

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO-NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA ODONTOLÓGICA - ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa
Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Mecanismos Moleculares Envolvidos na
Diferenciação das SHED (*Stem Cells from Exfoliated
Deciduous Teeth*) em Células Endoteliais

LETÍCIA WESTPHALEN BENTO

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Borba de Araujo

Porto Alegre, novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ÊNFASE EM ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa
Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

**Mecanismos Moleculares Envolvidos na
Diferenciação das SHED (*Stem Cells from Exfoliated
Deciduous Teeth*) em Células Endoteliais**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia na área de Clínica Odontológica com ênfase em Odontopediatria

LETÍCIA WESTPHALEN BENTO

Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE) – CAPES
Processo: BEX 5511/09-7

Convênio UFRGS-UMICH

Orientador no país
Prof. Dr. Fernando Borba de Araújo

Orientador no exterior
Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör

Porto Alegre, novembro de 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

Westphalen Bento, Letícia
Mecanismos Moleculares Envolvidos na Diferenciação
das SHED (Stem Cells from Exfoliated Deciduous
Teeth) em Células Endoteliais / Letícia Westphalen
Bento. -- 2012.
97 f.

Orientador: Fernando Borba de Araujo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2012.

1. Angiogênese. 2. Células-Tronco. 3. Endodontia.
4. Polpa Dental. 5. Engenharia Tecidual. I. Borba de
Araujo, Fernando, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Success is not final, failure is not fatal, it is
the courage to continue that counts.”*

(Winston Churchill)

Dedico esse trabalho,

Àqueles que nunca medem esforços para realizarem meus sonhos, que sempre estão ao meu lado, que são meus melhores amigos e razão da minha existência:

Minha mãe Regina, meu porto seguro, obrigada por estar sempre comigo, pelo colo, pelo carinho e pelo amor incondicional...

Meu pai Alfredo, minha força, meu exemplo, obrigada pelo incentivo, pelo carinho e por sempre acreditar em mim...

Queridos pais, obrigada por encherem minha vida de alegria!

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Agradeço pela ajuda na realização desse trabalho,

Ao **Felipe Nör**, meu amor, meu companheiro, meu amigo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me apoiar e me incentivar. Obrigada pelas revisões desse trabalho, por toda a ajuda no laboratório e pelos momentos inesquecíveis em Ann Arbor. Também é teu esse trabalho.

À minha irmã **Roberta**, minha benção, minha alegria. O teu amor é a energia para seguir em frente.

À minha família: primos, tios e avó que muito amo, agradeço pelo apoio carinhoso e por entenderem o caminho que escolhi. Em especial à **tia Jussara** pelo imenso carinho nesse período final.

À minha querida colega de mestrado e doutorado **Renata Franzon**, pelo carinho e pela amizade que construímos nesses anos! Obrigada pelo apoio de sempre.

À toda **equipe da Odontopediatria da FO-UFRGS, professores e pós-graduandos**, pelo apoio e incentivo.

À funcionária da Odontopediatria **Julcelaine**, pelo carinho, pela ajuda constante e por estar sempre disponível!

Aos **Profs. José Arthur Bogo Chies e Luciano Casagrande** pelas importantes contribuições na defesa do projeto.

Aos integrantes do Instituto de Pesquisas em Células-Tronco (IPCT), em especial à **Profa. Patrícia Pranke**, pelos ensinamentos no ano de 2011, quando participei das reuniões do grupo.

Aos meu colegas da **UNIFRA**, em especial à Profa. Ana Chagas, coordenadora do curso de Odontologia, agradeço pela acolhida e pelo apoio nesse período final do doutorado.

À querida amiga **Renata Licks**, pelo ano que moramos juntas em Ann Arbor, pela ajuda no laboratório, pela amizade e pelas nossas conversas nas noites frias do inverno americano!

Ao querido amigo **Vinícius Rosa**, por todo o apoio nos meus primeiros dias no laboratório. Obrigada por todos os ensinamentos de cultivo celular e PCR.

À querida amiga **Fernanda Visioli**, pela amizade e companheirismo e por me acolher em sua casa no primeiro mês que morei em Ann Arbor.

Aos meus queridos colegas e amigos do Angiogenesis Lab: **Sudha Krishnamurthy, Kristy Warner, Zihong Dong, Zhaocheng Zhang, Atsushi Imai e Tatiana Botero**, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo apoio durante meu período no lab. Obrigada por me receberem com tanto carinho e por estarem sempre prontos a me ajudar! Vocês moram no meu coração.

Aos queridos amigos **Fabiana, Rubens, Yorico, Marcos, Thiago e Tara** por toda a amizade durante minha estadia em Ann Arbor!

Às funcionárias da Universidade de Michigan, **Ruth, Susan e Renita**, pela ajuda tanto antes quanto durante o estágio sanduiche.

Aos professores: **José Antônio Poli de Figueiredo e João Eduardo Gomes Filho** e à Prof^a **Anna Christina Medeiros Fossati** por terem aceito o convite para participarem da banca de defesa.

Ao funcionário **Vladimir Arruda**, pela disponibilidade em ajudar.

À **Faculdade de Odontologia da UFRGS**, pela minha formação.

À comissão coordenadora, professores e funcionários do **Programa de Pós-graduação da FO-UFRGS**.

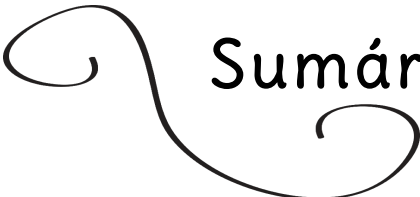
À **CAPES**, pela bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

À **Deus e meus anjos da guarda**, que sempre estão olhando por mim e me guiam no caminho a seguir.

E a todos que, de alguma forma, me auxiliaram na realização dessa tese.

Ao querido **Prof. Jacques Eduardo Nör**,
minha eterna gratidão por todos os ensinamentos e pela grande oportunidade de
trabalhar em seu laboratório. Foi, um ano enriquecedor, inesquecível e de
aprendizado incalculável. És, para mim, um exemplo de pessoa, de professor,
pesquisador e profissional!

Ao querido **Prof. Fernando Borba de Araujo**,
jamais conseguirei agradecer todas as oportunidades que me proporcionaste!
Obrigada por todos esses anos de convívio e aprendizado. Obrigada por sempre
acreditar em mim! Tu és um exemplo de dedicação e profissionalismo.
Minha admiração e carinho por ti são infinitos



Sumário

Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Introdução.....	13
1. Bioengenharia de tecidos.....	13
1.1 Células-Tronco.....	14
1.1.1 Células-Tronco Mesenquimais.....	15
1.2. Bioengenharia de Tecido Pulpar.....	16
1.2.1. Polpa Dentária.....	18
1.2.2. A Vascularização Pulpar.....	20
2. Formação de Vasos Sanguíneos: Vasculogênese e Angiogênese	21
2.1. Os receptores do VEGF.....	25
3. Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais em Células	
Endoteliais.....	27
Objetivo.....	31
Artigo: MEK1/ERK signaling is required for endothelial	
differentiation of SHED.....	32
Considerações Finais.....	54
Considerações Éticas.....	58
Referências.....	59
Anexos.....	69

Lista de Abreviaturas



µm	Micrometro
%	Porcento
BMMSC	Células-Tronco derivadas da Medula Óssea
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
BSP	Sialoproteína Óssea
CD-31/PECAM-1	Grupamento de diferenciação 31 / Molécula de Adesão Celular Plaquetária/Endotelial 1
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPSC	Células Tronco Derivadas da Polpa Dental
DSP	Sialoproteína Dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína Dentinária
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
EGM-2MV	Meio de Crescimento Endotelial – 2 Micro Vascular
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FBS/FCS	Soro Fetal Bovino
FC	Fator de Crescimento
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
Fig.	Figura
Flk-1	Receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (Quinase Fetal Hepática 1)
Flt-1	Receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>)
FO-UFRGS	Faculdade de Odontologia da UFRGS
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	Hora
H/E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
ICC	Índice de Concordância Intraclasse
iPC	Células Pluripotentes Induzidas
LY294002	Inibidor da rota de sinalização PI3k/Akt
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC	Matriz Extracelular

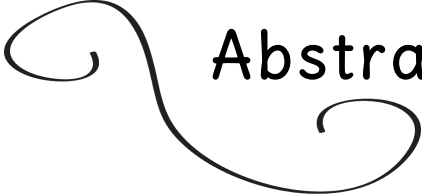
MEK-1	Proteína Quinase 1 ativada por Mitógeno
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MSC	Células-Tronco Mesenquimais
NP-1	Neuropilina- 1
ON	<i>(Over Night)</i>
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PLGF	Fator de Crescimento da Placenta
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia Reversa
RTK	Receptor tirosino- quinase
SCAP	Células – Tronco derivadas da Papila Apical
SHED	Célula Tronco derivada da Polpa de Dentes Decíduos Esfoliados
shRNA	<i>(Small hairpin RNA)</i>
SPSS	Pacote Estatístico para Ciências Sociais
SRB	Sulforodamina B
STAT-3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição -3
TA	Temperatura Ambiente
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UMICH	Universidade de Michigan
UO126	Inibitor das rotas de sinalização
VCAM	Proteína de adesão da Célula Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR-1	Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGFR-2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial
vWF	Fator de Von Willebrand



Resumo

As células-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) são uma fonte promissora de células-tronco para a terapia regenerativa. Já foi demonstrado que elas podem se diferenciar em células endoteliais, mas os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são desconhecidos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo elucidar os mecanismos moleculares relacionados à diferenciação endotelial dessas células. Para isso, um meio de cultura para células endoteliais (EGM-2MV), suplementado por 50ng/mL rhVEGF, foi utilizado com sucesso como estímulo para as SHED se diferenciarem em células endoteliais em cultura de monocamada. Uma vez que, elas expressaram os marcadores endoteliais VEGFR-2 e CD-31. Além disso, quando as SHED foram expostas ao meio de diferenciação, a fosforilação de STAT-3 (um marcador de células-tronco) foi inibida de acordo com a concentração utilizada, enquanto a fosforilação de ERK e AKT foi estimulada. Quando um inibidor de ERK foi adicionado ao meio, a fosforilação de STAT-3 aumentou. Por outro lado, quando um inibidor de STAT-3 foi adicionado ao meio de cultura, a fosforilação de ERK aumentou. A inibição de ERK também impediu a diferenciação endotelial. Para confirmar esse resultado, shRNA MEK-1 SHED também falharam em expressar VEGFR-2 quando estimuladas. Além disso, *scaffolds* de fatias dentais foram semeadas com shRNA VEGFR-1 SHED ou shRNA controle e implantadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes. Após recuperados, um tecido muito semelhante à polpa dental foi formado no interior das fatias. No entanto, havia menos células CD-31 positivas nos vasos sanguíneos dos implantes semeados com VEGFR-1 shRNA SHED, sugerindo um papel do VEGFR-1 na formação de vasos sanguíneos. Em conclusão, o VEGFR-1 e a via de sinalização de ERK estão envolvidos no processo de diferenciação das SHED em células endoteliais.

Palavras Chave: Angiogênese, Engenharia Tecidual, Células-Tronco, Endodontia, Células- Tronco da Polpa Dental.



Abstract

Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) are a promising source of stem cells for regenerative therapy. It was already shown they can differentiate into endothelial cells, but the mechanisms involved in this process remain unclear. Therefore, the following study aimed to elucidate the molecular mechanisms related to endothelial differentiation of SHED. For this purpose, a culture media for endothelial cells (EGM-2MV), supplemented with 50ng/ml rhVEGF, was successfully used as stimuli for SHED to undergo endothelial differentiation in monolayer culture, as they expressed the endothelial markers VEGFR-2 and CD-31. Moreover, when SHED were exposed to the differentiation medium, STAT-3 phosphorylation (a stemness marker) was inhibited while the ERK and AKT phosphorylation was stimulated. When an ERK inhibitor was added to the medium, the STAT-3 phosphorylation increased in a dependent concentration manner. On the other hand, when a STAT-3 inhibitor was added the ERK phosphorylation increased. The ERK inhibition also arrested endothelial differentiation. To confirm this results, shRNA MEK-1 SHED also failed to express VEGFR-2 when stimulated. Additionally, tooth slice scaffolds were seeded with shRNA VEGFR-1 SHED or shRNA control SHED and implanted, subcutaneously, into immunodeficient mice. After retrieved, a dental pulp-like tissue had been formed inside the tooth slice. However, there were fewer CD-31 positive blood vessels in the shRNA VEGFR-1 implants suggesting a role of VEGFR-1 in the formation of blood vessels by SHED. In conclusion, the VEGFR-1 and ERK pathway are involved in the process of differentiation of SHED into endothelial cells.

Keywords: Angiogenesis; Tissue Engineering; Stemness; Endodontics; Dental Pulp Stem Cells.

Introdução

1. Bioengenharia de Tecidos.

O crescimento da Odontologia vem acompanhado de importantes mudanças em seus paradigmas. Baseada, inicialmente, em uma filosofia cirúrgico-restauradora, mudou seus conceitos e sua prática para uma Odontologia de promoção de saúde na medida em que a etiopatogenia das doenças foi aos poucos sendo desvendada (FERJESKOV e KIDD, 2005). Atualmente, os conhecimentos dos aspectos celulares e moleculares envolvidos nas patologias e terapias odontológicas têm sido cada vez mais estudados. (NÖR, 2006) . Dessa forma, surge um novo ciclo de mudança de paradigma, onde os conhecimentos da biologia celular e molecular irão levar ao desenvolvimento de terapias cada vez mais avançadas, diagnósticos mais precisos e a possibilidade de tratamento para situações onde até agora não havia alternativa (SLAVKIN, 1999; NÖR, 2006).

Nesse contexto, a Odontologia, como ciência, tem buscado, na bioengenharia de tecidos, uma gama de novas possibilidades terapêuticas. Essa nova abordagem, reúne os conhecimentos das ciências básicas com os conhecimentos clínicos buscando transpor as descobertas da bancada para a cadeira odontológica (GIANNOBILE e JOSKOW, 2012).

A bioengenharia de tecidos é uma ciência que reúne conceitos multidisciplinares, no intuito de regenerar tecidos lesados ou substituir tecidos perdidos. (LANGER e VACANTI, 1993; NOR, 2006). Essa nova ciência está alicerçada sobre três fatores: células, capazes de se diferenciarem nos tecidos de interesse; matrizes, que irão sustentar as células substituindo, temporariamente, a matriz extracelular e moléculas responsáveis pelos sinais que direcionarão o destino das células (LANGER e VACANTI, 1993; NAKASHIMA e AKAMINE, 2005; NOR, 2006). As células-tronco, devido ao seu potencial de se diferenciarem em

diferentes tipos de tecido de acordo com a sua origem, são as células consideradas mais aptas para a bioengenharia de tecidos (NÖR, 2006; BLUTEAU *et al.*, 2008)

1.1 Células-Tronco

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas com alto potencial de proliferação e auto-renovação, capazes de gerar um ou mais tipos de células especializadas. Elas podem se dividir tanto simétrica quanto assimetricamente. A divisão simétrica aumenta o número de células-tronco no nicho, enquanto a divisão assimétrica mantém o número de células-tronco inalteradas e gera células com diferentes propriedades. Essas células podem tanto se multiplicar (células progenitoras) ou se direcionarem para uma diferenciação terminal. Os progenitores possuem um ciclo de vida limitado. Quanto transplantadas, podem reconstituir um tecido apenas por um curto período de tempo. Já as células-tronco são auto-renováveis e podem manter o tecido por toda a vida.(BLUTEAU *et al.*, 2008) Além disso, as células-tronco podem ser de origem embrionária, proveniente de tecidos adultos ou células somáticas induzidas à serem pluripotentes (iPC) (ANDERSON *et al.*, 2001; REYA *et al.*, 2001; RAO, 2004; BLUTEAU *et al.*, 2008).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e são pluripotentes, sendo capazes de gerar todos os tipos celulares diferenciados do organismo com exceção dos anexos embrionários. As iPC ou células-tronco pluripotentes induzidas, foram originadas da necessidade de se transpor as barreiras éticas e legais do uso de embriões humanos. Os experimentos que deram origem à ovelha Dolly mostraram que células somáticas poderiam ser reprogramadas pela transferência do seu conteúdo nuclear em oócitos (WILMUT *et al.*, 1997) ou por fusão com células-tronco embrionárias (TADA *et al.*, 2001; COWAN *et al.*, 2005). A partir desse conhecimento, verificou-se que existem fatores comuns entre óvulos e células-tronco embrionárias que conferem pluripotência ou totipotência (capacidade de gerar todas as células do organismo e os anexos embrionários). A partir de então, foi criada a hipótese de

que se esses fatores fossem identificados, poderiam ser utilizados para induzir pluripotência em células somáticas (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006). Dessa forma, não haveria necessidade do uso de embriões e não haveria a preocupação de rejeição quando do uso de enxertos alógenos, pois seria possível desenvolver células pluripotentes a partir das próprias células do paciente. Para isso, quatro importantes fatores de transcrição, responsáveis pela manutenção da pluripotência das células-tronco embrionárias (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf-4), foram inseridos em células murinas e humanas gerando iPcs (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007).

1.1.1 Células Tronco Mesenquimais

As células-tronco provenientes de tecidos adultos, ou também chamadas células tronco mesenquimais (MSC), são células indiferenciadas, multipotentes, capazes de gerar tipos celulares compatíveis com o tecido onde residem. Sua função principal é manter e reparar os tecidos no qual se encontram (THESLEFF e TUMMERS, 2003; NEDEL *et al.*, 2009). Entretanto, vários estudos demonstram que essas células possuem alta plasticidade, ou seja, podem se diferenciar em tipos celulares bastante diferentes do seu tecido de origem dependendo do estímulo recebido (HUANG *et al.*, 2009; ISHKITIEV *et al.*, 2010).

As primeiras células-tronco mesenquimais isoladas e caracterizadas foram as células-tronco da medula óssea (BMMSC) (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970; PROCKOP, 1997). Essas células demonstraram ter potencial de se diferenciarem em diferentes tecidos de origem mesodérmica, tais como: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e estroma fibroso mielosuportivo (PROCKOP, 1997; HUANG *et al.*, 2009). Posteriormente, células-tronco mesenquimais foram isoladas a partir de outras fontes, tais como: cérebro, pele, folículo piloso, músculos esqueléticos intestino e pâncreas (HARADA *et al.*, 1999; FUCHS e SEGRE, 2000; MORSCZECK *et al.*, 2008; VOLPONI *et al.*, 2010).

O microambiente em que as células-tronco residem é chamado nicho e é composto de tipos heterogêneos de células, matriz extracelular e fatores solúveis para manutenção e auto-renovação destas células (THESLEFF e TUMMERS,

2003; SCADDEN, 2006). Nos tecidos dentários também já foram identificados nichos de células-tronco. Em humanos, estas células já foram identificadas na polpa de dentes permanentes (GRONTHOS *et al.*, 2000) e decíduos (MIURA *et al.*, 2003; KERKIS *et al.*, 2006; BERNARDI *et al.*, 2011), no ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004), no folículo dentário de terceiros molares (MORSCZECK *et al.*, 2005) e na papila apical de dentes permanentes imaturos (SCAP)(SONOYAMA *et al.*, 2008). Em roedores, já foram identificadas na alça cervical de dentes incisivos e molares (HARADA *et al.*, 1999; THESLEFF e TUMMERS, 2003) e na polpa dental (WADDINGTON *et al.*, 2009). Em bovinos, foram encontradas nas células do folículo dental e da matriz de cimento (HANDA *et al.*, 2002) e em ovinos, no ligamento periodontal (GRONTHOS *et al.*, 2006).

