pulp stem cells (hDPSC) were isolated from normal and inflamed dental pulps from different patients. STRO-1-positive cells were isolated and irradiated with a red low-level laser (660 nm) in four different energy fluences (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>); the authors hypothesized that the first three fluences would promote biostimulatory effects, whereas the highest dose would induce antiproliferative effects. The two lower fluences were produced by irradiating the two higher fluences through a dentin disc, which was used to simulate a clinical condition. The proliferation and the cell odonto-osteogenic differentiation competence were compared.

#### Results

No statistically significant differences were observed between the proliferation rates and the relative productions of mineralized nodules compared to the respective controls, either for hDPSC from normal or inflamed dental pulps.

#### Conclusions

The irradiation with low-level InGaAlP red low-level laser (660 nm) in four different energy fluences (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>) potentiated neither proliferation nor odonto-osteogenic differentiation of hDPSC isolated from patients with normal and inflamed pulps.

## INTRODUCTION

Human dental pulp stem cells (hDPSC), isolated from healthy teeth and expanded in culture, have shown multipotency. They have been studied for diverse tissue-regenerative purposes, not only in dentistry but also in various medical applications<sup>1-6</sup>.

When a dental pulp is diagnosed with irreversible pulpitis, the therapeutic indication is traditional endodontic treatment, which consists of removing the pulp tissue, chemomechanically preparing the pulp chamber and the root canals and filling the chamber and canals with inert and biocompatible materials. The inflamed vital tissue is, therefore, discarded.

Recently, stem cells were isolated from clinically compromised dental pulp with irreversible pulpitis. They have shown favorable proliferative potential and *ex vivo* odonto-osteogenic differentiation capacity and potent in tissue regeneration *in vivo*<sup>7,8</sup>.

Low-level laser therapy (LLLT) has been reported to be responsible for promoting photostimulatory and photobiomodulatory effects *in vivo* and *in vitro*, stimulating cell growth, increasing cell metabolism, improving cell regeneration and invoking an anti-inflammatory response<sup>9</sup>. A photobiomodulating effect was observed in teeth exposed to LLLT, which resulted in lower levels of pulpal pain compared to teeth exposed to the placebo treatment<sup>10</sup>. LLLT also accelerated dentine regeneration after dental-pulp exposure<sup>11,12</sup>. Additionally, It has been reported that LLLT may be used to increase the number of stem cells in culture, to induce differentiation into specific cell types or both<sup>13</sup>. It has been reported that hDPSC responds positively to laser phototherapy by improving the cell growth *in vitro*<sup>14</sup>.

Laser irradiation at low doses biomodulates cell activity by some postulated mechanisms. It is proposed that it excites molecules of the mitochondrial respiratory chain, intensifying the formation of a transmembrane electromechanical proton gradient in mitochondria. It enhances cell proliferation by increasing the release of calcium into the cytoplasm, which triggers mitosis; by causing a short-term rise in the intracellular pH, which triggers mitogenic signals in the cells and also by increasing ATP production<sup>15,16</sup>.

In a recent review of 32 studies on the subject, the following was concluded: (1) for biological effects, laser wavelengths may be red or near infrared (600-1200 nm); and (2) for biostimulatory effects, energy fluences between 0.05 and 10 J/cm<sup>2</sup> may induce cell proliferation, whereas energies greater than this value (>10 J/cm<sup>2</sup>) may promote antiproliferative effects<sup>17</sup>.

Within this context, this study was performed in order to investigate whether low-level laser therapy could increase the proliferation and differentiation potentials of hDPSC isolated from healthy dental pulps and from inflamed pulps. The results of this study may be applicable to tissue engineering using hDPSC isolated from normal and inflamed dental pulp and to possible clinical LLLT in the modulation of pulpal responses under inflammatory conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Dental pulp tissues

Pulp tissues were obtained from the permanent teeth of patients (17–43 years of age) under approval of the Ethical Committee of Health Sciences Faculty of the University of Brasília (Brazil) (Project number 023/08) after informed consent. Normal pulp tissues were collected from 3 patients undergoing third molar extraction (N1, N2 and N3). These teeth were free of carious lesions. Inflamed dental pulps were obtained from 3 patients (I1, I2 and I3) with irreversible pulpitis that required treatment procedures to remove pulp tissue from the involved teeth. The diagnosis of irreversible pulpitis was determined by an endodontic specialist on the basis of clinical assessment, including history of spontaneous pain and intense, lingering pain to cold stimulus. The vitality of the pulp was confirmed on access. Teeth with completely necrotized pulp tissue were excluded<sup>7</sup>.

### Cell culture

Dental pulp from normal and inflamed teeth was harvested as previously described (7). To remove the dental pulp from extracted teeth, a longitudinal furrow was made using sterilized diamond discs without reaching the pulp tissue (KG Sorensen, ref: 7020). The teeth were fractured with a dental surgical elevator and pulp tissue was gently separated with a sterile dentinal excavator from the crown and root. Inflamed pulp tissues were collected from pulp chambers and root canals with a sterile endodontic file after complete exposure of pulp chamber. Normal and inflamed pulp tissues were transferred into sterile regular medium: - Minimum Essential Medium ( -MEM; Gibco, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Gibco). All pulp tissues were washed with -MEM, digested with 3 mg/ml collagenase type I (Gibco) in supplemented medium for 60 minutes at 37°C. After enzymatic digestion, cell suspension was washed three times by centrifugation (10 minutes at 750 x g) in culture medium and placed into 6-well plates. They were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 80% humidity environment. Antibiotics (penicillin and streptomycin) were used in all washing, digesting buffer, and culture media to minimize bacterial contamination. Each sample of normal and inflamed pulp tissue was processed, cultured and evaluated separately in all experiments. The cells were maintained semiconfluently in order to prevent differentiation.

### STRO-1-positive cell isolation

STRO-1 has been used as a stromal stem-cell surface marker<sup>18</sup>. To obtain enriched STRO-1-positive cells, the Dynabead (Invitrogen) positive isolation method was used according to the manufacturer's instructions, as previously described<sup>7</sup>.

### Laser irradiation

Cell suspensions (10<sup>6</sup> cells/mL in 200 µL) in regular medium without phenol red (Gibco) were placed in individual sterile wells of 96-well, V-bottom plates (Greiner). Laser irradiation was conducted in the top of the well at a constant distance of 15 mm from the bottom of the plate, using an InGaAlP low-level red laser (660 nm, MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brazil). Experimental conditions used to determine the effect of laser irradiation on cell growth of both types of cells, from normal (N1, N2 and N3) and inflamed pulps (I1, I2 and I3) are summarized in Table 1. L10 and L60 correspond to cells that were irradiated with a constant power of 28 mW for 10 and 60 seconds, achieving two laser energy fluences of 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>, respectively. A laser power meter (Spectra Physics) was used to confirm the laser potency. The exposure time and wavelengths were based in previous studies<sup>14,17</sup>. To test the influence of the remaining dentine tissue on the possible clinical irradiation of the pulpal wall, we interposed a thin human dentine disc (1 mm) between the cells and laser beam using the same constant power of 28 mW for 10 and 60 seconds (LD10 and LD60). The same 15 mm distance between the bottom of the plate and the laser spot was maintained. The power meter showed that the interposition of the dentine disc in groups

LD10 and LD60 decreased the total potency of the laser (0.2 mW) and, consequently, the energy fluences (0.05 and 0.30 J/cm<sup>2</sup> respectively).

We run a group of cells from normal and inflamed pulps under the same experimental conditions but without radiation that served as a control (C).

### **Cell culture proliferation assay**

We used the MTT assay according to standard procedure described elsewhere.<sup>14</sup> Briefly, after cells were irradiated, they were placed in triplicate, in four different 96-well culture plates at 10<sup>4</sup> cells/well. Then, 24, 48, 72 and 96 hours after laser irradiation, cell viability was accessed. The relative viable cell number was determined by measuring the absorbance of the cell lysate at 595 nm using a spectrophotometer (SpectraMax M2).

### **Odonto-osteogenic differentiation**

After laser irradiation, cells were seeded on 96-well plates and cultured until confluence was achieved. The cells from each experimental group were then incubated in osteogenic/odontogenic induction medium, which contained 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate (Sigma), 10 nM dexamethasone (Sigma), and 50 mg/mL L-ascorbic acid in regular medium<sup>7</sup>. As additional experimental controls, cells from each experimental group were also cultured in regular medium. The media were refreshed every 72 hours. After induction for three weeks, mineral-nodule formation was observed, and quantitative Alizarin Red staining was performed as described before<sup>19</sup>. The amount of Alizarin Red stain in the destaining solution was determined by measuring the absorbance of the solution at 562 nm using a spectrophotometer (SpectraMax M2).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad<sup>®</sup> software. For all the experiments, the absorbance values were normalized as percentages of the respective control group. A Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test were used to compare the groups; a P value less than 0.05 was considered to be significant.

## **RESULTS**

### **Effect of laser irradiation in different conditions on cell proliferation**

Cell proliferation data were analyzed for each patient individually and in groups. For the individual patient analysis, the statistical tests were used to compare the different experimental groups at each time point. There was a statistically significant difference, when compared to the respective control, only in the cells from patient I1 (the proliferation increased in the L60 group at 24 hours and decreased in group L10 at 96 hours.) There was no significant variation in cell proliferation in any of the other patients in any of the experimental periods (Figure 1).

The grouped analysis showed no significant variation in cell proliferation compared to the controls (Figure 2).

### **Effect of laser irradiation in different conditions on odonto-osteogenic differentiation**

For the relative production of mineralized nodules, the observed results were analyzed for each patient individually and in groups. For the individual patient analysis, the statistical tests were used to compare the different experimental groups with the respective control. There was a statistically significant difference, when compared to the respective controls, only in cells from patients N1 and I3. The production of mineralized nodules increased in groups L10 and LD10, respectively. There was no significant variation in the production of mineralized nodules in any of the other patients (Figure 3).



For the individual patient analysis, the statistical tests were used to compare the different experimental groups at each time point. There was a statistically significant difference, when compared to the respective controls, only in cells from patients N1 and I3. The production of mineralized nodules increased in groups LD10 and L10. There was no significant variation in the production of mineralized nodules in any of the other patients (Figure 3).

The grouped analysis showed no statistically significant difference between the relative production of mineralized nodules compared to the respective control, hDPSC from normal and inflamed dental pulps (Figure 4).

## DISCUSSION

The biostimulatory effect of LLLT has been reported for at least four decades. Since this effect was first reported, researchers in this field have sought to determine the best laser protocol to promote the reported positive biostimulatory effects attributed to low energy laser irradiation. In the present study, we aimed to evaluate the effects of LLLT on dental pulp stem cells isolated from normal and inflamed dental pulps. For this purpose, we used a red low-level laser (660 nm) and four different energy fluences (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>). We hypothesized that the first three energy densities would promote positive biostimulatory effects (increases in cell proliferation and differentiation), whereas the highest dose would induce antiproliferative effects<sup>17</sup>.