A possibilidade de isolar células-tronco mesenquimais a partir da polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 2003) fez surgir a possibilidade de aplicar os conceitos de bioengenharia tecidual para regeneração do tecido pulpar. Essa perspectiva é de grande importância para a odontopediatria e endodontia, para o tratamento de casos de bio ou necropulpectomia de dentes permanentes com rizogênese incompleta. As células derivadas da polpa de dentes decíduos (MIURA *et al.*, 2003) mostram-se distintas das DPSCs (GRONTHOS *et al.*, 2000) em respeito ao seu potencial de proliferação mais alto, capacidade de formar esferas e capacidade osteoindutiva. Além disso, por serem derivadas de dentes decíduos, essas células tornam-se uma alternativa promissora pelo fato de serem obtidas sem nenhum procedimento invasivo como é o caso das células-tronco derivadas da medula (MIURA *et al.*, 2003)

1.2 Bioengenharia de Tecido Pulpar

Sabe-se que a cárie dental e o traumatismo dentário frequentemente levam ao comprometimento irreversível da polpa. Entretanto, os tratamentos usualmente instituídos não são de caráter regenerativo, o que propicia o aumento da fragilidade da estrutura dentária. (CORDEIRO *et al.*, 2008; DESAI e CHANDLER, 2009). Além disso, o tratamento endodôntico convencional, durante o período da rizogênese, tem sido um desafio para o clínico, pois dentes imaturos

possuem alto risco de fratura antes e após o tratamento endodôntico e há dificuldade de se obter um selamento apical adequado (CVEK, 1992; RAFTER, 2005; NÖR, 2006; DESAI e CHANDLER, 2009). Outro fator importante a considerar é o fato da formação radicular incompleta levar a uma proporção coroa/raiz desfavorável após o tratamento endodôntico, fragilizando toda a estrutura (RAFTER, 2005).

Portanto, a forma ideal de terapia constituiria da substituição da polpa comprometida por um novo tecido pulpar capaz de revitalizar o dente. Dessa forma, seria proporcionado, aos dentes despulpados e com rizogênese incompleta, o término do desenvolvimento radicular, tanto no sentido lateral quanto vertical. Essa polpa, por sua vez, ao produzir dentina, proporcionaria, além do fechamento dos ápices e reforço das paredes radiculares, o retorno da capacidade sensorial a esse elemento dental. Assim, o tempo de permanência desses dentes em boca seria aumentado (NÖR, 2006; CORDEIRO *et al.*, 2008).

Recentes estudos têm proposto uma terapia de revascularização pulpar baseada nos estudos em dentes traumatizados (BANCHS e TROPE, 2004; TROPE, 2010; LOVELACE *et al.*, 2011). Essa nova abordagem tem se mostrado promissora, entretanto, os resultados clínicos ainda não são conclusivos, tanto pelo pouco tempo de acompanhamento dos casos (MILLER *et al.*, 2012) quanto pela heterogenicidade dos resultados clínicos obtidos (CHEN *et al.*, 2012). Avaliações histológicas do tecido formado mostraram a presença de um tecido mineralizado semelhante ao cimento, muito diferente de um tecido pulpar saudável (WANG *et al.*, 2010; YAMAUCHI *et al.*, 2011). Essa possível calcificação pulpar inviabilizaria um tratamento convencional futuro, condenando o dente, em muitos casos, a um tratamento mais invasivo.

Diante dessa perspectiva, a bioengenharia de tecido pulpar, através do uso de células-tronco de origem dentária se mostra como uma abordagem alternativa para a formação de um tecido pulpar saudável e funcional. Os resultados até o momento obtidos demonstram que apesar de ainda existir um amplo caminho a percorrer, as possibilidades de sucesso são cada vez mais promissoras (CORDEIRO *et al.*, 2008; CASAGRANDE *et al.*, 2010; HUANG *et al.*,

2010; SAKAI *et al.*, 2010; YAMAZA *et al.*, 2010; CASAGRANDE *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2011).

1.2.1 Polpa dentária

Novas terapias regenerativas são largamente inspiradas e baseadas no conhecimento do desenvolvimento embrionário. O objetivo da medicina regenerativa é criar *in vitro* os mecanismos e processos que a natureza utiliza durante a iniciação e morfogênese de um dado órgão (BLUTEAU *et al.*, 2008)

No intuito de gerar um tecido pulpar para o tratamento de dentes imaturos, é importante considerar os aspectos embriológicos e histológicos deste tecido. O desenvolvimento dentário resulta de interações seqüenciais e recíprocas entre o epitélio oral e o mesênquima adjacente derivado das células da crista neural (THESLEFF e ABERG, 1999; THESLEFF, 2003). A partir da fase do desenvolvimento dentário chamada de campânula, ocorre a histodiferenciação e a morfodiferenciação das células do epitélio interno em ameloblastos e das células da papila, próximas à membrana basal, em odontoblastos. (Fig.1) As células do epitélio interno do órgão do esmalte em desenvolvimento, em forma de pré-ameloblastos, induzem as células periféricas da papila dental, que se localizam junto à membrana basal a se tornarem colunares e se diferenciarem em pré-odontoblastos. Os pré-odontoblastos, por sua vez, iniciam a secreção de pré-dentina, completam sua diferenciação, e a dentina mineralizada parece induzir os pré-ameloblastos a se tornarem uma célula adulta capaz de secretar matriz de esmalte. A partir desse momento, a papila dental é chamada de Polpa Dental. (THESLEFF e VAAHTOKARI, 1992; KATCHBURIAN e ARANA, 1999; NOR *et al.*, 2001; TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, 2004; FOSSATI e RUSCHEL, 2005; ZHANG *et al.*, 2005).

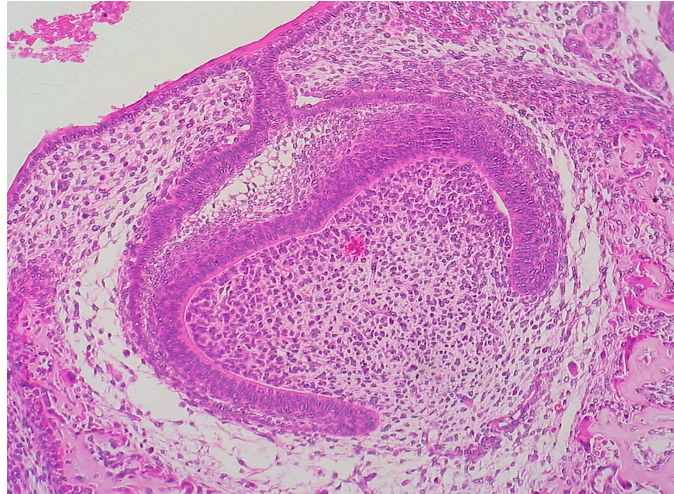


Fig.1 – Germe Dentário em Estágio de Campânula

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo que contém células de funções formadoras, nutritivas, sensoriais e de defesa responsáveis pela manutenção de sua vitalidade durante o estado de equilíbrio e de reparo, além de ser altamente vascularizada. O tipo celular que predomina no órgão pulpar é o fibroblasto, mas é possível observar a presença de outras células, tais como: odontoblastos, células sanguíneas, células de Schwann, células endoteliais e células mesenquimais indiferenciadas (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, 2004). (Fig 2)

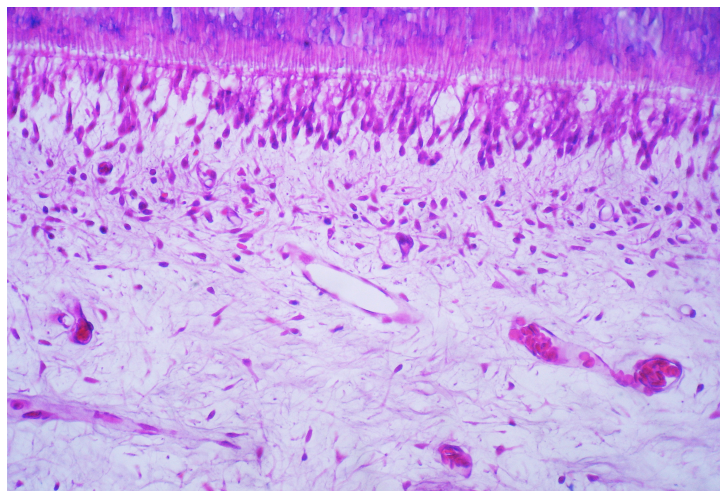


Fig. 2 – Fotomicrografia da Polpa Dental de um Dente Permanente. (HE)

Os odontoblastos são células colunares pós-mitóticas que formam uma camada em contato com a dentina. Os processos odontoblásticos são formados na sua porção distal, penetram na dentina e participam da secreção de matriz dentinária e minerais. Na diferenciação terminal dos odontoblastos, inicialmente os pré-odontoblastos se retiram do ciclo celular. Durante a última divisão, o eixo mitótico situa-se perpendicularmente a junção epitélio-mesenquima, a membrana basal. Após, a célula filha, em contato com a membrana basal se alonga e polariza. O núcleo toma uma posição basal excêntrica e cisternas de retículo endoplasmático rugoso se desenvolvem, se achatam e se tornam paralelas ao longo eixo das células. Por último, essas células começam a sintetizar pré-dentina e depois componentes da dentina incluindo colágenos de vários tipos. Odontoblastos funcionais também secretam proteoglicanas como decorina e bi-glican e proteínas não colágenas incluindo a Sialoproteína Óssea (BSP), Sialoproteína Dentinária (DSP), Osteocalcina Fosforina, Osteopontina, Osteonectina e Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP)(RUCH *et al.*, 1995; BLUTEAU *et al.*, 2008).

1.2.2 A vascularização pulpar

O arranjo dos vasos sanguíneos na polpa dentária se assemelha muita ao do sistema nervoso. Arteriolas e vênulas entram na polpa dentária via forames apicais e canais laterais. Eles correm longitudinalmente através dos canais radiculares de onde enviam ramificações para a periferia. No canal radicular os vasos se dividem e se estreitam se ramificando intensamente quando alcançam a polpa coronária. Uma trama de vasos abaixo dos odontoblastos forma o plexo subodontoblástico. Os capilares estão presentes tanto dentro quanto abaixo da camada dos odontoblastos e também entre os odontoblastos e a pré-dentina (GILBERT, 2000).

Localizados na periferia desses vasos, a intervalos irregulares, surgem os pericitos- ou células de Rouget- cujo citoplasma envolve parcialmente a parede capilar. Sugere-se que as células-tronco mesenquimais, tanto da medula óssea

quanto da polpa dentária estejam associadas a microvasculatura dos tecidos de origem, principalmente junto às células perivasculares (SHI e GRONTHOS, 2003).

Recentemente, foi demonstrado que a BMP-2 controla não só a diferenciação dos odontoblastos (CASAGRANDE *et al.*, 2010), mas também da formação do leito vascular na polpa e dos pericitos associados aos vasos. Esse controle demonstrou ser realizado através da produção de VEGFa pelos odontoblastos (YANG *et al.*, 2012)

2. Formação de Vasos Sanguíneos: Vasculogênese e Angiogênese

A formação dos vasos sanguíneos está intimamente conectada a formação de células sanguíneas. De fato, células e vasos sanguíneos compartilham um precursor comum, o hemangioblasto. Além disso, a primeira célula sanguínea e a primeira célula capilar compartilham muitas de suas proteínas de superfície. Os hemangioblastos são derivados a partir de células mesodérmicas que são expostas a concentrações relativamente altas de proteínas ósseas morfogenéticas no início do desenvolvimento. Eles dão origem ao angioblasto, os precursores das células endoteliais e às células-tronco pluripotentes hematopoiéticas que geram as células sanguíneas e os linfócitos. (RISAU e FLAMME, 1995; GILBERT, 2000) (Fig. 3)

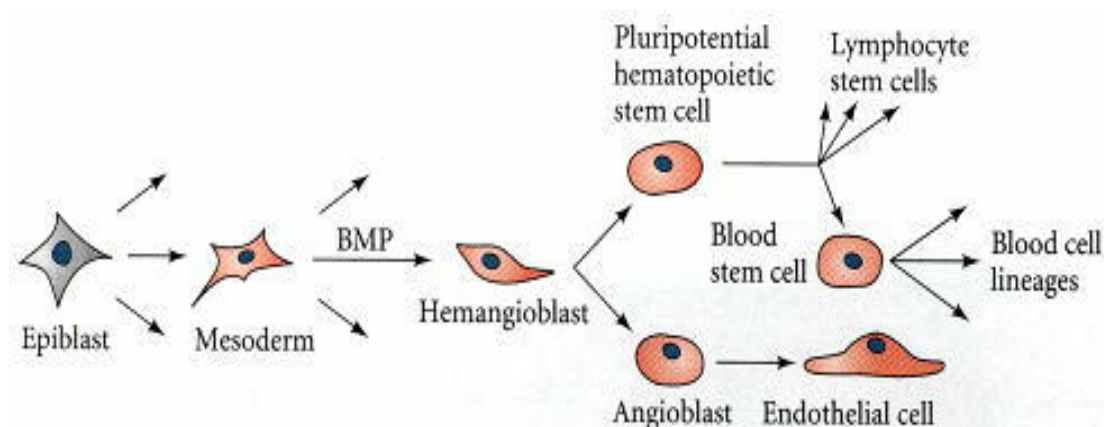


Fig.3 – Vasculogênese (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>)

Os vasos sanguíneos são formados por dois processos: Vasculogênese e Angiogênese. Durante a vasculogênese, os vasos sanguíneos são criados a partir

da placa lateral do mesoderma. A vasculogênese inicia quando o embrião atinge um tamanho em que a difusão simples não é mais suficiente para a nutrição. Durante a terceira semana de desenvolvimento, o embrião é transformado de um organismo avascular para um organismo em que praticamente todos os tecidos estão povoados por vasos sanguíneos(POLVERINI, 1995).

Na primeira fase da vasculogênese, grupos de células mesodérmicas são direcionadas a tornarem-se hemangioblastos, os precursores das células sanguíneas e dos vasos. (SHALABY *et al.*, 1997). Essas células condensam em agregados que são chamados ilhotas sanguíneas. As células mais internas dessas ilhotas tornam-se células tronco hematopoiéticas (as precursoras de todas as células do sangue), enquanto as células externas se tornam angioblastos, os precursores dos vasos sanguíneos. Na segunda fase da vasculogênese, os angioblastos se multiplicam e se diferenciam em células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Na terceira fase, as células endoteliais formam tubos e se conectam para formar o plexo capilar primário(POLVERINI, 1995; RISAU e FLAMME, 1995; GILBERT, 2000) (Fig.4)

Há uma importante diferença entre o desenvolvimento vascular intra e extraembrionário. A diferenciação fora do embrião ocorre concomitantemente e em associação com os precursores hematopoiéticos nas ilhotas sanguíneas. Já dentro do embrião, as células endoteliais se diferenciam a partir do mesoderma como angioblastos solitários sem a diferenciação concomitante das células hematopoiéticas, com exceção de uma pequena área da aorta. Assim, os angioblastos migram e se fusionam com outros angioblastos e capilares ou formam um vaso no local. As células hematopoiéticas derivadas tanto do saco vitelínico quanto dos agrupamentos paraorticos irão, então, povoar os vasos sanguíneos (POLVERINI, 1995; RISAU e FLAMME, 1995)

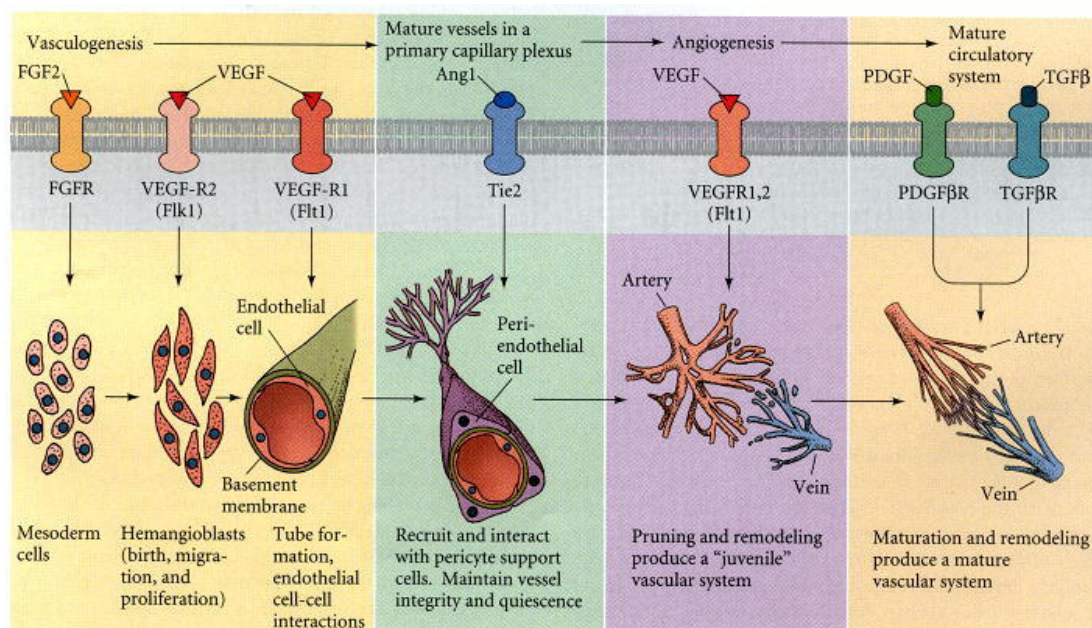
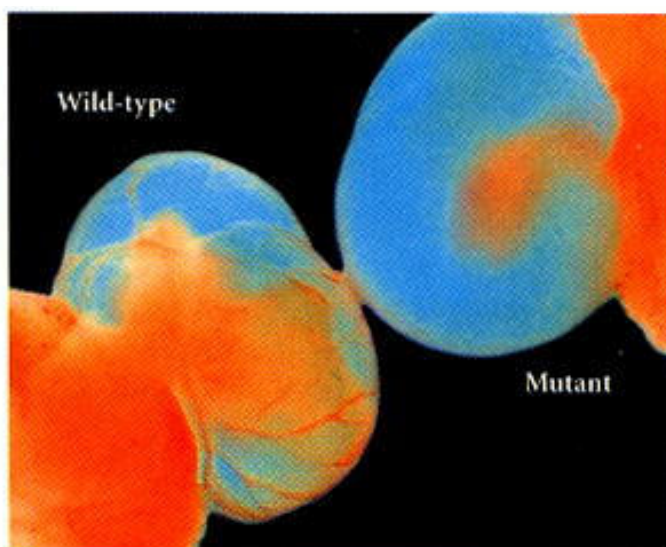


Fig 4 - Principais fatores envolvidos na vasculogênese e angiogênese.. (RISAU, 1997; GILBERT, 2000). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>

Três fatores de crescimento parecem ser responsáveis por iniciar a vasculogênese. Um deles, o FGF-2, ou fator de crescimento de fibroblasto básico, é necessário para a geração de hemangioblastos a partir do mesoderma esplênico. (FLAMME e RISAU, 1992)

A segunda proteína envolvida na vasculogênese é o VEGF. Ele parece permitir a diferenciação do angioblasto e sua multiplicação pra formar tubos endoteliais. VEGF é secretado pelas células mesenquimais próximas às ilhotas sanguíneas. Os hemangioblastos e angioblastos possuem receptores para este fator (MILLAUER *et al.*, 1993)

Se embriões de camundongos não possuem os genes que codificam o VEGF ou o seu principal receptor (VEGFR-2/ flk-1), as ilhotas sanguíneas do saco vitelínico não aparecem e a vasculogênese não se estabelece.(CARMELIET *et al.*, 1996; FERRARA *et al.*, 1996). (Fig.5)



Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>
 Fig. 5 - Sacos vitelínicos de um embrião de camundongo *wild-type* e um camundongo heterozigoto com uma mutação que ocasiona a perda da função do VEGF. O embrião heterozigoto não possui vasos sanguíneos no seu saco vitelínico. (GILBERT, 2000)

Camundongos que não possuem genes que codificam o segundo receptor para VEGF (*flt1* ou VEGFR-1) possuem células endoteliais diferenciadas e ilhotas sanguíneas mas essas células não se organizam em vasos sanguíneos (KEARNEY *et al.*, 2004) Além disso, a redução na expressão de VEGFR-1 levou a uma neovascularização reduzida, pois camundongos VEGFR-1 +/- exibiram significativamente menos células CD-31 positivas em tecidos isquêmicos do que camundongos não mutados (*wild-type*). (NISHI *et al.*, 2008)

Uma terceira proteína, a Angiopietina-1 (Ang1) media a interação entre as células endoteliais e os pericitos – células semelhantes a células musculares que recobrem as células endoteliais. Mutações, tanto na angiopietina como em seu receptor, levam à vasos sanguíneos mal formados com deficiência nas células que os recobrem (GILBERT, 2000).

Após a fase inicial da vasculogênese, a rede capilar primária é remodelada. Esse processo é chamado Angiogênese. Primeiro, o VEGF causa um afrouxamento dos contatos celulares e uma degradação da matriz extracelular

em certos pontos. As células endoteliais expostas proliferam e se ramificam formando novos vasos. O afrouxamento dos contatos celulares pode também permitir a fusão de capilares, formando vasos de maior calibre. Finalmente, a rede capilar madura se forma e é estabilizada pelo TGF- β (que fortifica a matriz extracelular) e o PDGF que é necessário para o recrutamento dos pericitos que contribuem para a flexibilidade mecânica da parede capilar (GILBERT, 2000).

Células progenitoras endoteliais podem se diferenciar em células endoteliais maduras e substituir células endoteliais danificadas ou em senescência no intuito de reestabelecer a integridade do endotélio. Além disso, células endoteliais progenitoras podem contribuir para a vasculogênese pós-natal já que foi demonstrado que elas podem ser recrutadas para locais de neovascularização. A mobilização e o recrutamento dessas células endoteliais derivadas da medula óssea para locais de vasculogênese envolve mecanismos similares àqueles associados com a angiogênese (fatores de crescimento, metaloproteinases, moléculas de adesão e citocinas). Contudo, permanece incerto em que medida e sob quais condições precisas as células endoteliais progenitoras contribuem para o crescimento vascular. Além de células endoteliais progenitoras derivadas da medula, células progenitoras multipotentes adultas, também derivadas da medula óssea, com potencial angioblástico, células-tronco de tecidos específicos, um subconjunto de células endoteliais circulantes e células endoteliais formadoras de colônia de alto potencial proliferativo, podem possuir um papel vasculogênico semelhante (FÉLETOU, 2011).

2.1 Os receptores para o VEGF

O VEGF se liga a dois receptores tirosino-quinase (RTK), VEGFR-1 e VEGFR-2. Ambos possuem sete domínios semelhantes a imunoglobulina no domínio extracelular, uma única região transmembrana e a mesma sequência tirosino-quinase que é interrompida por um domínio de inserção quinase. VEGFR-3 é um membro da mesma família de receptores, mas não é um receptor para VEGFA, e sim para VEGFC e VEGFD. Além desses receptores, o VEGF

interage com uma família de co-receptores, as neuropilinas (FERRARA *et al.*, 2003). Embora o VEGFR-1 tenha sido o primeiro RTK a ser identificado como receptor para VEGF, a função precisa dessa molécula ainda gera questionamentos. As evidências apontam que esses conflitos pode ser, ao menos em parte, devido ao fato de que a sinalização e propriedades do VEGFR-1 podem ser diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento e do tipo celular. O VEGFR-1 se liga tanto ao VEGF quanto ao PLGF. Além disso, uma forma solúvel desse receptor atua como inibidor da atividade do VEGF (FERRARA *et al.*, 2003).

A afinidade de ligação do VEGFR-1 com o VEGF é muito maior daquela com o VEGFR-2, enquanto que a atividade quinase é dez vezes menor daquela quando ligada ao VEGFR-2. Essa característica peculiar desse receptor sugere que ele atue como um regulador negativo, ao sequestrar o VEGF através de seu domínio de ligação e um regulador positivo através da sua atividade quinase. A atividade quinase do VEGFR-1 transduz sinais incluindo migração celular e moderada síntese de DNA em adultos. A ativação das rotas de sinalização MAPK, PI3k e Akt também ocorre pela estimulação do VEGFR-1. (SHIBUYA, 2006).

Estudos de Fong e colaboradores (FONG *et al.*, 1995; FONG *et al.*, 1996; FONG *et al.*, 1999) demonstraram que camundongos Flt-1 *-/-* morriam no útero entre o oitavo e nono dia. As células endoteliais se formavam, porém não se organizavam em vasos. A excessiva proliferação de angioblastos foi responsável pela letalidade (FONG *et al.*, 1999), indicando que ao menos durante o início do desenvolvimento o VEGFR-1 é um regulador negativo do VEGF. Além disso, já foi demonstrado o papel do VEGFR-1 na hematopoiese e no recrutamento de progenitores endoteliais através da sinalização pelo PLGF (HATTORI *et al.*, 2002)

O VEGFR-2 possui papel chave na angiogênese embrionária e na hematopoiese. Estudos mostram ausência de vasculogênese, falha no desenvolvimento de ilhotas sanguíneas e de vasos sanguíneos em camundongos FLK-1 *-/-*, o que leva a morte do embrião nos primeiros dias do desenvolvimento (SHALABY *et al.*, 1997). Esse receptor é considerado o principal mediador dos efeitos angiogênicos, mitogênicos e de aumento de permeabilidade do VEGF (FERRARA *et al.*, 2003). Além disso, está presente nas células endoteliais

que compõem a polpa de dentes decíduos e permanentes (GRANDO MATTUELLA *et al.*, 2007a; GRANDO MATTUELLA *et al.*, 2007b)

Em relação às Neuropilinas, já foi proposto que a Neuropilina 1 apresenta o VEGF para o VEGFR-2 de forma a aumentar a sua efetividade em transduzir o sinal. Entretanto, não há evidências de um sinal após a sua ligação com o VEGF. Porém, o papel da NP-1 no desenvolvimento vascular foi demonstrado em camundondos NP-1 *-/-* que morreram ainda no útero (KAWASAKI *et al.*, 1999; FERRARA *et al.*, 2003).

3. Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais em Células Endoteliais

É indiscutível que tecidos formados a partir de bioengenharia devem ter uma rede vascular que garanta adequado suprimento de nutrientes, trocas gasosas e eliminação de resíduos do metabolismo celular (LIN e MELERO-MARTIN, 2012). Dessa forma, é uma grande vantagem que as células utilizadas para a regeneração do tecido, sejam também capazes de se diferenciarem em células endoteliais, formarem vasos e se ligarem com os já existentes. Esse processo faria com que uma rede vascular seja formada junto e continuamente com o tecido de interesse, levando gradativamente e de acordo com as necessidades, o suporte sanguíneo necessário. (BREY *et al.*, 2005; VAN GASTEL *et al.*, 2012)

Dentro desse propósito, alguns estudos já demonstraram que células-tronco mesenquimais são capazes de se diferenciarem em células endoteliais e formarem vasos através do estímulo com diferentes fatores de crescimento angiogênicos, sozinhos ou associados, dependendo do tipo de célula-tronco utilizado. (MIRANVILLE *et al.*, 2004; OSWALD *et al.*, 2004; GANG *et al.*, 2006; ALVIANO *et al.*, 2007; D'AQUINO *et al.*, 2007; IOHARA *et al.*, 2008; KONIG *et al.*, 2012). (Quadro 1) Dessa forma, elas tornam-se, cada vez mais, o tipo celular favorável para a bioengenharia de tecidos.

Em relação ao uso das SHED (*stem cell from exfoliated deciduous teeth*) para a formação de vasos sanguíneos, dois estudos demonstraram sua capacidade de diferenciação em células endoteliais, tanto *in vivo* como *in vitro*

Além disso, também demonstraram que elas podem formar vasos sanguíneos capazes de se unirem ao sistema vascular do hospedeiro (CORDEIRO *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2010).

O primeiro trabalho que demonstrou a diferenciação endotelial das células-tronco de dentes decíduos esfoliados, verificou que SHED geneticamente modificadas pelo gene LacZ foram capazes de se diferenciarem em células endoteliais quando implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos em um scaffold composto de fatia dental e PLLA. Após 28 dias, as células endoteliais, que constituíam os vasos sanguíneos do tecido pulpar formado dentro das fatias dentais, foram marcados por B-galactocidase, confirmando que elas tinham se diferenciado a partir das SHED. Além disso, foram visualizadas células sanguíneas no interior desses vasos. Dessa forma, demonstravam que esses vasos eram funcionais e capazes de se unirem a vasculatura do hospedeiro (CORDEIRO *et al.*, 2008).

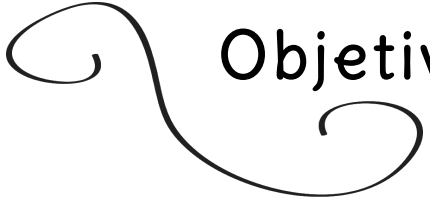
Posteriormente, foi demonstrado que as SHED foram capazes de se diferenciarem em células endoteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nesse estudo, verificou-se que os fatores provenientes da matriz dentinária, principalmente o VEGF, eram necessários para a diferenciação das SHED. Também foi demonstrado que o VEGF foi capaz de ativar as rotas de sinalização AKT e MAPK e de inativar STAT-3, além da presença de dois receptores (VEGFR-1 e NP-1) para esse fator de crescimento (SAKAI *et al.*, 2010).

Portanto, baseado nos estudos prévios e na possibilidade de diferenciação das SHED em células endoteliais, buscou-se explorar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo de diferenciação. Os resultados obtidos poderão, quando reunidos com demais estudos, contribuir para que seja viável o desenvolvimento de uma polpa saudável e adequadamente vascularizada para o tratamento de dentes permanentes jovens com rizogênese incompleta.

Quadro 1 : Estudos de Diferenciação Endotelial a partir de Células-Tronco Mesenquimais

Referência	Célula	Meio Indutor	Marcadores Avaliados
(MIRANVILLE <i>et al.</i> , 2004)	Células-tronco adiposo derivadas. CD34+/CD31-	Endothelial Cell growth media + VEGF IGF	<ul style="list-style-type: none"> • CD31 • vWF
(OSWALD <i>et al.</i> , 2004)	<i>Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell</i> (MSCs)	DMEM + 2% FCS + 50ng/ml VEGF * Não expressavam receptores de VEGF prévios ao estímulo	<ul style="list-style-type: none"> • Capillary formation (in vitro angiogenesis kit) • VEGFR-1 • VEGFR-2 • VE-CADHERIN • VCAM
(GANG <i>et al.</i> , 2006)	<i>Human Umbilical cord blood – derived MSC</i> (UCB)	DMEM + 5% FBS + 100ng/ml VEGF 50ng/ml EGF 1µg/ml hidrocortisona	<ul style="list-style-type: none"> • In vitro angiogenesis assay (Angiogenesis assay kit) • Cellular uptake assay of LDL (low protein cytokines) • Flk-1, Flt-1, VE-Cadherin, vWF, VCAM-1, Tie-1 and Tie-2, • Secretion of a specific set of cytokines.
(D'AQUINO <i>et al.</i> , 2007)	Stromal stem cells from human dental pulp (SBP-DPSCs)	MegaCell + 10% FBS + ácido ascórbico + L-glutamina (células indiferenciadas) α -MEM + 20% FBS (células diferenciadas)	<ul style="list-style-type: none"> • CD-31 • vWf • ACE – Angiotensin-converting enzyme • Alterações morfológicas (alongadas e dispostas de forma paralela)
(ALVIANO <i>et al.</i> , 2007)	<i>Amniotic Membrane-human Mesenchymal Stromal Cells</i> (AM-hMSCs)	DMEM + 2%FBS + 50ng/ml VEGF <u>Expressa</u> : VEGFR-1 e VEGFR-2	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da expressão de VEGFR-1, VEGFR-2, ICAM • CD34 e vWF • Matrigel Assay
(IOHARA <i>et al.</i> , 2008)	CD31- / CD 146 - <i>Pulp cells from porcine tooth germs</i>	EGM-2 Expressa: VEGFR-2 e CD34	<ul style="list-style-type: none"> • CD31 • VE-cadherin • vWF • Dil Acetylated -LDL

(KONIG <i>et al.</i> , 2012)	<i>Mesenchymal stromal cells derived from human amnion (hAMSC)</i>	EGM-2 +/- 50ng/ml -100ng/ml VEGF	<ul style="list-style-type: none">• Modificou morfologia da célula• Recaptação de LDL• Networks in Matrigel• NÃO expressou VE cadherin e vWF• Os autores consideraram que não houve diferenciação em células endoteliais maduras.
------------------------------	--	----------------------------------	---



Objetivo

Objetivo Geral:

- I. Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação das SHED em células endoteliais

Objetivos Específicos:

1. Desenvolver um método para a diferenciação das SHED em células endoteliais em cultura de monocamada
2. Estudar o efeito desse método na fosforilação das seguintes vias de sinalização Erk, AKT e STAT3 em SHED
3. Verificar a interrelação entre as vias de sinalização Erk, AKT e STAT3 no processo de diferenciação endotelial das SHED
4. Verificar o papel das vias de sinalização Erk, AKT e STAT3 na diferenciação endotelial das SHED através de meios químicos (inibidores) e genéticos (shRNA)
5. Verificar o papel do VEGFR-1 na diferenciação endotelial das SHED *in vivo*.

Artigo

(Em processo de avaliação pelo Journal of Dental Research)

MEK1/ERK signaling is required for endothelial differentiation of SHED

L.W. Bento^{1,2}, Z. Zhang¹, A. ImaI¹, F. Nör¹, Z. Dong¹, S. Shi³, F.B. Araujo², J.E. Nör^{1,4,5}

¹Angiogenesis Research Laboratory, Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, 48109-1078, USA; ²Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; ³Center for Craniofacial Molecular Biology, School of Dentistry, University of Southern California; Los Angeles, CA, USA; ⁴Department of Otolaryngology, University of Michigan School of Medicine; ⁵Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering.

Abstract: 175 words

Manuscript: 2,712 words

Figures: 4 figures

Supplemental information: 1 Figure

References: 25 references

Running title: Endothelial differentiation of dental pulp stem cells

Keywords: Angiogenesis; Tissue Engineering; Stemness; Endodontics; Dental pulp stem cells

Corresponding author:

Jacques E. Nör DDS, MS, PhD

Professor of Dentistry, Otolaryngology,

Biomedical Engineering

University of Michigan

1011 N. University Rm. 2309

Ann Arbor, MI, 48109-1078

United States

Telephone: (734) 936-9300

E-mail: jenor@umich.edu

ABSTRACT

The discovery that dental pulp stem cells are capable of differentiating into endothelial cells raises the possibility that these cells can be a single source of odontoblasts and vascular networks in dental tissue engineering. The purpose of this study was to begin to define signaling pathways that regulate endothelial differentiation of SHED. Stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) exposed to endothelial growth medium (EGM-2MV) supplemented with vascular endothelial growth factor (VEGF) differentiated into VEGFR2-positive and CD31-positive endothelial cells *in vitro*. *In vivo*, VEGFR1-silenced SHED seeded in tooth slice/scaffolds and transplanted into immunodeficient mice showed a reduction in human CD31-positive blood vessels as compared to controls ($p=0.02$). Exposure of SHED to EGM2-MV supplemented with VEGF induced potent activation of ERK and Akt signaling, while it inhibited phosphorylation of STAT3. Notably, genetic (MEK1 silencing) or chemical (U0126) inhibition of ERK signaling restored constitutive STAT3 phosphorylation and inhibited the differentiation of SHED into endothelial cells. Collectively, these data unveiled the VEGF/MEK1/ERK signaling pathway as a key regulator of the endothelial differentiation of dental pulp stem cells.

INTRODUCTION

Dental pulp tissue engineering is emerging as a potential treatment alternative for necrotic immature permanent teeth. Engineering of a dental pulp requires the generation of a complex tissue, composed of odontoblasts, sensory cells, supportive fibroblasts and a functional vascular network. Stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) are capable to differentiating into functional odontoblasts that secrete mineralizable dentin matrices (Casagrande et al., 2010; Sakai et al., 2010). Dental pulp stem cells can also differentiate into vascular endothelial cells that form functional blood vessels that anastomize with the host vasculature (Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010). Therefore, SHED are uniquely suited for dental pulp engineering, as they generate a functional dental pulp while providing a vascular network that supplies the oxygen and nutrients required for the high metabolic demands of cells that are engaged in tissue regeneration (Casagrande et al., 2011). Understanding the signaling pathways involved in the endothelial differentiation of dental pulp stem cells is critical for the optimization of methods to translate dental tissue engineering to the clinic.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent inducer of angiogenesis (Hoeben et al., 2004). Emerging evidence demonstrate that VEGF can function as an inducer of differentiation of human adipose-derived stem cells into endothelial cells (Behr et al., 2011; Cao et al., 2005). However, the effect of VEGF on the differentiation of dental pulp stem cells is unknown. We have recently shown that SHED express both vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1 and neuropilin (NP)-1 and that VEGFR1 signalling, but not NP-1, plays an important role in VEGF-induced capillary tube formation by SHED (Sakai et al., 2010). However, there is no evidence of the implication of VEGFR1 in the endothelial differentiation. VEGFR1 is widely expressed in normal and malignant tissues (Cao, 2009; Fan et al., 2005; Roy et al., 2006) and modulate the angiogenic potential of cells exposed to VEGF (Kearney et al., 2004; Zhang et al., 2010). We hypothesize, as SHED cells does not constitutively express VEGFR2, the most important receptor for VEGF signaling, that VEGFR1 is responsible for the VEGF signal that leads to differentiation of SHED into endothelial cells.