In the present study, the laser irradiation field, which is one of the most sensitive fields in cell culture studies, was carefully determined. As a laser emission is collimated light radiation, the irradiated area is similar to the spot area of the equipment output. Most of the published studies that have investigated LLLT in cell cultures have considered that the area of laser output was sufficient to irradiate the larger area of the adherent cell monolayer in the culture plates<sup>14, 20-22</sup>. In order to reduce this experimental bias, we adapted a protocol<sup>23</sup> by which we grouped the cells in a small space and promoted the irradiation of all cells simultaneously.

Our results did not show the expected biostimulatory effect, either in the proliferation or in the differentiation of human DPSC isolated from different patients with different pulp conditions, although in our irradiation protocols, the energy fluence was between 0.05 and 10 J/cm<sup>2</sup> (the therapeutic range)<sup>17</sup>. These results corroborate the findings of other studies, in which no proliferation was observed in dental pulp cells after Nd:YAG laser irradiation<sup>24</sup> or in the fibroblast lineage L-929 after diode laser irradiation (680 nm)<sup>25</sup>. Similar results were also found when murine bone-marrow mesenchymal stem cells were irradiated with infrared laser (808 nm) at 4 J/cm<sup>2</sup> for 91 seconds three times a week<sup>20</sup>.

The absence of an increase in cell proliferation after LLLT, which differs from the results of other dental-pulp stem cell studies<sup>14</sup>, could be explained by the finding that different cell lines of the same cell type may be differently sensitive to laser irradiation<sup>26</sup>. Moreover, most studies that showed an increase in cell proliferation after LLLT performed their analyses on unique cell isolates<sup>14, 21, 27, 28</sup>. In the present study, working with three different cell isolates in each group (normal and inflamed) and accomplishing individual and grouped analysis, another bias was prevented.

The cells from both groups of patients used in our study presented a fibroblast-like morphology and did not differentiate spontaneously during culture expansion. They had also very high proliferation rates, which might not have been overcome by LLLT as previously discussed<sup>20</sup>. Some authors have also suggested that the biostimulatory effect occurs only when the cells are under stress conditions<sup>13</sup>, such as nutritional deficits<sup>21, 27, 28</sup>. Although it has been shown that, under nutritional-deficit conditions, laser therapy was able to improve hDPSC growth, this cell-growth rate was lower than the rate observed when the cells were grown under regular nutritional conditions<sup>14</sup>.

In the present study, the inflamed condition presented by the dental pulp from which some hDPSC were isolated could be considered to be a stressed condition, but it also did not induce biostimulatory effects. These results suggest that stressed conditions are not always

determinants of photostimulatory effects. This result was also observed by Ferreira et al.<sup>22</sup>, who showed that, under nutritional deficiency, no proliferation increase was observed in cultured C2C12 myoblasts irradiated with low-energy GaAlAs (660 nm) and with InGaAlP (780 nm) lasers of various wavelengths and powers.

In previous studies, LLLT has accelerated differentiation<sup>29-32</sup>, whereas in the present study, the effect of a single-laser irradiation on odonto-osteogenic differentiation was tested and quantified based on the amount of matrix mineralization and revealed no significant effect. Similarly, Bouvet-Gerbetaz et al. irradiated murine mesenchymal stem cells three times a week, and also found no significant effect<sup>20</sup>. The authors discussed that, as suggested by various studies, the LLLT effect on mineralization may be related to an early increase in cell proliferation and not to a direct effect on the differentiation pathway. Such a hypothesis could be another explanation for the results obtained in this study, in which no early cell proliferation burst effect was observed, and mineralized nodule formation was found to be equivalent under the control and laser conditions. Furthermore, some authors have discussed that the effect of laser irradiation is immediate and not cumulative, suggesting that irradiated cells respond immediately, but then return shortly thereafter to their original state<sup>21</sup>.

Because promising results have been reported for low-level laser therapy against dentin hypersensitivity by producing anti-inflammatory effects on dental pulp cells *in vivo*<sup>33-37</sup>, we also irradiated the cells through dentine tissue, which produced a very low level energy. Several effects have been described after ultra-low level laser therapy (ULLLT), which is a novel therapeutic modality that uses laser potencies lower than 3 mW. At such power levels, there is no thermal effect, and there is available evidence suggesting that ULLLT can affect the redox state and the mechanical properties (stiffness, cell adhesion, etc.)<sup>38</sup>. It is possible that, in the present study, the effects of laser irradiation were not associated with the increases in cell proliferation and differentiation, and they need further investigation.

Based on the high variability of the results found in the literature and considering the fact that the energy-density range seems very narrow, we highly recommend the use of a power meter to set up LLLT irradiation protocols. In this study and in a previous one<sup>20</sup>, important differences were found between the real emitted power and the displayed power. This result was probably due to alteration of the light transmission through the optic fiber, as well as the defocalization system.

As suggested in some reviews<sup>13, 17</sup>, the effects of low-level laser therapy on cells in culture are still controversial. The photochemical effects of the light depend on the combination of several parameters, including the following: wavelength, spot size, power, power density, energy, energy density, duration and frequency of irradiation, medium or plate light absorption, nutritional conditions and the type of cell subjected to the irradiation. Moreover, there may be possible effects on other cell processes that are different from proliferation and differentiation and that were not evaluated in this study.

In conclusion, the results of the present study showed that the irradiation of low-level InGaAlP red low-level laser (660 nm) in four different energy fluences (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm<sup>2</sup>) potentiated neither proliferation nor odonto-osteogenic differentiation of human dental-pulp stem cells isolated from patients with normal and inflamed pulps.

## REFERENCES

1. 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 U S A* 2000;**97**(25):13625-30.
2. Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SAS, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med* 2008;**6**(35):1-13.

3. de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* 2008;**19**(1):204-10.
4. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;**81**(8):531-5. .
5. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008;**26**(7):1787-95.
6. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;**80**(6):836-42.
7. Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod* 2010;**36**(5):820-5.
8. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010;**5**(4):617-31.
9. Kneebone WJ, Cnc DIH, Fiama D. Practical applications of low level laser therapy. *Pract Pain Manag* 2006;**6**(8):34-40.
10. Kotlow L. Photobiomodulating Lasers and Children's Dental Care. *J Laser Dent* 2009;**17**(3):125-30.
11. Pretel H, Oliveira JA, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Evaluation of dental pulp repair using low level laser therapy (688 nm and 785 nm) morphologic study in capuchin monkeys. *Laser Phys Lett* 2009;**6**(2):149-58.
12. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Nunez SC, Ribeiro MS. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol* 2007;**52**(9):899-903.
13. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2010;**28 Suppl 1**:S3-40.
14. Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2008;**40**:433-8.
15. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B* 1989;**3**(4):638-40.
16. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 1991;**11**(1):87-91.
17. Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2011 [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s10103-011-0885-2.
18. Gronthos S, Zannettino AC. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. *Methods Mol Biol* 2008;**449**:45-57.
19. Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *J Dent Res* 2004;**83**(6):496-9.
20. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med* 2009;**41**(4):291-7.
21. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zzell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007;**39**(4):365-72.
22. Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg* 2009;**27**(6):901-6.

23. Gulsoy M, Ozer GH, Bozkulak O, Tabakoglu HO, Aktas E, Deniz G, et al. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Photochem Photobiol B* 2006;**82**(3):199-202.
24. Shiba H, Tsuda H, Kajiya M, Fujita T, Takeda K, Hino T, et al. Neodymium-doped yttrium-aluminium-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. *J Endod* 2009;**35**(3):373-6.
25. Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. *J Oral Sci* 2010;**52**(1):33-8.
26. Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg* 2007;**25**(4):275-80.
27. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, et al. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci* 2010;**25**(4):559-69.
28. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;**29**(2):179-84.
29. Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, et al. Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *J Cell Biochem* 2010;**111**(6):1445-52.
30. Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol Pharm Bull* 2007;**30**(1):27-31.
31. Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J* 2010;**21**(6):491-8.
32. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005;**23**(2):161-6.
33. Corona SAM, Nascimento TN, Catirse ABE, Lizarelli RFZ, Dinelli W, Palma Dibb RG. Clinical evaluation of low level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. *J Oral Rehabil* 2003;**30**(12):1183-9.
34. Dilsiz A, Aydin T, Canakci V, Gungormus M. Clinical evaluation of Er:YAG, Nd:YAG, and diode laser therapy for desensitization of teeth with gingival recession. *Photomed Laser Surg* 2010;**28 Suppl 2**:S11-7.
35. Marsilio AL, Rodrigues JR, Borges AB. Effect of the clinical application of the GaAlAs laser in the treatment of dentine hypersensitivity. *J Clin Laser Med Surg* 2003;**21**(5):291-6.
36. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of laser in dentinal hypersensitivity treatment: a systematic review. *J Endod* 2011;**37**(3):297-303.
37. Todea CDM, Miron MI, Filip LM, Petre A. The Efficiency of Laser in the Hypersensitivity Therapy in Cervical Erosion. *Timisoara Med* 2003;**52**:176-80.
38. Baratto L, Calza L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, et al. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* 2011;**26**(1):103-12.

**Table 1.** Parameters used in laser irradiation of stem cells from normal (N1, N2 and N3) and inflamed ( I1, I2 and I3) dental pulps.