It has been shown that the MAPK pathway is critical for endothelial differentiation of bone marrow stem cells (Xu et al., 2008). Further, in adipose-derived stem cells it is the PI3K-Akt pathway that regulates endothelial differentiation (Cao et al., 2005; Zhang et al., 2011). We know that both Akt and ERK signaling are induced by VEGF in SHED (Sakai et al., 2010), but we do not know which signaling pathways are required for this process. Therefore, the overall goal of the project is to understand the signaling pathways that regulate the differentiation of SHED into endothelial cells.

MATERIALS & METHODS

Cell culture: Human Stem cells from Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) (Miura et al., 2003) were cultured in alpha-MEM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C and 5% CO₂. Endothelial differentiation was induced by culturing SHED cells with endothelial growth medium (EGM-2MV; Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 50 ng/ml rhVEGF₁₆₅ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), named differentiation medium throughout this manuscript. Endothelial differentiation was assessed *in vitro* by determining the expression of two endothelial markers (VEGFR2 and CD31) by western blot and RT-PCR. Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC; Lonza) were used as positive control. To evaluate cell morphology, SHED cells were cultured in 8-well chamber slides (Fisher, Rochester, NY, USA) in alpha-MEM or EGM2-MV medium with or without rhVEGF supplementation. Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen) was used to visualize the cytoskeleton (F-Actin; green) and nuclei were stained with DAPI (Prolong Gold; Invitrogen).

Western Blots

Protein (20-50µg) was electrophoresed in 9% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Protran; Whatman, Dassel, Germany). The following primary antibodies were used: mouse anti-human phospho-STAT3, rabbit anti-human-STAT3, rabbit anti-human phospho-Akt, rabbit anti-human

Akt, rabbit anti-human phospho-ERK1/2, mouse anti-ERK1/2; rabbit anti-beta-Actin; rabbit anti-MEK1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); rabbit anti-VEGFR1, rabbit anti-VEGFR2; rabbit anti-CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunoreactive proteins were visualized by SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). To evaluate interactions between signaling pathways, we pre-incubated cells for 1 hour with 5-30 μ M Stattic V (STAT3 inhibitor; Calbiochem, San Diego, CA, USA), 5-30 μ M LY294002 (PI3k/Akt inhibitor; A.G. Scientific, San Diego, CA, USA), or 5-30 μ M UO126 (MEK1/2 inhibitor; A.G. Scientific), before exposing to 50 ng/ml rhVEGF₁₆₅ (R&D Systems) for 30 minutes in presence of inhibitors. The role of ERK and Akt pathway in endothelial differentiation of SHED was evaluated by adding 10 μ M LY294002 or 10 μ M UO126 to EGM2-MV for up to 5 days. The role of VEGFR1 was assessed by culturing VEGFR1-stably silenced SHED (SHED-shRNA-VEGFR1) (Sakai et al., 2010) in EGM2-MV medium for up to 7 days.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen), and PCR reactions were performed with Superscript™ III Platinum Two-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Primers were the following: human VEGFR2 (sense 5'-gctgtctcagtgacaaacccat-3' and anti-sense 5'-ctccacatggattggcagagg-3'; size=373 bp); human CD31 (sense 5'-gagtcctgctgacccttctg and anti-sense 5'-acagttgaccctcagcatcc-3'; size= 416 bp); human GAPDH (sense 5'-gacccttcattgacctcaact-3' and anti-sense 5'-accaccttcttgatgtcatc-3'; size=683 bp).

Lentiviral-mediated gene silencing

Gene silencing was performed using lentiviral vectors encoding shRNA constructs, as described (Sakai et al., 2010). Briefly, 293T cells were transiently co-transfected with lentivirus packaging vector psPAX2, pMD2.G, and shRNA-C (control), shRNA-VEGFR1 or shRNA-MEK1 (Vector Core, University of Michigan) using calcium phosphate. We used supernatants containing lentiviruses to infect

SHED overnight, and then cells were selected with 1 µg/mL puromycin (InVivogen, San Diego, CA, USA) for at least 1 week. Infection efficiency was determined by fluorescence and gene silencing by Western blot.

Tooth slice/scaffold assay

To evaluate the role of VEGFR1 in the differentiation of SHED into endothelial cells *in vivo*, SHED stably transduced with shRNA-VEGFR1 (SHED-shRNA-VEGFR1) or control shRNA (SHED-shRNA-C) were seeded in a human tooth slice/scaffold, as described by (Cordeiro et al., 2008). Briefly, 1 mm-thick tooth slices were obtained from healthy human third molars. The pulp chamber of the tooth slice was filled with sieved NaCl and a PLLA/chloroform solution was gently dropped soaking the salt. After 24 hours, tooth slice/scaffolds were washed with mq water to remove the salt, and scaffolds were re-hydrated/disinfected with decreasing concentrations of ethanol (100%-70%). 6×10^5 cells were seeded in each tooth slice/scaffold that were transplanted subcutaneously into the dorsum of severe combined immunodeficient mice (CB.17 SCID; Charles River, Wilmington, MA, USA). After 28 days, specimens were retrieved and fixed with IHC Zinc Fixative (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) for 24 hours at 4°C and demineralized with Decalcifier II (Surgipath; Richmond, IL, USA) for 24 hours at room temperature. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry with rabbit anti-human CD31 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) were used to evaluate the morphology and microvessel density. Vessels were counted in five fields per tooth slice by a calibrated evaluator (ICC=0.95) in a blinded fashion. Appropriate institutional review boards at the University of Michigan approved all protocols of this study.

Statistical analyses

T-test was performed to compare the number of positive CD-31 vessels in SHED-shRNA-VEGFR1 and control using the SigmaStat 2.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Significance was determined at $p < 0.05$.

RESULTS

Time course of the differentiation of SHED into endothelial cells

To evaluate the effect of VEGF on endothelial differentiation, we exposed SHED to EGM-2MV supplemented with rhVEGF₁₆₅ and observed cells acquired mRNA (Fig. 1A) and protein (Fig. 1B) expression of endothelial markers (VEGFR2 and CD31). In contrast, SHED cultured in α -MEM with or without rhVEGF₁₆₅ did not express endothelial markers for up to 28 days (data not shown). VEGFR2 and CD31 mRNA expression was highest 1 day after exposure to the differentiation medium and then tapered off (Fig. 1A). Interestingly, VEGFR2 protein expression was observed after 7 days of treatment and lasted for 28 days, while CD31 expression was strong from day 7 through day 21 (Fig. 1B). Qualitative morphological evaluation revealed that SHED exposed to EGM-2MV containing or not VEGF became elongated, when compared to controls cultured in alpha-MEM (Fig. 1C). Collectively, these data characterizes culture conditions with EGM2-MV supplemented with rhVEGF₁₆₅ that induce the differentiation of dental pulp stem cells into endothelial cells.

VEGFR1 silencing inhibits endothelial differentiation of SHED *in vivo*

It has been previously reported that VEGFR1 is constitutively expressed in SHED (Sakai et al., 2010). We have also observed that SHED-LacZ differentiate into human blood vessels when seeded in tooth slice/scaffolds and transplanted into immunodeficient mice, as determined by the consistent presence of B-galactosidase-positive blood vessels in the resulting pulp chambers (Cordeiro et al., 2008). However, the role of VEGFR1 signaling in the endothelial differentiation of SHED *in vivo* is unknown. Here, VEGFR1-silenced SHED or SHED transduced with control lentiviral vector (shRNA-C) (Fig. 2E) were seeded into tooth slice/scaffolds and transplanted into immunodeficient mice. After 28 days, the tooth slice/scaffolds were retrieved and pulp-like tissues were observed in the pulp chambers (Fig. 2A,2B). Microvessel density was evaluated using an anti-human CD31 antibody that has low affinity for mouse blood vessels. A decrease in the density of anti-human CD31-positive cells ($p=0.02$) was observed in the pulps

generated with SHED-shRNA-VEGFR1 cells (Fig. 2C,2F) as compared to pulps generated with control SHED-shRNA-C cells (Fig. 2D,2F).

MEK1/ERK signaling is required for endothelial differentiation of SHED *in vitro*

To begin to evaluate signaling events involved in the endothelial differentiation of SHED, we exposed cells to EGM2-MV supplemented with VEGF and evaluated phosphorylation of key signaling molecules. We observed that ERK and Akt became phosphorylated within 15 minutes of exposure to the differentiation medium (Fig. 3A). This was followed by de-phosphorylation of STAT3, which is constitutively active in SHED (Fig. 3A). To evaluate a potential crosstalk between these pathways, we exposed SHED to the differentiation medium in presence of well-characterized chemical inhibitors of STAT3 (Stattic V), PI3k/Akt (LY294002), or MEK/ERK (U0126). This experiment revealed that inhibition of ERK signaling with U0126 prevented differentiation medium-induced de-phosphorylation of STAT3 (Fig. 3B). These data suggest the existence of a crosstalk between ERK and STAT3 in SHED cells exposed to the differentiation medium. Notably, while inhibition of STAT3 or PI3k/Akt pathway inhibited SHED proliferation, inhibition of MEK/ERK did not have such effect under the experimental conditions used here (Suppl. Fig 1).

To define a functional role for ERK signaling in the acquisition of an endothelial phenotype by SHED cells, we inhibited this pathway using two complementary strategies, a chemical (U0126) and a genetic (shRNA-MEK1) approach. SHED exposed to differentiation medium in presence of U0126 no longer presented an elongated shape suggestive of endothelial differentiation (Fig. 4A). Notably, induction of the endothelial cell marker (VEGFR2) by the differentiation medium was completely inhibited by treatment with the ERK inhibitor U0126 (Fig. 4C). Similar results were observed when ERK signaling was inhibited by silencing MEK1 (Fig. 4D), the upstream kinase that phosphorylates ERK. SHED stably transduced shRNA-MEK1 and exposed to differentiation medium no longer expressed VEGFR2 (Fig. 4E). In contrast, inhibition of PI3k/Akt signaling with LY294002 did

not affect SHED morphology (Fig. 4A), nor did it prevent expression of the endothelial marker VEGFR2 induced by the differentiation medium (Fig. 4B). Collectively, these results demonstrate that specific signaling through MEK1/ERK is required for the endothelial differentiation of SHED.

DISCUSSION

Identification of cell signaling pathways and, therefore, control of cell fate, is closely related to the possibility of using stem cells for therapy in the future. While the cellular events leading to the differentiation of dental pulp stem cells into endothelial cells have been partially characterized (Sakai et al., 2010), the molecular mechanisms and signaling pathways underlying the acquisition of the vasculogenic fate are not known. Such knowledge may accelerate the translation of dental pulp stem cell-based therapies to the clinic.

In a previous study, we have shown that SHED cultured in tooth slice scaffolds expressed endothelial markers suggesting their differentiation into endothelial cells (Sakai et al., 2010). We hypothesized that angiogenic factors residing in the dentin matrix (Roberts-Clark and Smith, 2000) or stromal cells (Tran-Hung et al., 2008) together with rhVEGF₁₆₅ supplementation triggered signaling pathways that were sufficient to induce the endothelial differentiation of SHED. In the present work, we explored the possibility of creating differentiation conditions sufficient to induce endothelial differentiation of SHED without the tooth slice, which would facilitate mechanistic signaling studies. We discovered that the endothelial growth medium (EGM2-MV), which contains rhEGF, Hydrocortisone, 5% Fetal Bovine Serum, rhbFGF, R3-IGF-1, ascorbic acid and 2 ng/ml rhVEGF supplemented with additional 50 ng/ml rhVEGF, three of the angiogenic growth factor found in dentin matrix, provides an inductive stimulus that allows for endothelial differentiation of SHED in monolayer culture as expression of CD-31 and VEGFR2 were detected after stimulation and a indicative change in cell morphology was detected. Notably, EGF, VEGF and bFGF are three of the five angiogenic growth factor found in dentin matrix (Roberts-Clark and Smith, 2000). VEGFR2 is considered an early marker of endothelial precursors (Yamaguchi et al., 1993) and CD-31 a marker of mature endothelial cell (Iohara et al., 2008). Both are strong indicative of endothelial differentiation of mesenchymal stem cells (Quirici et al., 2001; Xu et al., 2008). The morphology alteration is also considered, together with the molecular markers, an indicative of cell differentiation (d'Aquino et al., 2007; Kim et al., 2005; Konig et al., 2012)

Here, it was observed that VEGFR1-silenced SHED showed less angiogenic potential *in vivo* than controls, as demonstrated by the fewer CD-31 positive vessels in the bioengineered dental pulp, suggesting that VEGFR1 signaling plays an important role in endothelial differentiation of dental pulp stem cells. Since SHED cells do not express VEGFR2, the VEGFR1 appears to be responsible for the VEGF signal that leads to differentiation of SHED into endothelial cells, as demonstrated by the acquisition of endothelial markers by SHED over time. The involvement of VEGFR1 in the differentiation process is in accordance to the fact that, *in vitro*, this receptor is related to the VEGF- induced capillary tube formation by SHED (Sakai et al., 2010). Moreover, during embryonic development the loss of VEGFR1 resulted in reduced vascular branching due to decreased sprout formation and migration (Kearney et al., 2004). Additionally, decreased expression of VEGFR1 led to reduced neovascularization, as VEGFR1+/- mice exhibited significantly fewer CD31- positive cells in the ischemic tissues than wild-type (Nishi et al., 2008).

STAT3 phosphorylation is sufficient to maintain stem cells in an undifferentiated state (Matsuda et al., 1999). In contrast, unstimulated stem cells express low levels of phosphorylated ERK and AKT, while cells that are induced to undergo differentiation exhibit an increase in ERK and Akt phosphorylation (Cao et al., 2005; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2011). Here, we observed that unstimulated SHED express high levels of phosphorylated STAT3 and that exposure of these cells to the differentiation medium quickly inhibits (within 30 minutes) STAT3 activity, which is in line with the observation that STAT3 activity correlates with stemness. Surprisingly, inhibition of STAT3 phosphorylation with STATTIC V enhanced ERK, but not Akt phosphorylation, beyond what was achieved with the differentiation medium. Further, inhibition of ERK with U0126 allowed for recovery of STAT3 phosphorylation in SHED cells that were induced to differentiate. And finally, to characterize the functional relevance of ERK signaling, we inhibited ERK with U0126 or by silencing MEK1 expression and observed that SHED cells no longer differentiated into endothelial cells. These results demonstrate the existence of a bi-directional crosstalk between STAT3

and ERK signaling that plays a critical role in the regulation of dental pulp stem cell fate. Proliferation rate of SHED was evaluated in the presence of the pathway inhibitors and it was verified that inhibition of STAT-3 or Akt but not ERK resulted in reduced proliferation. This fact indicates that there is a relation between Akt and STAT-3 and that these pathway may be also associated with survival signaling.

In conclusion, this work unveiled a pathway triggered by VEGF/MEK1 signaling that results in the inverse and reciprocal regulation of STAT3 and ERK activity that results in the differentiation of primary tooth pulp stem cells into endothelial cells and the importance of VEGF signaling through VEGFR1 for this process. Such studies may offer clues into the mechanisms regulating cell differentiation during odontogenesis. In addition, the understanding of signaling pathways will be critical to exploit the differentiation potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine.

Acknowledgments: This work was funded by grant R01-DE21410 from the NIH/NIDCR (JEN) and by grant BEX 5511/09-7 from CAPES (LWB).

REFERENCES

Behr B, Tang C, Germann G, Longaker MT, Quarto N (2011). Locally applied vascular endothelial growth factor A increases the osteogenic healing capacity of human adipose-derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells* 29(2):286-296.

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332(2):370-379.

Cao Y (2009). Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal* 2(59):re1.

Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE (2010). Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 89(6):603-608.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nor SA, Nor JE (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 99(1):1-7.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S *et al.* (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 34(8):962-969.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A *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 Differ* 14(6):1162-1171.

Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW *et al.* (2005). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 24(16):2647-2653.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56(4):549-580.

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H *et al.* (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26(9):2408-2418.

Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL (2004). The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 103(12):4527-4535.

Kim SY, Park SY, Kim JM, Kim JW, Kim MY, Yang JH *et al.* (2005). Differentiation of endothelial cells from human umbilical cord blood AC133-CD14+ cells. *Ann Hematol* 84(7):417-422.

Konig J, Huppertz B, Desoye G, Parolini O, Frohlich JD, Weiss G *et al.* (2012). Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells Dev* 21(8):1309-1320.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T *et al.* (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18(15):4261-4269.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG *et al.* (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5807-5812.

Nishi J, Minamino T, Miyauchi H, Nojima A, Tateno K, Okada S *et al.* (2008). Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt. *Circ Res* 103(3):261-268.

Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115(1):186-194.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ (2000). Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 45(11):1013-1016.

Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 580(12):2879-2887.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S *et al.* (2010). SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 89(8):791-796.

Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I (2008). Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 53(1):9-13.

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z *et al.* (2008). MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med* 12(6A):2395-2406.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993). flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118(2):489-498.

Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C, McIlhenny S *et al.* (2011). Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem Cells Dev* 20(6):977-988.

Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nor JE (2010). VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ* 17(3):499-512.

FIGURES

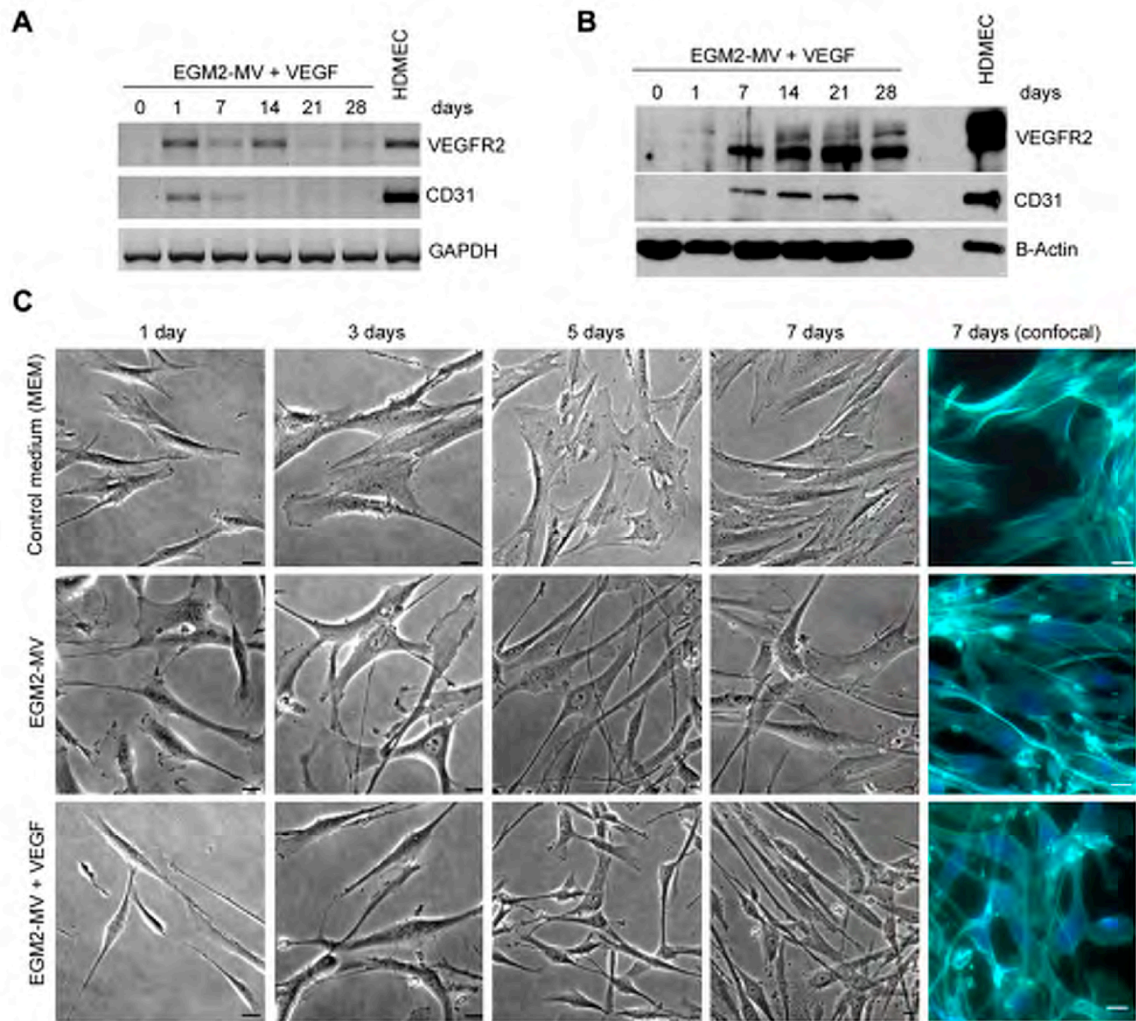


Figure 1: Time course of the differentiation of SHED into endothelial cells. **(A)** Time course of mRNA and **(B)** protein expression of endothelial cell markers VEGFR2 and CD31 upon culture of SHED cells with EGM2-MV + 50 ng/ml rhVEGF₁₆₅. **(C)** Cell morphology over time upon culture of SHED cells with basal medium (alpha-MEM), endothelial growth medium (EGM2-MV), or EGM2-MV supplemented with 50 ng/ml rhVEGF₁₆₅ (bar=20μm).

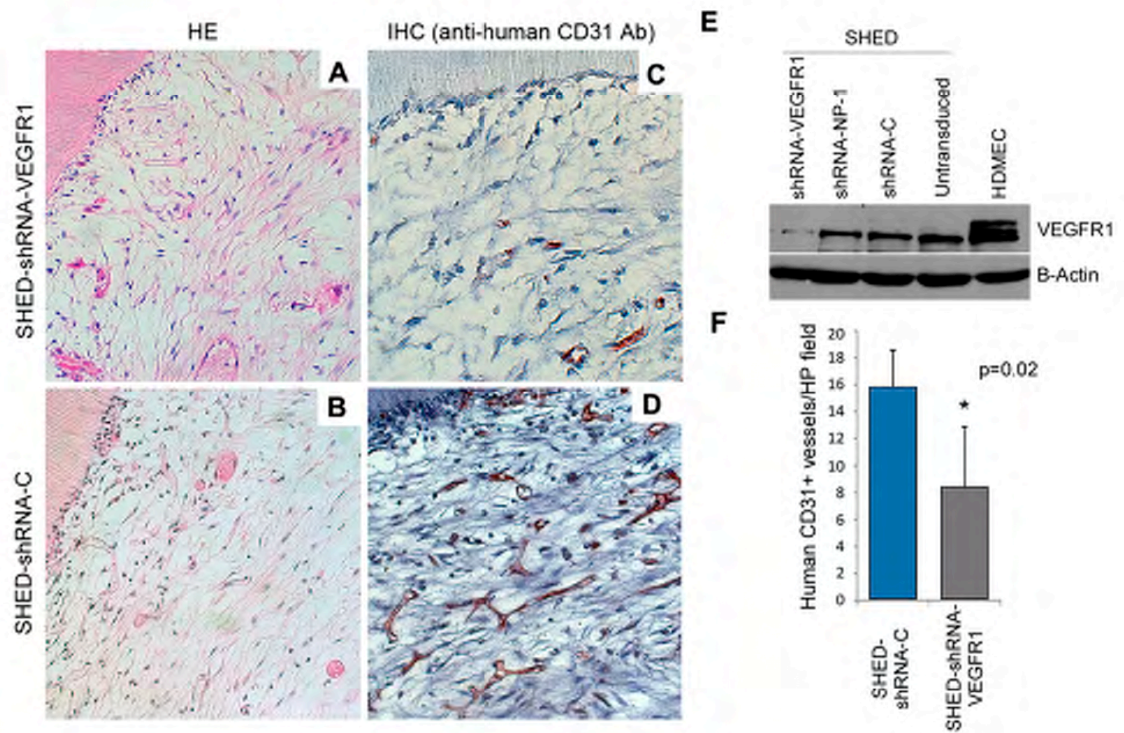


Figure 2: VEGFR1 silencing inhibits endothelial differentiation of SHED *in vivo*. **(A and C)** Tooth slice/scaffolds seeded with VEGFR1-silenced SHED (SHED-shRNA-VEGFR1) and **(B and D)** vector control SHED (SHED-shRNA-C) were transplanted into the subcutaneous space of immunodeficient mice. After 28 days, tooth slice/scaffolds were retrieved, fixed, and analyzed by hematoxylin-eosin staining immunohistochemistry with anti-human CD31. **(E)** Western blot to evaluate the effectiveness of VEGFR1 knockdown in SHED cells. **(F)** Microvessel density analysis from 4 tooth slice/scaffolds and 5 microscopic fields/specimen (at 200x) per experimental condition.

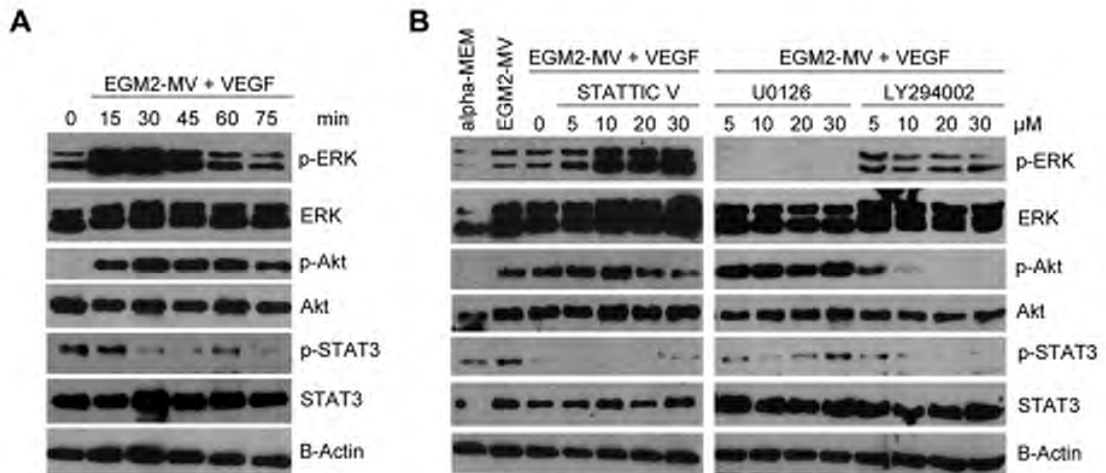


Figure 3: Activation of signaling upon exposure of SHED to differentiation medium. **(A)** Western blot depicting effect of differentiation medium (EGM-2MV + rhVEGF₁₆₅) on phosphorylated and total ERK, Akt and STAT3. **(B)** Western Blot showing the effect of inhibitors for ERK (U0126), Akt (LY294002) or STAT3 (Stattic V) on signaling induced by the differentiation medium.

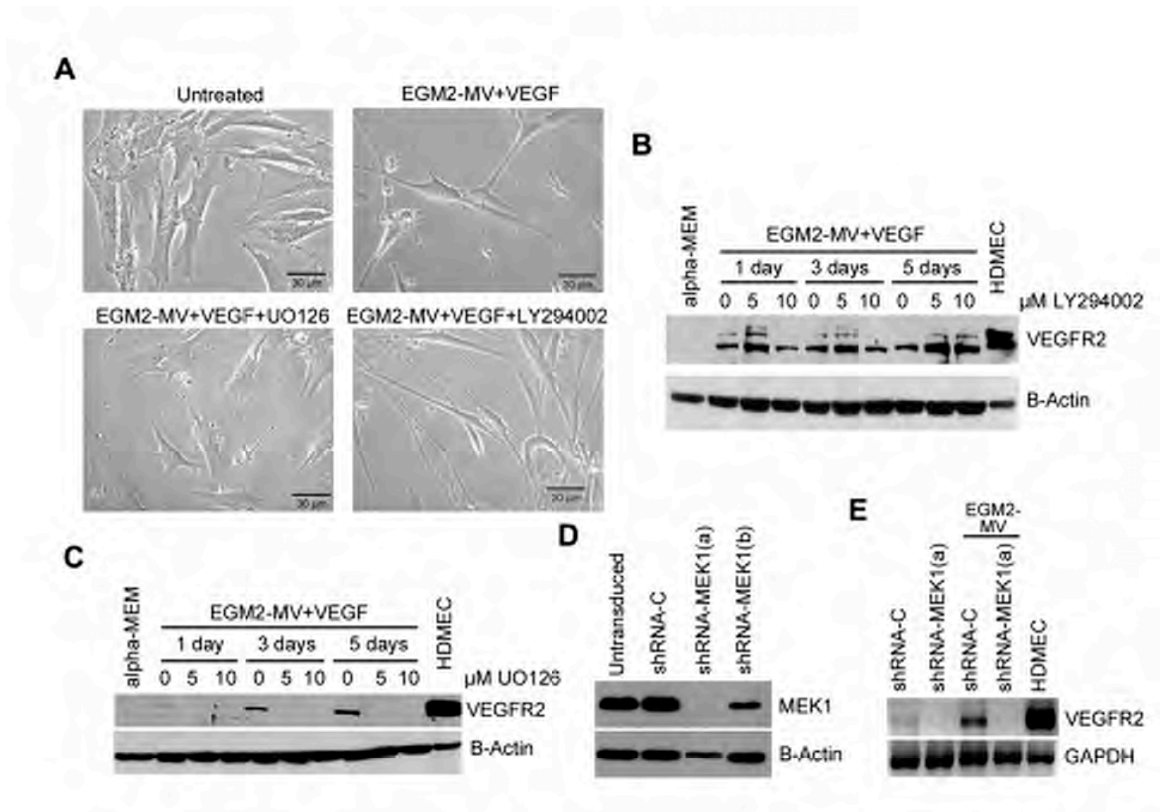


Figure 4: MEK1/ERK signaling is required for endothelial differentiation of SHED *in vitro*. **(A)** Qualitative analysis of the morphology of SHED cells treated with differentiation medium in presence of U0126 or LY294002. **(B)** Western blot showing the effect of Akt inhibition with LY294002 or **(C)** the effect of ERK inhibition with U0126 on endothelial cell differentiation of SHED, as determined by VEGFR2 expression. **(D)** Effect of two different shRNA-MEK1 sequences (a,b) on silencing of MEK1 in SHED cells. **(E)** Effect of MEK1 silencing on endothelial cell differentiation of SHED, as determined by VEGFR2 expression.

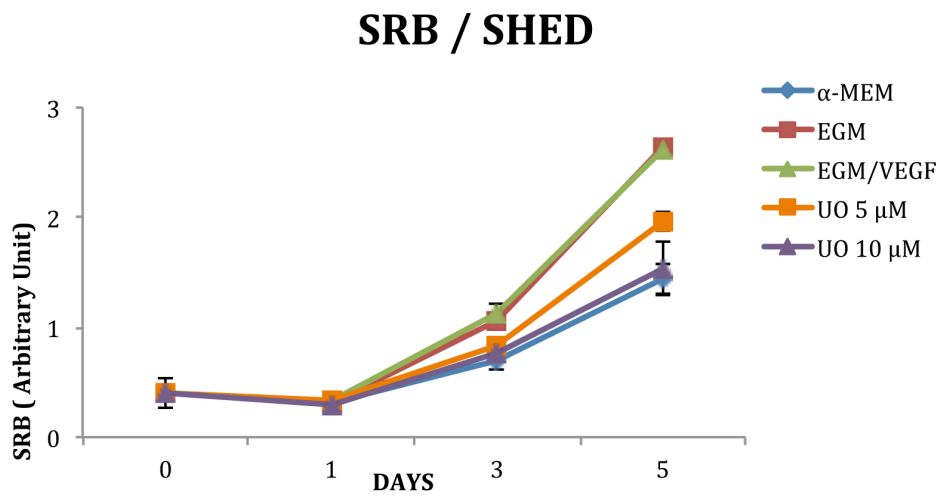
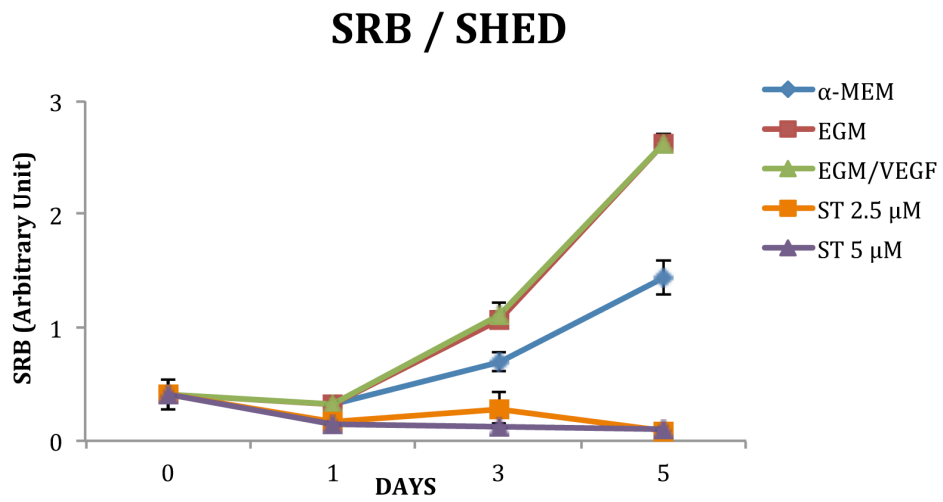
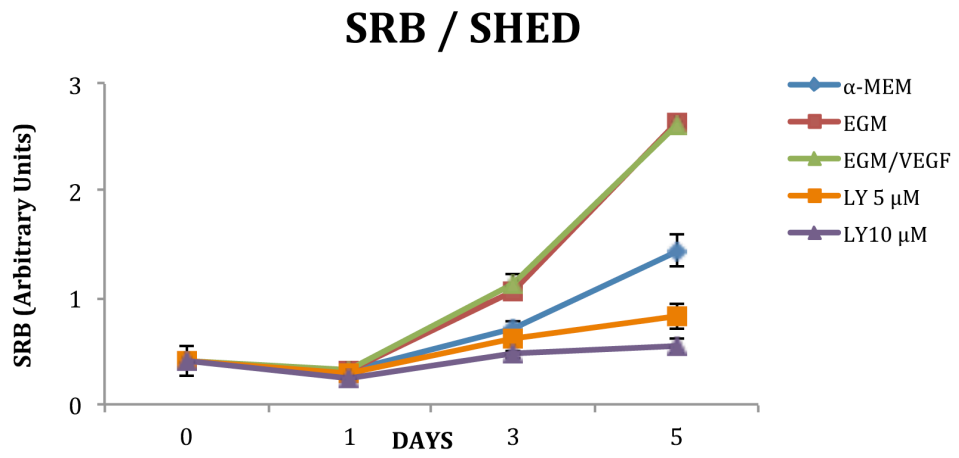
SUPPLEMENTAL MATERIALS & METHODS

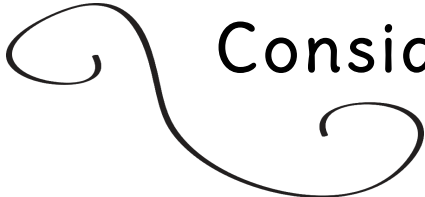
To evaluate the toxicity of chemical inhibitors, we plated 2×10^3 SHED/well (96 well-plate) and exposed cells to the following conditions (6 wells per condition): alpha-MEM; EGM-2MV; EGM- 2MV + 50 ng/ml rhVEGF165; EGM-2MV + 50 ng/ml rhVEGF165 + 5-10 μ M LY2940002; EGM-2MV + 50 ng/ml rhVEGF165 + 5-10 μ M UO126; or EGM-2MV + 50 ng/ml rhVEGF + 2.5-5 μ M Stattic V. After 0-5 days, cells were fixed with 10% of trichloroacetic acid solution for 1 hour at 40C and stained with 0.4% Sulforhodamine B solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 minutes at room temperature. Cells were washed (1% acetic acid), dried, and plates were read in a microplate reader (Genios; Tecan, Männedorf, Switzerland) at 565 nm.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1 LEGEND:

Supplemental Figure 1. Effect of the inhibitors of ERK, Akt, or STAT3 on proliferation of SHED. Cells were exposed to inhibitors for ERK (UO126), Akt (LY294002) or STAT3 (Stattic V) for 0-5 days. The effect of these inhibitors on cell number was evaluated by the sulforhodamine B (SRB) assay.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1





Considerações Finais

“Discoveries raise more questions than answers”

A descoberta de um nicho de células-tronco nos tecidos dentais proporcionou à Odontologia uma nova perspectiva terapêutica baseada na reconstrução de tecidos lesados, perdidos (GRONTHOS *et al.*, 2000) ou até mesmo a criação de um dente completo (ZHANG *et al.*, 2005).

Recentes pesquisas mostraram que as células-tronco derivadas da polpa dental são capazes de formar um tecido pulpar muito semelhante à polpa dentária, com odontoblastos funcionais capazes de produzir dentina (CORDEIRO *et al.*, 2008; CASAGRANDE *et al.*, 2010; SAKAI *et al.*, 2010). A possibilidade de devolver um tecido pulpar funcional trará um importante benefício para os casos de endodontia em dentes permanentes despolpados e com rizogênese incompleta, uma vez que melhorará o prognóstico do tratamento (NÖR, 2006). Sabe-se que as consequências de traumatismos dentais podem ter um impacto significativo no nível de estresse de crianças e adolescentes (THELEN *et al.*, 2011). Além da frequência desses casos ser relativamente alta nessa faixa etária, os tratamentos propostos não possuem um prognóstico favorável. Portanto, haveria um impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes infanto-juvenis afetados. Entretanto, os processos pelos quais esse tecido pulpar é formado a partir das células-tronco ainda não estão completamente esclarecidos, o que dificulta a transposição do laboratório para a clínica de forma segura. Dentro dessa perspectiva, o presente estudo buscou identificar os aspectos moleculares envolvidos na diferenciação das SHED em células endoteliais no contexto de bioengenharia de tecido pulpar.