Treatment*	Power Setting <sup>a</sup> (mW)	Dentin Interposition	Final Power <sup>b</sup> (W)	Exposure Time (seconds)	Total Energy <sup>c</sup> (J)	Final Energy Fluence <sup>d</sup> (J/cm <sup>2</sup> )
LD10	28.0	Yes	$0.2 \times 10^{-3}$	10	0.002	0.05
LD60	28.0	Yes	$0.2 \times 10^{-3}$	60	0.012	0.30
L10	28.0	No	$28.0 \times 10^{-3}$	10	0.280	7.00
L60	28.0	No	$28.0 \times 10^{-3}$	60	1.680	42.00
C	-	No	-	-	-	-

\*Treatments performed on the cells from the six patients (N1, N2, N3, I1, I2, I3). L10 and L60, cells irradiated for 10 and 60 seconds, respectively; LD10 and LD60, cells irradiated for 10 and 60 seconds respectively, with a dentine disc interposed between laser and cells;

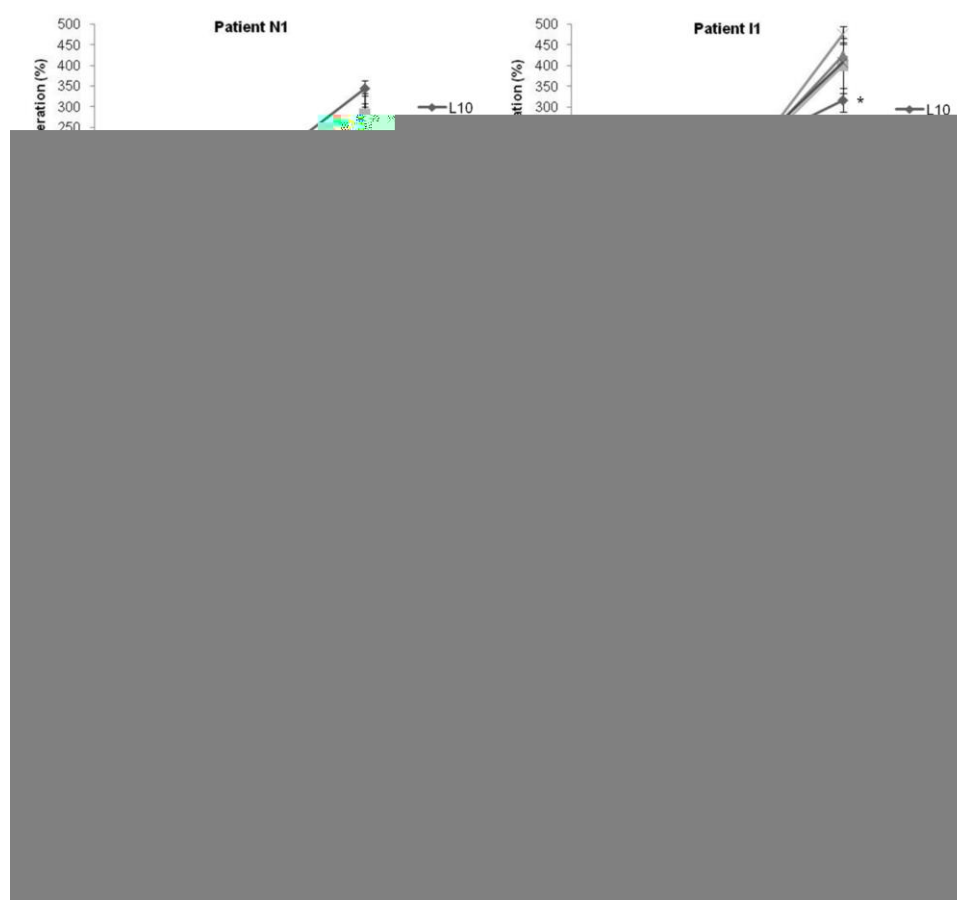
<sup>a</sup> Laser power set in the equipment;

<sup>b</sup> Laser power measured by a power meter (Spectra Physics);

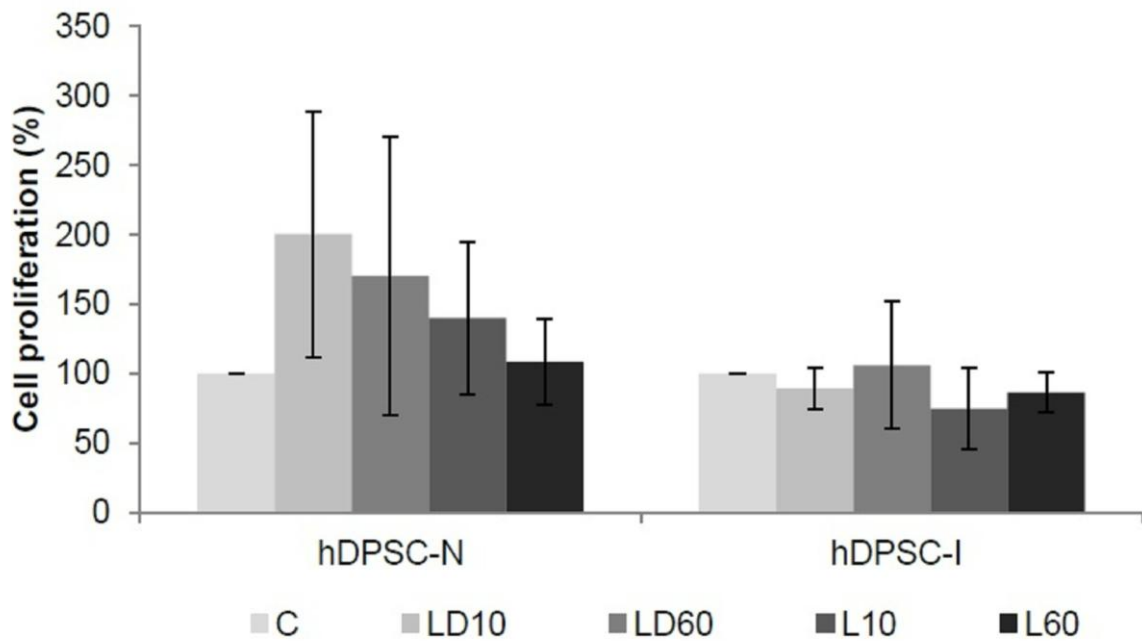
<sup>c</sup> Laser energy was calculated by multiplying the final power values by the time of application;

<sup>d</sup> Laser energy fluence is the total energy delivered on a determined area.

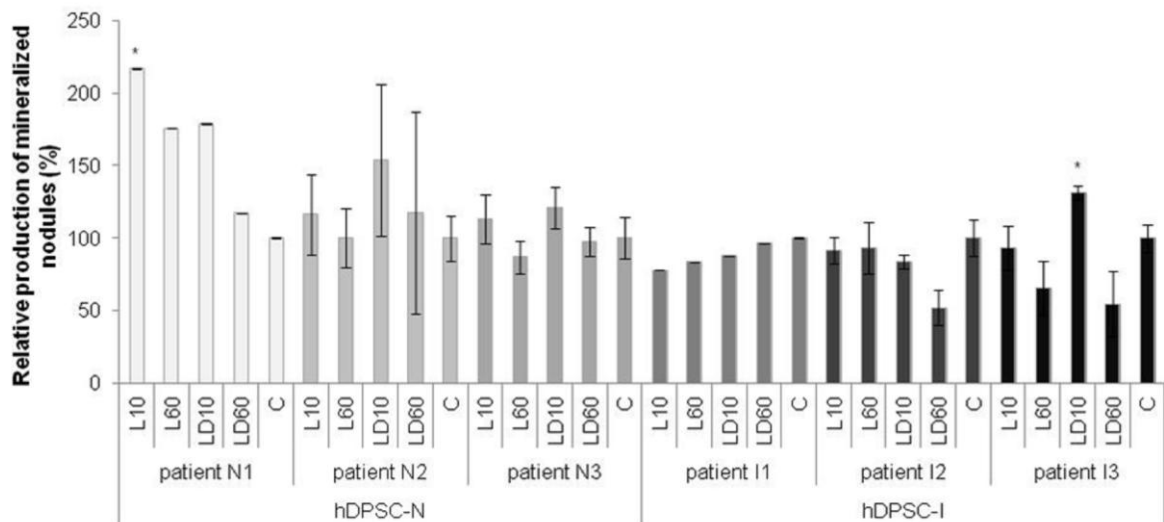
## Figures



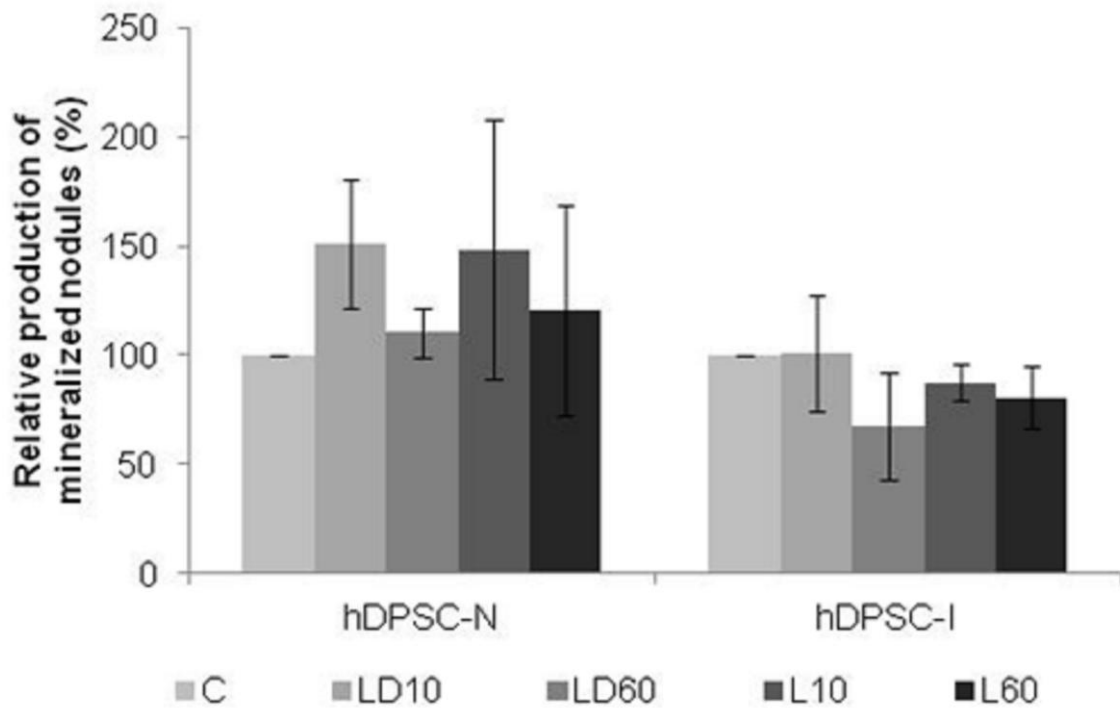
**Figure 1:** Proliferation of hDPSC from normal (N1-N3) and inflamed (I1-I3) dental pulps after laser irradiation in different conditions. C: Control; LD10 and LD60: Cells irradiated with dentin interposition (0.05 and 0.30 J/cm<sup>2</sup>, respectively); L10 and L60: Cells irradiated directly (7 and 42 J/cm<sup>2</sup>, respectively). Asterisks indicate statistical difference between the group and its control (C).



**Figure 2:** Mean proliferation of hDPSC from normal (hDPSC-N) and inflamed (hDPSC-I) dental pulps after laser irradiation in different conditions. C: Control; LD10 and LD60: Cells irradiated with dentin interposition (0.05 and 0.30 J/cm<sup>2</sup>, respectively); L10 and L60: Cells irradiated directly (7 and 42 J/cm<sup>2</sup>, respectively). No statistical difference was found between groups and their controls (p>0.05).