Verificou-se que a rota de sinalização MAPK/ERK, bem como o VEGF e seu receptor VEGFR-1, estão intimamente ligados ao processo. Não há dúvidas de

que o VEGF é o fator angiogênico mais importante no processo de diferenciação endotelial, já que apenas na sua presença as SHED se diferenciam em endotélio. Porém, este fator isoladamente não foi capaz de desencadear a diferenciação endotelial. Um resultado importante do presente estudo foi a descoberta de que o EGM2-MV, um meio de cultura para células endoteliais, foi capaz de estimular as SHED a se diferenciarem em células endoteliais em cultura de monocamada. Experimentos anteriores (CORDEIRO *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2010) verificaram que essa diferenciação ocorreu quando as células eram semeadas em *scaffolds* tridimensionais de PLLA construídos no interior de fatias dentais. Criou-se a hipótese de que o ambiente tridimensional era um fator essencial para essa diferenciação. Entretanto, a diferenciação endotelial em monocamada, sem a presença de dentina, evidenciou a importância de uma associação de fatores de crescimento angiogênicos para que a diferenciação endotelial das SHED ocorresse. No caso desse estudo, esses fatores angiogênicos foram fornecidos por um meio de cultura (EGM-2MV). Em estudos anteriores (CORDEIRO *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2010), a combinação de fatores angiogênicos foi obtida a partir da matriz dentinária das fatias dentais. (ROBERTS-CLARK e SMITH, 2000; ZHANG *et al.*, 2011).

Baseado nesse resultado, surge o questionamento a respeito de quais seriam os outros fatores que, agindo de forma sinérgica com o VEGF, desencadeariam o processo de diferenciação. Uma das possíveis hipóteses poderia estar no FGF-2. Sabe-se que esse fator de crescimento participa das fases precoces da vasculogênese, atuando na diferenciação do angioblasto. Além disso, já foi demonstrado que este fator está presente na matriz dentinária (ROBERTS-CLARK e SMITH, 2000; ZHANG *et al.*, 2011), tem ação sinérgica com o VEGF em células endoteliais (HATA *et al.*, 1999) e é um dos componentes ativos do meio indutor do presente estudo (EGM-2MV). Portanto, uma das perspectivas seria verificar o papel do FGF-2, bem como de seus receptores, no processo de diferenciação endotelial das SHED.

Outra perspectiva do estudo é verificar a função da NP-1 no processo de diferenciação endotelial, uma vez que esse é um receptor para VEGF expresso

pelas SHED (SAKAI *et al.*, 2010) e que contribui para a vasculogênese embrionária (TAKASHIMA *et al.*, 2002).

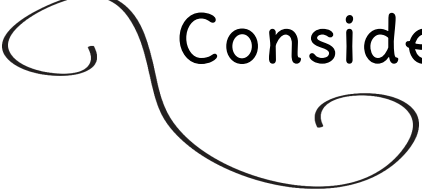
Recentemente, foi demonstrado que existe uma importante ligação entre a formação do leito vascular pulpar com o VEGF secretado pelos odontoblastos (YANG *et al.*, 2012). Essa descoberta levanta outras perspectivas no sentido de se relacionar a odontogênese com a vasculogênese pulpar. Na medida em que as vias de sinalização e as moléculas envolvidas no processo de formação de cada tecido são reveladas, é possível verificar se há uma relação de dependência entre os processos. Dessa forma, será facilitado o entendimento do mecanismo de certas alterações do desenvolvimento dentário, bem como vislumbrar novas terapias baseadas nesse conhecimento.

Além da possibilidade de utilizar as SHED para a bioengenharia de tecido pulpar, convém destacar que essas células também estão sendo exploradas pela medicina regenerativa no intuito de regenerar outros tipos de tecido (ZHENG *et al.*, 2009; CHADIPIRALLA *et al.*, 2010; VAKHRUSHEV *et al.*, 2012). Essa possibilidade surge da constatação de que as SHED possuem características favoráveis quanto a capacidade proliferativa, expressão de fatores de crescimento e por serem obtidas sem a necessidade de procedimentos invasivos, como é o caso das células-tronco mesenquimais da medula óssea (NAKAMURA *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado que as SHED apresentam alta expressão (superior a 20% das células) de CD146, um marcador relacionado à multipotência e CD105, um marcador de progenitores endoteliais. Dessa forma, os autores sugerem que as SHED são um tipo distinto de células indiferenciadas com maior capacidade de diferenciação, sendo assim mais indicadas do que as DPSC para a bioengenharia de tecidos (WANG *et al.*, 2012).

Devido a suas características favoráveis à terapia regenerativa, as SHED também estão sendo consideradas para o tratamento de doenças sistêmicas (NAKAMURA *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi avaliado os efeitos do meio condicionado dessas células no tratamento de isquemia cerebral. O meio condicionado por SHED foi administrado intranasalmente em animais com isquemia cerebral induzida e mostrou um efeito benéfico. Os resultados obtidos

mostraram que o meio condicionado por SHED é um conjugado de fatores de crescimento e que promove neurogênese e vasculogênese após a isquemia cerebral (INOUE *et al.*, 2012)

Em suma, apesar dos obstáculos que a bioengenharia de tecidos dentais precisa transpor antes de aplicar os resultados do laboratório para a prática clínica, existem muitas possibilidades promissoras e os resultados progredem de forma intensa. As pesquisas estão cada vez mais focadas na aplicação clínica, uma vez que não se pode distanciar-se do objetivo principal que é o benefício do paciente (GIANNOBILE e JOSKOW, 2012). Portanto, é indispensável que os profissionais da saúde continuem investindo no aprendizado das ciências básicas e agregando as experiências das diversas áreas. Dessa forma, será possível continuar avançando na construção dos conhecimentos necessários para a aplicação clínica de forma segura.

A decorative flourish consisting of a single continuous line that starts with a small loop on the left, curves upwards and then downwards, ending in a larger loop on the right.

Considerações Éticas

Esse projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade de Michigan. Protocolo numero : 09546



Referências

ALVIANO F, FOSSATI V, MARCHIONNI C, ARPINATI M, BONSI L, FRANCHINA M, LANZONI G, CANTONI S, CAVALLINI C, BIANCHI F, TAZZARI PL, PASQUINELLI G, FORONI L, VENTURA C, GROSSI A e BAGNARA GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. BMC Dev Biol, v.7, p.11. 2007.

ANDERSON DJ, GAGE FH e WEISSMAN IL. Can stem cells cross lineage boundaries? Nat Med, v.7, n.4, Apr, p.393-5. 2001.

BANCHS F e TROPE M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endod, v.30, n.4, Apr, p.196-200. 2004.

BERKOVITZ BKB. Anatomia, embriologia e histologia bucal. Porto Alegre: Artmed. 2004. 378 p.

BERNARDI L, LUISI SB, FERNANDES R, DALBERTO TP, VALENTIM L, BOGO CHIES JA, MEDEIROS FOSSATI AC e PRANKE P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. J Endod, v.37, n.7, Jul, p.973-9. 2011.

BLUTEAU G, LUDER HU, DE BARI C e MITSIADIS TA. Stem cells for tooth engineering. Eur Cell Mater, v.16, p.1-9. 2008.

BREY EM, URIEL S, GREISLER HP e MCINTIRE LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. Tissue Eng, v.11, n.3-4, Mar-Apr, p.567-84. 2005.

CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G, POLLEFEYT S, KIECKENS L, GERTSENSTEIN M, FAHRIG M, VANDENHOECK A, HARPAL K, EBERHARDT C, DECLERCQ C, PAWLING J, MOONS L, COLLEN D, RISAU W e NAGY A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature, v.380, n.6573, Apr 4, p.435-9. 1996.

CASAGRANDE L, CORDEIRO MM, NOR SA e NOR JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. Odontology, v.99, n.1, Jan, p.1-7. 2011.

CASAGRANDE L, DEMARCO FF, ZHANG Z, ARAUJO FB, SHI S e NOR JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. J Dent Res, v.89, n.6, Jun, p.603-8. 2010.

CHADIPIRALLA K, YOCHIM JM, BAHULEYAN B, HUANG CY, GARCIA-GODOY F, MURRAY PE e STELNICKI EJ. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. Cell Tissue Res, v.340, n.2, May, p.323-33. 2010.

CHEN MY, CHEN KL, CHEN CA, TAYEBATY F, ROSENBERG PA e LIN LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. Int Endod J, v.45, n.3, Mar, p.294-305. 2012.

CORDEIRO MM, DONG Z, KANEKO T, ZHANG Z, MIYAZAWA M, SHI S, SMITH AJ e NOR JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod, v.34, n.8, Aug, p.962-9. 2008.

COWAN CA, ATIENZA J, MELTON DA e EGGAN K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science, v.309, n.5739, Aug 26, p.1369-73. 2005.

CVEK M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. Endod Dent Traumatol, v.8, n.2, Apr, p.45-55. 1992.

D'AQUINO R, GRAZIANO A, SAMPAOLESI M, LAINO G, PIROZZI G, DE ROSA A e PAPACCIO G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ, v.14, n.6, Jun, p.1162-71. 2007.

DESAI S e CHANDLER N. The restoration of permanent immature anterior teeth, root filled using MTA: a review. J Dent, v.37, n.9, Sep, p.652-7. 2009.

FÉLETOU M. Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. In. The Endothelium San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57148/>

FERJESKOV O e KIDD E. Cárie Dentária. São Paulo: Editora Santos. 2005. 352 p.

FERRARA N, CARVER-MOORE K, CHEN H, DOWD M, LU L, O'SHEA KS, POWELL-BRAXTON L, HILLAN KJ e MOORE MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature, v.380, n.6573, Apr 4, p.439-42. 1996.

FERRARA N, GERBER HP e LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med, v.9, n.6, Jun, p.669-76. 2003.

FLAMME I e RISAU W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. Development, v.116, n.2, Oct, p.435-9. 1992.

FONG GH, KLINGENSMITH J, WOOD CR, ROSSANT J e BREITMAN ML. Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. Dev Dyn, v.207, n.1, Sep, p.1-10. 1996.

FONG GH, ROSSANT J, GERTSENSTEIN M e BREITMAN ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature, v.376, n.6535, Jul 6, p.66-70. 1995.

FONG GH, ZHANG L, BRYCE DM e PENG J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. Development, v.126, n.13, Jul, p.3015-25. 1999.

FOSSATI ACM e RUSCHEL H. Bases Biológicas In: KRAMER, P.F. Traumatismos na Dentição Decídua. São Paulo: Santos. 2005. Cap.2 311 p.

FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK e LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet, v.3, n.4, Oct, p.393-403. 1970.

FUCHS E e SEGRE JA. Stem cells: a new lease on life. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.143-55. 2000.

GANG EJ, JEONG JA, HAN S, YAN Q, JEON CJ e KIM H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy, v.8, n.3, p.215-27. 2006.

GIANNOBILE WV e JOSKOW RW. Clinical and translational oral health research: prospects for the future. J Dent Res, v.91, n.7, Jul, p.633-6. 2012.

GILBERT S. Lateral Plate Mesoderm. In. Development Biology 6th. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>

GRANDO MATTUELLA L, POLI DE FIGUEIREDO JA, NOR JE, DE ARAUJO FB e MEDEIROS FOSSATI AC. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. J Endod, v.33, n.12, Dec, p.1408-12. 2007a.

GRANDO MATTUELLA L, WESTPHALEN BENTO L, DE FIGUEIREDO JA, NOR JE, DE ARAUJO FB e FOSSATI AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. J Endod, v.33, n.5, May, p.524-30. 2007b.

GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG e SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.25, Dec 5, p.13625-30. 2000.

GRONTHOS S, MROZIK K, SHI S e BARTOLD PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Calcif Tissue Int, v.79, n.5, Nov, p.310-7. 2006.

HANDA K, SAITO M, YAMAUCHI M, KIYONO T, SATO S, TERANAKA T e SAMPATH NARAYANAN A. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. Bone, v.31, n.5, Nov, p.606-11. 2002.

HARADA H, KETTUNEN P, JUNG HS, MUSTONEN T, WANG YA e THESLEFF I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. J Cell Biol, v.147, n.1, Oct 4, p.105-20. 1999.

HATA Y, ROOK SL e AIELLO LP. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Diabetes, v.48, n.5, May, p.1145-55. 1999.

HATTORI K, HEISSIG B, WU Y, DIAS S, TEJADA R, FERRIS B, HICKLIN DJ, ZHU Z, BOHLEN P, WITTE L, HENDRIKX J, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, WERB Z, LYDEN D e RAFII S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. Nat Med, v.8, n.8, Aug, p.841-9. 2002.

HUANG GT, GRONTHOS S e SHI S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res, v.88, n.9, Sep, p.792-806. 2009.

HUANG GT, YAMAZA T, SHEA LD, DJOUAD F, KUHN NZ, TUAN RS e SHI S. 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, v.16, n.2, Feb, p.605-15. 2010.

INOUE T, SUGIYAMA M, HATTORI H, WAKITA H, WAKABAYASHI T e UEDA M. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth-derived Conditioned Medium Enhances Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. Tissue Eng Part A, Jul 28. 2012.

IOHARA K, ZHENG L, WAKE H, ITO M, NABEKURA J, WAKITA H, NAKAMURA H, INTO T, MATSUSHITA K e NAKASHIMA M. A novel stem cell source for

vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells, v.26, n.9, Sep, p.2408-18. 2008.

ISHKITIEV N, YAEGAKI K, CALENIC B, NAKAHARA T, ISHIKAWA H, MITIEV V e HAAPASALO M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. J Endod, v.36, n.3, Mar, p.469-74. 2010.

KATCHBURIAN E e ARANA V. Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999

KAWASAKI T, KITSUKAWA T, BEKKU Y, MATSUDA Y, SANBO M, YAGI T e FUJISAWA H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. Development, v.126, n.21, Nov, p.4895-902. 1999.

KEARNEY JB, KAPPAS NC, ELLERSTROM C, DIPOLA FW e BAUTCH VL. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. Blood, v.103, n.12, Jun 15, p.4527-35. 2004.

KERKIS I, KERKIS A, DOZORTSEV D, STUKART-PARSONS GC, GOMES MASSIRONI SM, PEREIRA LV, CAPLAN AI e CERRUTI HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs, v.184, n.3-4, p.105-16. 2006.

KONIG J, HUPPERTZ B, DESOYE G, PAROLINI O, FROHLICH JD, WEISS G, DOHR G, SEDLMAYR P e LANG I. Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. Stem Cells Dev, v.21, n.8, May 20, p.1309-20. 2012.

LANGER R e VACANTI JP. Tissue engineering. Science, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.

LIN RZ e MELERO-MARTIN JM. Fibroblast growth factor-2 facilitates rapid anastomosis formation between bioengineered human vascular networks and living vasculature. Methods, v.56, n.3, Mar, p.440-51. 2012.

LOVELACE TW, HENRY MA, HARGREAVES KM e DIOGENES A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. J Endod, v.37, n.2, Feb, p.133-8. 2011.

MILLAUER B, WIZIGMANN-VOOS S, SCHNURCH H, MARTINEZ R, MOLLER NP, RISAU W e ULLRICH A. High affinity VEGF binding and developmental expression

suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell, v.72, n.6, Mar 26, p.835-46. 1993.

MILLER EK, LEE JY, TAWIL PZ, TEIXEIRA FB e VANN WF, JR. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. Pediatr Dent, v.34, n.1, Jan-Feb, p.66-9. 2012.

MIRANVILLE A, HEESCHEN C, SENGENES C, CURAT CA, BUSSE R e BOULOUMIE A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. Circulation, v.110, n.3, Jul 20, p.349-55. 2004.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG e SHI S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.10, May 13, p.5807-12. 2003.

MORSCZECK C, GOTZ W, SCHIERHOLZ J, ZEILHOFER F, KUHN U, MOHL C, SIPPEL C e HOFFMANN KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol, v.24, n.2, Apr, p.155-65. 2005.

MORSCZECK C, SCHMALZ G, REICHERT TE, VOLLNER F, GALLER K e DRIEMEL O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. Clin Oral Investig, v.12, n.2, Jun, p.113-8. 2008.

NAKAMURA S, YAMADA Y, KATAGIRI W, SUGITO T, ITO K e UEDA M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod, v.35, n.11, Nov, p.1536-42. 2009.

NAKASHIMA M e AKAMINE A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. J Endod, v.31, n.10, Oct, p.711-8. 2005.

NEDEL F, ANDRE DDE A, DE OLIVEIRA IO, CORDEIRO MM, CASAGRANDE L, TARQUINIO SB, NOR JE e DEMARCO FF. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. J Contemp Dent Pract, v.10, n.4, p.90-6. 2009.

NISHI J, MINAMINO T, MIYAUCHI H, NOJIMA A, TATENO K, OKADA S, ORIMO M, MORIYA J, FONG GH, SUNAGAWA K, SHIBUYA M e KOMURO I. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt. Circ Res, v.103, n.3, Aug 1, p.261-8. 2008.

NOR JE. Tooth regeneration in operative dentistry. Oper Dent, v.31, n.6, Nov-Dec, p.633-42. 2006.

NÖR JE. Tooth regeneration in operative dentistry. Oper Dent, v.31, n.6, Nov-Dec, p.633-42. 2006.

NOR JE, PETERS MC, CHRISTENSEN JB, SUTORIK MM, LINN S, KHAN MK, ADDISON CL, MOONEY DJ e POLVERINI PJ. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. Lab Invest, v.81, n.4, Apr, p.453-63. 2001.

OSWALD J, BOXBERGER S, JORGENSEN B, FELDMANN S, EHNINGER G, BORNHAUSER M e WERNER C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells, v.22, n.3, p.377-84. 2004.

POLVERINI PJ. The pathophysiology of angiogenesis. Crit Rev Oral Biol Med, v.6, n.3, p.230-47. 1995.

PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science, v.276, n.5309, Apr 4, p.71-4. 1997.

RAFTER M. Apexification: a review. Dent Traumatol, v.21, n.1, Feb, p.1-8. 2005.

RAO MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. Stem Cells Dev, v.13, n.5, Oct, p.452-5. 2004.

REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF e WEISSMAN IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, v.414, n.6859, Nov 1, p.105-11. 2001.

RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. Nature, v.386, n.6626, Apr 17, p.671-4. 1997.

RISAU W e FLAMME I. Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol, v.11, p.73-91. 1995.

ROBERTS-CLARK DJ e SMITH AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. Arch Oral Biol, v.45, n.11, Nov, p.1013-6. 2000.

RUCH JV, LESOT H e BEGUE-KIRN C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol, v.39, n.1, Feb, p.51-68. 1995.

SAKAI VT, ZHANG Z, DONG Z, NEIVA KG, MACHADO MA, SHI S, SANTOS CF e NOR JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. J Dent Res, v.89, n.8, Aug, p.791-6. 2010.

SCADDEN DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature, v.441, n.7097, Jun 29, p.1075-9. 2006.

SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J, YOUNG M, ROBEY PG, WANG CY e SHI S. Investigation of multipotent postnatal stem cells

from human periodontal ligament. Lancet, v.364, n.9429, Jul 10-16, p.149-55. 2004.

SHALABY F, HO J, STANFORD WL, FISCHER KD, SCHUH AC, SCHWARTZ L, BERNSTEIN A e ROSSANT J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell, v.89, n.6, Jun 13, p.981-90. 1997.

SHI S e GRONTHOS S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res, v.18, n.4, Apr, p.696-704. 2003.

SHIBUYA M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. Angiogenesis, v.9, n.4, p.225-30; discussion 31. 2006.

SLAVKIN HC. Entering the era of molecular dentistry. J Am Dent Assoc, v.130, n.3, Mar, p.413-7. 1999.

SONOYAMA W, LIU Y, YAMAZA T, TUAN RS, WANG S, SHI S e HUANG GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod, v.34, n.2, Feb, p.166-71. 2008.

SUN HH, JIN T, YU Q e CHEN FM. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med, v.5, n.4, Apr, p.e1-16. 2011.

TADA M, TAKAHAMA Y, ABE K, NAKATSUJI N e TADA T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. Curr Biol, v.11, n.19, Oct 2, p.1553-8. 2001.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K e YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, v.131, n.5, Nov 30, p.861-72. 2007.

TAKAHASHI K e YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, v.126, n.4, Aug 25, p.663-76. 2006.

TAKASHIMA S, KITAKAZE M, ASAKURA M, ASANUMA H, SANADA S, TASHIRO F, NIWA H, MIYAZAKI JI J, HIROTA S, KITAMURA Y, KITSUKAWA T, FUJISAWA H, KLAGSBRUN M e HORI M. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.6, Mar 19, p.3657-62. 2002.

TEN CATE R. Histologia bucal : desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: ganabara koogan. 2001. 439 p.

THELEN DS, TROVIK TA e BARDBSEN A. Impact of traumatic dental injuries with unmet treatment need on daily life among Albanian adolescents: a case-control study. Dent Traumatol, v.27, n.2, Apr, p.88-94. 2011.

THESLEFF I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci, v.116, n.Pt 9, May 1, p.1647-8. 2003.

THESLEFF I e ABERG T. Molecular regulation of tooth development. Bone, v.25, n.1, Jul, p.123-5. 1999.

THESLEFF I e TUMMERS M. Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice. Med Princ Pract, v.12 Suppl 1, p.43-50. 2003.

THESLEFF I e VAAHTOKARI A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. Proc Finn Dent Soc, v.88 Suppl 1, p.357-68. 1992.

TROPE M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. Dent Clin North Am, v.54, n.2, Apr, p.313-24. 2010.

VAKHRUSHEV IV, ANTONOV EN, POPOVA AV, KONSTANTINOVA EV, KARALKIN PA, KHOLODENKO IV, LUPATOV AY, POPOV VK, BAGRATASHVILI VN e YARYGIN KN. Design of Tissue Engineering Implants for Bone Tissue Regeneration of the Basis of New Generation Polylactoglycolide Scaffolds and Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED Cells). Bull Exp Biol Med, v.153, n.1, May, p.143-7. 2012.

VAN GASTEL N, TORREKENS S, ROBERTS SJ, MOERMANS K, SCHROOTEN J, CARMELIET P, LUTTUN A, LUYTEN FP e CARMELIET G. Engineering Vascularized Bone: Osteogenic and Pro-Angiogenic Potential of Murine Periosteal Cells. Stem Cells, Aug 21. 2012.

VOLPONI AA, PANG Y e SHARPE PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. Trends Cell Biol, v.20, n.12, Dec, p.715-22. 2010.

WADDINGTON RJ, YOUDE SJ, LEE CP e SLOAN AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. Cells Tissues Organs, v.189, n.1-4, p.268-74. 2009.

WANG X, SHA XJ, LI GH, YANG FS, JI K, WEN LY, LIU SY, CHEN L, DING Y e XUAN K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Arch Oral Biol, v.57, n.9, Sep, p.1231-40. 2012.

WANG X, THIBODEAU B, TROPE M, LIN LM e HUANG GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. J Endod, v.36, n.1, Jan, p.56-63. 2010.

WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ e CAMPBELL KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, v.385, n.6619, Feb 27, p.810-3. 1997.

YAMAUCHI N, YAMAUCHI S, NAGAOKA H, DUGGAN D, ZHONG S, LEE SM, TEIXEIRA FB e YAMAUCHI M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. J Endod, v.37, n.3, Mar, p.390-7. 2011.

YAMAZA T, KENTARO A, CHEN C, LIU Y, SHI Y, GRONTHOS S, WANG S e SHI S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cell Res Ther, v.1, n.1, p.5. 2010.

YANG W, HARRIS MA, CUI Y, MISHINA Y, HARRIS SE e GLUHAK-HEINRICH J. Bmp2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. J Dent Res, v.91, n.1, Jan, p.58-64. 2012.

ZHANG R, COOPER PR, SMITH G, NOR JE e SMITH AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. J Endod, v.37, n.1, Jan, p.26-30. 2011.

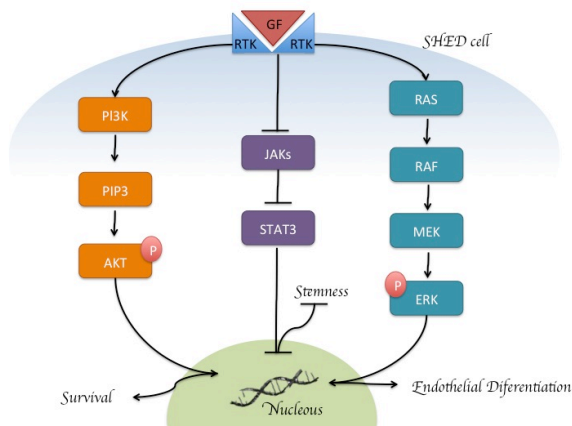
ZHANG YD, CHEN Z, SONG YQ, LIU C e CHEN YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Res, v.15, n.5, May, p.301-16. 2005.

ZHENG Y, LIU Y, ZHANG CM, ZHANG HY, LI WH, SHI S, LE AD e WANG SL. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. J Dent Res, v.88, n.3, Mar, p.249-54. 2009.

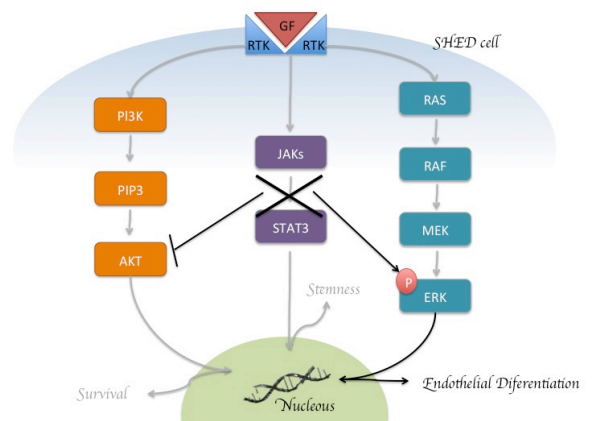
Anexos

Anexo1: Diagrama das Rotas de Sinalização

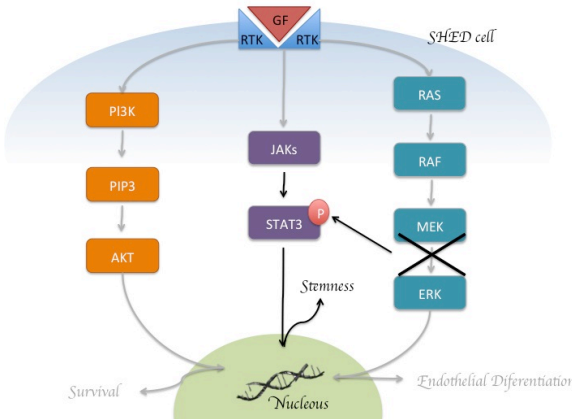
A



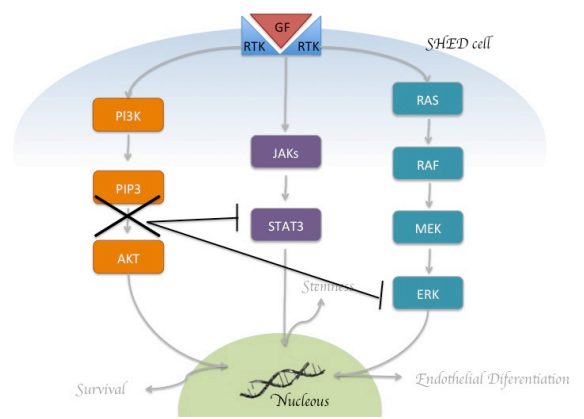
B



C



D



O painel A ilustra as três rotas de sinalização estudadas e o sinal que por elas foi transmitido quando um fator de crescimento ligou-se a seu receptor (tirosino-quinase). Os painéis B, C e D ilustram o que ocorreu com a célula quando cada uma das rotas foi bloqueada.

Anexo 2: Protocolos

CELL CULTURE

CULTURE MEDIUM

1) SHED medium

- FBS 10% - 50ml (special for stem cells- GIBCO – cat.no. 10082-147)
- Pen Strep 1% - 5,5ml
- α -MEM - 500ML

2) 293T cells culture medium

- 500 mL DMEM (high glucose 1x)
- 50 mL FBS
- 5 mL Pen Strep

3) HDMEC culture medium

- 500 mL EBM-2
- EGM2-MV Bullekit
 - 5% FBS
 - hEGF
 - Hydrocortisone
 - GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B)
 - FBS (Fetal Bovine Serum) 25 ml
 - VEGF
 - hFGF-B
 - R3-IGF-1
 - Ascorbic Acid

4) Endothelial differentiation medium

- 500 ml EBM-2
- EGM2-MV bullekit
- 50ng/ml rhVEGF

5) Freezing medium:

- 8 mL of growth medium

- 1 mL of fetal bovine serum (FBS)
- 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Filter all the mixture before use and keep it at -20°C

THAWING CELLS

1. Clean the hood with 70% ethanol and warm the medium inside the water bath. (37°C)
2. Clean the medium with ethanol and keep it inside the hood.
3. Remove the cryovial from the liquid nitrogen, put inside the ice box and go back to the cell culture room.
4. Inside the hood, open the cryovial to relief pressure and close again.
5. Put the cryovial into the water bath for 3-5 minutes.
6. Clean the cryovial with 70% ethanol.
7. Take a new T75 flask and put 10 mL of the medium.
8. Gently take the cells with a pipette and put them in the flask.
9. Gently move the flask to spread the cells on the surface.
10. Label the flask properly (cell, researcher name, date and passage)
11. Check the cells at the microscope
12. Put the flask into the incubator 37°C with 5% CO_2
13. Check cells every day and change the medium every other day.

CHANGING THE MEDIUM

1. Clean the hood with 70% ethanol.
2. Remove the medium and PBS (1x) from the fridge and warm it up (37°C) in the water bath.
3. Clean the bottle with 70% ethanol.
4. Check the flasks at the microscope.
5. Inside the hood, remove the medium from the plates with a pipette.

6. Put 5 ml of PBS and wash the cells
7. Remove the PBS carefully
8. Gently put 10 mL of new medium.
9. Return the plates to the incubator (37°C and 5% [CO₂]).

SPLITTING CELLS (when 80% confluent)

1. Check cells at microscope
2. Clean the hood with 70% ethanol.
3. Remove the medium.
4. Add 4 mL of PBS 1x into the flask and move gently to wash the cells.
5. Discard the PBS.
6. Put 3 mL of trypsin and return the flask in the incubator for 5 minutes to detach the cells.
7. Add 4 mL of medium to neutralize and stop the reaction.
8. With the same pipette, resuspend the cells (up and down).
9. Transfer the sample to a falcon tube (15 mL) and centrifuge it (4°C, 800 rpm, 5 min).
10. Discard the supernatant and resuspend the pellet with 6 mL of medium (up and down several times).
11. Take 3 flasks and put 8 mL of medium in each + 2 mL of the resuspended cells.
12. Label the flasks properly (cell type, researcher name, date and passage).
13. Put the flasks inside the incubator
14. Change the medium after 24 hours.
- 15.

FREEZING CELLS

1. Take a freezing container (NALGENE™) and fill it with 200ml isopropanol

2. Take the freezing medium out of the freezer and thaw it into the water bath
3. Prepare freezing vials with the tips and label them accordingly
4. Check cells at microscope
5. Clean the hood with 70% ethanol.
6. Remove the old medium from the flask.
7. Add 4 mL of PBS 1x into the flask and move gently to wash the cells.
8. Discard the PBS.
9. Put 3 mL of trypsin and return the flask in the incubator for 5 minutes to detach the cells.
10. Add 4 mL of medium to neutralize and stop the reaction.
11. With the same pipette, resuspend the cells (up and down).
12. Transfer the sample to a falcon tube (15 mL) and centrifuge it (4°C, 800 rpm, 5 min).
13. Discard the supernatant and resuspend the pellet with 3 mL of freezing medium.
14. Put 1mL in each cryovial.
15. Put the cryovials into the freezing container Put it in -80°C.
16. After 24h change the cryovials to liquid nitrogen.

EXPERIMENTS

SULFORHODAMINE B ASSAY (SRB)

Necessary reagents:

1. Trichloroacetic acid (TCA), 50% solution (toxic, do not inhale)
2. SRB, 0.4% (w/v) in 1% acetic acid
3. Acetic acid, 1%
4. Trizma-base, 10 mM

Method:

1. Plate the cells in 96-well plates
 - 6 wells per treatment
 - one plate per day of evaluation.

At each evaluation day:

1. Fix the adherent cells with a final concentration of 10% TCA by adding ,to each well, the 50% TCA solution without discarding the old medium (use the multichannel pippet)
 - For cells in 200 μ L medium, add 50 μ L of 50% TCA solution
 - For cells in 100 μ L, add 25 μ L of 50% TCA solution
2. Incubate the plates at cold room (4°C) for 1 h.
3. Wash the plates 5 times under running tap water.
 - Attention: Allow water flow to hit the top edge of the plate and gradually fill up wells rather than letting flow hit wells directly.
4. Allow plates to air dry, at room temperature or in low temperature dryer overnight.
5. Close the plate lid and store it until all the plates are ready to stain.

After all plates were fixed

1. Add 0.4% SRB solution (50 μ L) to all wells in order to stain the cells.
2. Incubate plates for 30 min at room temperature.
3. Wash plates 4 times with 1% acetic acid to remove unbound excess dye.

4. Allow to air dry completely.
5. Add 100 μ L Trizma-base (10 mM) to solubilize the bound dye.
6. Put the plates on the shaker, very gently moving, at room temperature for 1 h to allow complete solubilization.
7. Read plates on microplate reader at 565 nm

ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION OF SHED

- 1- Plate 10^5 cells in 6cm dishes (use SHED medium)
- 2- After 24 hours remove the medium
- 3- Wash the cells with PBS twice
- 4- Put 1,5 ml of endothelial differentiation medium in each dish
- 5- Change medium every other day

DIFFERENTIATION MEDIA AND SIGNALING PATHWAYS (TIME POINT)

- 1- Plate 3×10^5 cells in 6cm dishes (use SHED medium) – 6 dishes
- 2- After 24 hours remove the medium
- 3- Wash the cells with PBS twice
- 4- Put 1,5 ml of endothelial differentiation medium in each dish
- 5- Every 15 minutes, collect protein of one dish.
- 6- Keep one dish in SHED medium (control) until the end of the time point, and then collect the protein as well.

SIGNALING PATHWAY INHIBITORS (CROSSTALK EXPERIMENT)

- 1- Plate 3×10^5 cells in seven 6cm dishes (use SHED medium).
- 2- Keep them for 24 hours.
- 3- Take four 15 ml falcon tubes and label them properly.
- 4- In each falcon tubes prepare the inhibitor according to the concentration ($5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ and $30\mu\text{M}$). Prepare 2,0 ml of each solution
- 5- Label the dishes according to the inhibitor concentration.
- 6- Remove the SHED medium from the dish
- 7- Wash the cell with 1 ml of PBS
- 8- Put 1,5 ml of each solution (tests and controls) in the proper dishes.
- 9- Every 15 minutes, collect protein of one dish.
- 10-Keep one dish in SHED medium (control) until the end of the time point, and then collect the protein as well.

IMMUNOCITOCHEMISTRY (F-ACTIN)

1. Culture SHED in 8 well chambers slides (Thermo, Fischer Scientific, Rochester, NY, USA).
2. Do not allow the slides to dry out at any point during the staining protocol.
3. Fix the cell sample in 4% formaldehyde solution in PBS for 15 minutes at room temperature.
4. Incubate for 15 minutes at 37°C under 5% CO₂. This latter fixation method has been observed to better preserve cytoskeletal morphology.
5. Wash the cell sample with PBS.
6. Permeabilize the cells by incubating the sample in PBS containing 0.1% Triton® X-100 for 5 minutes at room temperature.
7. Remove the detergent solution.
8. Block nonspecific binding sites in the cell sample for 30 minutes in PBS containing 10% normal goat serum (NGS).
9. Dilute the Alexa Fluor® 488 phalloidin in PBS (dilute 5 µL of stock solution into 200 µL PBS containing 10% NGS, and apply a sufficient volume to immerse the cell sample completely.
10. Incubate the cell sample for 60 minutes at room temperature. And protected from light. When staining is complete, wash the cell sample with PBS.
11. Perform a second fixation of the cell sample in 4% formaldehyde solution in PBS for 15 minutes at room temperature.
12. Counterstain the cell sample with DAPI and wash with PBS after any additional staining procedure.
13. Mount the slide with antifade mounting medium ProLong® Antifade Kit

EXTRACTING PROTEIN FOR WESTERN BLOT

1. Label tubes and check the cold centrifuge (must be 4°C)
2. Place the dishes on ice
3. Aspirate the media from the dish
4. Wash cells with cold PBS 1x with the dish on ice (2ml PBS) – Keep PBS on ice.
5. Aspirate de PBS
6. Add 1.5ml of PBS and scrap the dish with a cell scraper.
7. Transfer the content of the dish to an eppendorf tube (on ice).
8. Cold Spin for 1min at 8000RPM, 4°C
9. Aspirate Supernatant of the tube and keep the pellet
10. Keep on ice
11. Add 30-100µl (50µl) of the lyses buffer (NP40) according to the size of the pellet. Vortex to dilute the pellet.
12. Incubate for 10 min on ice.
13. Cold Spin for 10 min 13000 RPM, 4°C
14. Transfer the supernatant to a new tube
15. Store at -80°C
- 16.

MEASURING THE PROTEIN CONCENTRATION

1. Put 800µl of DDW in a tube.
2. Add 1µl of the protein (with a 1µl pipette)
3. Add 200µl of BioRad dye
4. Shake the tube with hands
5. Transfer 200µl to a 96-well plate
6. Read the protein concentration in the microplate reader (Tecan-Genios) (filter 595nm)
7. The result is the concentration of the protein at µg/µl)

WESTERN BLOT

1. Turn on the thermostat (95°C) to let it warm up
2. Put the samples (proteins) on ice
3. Prepare the samples (20-50µg of protein/well).
4. Calculate the volume of protein lysate that will be used by the formula
 $C_i \times V_i = C_f \times V_f$
 - a. The lysate + water = 10µl
 - b. Sample buffer (LDS sample buffer 4x) = 4µl
 - c. 0.5M DTT = 1.6µl
5. First put the water into the e-tubes
6. After the mix LDS +DTT (= 5.6µl per sample) –Prepare 3 more than the number of samples.
7. Protein at last
8. Vortex and centrifuge the tubes (1min, 12000rpm)
9. Warm up the tubes (95°C) for 5 min
10. Remove the white tape of the cassette
11. Remove the comb and wash the wells with ddw
12. Shake the cassette to remove the water from the wells

LOADING

13. Molecular Marker (leader) : Bench Mark Invitrogen (PRESTAINED) for the 9% gel. = 10µl
 Samples: 15,6µl
 Empty wells : Fill with loading buffer only.
14. Add RUNNING buffer (fresh inside and used outside)
15. Turn on the electrophoresis device (130v 1:30min – 2:00h) or (40V for stacking gel and 100V for resolving gel)
16. Aspirate the inside running buffer and keep the outside as USED.