**Figure 3:** Relative production of mineralized nodules by hDPSC from normal (hDPSC-N) and inflamed (hDPSC-I) dental pulps after laser irradiation in different conditions. C: Control; LD10 and LD60: Cells irradiated with dentin interposition (0.05 and 0.30 J/cm<sup>2</sup>, respectively); L10 and L60: Cells irradiated directly (7 and 42 J/cm<sup>2</sup>, respectively). Asterisks indicate statistical difference between the group and the respective control.



**Figure 4:** Relative production of mineralized nodules by hDPSC from normal (hDPSC-N) and inflamed (hDPSC-I) dental pulps after laser irradiation in different conditions. C: Control; LD10 and LD60: Cells irradiated with dentin interposition (0.05 and 0.30 J/cm<sup>2</sup>, respectively); L10 and L60: Cells irradiated directly (7 and 42 J/cm<sup>2</sup>, respectively). No statistical difference was found between groups and their controls ( $p > 0.05$ ).

**APÊNDICE F – ARTIGO 2**

Received Date : 05-Dec-2011

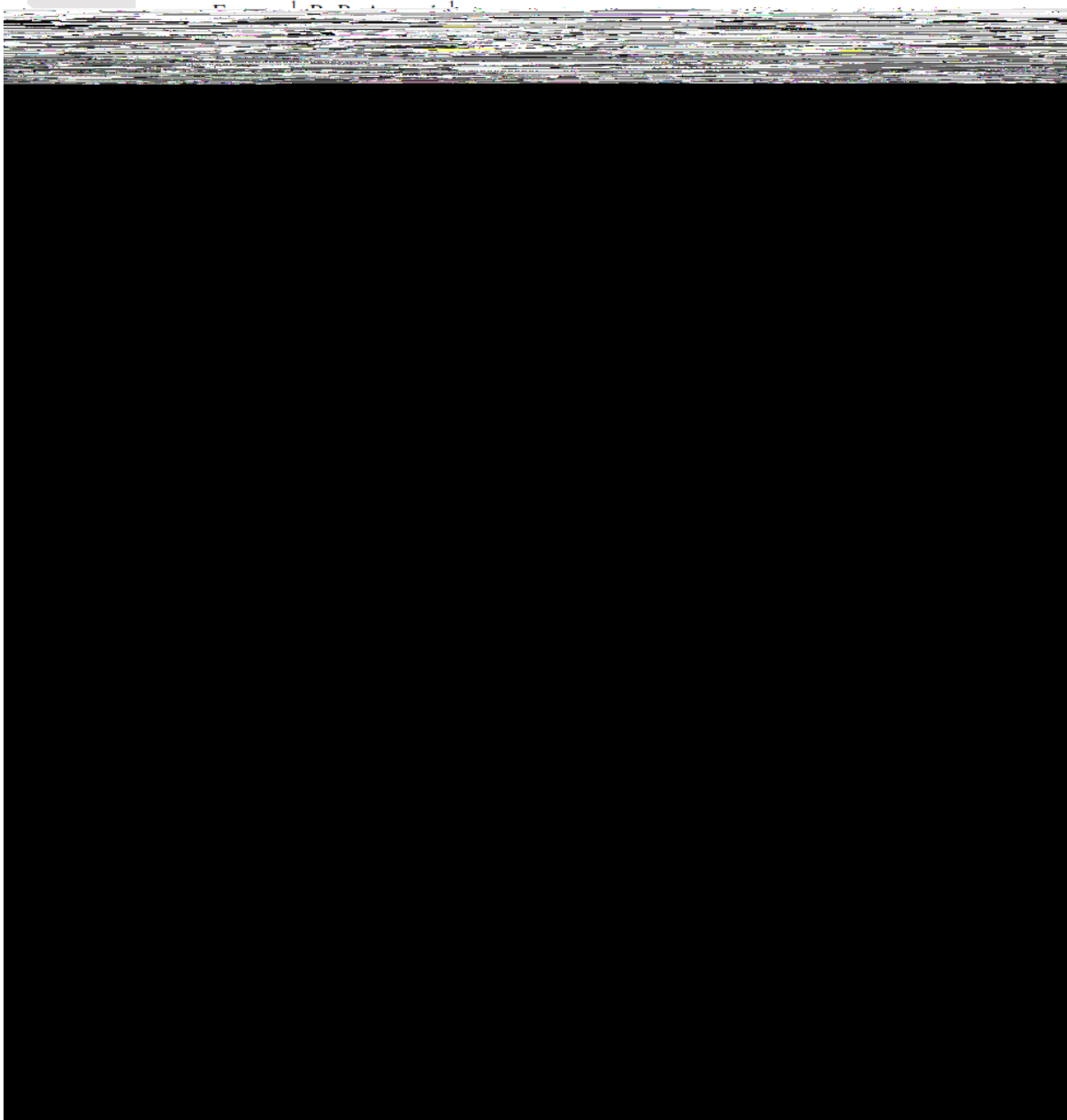
Accepted Date : 11-Apr-2012

Article type : Original Scientific Article

**Comparison of stem cells properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps**

L. O. Pereira<sup>1</sup>, M. R. Rubini<sup>2</sup>, J. R. Silva<sup>1</sup>, D. M. Oliveira<sup>1</sup>, I. C. R. Silva<sup>3,4</sup>, M. J. Poças-

Article





## Abstract

**Aim** To compare cells from normal and inflamed human dental pulps regarding the presence of stem cells, their proliferation and differentiation potential **Methodology** Human dental pulp stem cells (hDPSCs) were isolated from normal (DPSC-N) and inflamed dental pulps (DPSC-I). They were compared in respect to proliferation (MTT assay), morphology and STRO-1 expression. STRO-1-positive cells were subject to proliferation (MTT and CFU counting) and morphological analyses and then submitted to odonto-osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. Differentiated cells were evaluated concerning morphology and the expression, by qRT-PCR, of *BSP*, *LPL* and *SOX-9* genes. The amount of mineralized matrix produced after odonto-osteogenic differentiation was compared by quantitative Alizarin Red staining.

**Results** No difference was observed in the morphology and in the proliferation rate of DPSC-N and DPSC-I either before or after separation of STRO-1-positive cells. These cells represented, 0.46% ( $\pm 0.14$ ) and 0.43% ( $\pm 0.19$ ) of the cell population from normal and inflamed dental pulps, respectively. Both DPSC-N and DPSC-I were capable of differentiating under the three assayed conditions and presented similar patterns for *BSP*, *LPL* and *SOX-9* expression. Mineralized matrix production was also compatible. In all the quantitative experiments, differences were found between cells from each patient, either from normal or inflamed pulps. Nonetheless, there was no statistical difference between these two groups.

**Conclusion** The morphology, proliferation rate and differentiation potential of DPSC-I were similar to the observed in DPSC-N, thus demonstrating that the inflammatory process did not affect the stem cell properties that were assessed.

**Keywords:** Dental pulp stem cells (DPSC), Inflamed dental pulp, Proliferation, Morphology, Differentiation

## Introduction

The vitality of the dentin-pulp complex ensures a proper response to noxious stimuli that affect the tooth, including dental trauma, exposure to irritants, caries and direct or indirect exposure of the dental pulp to the oral environment contaminants. The nature and the magnitude of the response reflect both the extent of the tissue damage and the integrity of this complex. An extensive damage to the dental pulp can trigger an irreversible pulpitis, which is a severe dental pulp inflammation characterized by changes in blood flow, including vasodilatation and high vascular permeability; an increase in the pulpal pressure; immune cells activation; and neuronal activity, associated with intense pain (Jontell *et al.* 1998; Di Maio *et al.* 2004; Hahn *et al.* 2007). The irreversibility of this inflammation is related to the inability of the body defense mechanisms to reverse this process, even after eliminating the causal factors. So far no treatment has been established to induce pulp healing in this extreme case, and the recommended treatment is the removal of the entire pulp tissue following conventional endodontic treatment.

Dental pulp undifferentiated cells are responsible for damage healing. In experimental conditions, these cells presented stem-cell-like qualities, including self-renewal capability and multi-lineage differentiation (Gronthos *et al.* 2000; Gronthos *et al.* 2002; Miura *et al.* 2003). Considering the irreversibility of some pulpal inflammations, some questions arise: Is the viability of dental pulp stem cells compromised in irreversible pulpitis? If not, are they able to normally proliferate and differentiate? Could these cells also be used in tissue engineering? Is

the impairment of dental pulp stem cell function the responsible for the irreversibility of the pulpitis? If not, what makes it irreversible?

Recent studies have reported the presence of viable stem cells in the inflamed human dental pulp (Alongi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010). These studies searched for possible sources of stem cells for future tissue engineering applications. Stem cells have also been identified in inflamed periapical tissues (Liao *et al.* 2011).

In this context, the aim of this study was to compare cells from normal and inflamed human dental pulps regarding the presence of stem cells and their potential for proliferation and differentiation.

## Materials and methods

### Subjects

Pulp tissues were obtained from the permanent teeth of patients (17–43 years of age) under approval of the Ethical Committee of Health Sciences Faculty of the University of Brasília (Brazil) (Project number 023/08) after informed consent. Normal pulp tissues were collected from 3 patients (N1, N2 and N3) undergoing third molar extraction. These teeth were free of carious lesions. Inflamed dental pulps were obtained from 3 patients (I1, I2 and I3) with post-carious irreversible pulpitis that required pulp tissue removal from the involved teeth. The diagnosis of irreversible pulpitis was determined by an endodontic specialist on the basis of clinical assessment, including history of spontaneous pain and intense, lingering pain to cold stimulus. The vitality of the pulp was confirmed on access. Teeth with completely necrotized pulp tissue were excluded.

### Cell culture

Dental pulps from normal and inflamed teeth were harvested as previously described (Gronthos *et al.* 2000). A longitudinal furrow was made in the extracted teeth using sterilized diamond discs tissue (KG Sorensen, ref. 7020) without reaching the pulp tissue using sterilized diamond discs without reaching the pulp tissue (KG Sorensen, ref. 7020). The teeth were fractured with a dental surgical elevator and pulp tissue was gently separated with a sterile dentinal excavator from the crown and root. Inflamed pulp tissues were collected from pulp chambers and root canals with a sterile endodontic file. Extracted pulp tissues were transferred to sterile regular medium (Minimum Essential Medium - MEM; Gibco, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Gibco). Pulps were digested with 3 mg/mL collagenase type I (Gibco) in supplemented medium for 60 minutes at 37°C. After enzymatic digestion, cell suspensions were washed three times by centrifugation (10 minutes at 750 x g) in culture medium and placed into 6-well plates. Cells were then incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 80% humidity environment. Penicillin and streptomycin were used in all solutions to minimize bacterial contamination. Each sample of normal and inflamed pulp tissue was processed, cultured and evaluated separately in all the experiments. Cells were maintained semiconfluently in order to prevent differentiation.

### STRO-1 Expression Evaluation

The stromal stem cell surface marker STRO-1 has been used as a marker of mesenchymal stem cells (Shi *et al.* 2003; d'Aquino *et al.* 2007). Cells expanded from normal and inflamed dental pulps were evaluated concerning STRO-1 expression by flow cytometry as previously described (Wang *et al.* 2010). Cells from each patient sample, at passage 3, were harvested at 70% confluence, washed, resuspended in 10% FBS PBS at density of 5 x 10<sup>6</sup>/mL and incubated on blocked in 10% FBS on ice for 1 hour at 5 x 10<sup>6</sup>/mL, and then incubated with

anti-human STRO-1 mouse monoclonal IgM antibody (Invitrogen, ref. 39-8401) for 1 hour on ice. After three washes with phosphate-buffered saline (PBS), cells were incubated with FITC-conjugated polyclonal secondary antibody (rabbit anti-mouse IgM - FK Biotec - Brazil) for 30 minutes on ice. Subclass-matched antibodies were used as controls. Cells were washed and resuspended in PBS before analysis by Cyflow Space cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) running the FLOMax software (Partec, Münster, Germany). Positive cells were defined after the subtraction of the cells with nonspecific labeling.

### **STRO-1-positive cells isolation**

To obtain an enriched STRO-1-positive cell population, the Dynabead (Invitrogen) positive isolation method was used according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $4 \times 10^6$  cells were blocked with 10% FBS-PBS for 30 minutes on ice and further incubated with  $1 \mu\text{g}$  of anti-human STRO-1 mouse monoclonal antibody (Invitrogen, ref. 39-8401) for 20 minutes at  $4^\circ\text{C}$  on a rocking platform. The labeled cells were washed and resuspended at  $4 \times 10^6$  cells/ml in Buffer 1 (PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin and 2 mM EDTA) prior to the addition of  $1 \times 10^7$  anti-mouse IgM Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 20-minute incubation at  $4^\circ\text{C}$  with gentle tilting and rotation, the volume was doubled with Buffer 1 and STRO-1-enriched cell pellets were obtained by magnetic pull-down. Cells were subsequently washed and cultured in regular medium. Before passage to the culture flask, cell concentration was determined using a Neubauer chamber. The isolated STRO-1 positive cells were considered as stem cells from the dental pulp (DPSC).

### **Immunophenotyping by Flow Cytometry**

We analyzed cell-surface expression of STRO-1-positive cells using monoclonal antibodies, following the manufacturer's instructions. Briefly, DPSC-N and DPSC-I samples at passage 3 were harvested by treatment with 0.25% Tryple Express (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA), washed with PBS (pH 7.4), stained with the monoclonal antibodies, and incubated in the dark for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Cells were then washed and fixed with 1% paraformaldehyde. The following conjugated antibodies were used: CD14-FITC, CD29-PE, CD31-PE, CD34-PE, CD44-PE, CD73-PE, CD90-APC, CD166-PE, CD45-PerCP-Cy5, HLA-DR-PerCP-Cy5 (Biosciences, San Jose, CA), and CD105-PE (Chemicon, Temecula, CA), CD133-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Subtype-matched antibodies were used as controls. The experiment was done using a FACSARIA flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), and data were analyzed using FACSDIVA software (BD Biosciences, San Jose, CA).

### **Morphological analysis**

DPSC from normal (DPSC-N) and inflamed (DPSC-I) dental pulp isolated from each patient, at passage 3, were placed, in triplicate, in 24-well culture plates ( $2 \times 10^4$  cells/well). After 48 and 72 hours, cells were washed with PBS, stained with Giemsa (Dole, Brazil) for 20 minutes and washed again with PBS. Cells were then analyzed in Axiovert inverted microscope (Zeiss, Germany).

### **Cell proliferation assay**

The proliferation of multicellular cultures and of STRO-1-positive cells from each patient was evaluated by the MTT assay, as previously described (Eduardo *et al.* 2008). Cells from each patient, at passage 3, were placed, in triplicate, in four different 96-well culture plates at  $10^4$  cells/well and they were cultivated for 24, 48, 72 and 96 hours. Three hours before the experimental times, the culture media was replaced by medium containing MTT compound (0.5 mg/mL) (Invitrogen). Following the incubation period, the medium was removed and

cells were lysed using 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (Sigma, St Louis, MO, USA). The relative viable cell number was determined by measuring the absorbance of the cell lysate at 595 nm using a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). The absorbance values were normalized as percentages of the values obtained in 24 hours.

### Colony-forming Unit Assay

DPSC-N and DPSC-I, from each patient sample, at passage 3, were placed, in quadruplicate, in 6-well plates (40 single cells per well). After 2 weeks in culture, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes and stained with 3% (v/v) crystal violet (Sigma) for 5 minutes. Cells were then washed twice with distilled water and the number of colonies was determined. Only colonies with more than 50 cells were counted. The percentage colony-forming efficiency was expressed as the total number of colonies divided by the initial number of cells that were seeded and multiplied by 100 (Huang *et al.* 2009).

### Differentiation assays

For odonto-osteogenic, adipogenic and condrogenic differentiation assays, DPSC-N and DPSC-I, from each patient, at passage 3, were placed, in triplicate, in 24-well plates at  $2 \times 10^4$  cells/well. When confluence was achieved, the regular medium was replaced by the induction medium, which was refreshed every 72 hours for 21 days. Cells cultured in regular medium were used as controls. The odonto-osteogenic medium contained 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate (Sigma), 10 nM dexamethasone (Sigma), and 50 mg/mL L-ascorbic acid (Sigma) in regular medium (Wang *et al.* 2010). The adipogenic medium contained 5 mg/mL insulin (Sigma), 50 mmol/L indomethacin (Sigma), 1 mmol/L dexamethasone (Sigma), and 0.5 mmol/L isobutyl-1-methyl xanthine (Sigma) in regular medium (Huang *et al.* 2009). The condrogenic medium contained 50 mg/mL L-ascorbic acid (Sigma), 6.25  $\mu$ g/mL insulin (Sigma) and 10 ng/mL TGF- $\beta$  (R&D Systems, Indianapolis, USA) in regular medium (Sibov *et al.* 2010).

At the end of differentiation induction, cells were morphologically analyzed in inverted microscope and harvested for RNA isolation.

Mineralized matrix formation after the odonto/osteogenic differentiation was detected as previously described (Liu *et al.* 2004), samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed in PBS, and stained for 10 min with a 40 mM Alizarin Red (Sigma) solution, pH 4.2, at room temperature. Cells were then rinsed 5 times with water, followed by a 15-minute wash with PBS to reduce non-specific staining. The amount of Alizarin Red stain bound to the mineral in each dish was quantified by de-staining each sample in 10 mM sodium phosphate containing 10% cetylpyridinium chloride (Sigma), pH 7.0, for 15 min at room temperature. The amount of Alizarin Red stain in the de-staining solution was determined by measurement of the absorbance of the solution at 562 nm in a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). The results were expressed as percentuals of the respective controls, which were all normalized as 100%.

In order to detect lipid vacuoles in the cytoplasm after the adipogenic differentiation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed in PBS, and stained for 60 min with 0.5% Oil Red O (Sigma) in ethanol. After this period, cells were rinsed 5 times with water to remove the excess of the dye.

Cells undergone condrogenic differentiation were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed in PBS, and stained for 2 h with 1% Alcian blue (Sigma) in 3% acetic acid pH 2.5 to reveal the mucopolysaccharide matrix. Cells were then washed with 0.1 M hydrochloric acid and twice with PBS. After staining, the cells undergone the three differentiations were analyzed and photographed in Axiovert inverted microscope (Zeiss, Germany).

The accumulation of bone sialophosphoprotein (BSP), lipo protein lipase (LPL) and sex determining region Y-box 9 (SOX-9) transcripts was assessed by quantitative reverse

transcription – polymerase chain reaction (qRT-PCR) aiming the determination of the lineage-specific gene-expression profile of the odonto-osteogenic, adipogenic and condrogenic differentiation, respectively. Amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) transcript from each sample was included as internal control.

Total RNA was extracted with TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) and treated with DNase I (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA by using the SuperScript<sup>®</sup> III (Invitrogen) enzyme. qRT-PCR was performed, in triplicate, in 10 µL reactions using SYBR Green<sup>®</sup> (Applied Biosystems, USA) in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Oligonucleotides used as primers in qRT-PCR are listed in Table 1. The relative quantitative “cycle threshold” method (Livak *et al.* 2001) was used to quantify the relative transcript accumulation in comparison to the level of the housekeeping gene *GAPDH* transcript ( $2^{-CT}$ ). In this method, the results are expressed in relation to the respective controls, which are all equal to 1.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software GraphPad<sup>™</sup> (San Diego, CA, USA). The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare grouped DPSC-N and DPSC-I concerning: a) the mean of the percentages of STRO-1 labeled cells; b) the mean of the percentages of isolated STRO-1-positive cells; c) the proliferation rates; d) the colony-forming efficiencies; e) the production of mineralized matrix after odonto-osteogenic differentiation and f) the expression of *BSP*, *SOX-9* and *LPL* genes after the differentiation assays. The Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test were used to compare individual results of cells from each patient regarding the proliferation rates and the production of mineralized matrix after odonto-osteogenic differentiation. ANOVA and Tukey's multiple comparison test were employed to compare colony-forming efficiencies of DPSC-N and DPSC-I individually. ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test were performed to compare individual results of cells from each patient in relation to the expression of *BSP*, *SOX-9* and *LPL* genes after the differentiation assays. In all tests, statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Cell isolation and initial proliferation

With the employed methodology, we were able to establish fibroblast-like adherent cell cultures from normal and irreversibly inflamed human teeth, thus showing that even dental pulps considered as irreversibly inflamed contain viable cells. The success rate in establishing cell cultures was approximately 100% from normal dental pulps. Considering inflamed pulps, this rate was proximally 70% for extracted teeth and 50% for pulpectomy samples. It was not possible to isolate cells by pulpectomy in atretic canals. Cells obtained by pulpectomy were further characterized.

Cells from both normal and inflamed origin presented fibroblast-like growth, formed single cell-derived colonies and became confluent after 1-2 weeks. Larger volumes of the isolated pulp tissues, either normal or inflamed, became confluent earlier. No difference was observed in the 96 h growth curve of cells from normal and from inflamed dental pulp (data not shown).

### STRO-1 expression and STRO-1-positive cell isolation

Flow cytometry analysis showed that cells from both normal and inflamed dental pulps are divided in two distinct populations, presenting the same granularity but different sizes. STRO-1-positive cells are present within the smaller size population which represents 8.59%

( $\pm 2.33$ ) of the total cell number. STRO-1-positive cells correspond to 0.46% ( $\pm 0.14$ ) and 0.43% ( $\pm 0.19$ ) of cells obtained from normal and inflamed dental pulps, respectively (Figure 1). No statistical difference was found between the two groups.