TRANSFERRING TO A NITROCELLULOSE MEMBRANE

17. Label de membrane (target/date/gel number)
18. Keep 2 pads, 2 filter and 1 membrane in a recipient covered with transfer buffer
19. Break the cassette with a spatula (with de hole facing up) and cut the gel, removing the stacking gel and the bottom part (blue lane)
20. Put the wet membrane on the gel and remove both from the cassette with the aid of a spatula.
21. Put the membrane and gel on the filters inside the recipient (gel facing up).
22. Remove the air bubbles between the gel and the membrane
23. Add 2 filters and 2 pads on them.
24. Remove the set from the recipient and flip it in order to accommodate it inside the cassette in the corret position.
25. Gel keeps in the negative, membrane in the positive.
26. Pour fresh TRANSFER buffer in the middle of the cassete, add 550ml of DDW outside.
27. 40v 2h

BLOCKING THE MEMBRANES

28. Remove the gel and cut the membrane if necessary (different antibodies)
29. Put the membrane in a container with non fat milk 5% and incubate it for 1 hour (shaking).
30. Non-fat milk 5% (20ml TBST – 1g Non fat milk)

INCUBATING PRIMARY ANTIBODY

31. Put the membranes into plastic bags
32. Add the primary antibody diluted in TBST and incubate it (shaking) in the cold room overnight.

INCUBATING SECOND ANTIBODY

→ On shaker ←

33. Put the membranes into proper containers with TBST

34. Wash the membranes 2 times of 30min with TBST
35. Add the second antibody diluted in TBST and incubate it for 2h. (20ml TBST-2 μ l Antibody)
36. Wash the membrane 2 times with TBST for 30 min. or 3 times of 20min

REVELING THE RESULTS

37. Add 2 ml of both content of the chemiluminescent product and shake the membrane for 5 min.
38. Prepare the plastic film to wrap the membrane
39. Put it inside the autoradiography cassette
40. In the dark room, expose the film for 5-10 min. mark the left upper corner of the film.
41. Put the film in the processing machine
42. Put another film in the cassette over the membrane and count the time (exposure).
43. Adjust the time according to the results observed in the first film.
44. Label the films properly.

RT-PCR

EXTRACTING RNA

HOMOGENIZATION

1. Lyse cells directly in the culture dish by adding 1 ml of TRIZOL® Reagent to the 6 cm diameter dish, and passing the cell lysate several times through a pipette. *(The amount of TRIZOL® Reagent added is based on the area of the culture dish (1 ml per 10 cm²) and not on the number of cells present. An insufficient amount of TRIZOL® Reagent may result in contamination of the isolated RNA with DNA).*

PHASE SEPARATION

2. Incubate the homogenized samples for 5 minutes at 15 to 30°C to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes.
3. Add 0.2 ml of chloroform per 1 ml of TRIZOL® Reagent
4. . Cap sample tubes securely.
5. Shake tubes vigorously by hand for 15 seconds and incubate them at 15 to 30°C for 2 to 3 minutes.
6. Centrifuge the samples at no more than 12,000 g for 15 minutes at 2 to 8°C. (Following centrifugation, the mixture separates into a lower red, phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. RNA remains exclusively in the aqueous phase. The volume of the aqueous phase is about 60% of the volume of TRIZOL® Reagent used for homogenization.)

RNA PRECIPITATION

7. Transfer the aqueous phase to a fresh tube, and save the organic phase if isolation of DNA or protein is desired.

8. Precipitate the RNA from the aqueous phase by mixing with isopropyl alcohol. Use 0.5 ml of isopropyl alcohol per 1 ml of TRIZOL® Reagent used for the initial homogenization.
9. Incubate samples at 15 to 30°C for 10 minutes and centrifuge at no more than 12,000 g for 10 minutes at 2 to 8°C. The RNA precipitate, often invisible before centrifugation, forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.

RNA WASH

10. Remove the supernatant.
11. Wash the RNA pellet once with 75% ethanol, adding at least 1 ml of 75% ethanol per 1 ml of TRIZOL® Reagent used for the initial homogenization.
12. Mix the sample by vortexing and centrifuge at no more than 7,500 g for 5 minutes at 2 to 8°C.

REDISSOLVING THE RNA

13. Briefly dry the RNA pellet (air-dry or vacuum-dry for 5-10 minutes). It is important NOT to let the RNA pellet dry completely as this will greatly decrease its solubility.
14. Dissolve RNA in RNase-free water by passing the solution a few times through a pipette tip.

FIRST-STRAND cDNA SYNTHESIS

1. Combine the following kit components in a tube on ice. For multiple reactions, a master mix without RNA may be prepared:
2. 10µl of 2X RT Reaction Mix
3. 2µl of RT Enzyme Mix
4. RNA (10 pg to 1 µg)
5. Up to 20µl DEPC-treated water
6. Gently mix tube contents and incubate at 25°C for 10 minutes.
7. Incubate tube at 42°C for 50 minutes.

8. Terminate the reaction at 85°C for 5 minutes
9. Chill on ice.
10. Add 1 μ l (2 U) of E. coli RNase H
11. Incubate at 37°C for 20 minutes.
12. Store the reaction at -20°C until use.

PCR REACTION

<u>Primer reaction Mix</u>	
PCR Super Mix UDG	25 μ l
Primer Sense 10 μ M	1 μ l
Primer Antisense 10 μ M	1 μ l
cDNA	5 μ l
DEPC water	to 50 μ l

Prepare the samples into PCR tubes and put them in the thermocycler according to this program:

1. 94° C for 2 min
2. 94° C for 30seg
3. 55° C for 30s
4. 12° C for 1 min
5. return to step 2 (35-40 cycles)
6. 72° C for 10min
7. 4° C hold

ELECTROPHORESIS – PCR PRODUCTS

1. Preparing the gel
 - a. 1 % agarose gel (100 mL of 1x TAE buffer (1x) + 1 g of agarose + 4 μ L of ethidium bromide)
 - b. Warm up the 1x TAE buffer and the agarose in a beaker in the microwave for 1 min.
 - c. Add the ethidium bromide when the agarose is not that hot.
 - d. Put the gel into the cassette

- e. Put the combs.
 - f. After gel polymerization, remove the comb and wash the wells with 1x TAE buffer using a plastic Pasteur pipette
 - g. Fill the cassette with 1x TAE buffer up to the indicator mark.
2. Loading and running
- a. Fix a parafilm on the bench and put drops of the dye (4 μL each) + 10-15 μL of the RT-PCR product.
 - b. To load the gel with the samples, follow the table of samples in the labnotebook.
 - c. Load the ladder (10 μL + 4 μL of the dye) and samples.
 - d. Run the gel at 80 V, 3 mA, ~45 min.
3. Reading the gel
- a. Clean the transilluminator box with 70% ethanol
 - b. Remove the 1x TAE buffer from the PCR cassette .
 - c. Take the gel in a toilette paper and put it on the UV transilluminator.
 - d. Remove the gloves.
 - e. At the computer:
 - Click Kodak \rightarrow Capture \rightarrow Export image
 - Save as JPEG
 - f. Close the windows in the computer and discard the gel.
 - g. Open the image in Photoshop program to label according to the table in the labnotebook.

shRNA INFECTION

LB BROTH MEDIUM

- 25g of LB broth miller medium
- 1liter of distilled water

Day 1

GROWING BACTERIA

1. Prepare 1 liter of LB Broth Miller medium and put into two 500 mL bottles. Autoclave the bottles (liquid cycle).
Put an aluminum foil around the lid, which should not be closed tightly.
2. When the LB medium is cold, put ampicilin (100 µg/mL) in one of the bottles and ampicilin (100 µg/mL) and zeocin (25 µg/mL) in the other one. The media with antibiotic should be stored at 4°C.
3. Put 7 ml of the medium with ampicilin and zeocin in 50 mL falcon tubes. (for shRNA)
4. Put 7 ml of the medium just with Ampicilin in 50ml falcon tubes (for helpers)
5 tubes per each helper (pMD2 and psPAX2) and 5 per each shRNA should be enough
5. Grab the bacteria stock from -80° or take agar plates from 4°C
6. Wipe a forceps with ethanol 70%.
7. Grab a sterile tip, scratch the tip into the frozen bacteria or pick a colony from an agar plate.
8. Put the tip with the bacteria inside the 50ml tube with the LB medium
9. Put the tubes inside the incubator (37°C), and leave them shaking at 220-250 RPM overnight (12-16h).

Day 2:

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

**** Label all tubes before start****

1. In the next day, take out the 50ml tubes from incubator and freeze a vial of each bacteria type in glycerol by mixing 1000 μL of the bacteria from the 50ml tube and 200 μL of autoclaved glycerol. Vortex the vials and keep them at -80°C .
2. After the freezing step, use the Minipreps DNA purification system as follows.
3. Spin down all 50ml tubes for 10 minutes in 3200 RPM in room temperature or 4°C .
4. Pour the supernatant from the 50ml tubes to a flask with bleach and keep the pellet. (use a mask)
5. Add 250 μL of Cell Resuspension Solution to each 50ml falcon tube and vortex to break the pellet. (do not touch the bacteria and use one tip for each tube)
6. Transfer its content into microcentrifuge tubes (1.5ml).
7. Add 10 μL of Alkaline Proteases Solution to each microcentrifuge tube
8. Invert the tubes 4 times. (do not vortex)
9. Add 250 μL of Cell Lysis Solution to each sample
10. Invert the tubes 4 times. (do not vortex)
11. Incubate 5 minutes at room temperature.
12. Add 350 μL of Neutralization Solution
13. Invert the tubes 4 times. (do not vortex)
14. Centrifuge the bacterial lysate for 15 minutes at 13000 rpm (top speed) at room temperature.
15. Insert Spin Column into Collection Tube.
16. Transfer the supernatant into Spin Column. (take just the clearest portion and balance the volumes of each column. You can mix between tubes from same bacteria in order to balance.)
17. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. (13000 RPM)
18. Discard all the content of the collection tube and reinsert the column into it.
19. Add 700 μL of wash solution with ethanol in each column
20. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. (13000 RPM)

21. Add 200 μ l of wash solution with ethanol in each column
22. Centrifuge at top speed for 2 minute at room temperature. (13000 RPM)
23. Transfer Spin Column to a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube. (Do not transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at top speed, then transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5 mL microcentrifuge tube.)
24. Add 100 μ L of Nuclease-Free Water (that comes with the kit) to the Spin Column.
25. Centrifuge at 13000 for 1 minute at room temperature.
26. Discard column. (In this step, we can combine all the same kind of DNA in one 1.5ml tube by proceeding multiples centrifugations at the same 1.5ml microcentrifuge tube.)
27. Combine the tubes if you use multiple tubes for the same DNA. (at the end of this step we are going to have one 1.5ml microcentrifuge tube for DNA-helpers and shRNA)
28. Measure DNA concentration in a spectrophotometer as follows:
 - a. Add 99 μ l of nuclease-free water in microcentrifuge tube for each DNA that should be mesuared.
 - b. Add 1 μ l of the DNA in the tubes with water.
 - c. Add 100 μ l in a separate tube as a control.
 - d. At the spectrophotometer screen chose: nucleic acid
 - e. Fill the spots with the contents of the tubes prepared before. The upper spot is the blank. (Don't forget to register the order you add the samples.)
 - f. Select : BLANK and READ SAMPLES
 - g. Ask to print the results.
 - h. At the printed sheet look at the abs260nm and multiply every result by 5 to get the concentration of DNA (μ g/ μ l). i.e. : shcontrol abs260 = 0.1138, so $0.1138 \times 5 = 0.569$. Then, the DNA concentration we have for shRNA control is 0.569 μ g/ μ l

29. Store DNA at -20° .
30. Seed 3×10^6 293 T cells to 10 cm dishes and leave overnight to allow them to attach.

Day 3:

Transient transfection of lentivirus

1. Put the DNA tubes on ice to allow them to thaw.
2. Remove medium from the 293T cells and add 6 mL of DMEM.
3. Prepare the transfection cocktail (calcium phosphate method) in a 2 mL tube.

TRANSFECTION COCKTAIL:

4. Mix all reagents at this order: (1) DNase, RNase free water, (2) DNA, (3) CaCl_2 , (4) HBSS.
 - a. DNase, RNase free water = $876\mu\text{l}$ – plasmid DNA (shRNA +psPAX2 + pMD2G)
 - b. Plasmid DNA (shRNA +psPAX2 + pMD2G)
 - c. $2\text{M CaCl}_2 = 124\ \mu\text{L}$
 - d. $2\text{X HBS} = 1\ \text{mL}$
5. DNA preparation:
 - a. $\text{shRNA} = 21\mu\text{g} = 21/[\text{DNA}]$
 - b. $\text{pmD2g} = 10.5\mu\text{g} = 10.5\mu\text{g}/[\text{DNA}]$
 - c. $\text{pax2} = 21\mu\text{g} = 21\mu\text{g} = 21/[\text{DNA}]$
6. Incubate the transfection cocktail at room temperature for 15minutes.
7. Add the cocktail to the cells very carefully (drop by drop, in order to avoid detachment) and incubate them for 5 or 6 hours.

8. Change medium (add 10 mL of DMEM with 10% FBS) and leave overnight. (Do not wash with PBS before reseeded. Do not aspirate the old media, take it off with pipettes and then clean them with bleach before discard)

Day 4:

1. Change medium (add 10 mL of DMEM with 10% FBS) and leave overnight.

Day 5:

1. Use gloves, mask and a disposable labcoat.
2. With a pipette collect the lentivirus supernatant and put it in a 50ml falcon tube and keep it at -80C. (48 h after transfection).
3. Add 10 mL of DMEM with 10% FBS and leave overnight.

Day 6:

1. Use gloves, mask and a disposable labcoat.
2. With a pipette collect the lentivirus supernatant and put it in a 50ml falcon tube and keep it at -80C. (72 h after transfection).
3. Discard the 293T cells.
4. Seed T25 flasks with the cells to be infected to get a 70% to 90% confluency the next day.

Day 7:

Infection of cells with lentivirus supernatant

1. Put the lentivirus supernatant on ice to thaw
2. Centrifuge 10 min 4C 3000rpm and filter the supernatant (0,4µm filter).
3. Prepare a 6 mL infection cocktail:
 - a. Lentivirus supernatant \leq 3 mL
 - b. 4 µg/mL polybrene (1:1000 using the stock solution of 4ng/ml)
 - c. Medium to final volume of 6 mL → (6ml for 75t flasks or 5ml for 25T flasks)
4. Remove medium, add the infection cocktail.

5. After 4-6 h, add another 6 or 5 mL of infection cocktail and leave overnight.
6. Add another round of infection cocktail for 4 hours.
7. Remove medium, add fresh medium and leave overnight.
8. Check gene expression (fluorescence first, western blot when you have enough cells)
9. Begin puromycin selection (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for at least 1 week.

IN VIVO EXPERIMENT

Transport Medium for collecting tooth.

- 500 mL DMEM (high glucose 1x)
- 5 mL Pen Strep
- 1 mL amphotericin

TOOTH SLICES PREPARATION

1. Place the teeth, immediately after extraction, in 50 mL falcon tubes containing transport medium.
2. Remove the gingival tissue with a periodontal curette or other dental instrument.
3. Disinfect the teeth with 70% ethanol and gauze.
4. Fix the teeth with super glue on the proper wood cubes.
5. Cut the teeth transversally into 1-mm thick slices using a diamond saw in the Isomet Low Speed Saw, cooled with PBS 1x.
6. If the pulp will be used, place the tooth slices in a 12-well plate containing 1 mL of culture media per well, prior to culture.
7. If the scaffold will be made inside the tooth slices, remove the pulp tissue and place the slices in a 15-mL falcon tube containing PBS 1x.
8. Place the slices on a glass surface and allow it to air dry completely.

TOOTH SLICE SCAFFOLD

1. Prepare a 5% (w/v) solution of PLLA in chloroform (1g:20ml) , leave it overnight to dilute the PLLA
2. Fill the pulp cavities with NaCl (250 μ m - 425 μ m)
3. Drop the PLLA solution on the NaCl and let the chloroform evaporate (24hours)
4. Remove the NaCl by changing water for 2 days (4 times a Day)
5. Keep them in PBS

In the hood:

1. Desinfect the TSS with sequential concentrations of ethanol (100%, 90%, 80% and 70%) for 20 minutes each.

1. Wash the samples with sterile PBS for 1hour, keeping overnight at 4°C most for 2 days.

AT IMPLANTATION DAY:

1. Treat the TSS with sterile filtered EDTA 10% (pH 7.2) for 1 min at 4° C
2. 3 washes with sterile PBS (10 min each)
3. Dry the tooth slices gently with a sterile gauze
4. Put them in a 24 well plate.
5. Spin and resuspend cells in MEM α (10 μ l – 600.000 cells /scaffold)
6. Matrigel (1:1)– use cold pipettes!
7. Add 10 μ l of matrigel for each sample
8. Put the mixture in the scaffold
9. Place in incubator for 30 minutes
10. Place on ice until ready for surgery.

TOOTH SLICE RETRIVAL

1. Prepare Falcon tubes (15ml) according to the number of samples
2. Label them properly
3. Put the tubes on ice box
4. Put 10 ml of IHC Zinc Fixative (BD Pharmingen™) in each tube
5. Retrieve the samples according to the procedures for mice handling
6. Put each sample in the proper container and keep fixing for 24 hours in the cold room (4°C)
7. Prepare new tubes, labeling them properly
8. Fill the tubes with 10ml of Decalcifier II
9. Transfer each sample from the fixative to the decalcifier
10. Put the tubes in the tube rotator
11. Keep them rotating for 24 hours at room temperature

HUMAN ENDOTHELIAL CELL STAINING WITH CD31 ANTIBODY

1. Bake slides for 1h at 60°C
2. Deparaffinize in xylene 4X, 10 minutes each
3. Rehydrate in
 - a. 100% EtOH 3x 3 minutes
 - b. 95% EtOH 3x 3 minutes
 - c. 70% EtOH 1x 3 minutes
 - d. DDW 2x 3 minutes
4. Wash 2x DAKO wash buffer (S3006)
5. Endogenous Peroxidase blocking (Bottle 1 of DAKO K4008), RT, 10 minutes

6. Wash 2X DDW
7. Protein block (DAKO X0909) 30 minutes → NGS 1% diluted in Dako antibody diluent
8. Primary antibodies:
 - a. Rabbit anti-human CD31 (Bethyl IHC-000555) 1:100 in Dako antibody diluent (S3022), overnight at 4°C.
9. Wash 3X in Dako wash buffer
10. Secondary antibodies:
 - a. HRP labelled anti-rabbit antibody (bottle 2 of Dako k4008), RT, 30 minutes for IHC
11. Wash 3X in Dako wash buffer
12. Add AEC solution (bottle 3 of Dako K4008), RT , 5-30 minutes, monitor under LM, stop reaction in DDW
13. Wash in DDW for 5 minutes
14. Counterstain with Hematoxylin
15. Wash in DDW
16. Coverslip with aqueous mounting médium (Vector, H5501)