After magnetic separation, the mean values of STRO-1-positive cells for the different patients were 0.54% ( $\pm 0.20$ ) and 0.72% ( $\pm 0.17$ ) of total cells isolated from normal and inflamed pulps, respectively. No statistical difference was found between the two groups.

### **Immunophenotyping by Flow Cytometry**

Both DPSC-N and DPSC-I expressed CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD166 but did not express CD14, CD31, CD34, CD45, CD133 and HLA-DR.

### **Morphological analysis**

When analyzed under optical microscopy, cells isolated from normal and inflamed dental pulps presented similar morphologies. No difference was noted between the two groups either before or after the magnetic separation of STRO-1-positive cells (DPSC). Figure 2 shows that both DPSC-N and DPSC-I are predominantly fusiform, especially in confluent cultures, but some cells with polygonal shape are also observed. Cytoplasmic projections connecting cells are frequent. The nuclei are spherical or ovoid and one or more nucleoli are evident. The cytosol has an homogeneous appearance. After confluence, cells from both groups continued to grow on superposed layers with little or without contact inhibition.

### **Cell culture proliferation assay**

The MTT assay was performed to evaluate the proliferative potential of DPSC-N and DPSC-I. There was no difference in the proliferation rates between DPSC-N and DPSC-I samples (Figure 3a). At 72 hours, only the sample DPSC-I1 (227.24%  $\pm 5.37$ ) demonstrated a significantly higher proliferation rate. At 96 hours, samples DPSC-I1, I2 and N1 presented higher rates [475.12 ( $\pm 5.37$ ); 287.14% ( $\pm 15.71$ ) and 268.91% ( $\pm 29.92$ ), respectively]. In the grouped analysis, which considers the mean value of the different samples, there was no statistically significant difference in the proliferative potential of DPSC-N and DPSC-I (Figure 3b). Cellular proliferation rates prior to the magnetic separation of the STRO-1(+) population were equivalent (data not shown).

### **Colony-forming Unit Assay**

Cells derived from normal and inflamed dental pulps began to form colonies of fibroblast-like morphology by the end of the first week of culture. Figures 3c and 3d show the colony-forming efficiency of DPSC-N and DPSC-I from different patients, ranging from 25.63% (DPSC-I3) to 70.63% (DPSC-I1). DPSC-N1, I1 and I2 were statistically equivalent and different from DPSC-N2, N3 and I3, which were equivalent among them. There was no statistical difference between the mean values obtained for DPSC-N (47.08%  $\pm 5.18$ ) and DPSC-I (54.79%  $\pm 6.32$ ).

### **Differentiation assays**

DPSC-N and DPSC-I differentiation was evidenced by the formation of mineralized nodules (odonto-osteogenic), lipid vacuoles in the cytoplasm (adipogenic) and mucopolysaccharide matrix (condrogenic) after 21 days of treatment with the respective induction media (Figure 4a-r). These differentiation markers were homogeneous in all groups and they were not observed in the respective negative controls (cultivated in regular medium).

Mineralized matrix formation in the odonto-osteogenic differentiation (Figure 4s) showed some differences for individual samples. Nonetheless, there was no statistical difference

among the mean values of the grouped samples:  $2367.91 \pm 439.92 \mu\text{M}$  (DPSC-N) and  $2861.60 \pm 69.80 \mu\text{M}$  (DPSC-I).

Cell differentiation was confirmed by the increased accumulation of specific transcripts in each induction experiment. Relative gene expression presented differences amongst some distinct DPSC samples (Figure 4 t-v). However, there was no statistical difference when the mean values of each group were considered:  $3.03 \pm 0.93$  (DPSC-N) and  $4.29 \pm 3.02$  (DPSC-I) for *BSP* gene (odonto-osteogenic differentiation); DPSC-N ( $39.87 \pm 43.82$ ) and DPSC-I ( $37.35 \pm 33.33$ ) for *LPL* gene (adipogenic); DPSC-N ( $1.22 \pm 0.25$ ) and DPSC-I ( $2.34 \pm 0.98$ ) for the *SOX-9* gene (condrogenic).

## Discussion

In the light of our results, severe inflammation was not sufficient to completely destroy the dental pulp stem cells repertoire.

The success rate in establishing cell culture from inflamed dental pulps was lower than the verified for normal teeth. This was probably due to the fact that the amount of tissue obtained from inflamed teeth is usually lower. The rate we observed was compatible to a previous study (Alongi *et al.* 2010).

Wang *et al.* (2010) reported that cells from inflamed pulp presented a late emergence of single-cell derived colonies. We believe this fact is probably associated to a lower volume of tissue one normally obtains from pulpectomy of inflamed teeth, rather than to a compromised cell phenotype.

The phenotype presented by DPSC-N and DPSC-I was compatible to mesenchymal stem cells, since their identification is achieved by the observation of adherence to plastic surfaces, multipotent differentiation potential and expression of the surface antigens CD105, CD73 and CD90, as well as by the lack of expression of CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79 or CD19 and HLA-DR surface molecules (Dominici *et al.* 2006). In addition to these, one of the most studied surface markers for DPSC is STRO-1 (Shi *et al.* 2003; d'Aquino *et al.* 2007; Jo *et al.* 2007; Wang *et al.* 2010), which we have employed in order to obtain a homogenous cell population from the different cell types normally found in dental pulp. In this view, in spite of not being the most abundant stem cell group in dental pulp, we can be sure that we have compared the same cell sub-population from both normal and inflamed dental pulps (Figure 1). Wang *et al.* (2010) have also observed that cells from normal and inflamed dental pulps presented similar STRO-1 expression profiles. The results of distinct flow cytometry experiments were always compatible to the counts of STRO-1(+) cells obtained after magnetic separation, which also confirmed this isolation. The low abundance we observed is in agreement to the data presented by Liao *et al.* (2011). Smith *et al.* (2005) concluded that stem cells comprise less than 1% of the total dental pulp cell population. We believe it is possible that results regarding distinct stems cells subpopulations could vary from the ones focusing on stem cells in general.

Even though two populations with different sizes were observed during the flow cytometry analysis of all cells from both groups, no difference was verified in the morphology of cells before and after magnetic separation of STRO-1-positive cells, probably because of the greater sensibility of the cytometer to small variations of size in relation to the optical microscopy. Additionally, DPSC-N and DPSC-I were morphologically identical, which corroborates previous findings (Alongi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010).

DPSC-N and DPSC-I did not exhibit contact inhibition at confluence (Figure 2e-f). This feature is commonly described for embryonic (Burdon *et al.* 2002) but not for adult stem cells (Young *et al.* 2004). Nevertheless, contact inhibition was not also verified for different

mesenchymal stem cells under hypoxia (Grayson *et al.* 2007) and immature DPSC (Kerkis *et al.* 2006).

When different DPSC-N and DPSC-I samples were grouped for the statistical analysis, the proliferation rates and the colony-forming efficiencies were similar (Figure 3). No differences were observed when the multicellular populations and the STRO-1(+) cells were compared. Also for differentiation assays, differences were observed amongst individual samples, but not between the two cell groups (Figure 4). In our pilot studies, similar results were observed for multicellular populations of cells from normal and inflamed dental pulps (data not shown). Previous studies (Alongi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010) reported lower proliferation rates or lower CFU counts for DPSC-I when compared with DPSC-N. Concerning the differentiation potential, Wang *et al.* (2010) observed that DPSC-I exhibited a similar percentage of positive *ex-vivo* osteogenic induction and dentin sialophosphoprotein expression after differentiation but, unlike our study, they did not test additional differentiation inductions. On the other hand, Alongi *et al.* (2010) found that they appeared to have a decreased osteo/dentinogenic and adipogenic potential compared to DPSC-N.

Several biological aspects may explain the differences between the data we present in this work and the previous reports in the scientific literature. In this study, the evaluation of dental pulp conditions (normal or inflamed) was based on clinical findings, which do not consider molecular features. Since stem cells may act in pulpal physiology both at normality and inflammation, DPSC could adopt distinct activation states at the normal and at the inflamed pulp. This difference of the cell activation status is not detected by clinical tests. Moreover, cell properties can be affected by gene expression changes in response to *in vitro* cultivation. Another possible rationale is that cell function differences can reflect the individual genetic background and not be necessarily linked to the presence or absence of inflammation. In light of the exposed, we believe DPSC-I may not present altered stem cell properties, as hypothesized by Alongi *et al.* (2010).

Inflammation is a complex process that comprises multiple steps, whose symptoms, duration and effects vary widely in different individuals. Depending on the inflammation intensity, some noxious stimuli can activate some stem cell properties, thus inducing proliferation and differentiation. Previous studies showed that hypoxia enhanced DPSC proliferation (Sakdee *et al.* 2009; Iida *et al.* 2010) and the angiogenic potential of dental pulp cells (Aranha *et al.* 2010). An increased expression of transforming growing factor-beta 1 (TGF- $\beta$  1) was observed in irreversibly inflamed dental pulp (Piattelli *et al.* 2004) and this protein is associated to reparative dentinogenesis. Activated platelets are frequent in dental pulp inflammation and they seem to stimulate dental pulp cells proliferation and protein synthesis *in vitro*, without been hampered by inflammatory factors such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 and 6 and the bacterial toxin lipopolysaccharide (Agis *et al.* 2010).

Considering that the inflamed dental pulp presents viable stem cells, with preserved proliferation and differentiation potential, the irreversibility of the pulpitis may be related to other causal factors. Clinically diagnosed irreversible pulpitis, differently from the reversible one, has been associated with an up-regulation of TNF- $\alpha$  gene expression in the dental pulp (Kokkas *et al.* 2007). Since enamel and dentine confine the dental pulp, intrapulpal tissue pressure is of paramount importance in pulpal physiology. The increased internal pressure resulting from inflammation may physically constrain stem cells-guided regeneration. Furthermore, the intense pain associated with nerve fibers excitation by the increased internal pressure (Van Hassel 1971; Kim 1990; Hahn *et al.* 2007) makes clinical intervention urgent, allowing no time to possible natural pulp regeneration. Our results suggest that these cells may preserve their stemness even in an unfavorable physical environment.

Since the inflamed dental pulp contains preserved stem cells, it could be envisaged as a suitable source of DPSC for dental pulp regeneration and tissue engineering, and not only as a



mere biological waste. Our findings reinforce the hypothesis that irreversible pulpitis is not necessarily associated with the depletion of functional pulp stem cells.

Additional studies must address the molecular events which could affect DPSC viability and regenerative potential. This approach could contribute to the identification of the irreversible pulpitis determinants, in order to prevent them and/or to circumvent the associated regeneration impairment.

### Conclusion

In this study, we have demonstrated that the DPSC-I morphology, proliferation rate and differentiation potential are similar to the observed for DPSC-N, thus showing that inflammation did not affect the stem cell properties we have evaluated.

### References

- Agis H, Stampfl B, Watzek G, Gruber R (2010) Activated platelets increase proliferation and protein synthesis of human dental pulp-derived cells. *International Endodontic Journal* **43**(2), 115-24.
- Alongi DJ, Yamaza T, Song Y *et al.* (2010) Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative Medicine* **5**(4), 617-31.
- Aranha AMF, Zhang Z, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, Nör JE (2010) Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* **36**(10), 1633-7.
- Burdon T, Smith A, Savatier P (2002) Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology* **12**(9), 432-8.
- d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M *et al.* (2007) Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death & Differentiation* **14**(6), 1162-71.
- Di Maio FDN, Lohinai Z, D'arcangelo C *et al.* (2004) Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *Journal of Dental Research* **83**(4), 312-6.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I *et al.* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**(4), 315-7.
- Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM *et al.* (2008) Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers in Surgery and Medicine* **40**, 433-8.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T (2007) Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**(3), 948-53.
- Gronthos S, Brahim J, Li W *et al.* (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* **81**(8), 531-5. .
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(25), 13625-30.
- Hahn CL, Liewehr FR (2007) Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *Journal of Endodontics* **33**(3), 213-9.
- Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieh TY, Lin LM (2009) Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *Journal of Endodontics* **35**(5), 673-81.

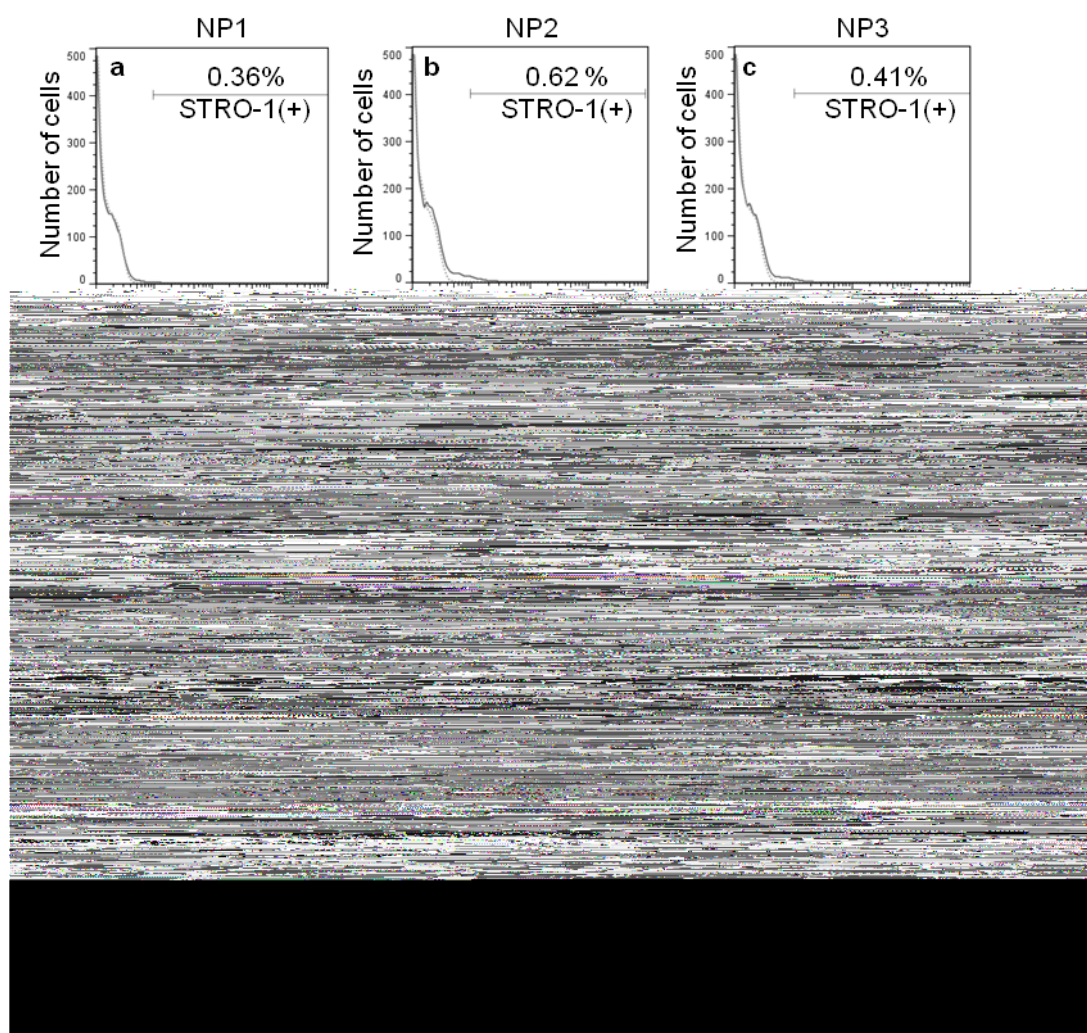
- Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K (2010) Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Archives of Oral Biology* **55**(9), 648-54.
- Jo YY, Lee HJ, Kook SY *et al.* (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering* **13**(4), 767-73.
- Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G (1998) Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **9**(2), 179-200.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D *et al.* (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* **184**(3-4), 105-16.
- Kim HJ, Im GI (2009) Chondrogenic differentiation of adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary. *Journal of Orthopaedic Research* **27**(5), 612-9.
- Kim S (1990) Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *Journal of Endodontics* **16**(2), 48-53.
- Kokkas A, Goulas A, Varsamidis K, Mirtsou V, Tziafas D (2007) Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *International Endodontic Journal* **40**(3), 198-203.
- Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GTJ (2011) Cells Isolated from Inflamed Periapical Tissue Express Mesenchymal Stem Cell Markers and Are Highly Osteogenic. *Journal of Endodontics*.
- Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK (2004) Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *Journal of Dental Research* **83**(6), 496-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**(4), 402-8.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M *et al.* (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(10), 5807.
- Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Tripodi D, Strocchi R (2004) Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *International Endodontic Journal* **37**(2), 114-9.
- Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV (2009) Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* **35**(6), 818-23.
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**(4), 696-704.
- Sibov TT, Pavon LF, Oliveira DM *et al.* (2010) Characterization of Adherent Umbilical Cord Blood Stromal Cells Regarding Passage, Cell Number, and Nano-biomarking Utilization. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")* **12**(4), 391-403.
- Smith AJ, Patel M, Graham L, Sloan AJ, Cooper PR (2005) Dentine regeneration: key roles for stem cells and molecular signalling. *Oral Biosciences & Medicine* **2**, 127-32.
- Van Hassel HJ (1971) Physiology of the human dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **32**(1), 126-34.
- Wang Z, Pan J, Wright JT *et al.* (2010) Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *Journal of Endodontics* **36**(5), 820-5.
- Young HE, Black Jr AC (2004) Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **276**(1), 75-102.

**Table 1** Oligonucleotides used for qRT-PCR

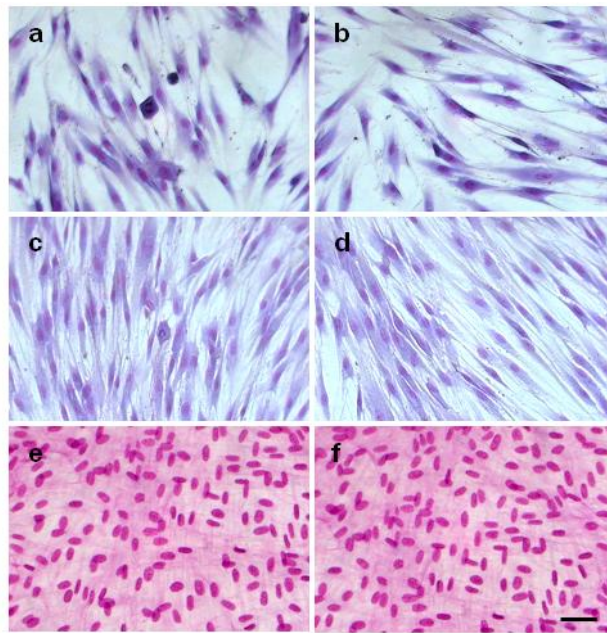
Differentiation	Gene		Sequence (5'-3')	Product size
Odonto-osteogenic	<i>BSP</i> <sup>1</sup>	Sense	AAAGTGAGAACGGGGAACCT	161 bp
		Antisense	GATGCAAAGCCAGAATGGAT	
Adipogenic	<i>LPL</i> <sup>1</sup>	Sense	AGTGGCCAAATAGCACATCC	186 bp
		Antisense	CCGAAAGATCCAGAATTCCA	
Condrogenic	<i>SOX-9</i> <sup>2</sup>	Sense	CACACAGCTCACTCGACCTTG	76 bp
		Antisense	TTCGGTTATTTTTAGGATCATCTCG	
Internal control	<i>GAPDH</i> <sup>1</sup>	Sense	CAAGGCTGAGAACGGGAAGC	194 bp
		Antisense	AGGGGGCAGAGATGATGACC	

<sup>1</sup> (Alongi *et al.* 2010), <sup>2</sup> (Kim *et al.* 2009)

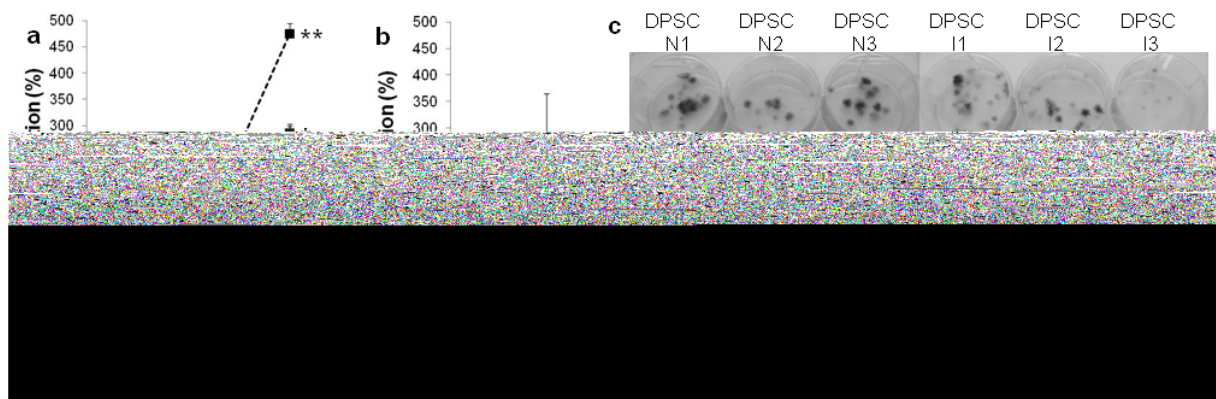
## Figures



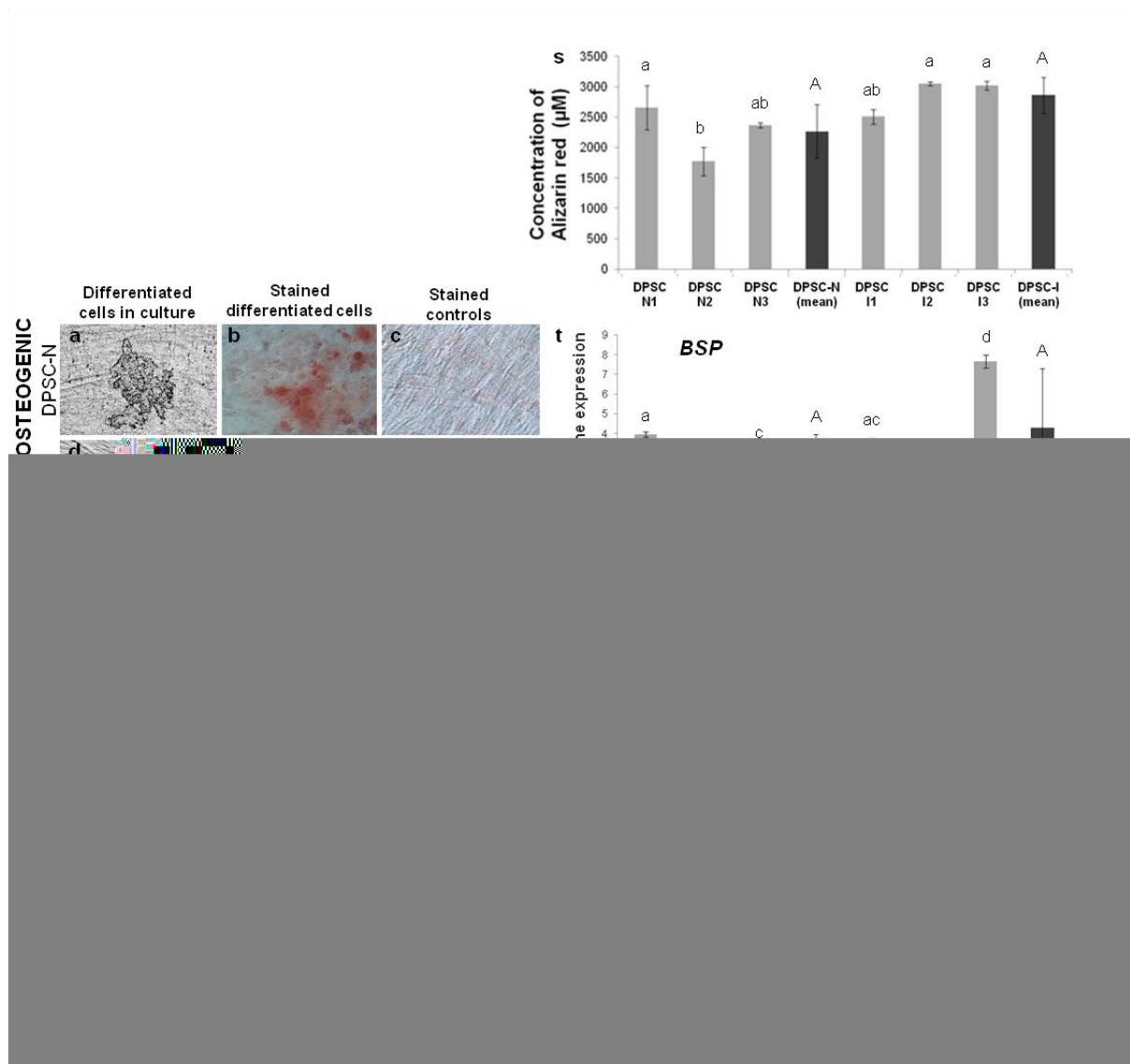
**Figure 1** STRO-1 expression profile (flow cytometry) for cells obtained from normal and inflamed dental pulps. NP1, NP2 and NP3: cells from normal dental pulp (a-c, g) and IP1, IP2 and IP3: cells from inflamed pulp (d-g). Dotted lines: nonspecific labeling by the secondary antibody. Solid lines: STRO-1(+) cells. (g) Percentage of cells from normal and inflamed dental pulps expressing STRO-1. No statistical difference was found between NP and IP means.



**Figure 2** DPSC-N and DPSC-I stained with Giemsa. (a, c, e) DPSC-N1, (b, d, f) DPSC-I1. (a, b) Subconfluent cultures. (c, d) Confluent cultures. (e, f) Post-confluence cultures displaying superposed growth. Bar = 50  $\mu$ m.

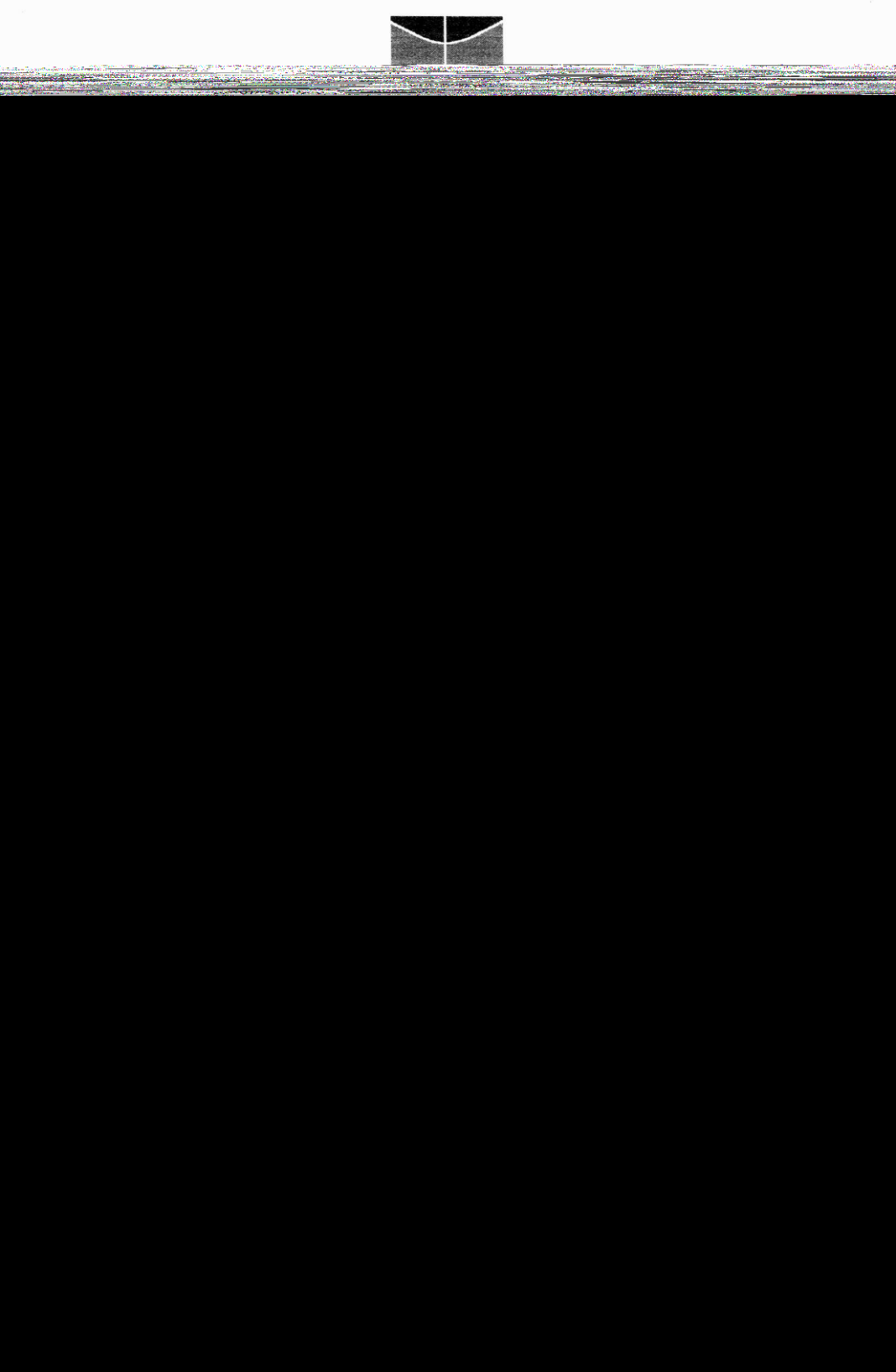


**Figure 3** DPSC-N (3 patients – N1, N2 and N3) and DPSC-I (3 patients – I1, I2 and I3) proliferation. (a) Growth curve of DPSC-N and DPSC-I Asterisks indicate statistically significant differences within the same experimental time. (b) Mean proliferation of DPSC-N (N1, N2 and N3) and DPSC-I (I1, I2 and I3) after 96 hours. There was no statistical difference. (c) Colony-forming units (CFU) in DPSC-N and DPSC-I stained with violet crystal. (d) Colony-forming efficiency in DPSC-N and DPSC-I. Different letters denote statistical difference between the columns of the same color.



**Figure 4** Differentiation assays: (a-f, s, t) odonto-osteogenic; (g-l, u) adipogenic; (m-r, v) chondrogenic. Odonto-osteogenic differentiation of DPSC-N (patient NP2) (a-c) and DPSC-I (IP2) (d-f): (a) and (d) contain differentiated cells, showing mineralized nodules in the culture; (b) and (e) contain mineralized nodules stained with Alizarin red; (c) and (f) are negative controls after Alizarin red staining. Adipogenic differentiation of DPSC-N (patient NP1) (g-i) and DPSC-I (IP1) (j-l): (g) and (j) contain differentiated cells displaying lipid vacuoles in the cytoplasm; (h) and (k) contain differentiated cells stained with Oil red-O; (i) and (l) are negative controls after Oil red-O staining. Chondrogenic differentiation of DPSC-N (patient NP3) (m-o) and DPSC-I (IP3) (p-r): (m) and (p) contain cells in culture after the induction of chondrogenic differentiation; (n) and (q) contain regions of matrix mucopolysaccharides stained with Alcian blue; (o) and (r) are negative controls after Alcian blue staining. (s) Relative concentration of Alizarin red absorbed by the mineralized matrix produced by DPSC-N and DPSC-I after differentiation assay. All controls were normalized as 100%. (t, u, v): Relative expression of the genes *BSP*, *LPL* and *SOX-9*, respectively, obtained by qPCR. All controls are equal to 1. Different letters denote statistical difference between the columns of the same color. Bars = 50 µm.

**ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



**ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA  
FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – SES-DF**



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

