

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**EFEITOS DOS MODULADORES EPIGENÉTICOS BUTIRATO DE SÓDIO E  
HIDRALAZINA NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À  
PLURIPOTÊNCIA EM CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA HÍGIDA E  
INFLAMADA**

**CLARISSA CALAIS ROMEZ**

**BRASÍLIA  
2013**

**CLARISSA CALAIS ROMEZ**

**EFEITOS DOS MODULADORES EPIGENÉTICOS BUTIRATO DE SÓDIO E  
HIDRALAZINA NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À  
PLURIPOTÊNCIA EM CÉLULAS DE POLPA DENTAL HUMANA HÍGIDA E  
INFLAMADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal pelo  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da  
Universidade de Brasília

**Orientadora:** Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida  
Santos

**BRASÍLIA  
2013**

Dissertação de Mestrado

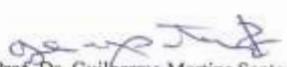
Clarissa Calais Romez

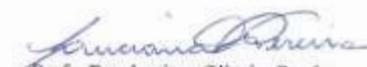
Título:

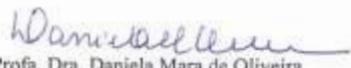
**“Efeito dos moduladores Epigenéticos Butirato de Sódio e Hidralazina na Expressão de Genes Relacionados à Pluripotencia em Células de Polpa Dental Humana Hígida e Inflamada.”**

Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos  
*Presidente / Orientadora*  
UnB / GEM

  
Prof. Dr. Guilherme Martins Santos  
*Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa*  
FCS

  
Profa. Dra. Luciana Oliveira Pereira  
*Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa*  
HRT

  
Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira  
*Membro Suplente*  
*Interno Vinculado ao Programa*  
UnB / GEM

Brasília, 26 de julho de 2013.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado tudo que eu necessitava durante todo o meu mestrado e durante toda a minha vida.

Aos meus pais e minha irmã, por ser o suporte que eu precisava nos momentos mais difíceis do meu trabalho e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos, por sempre acreditar no meu trabalho desde o início da minha graduação e ter aceitado o desafio de trabalhar com o que eu queria trabalhar em meu mestrado.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca por investir em minha formação acadêmica e por ser fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

À Doutora Luciana Pereira, pelas diversas colaborações neste trabalho e por ter me cedido às culturas pulpares.

À Dra. Izabel Silva, pela grande ajuda com as análises estatísticas e por sempre ter me ajudado com tudo que eu precisava.

À Dra. Mariana Campos da Paz, por sempre aparecer nos momentos que eu mais precisava de ajuda e por ter me treinado desde a minha graduação.

À Fabiana Brandão pela valorosa ajuda com as qPCRs e suas análises.

À Larissa Bittencourt pela ajuda em todas as PCRs.

Ao Dr. Marciano Rubini, por todas as discussões e colaborações nesse trabalho.

À Dra. Jaqueline Rodrigues pela grande colaboração na citometria de fluxo.

Aos meus queridos amigos Ana Luiza Perotto, Marina Santos, Gezi Monteiro, Yara Ferrari, Eid Almada, Everton Dantas, Diêgo Iocca e Aline Dias por estarem juntos comigo durante essa caminhada e por sempre trazer uma palavra de conforto e confiança sem as quais eu não sei se esse trabalho iria chegar ao fim, ao Thiago Bruno por ter desenvolvido um software para auxiliar as minhas análises, to Brandy Mae, my dear friend that came to Brazil when I needed freedom from my master and for always caring for what I say even not understanding it.

Aos meus familiares, em especial às minhas tias Carminha, Sônia, Sandra e Júlia e ao meu tio Antônio, que mesmo não entendendo nada sobre o que eu faço sempre me apoiaram.

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

À Capes, ao DPP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Nunca se fez nada grande sem uma esperança exagerada.”*

*Júlio Verne*

## RESUMO

**Introdução:** A literatura tem demonstrado que células diferenciadas, por exemplo, fibroblastos, podem, por meio de transfecção mediada por retrovírus, adquirir cópias extras de genes cuja expressão está associada à pluripotência e voltarem assim a um estado de indiferenciação, similar ao encontrado em células-tronco embrionárias. Entretanto, a transfecção de genes mediada por retrovírus tem potencial restrito para uso em terapias humanas, pois, além de ser de baixíssima eficiência, pode ocorrer a inserção de genes virais no genoma das células com pluripotência induzida por essa técnica. Nesse sentido, diversos estudos têm sido desenvolvidos de modo a reverter essas células diferenciadas a um estado similar ao embrionário sem utilizar a transfecção de genes. O restabelecimento da pluripotência de células diferenciadas poderia também ser induzido por alterações na expressão de genes envolvidos na pluripotência celular sem afetar a sequência do DNA, ou seja, por mecanismos epigenéticos, como a inibição por algumas substâncias da ação de enzimas que desacetilam histonas ou metilam o DNA. Dentre as substâncias capazes de inibir a ação de enzimas com atividade Histona Desacetilase, ou seja, favorecer a expressão gênica situa-se o butirato de sódio, um ácido graxo de cadeia curta. A inibição da metilação do DNA ocorre por meio da inibição da atividade de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Uma das drogas que inibe a ação de DNMTs é a hidralazina, um potente vasodilatador arterial.

**Objetivo:** O presente estudo se propôs a avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio na desdiferenciação de células de polpa dental hígida e inflamada. **Métodos:** Células de polpa dental hígida (PN) e inflamada (PI) foram analisadas quanto à sua viabilidade celular, ensaio MTT e coloração por azul de tripano, quanto à sua morfologia, microscopia de luz e citometria de fluxo, e quanto à sua expressão gênica, RT-qPCR, na presença ou não de butirato de sódio ou hidralazina. **Resultados:** Seis subculturas de polpa dental hígida e inflamada não tiveram sua viabilidade alterada quando tratadas com butirato de sódio (10 mM) e hidralazina (30  $\mu$ M). O tratamento com butirato de sódio (10 mM) induziu alterações discretas na morfologia das células, como o aumento do tamanho e da granulosidade celular. Células tratadas com hidralazina não mostraram alterações quanto a sua morfologia com relação às células não tratadas. O tratamento com butirato de sódio (10 mM) não alterou a expressão relativa dos genes OCT-4 (PN-3; PI-1; PI-2; PI-3); colágeno tipo I (PN-1; PN-3; PI-2; PI-3). O tratamento com butirato de sódio diminuiu a expressão relativa dos genes OCT-4 (PN-1; PN-2); colágeno tipo III (PN-1; PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3); colágeno tipo I (PI-1)

e aumentou a expressão relativa do gene colágeno tipo I (PN-2). O tratamento com hidralazina (30  $\mu$ M) não alterou a expressão relativa dos genes OCT-4 (PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3); colágeno tipo I (PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3); colágeno tipo III (PN-1; PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3). O tratamento com hidralazina (30  $\mu$ M) diminuiu a expressão relativa do gene OCTOCT-4-4 (PN-1); e aumentou a expressão relativa do gene colágeno tipo I (PN-1).  
**Conclusão:** O butirato de sódio e a hidralazina não induziram a desdiferenciação celular de células de polpa dental hígida e inflamada.

**Palavras-chave:** desdiferenciação celular; células-tronco de polpa dental; butirato de sódio; hidralazina;

## ABSTRACT

**Introduction:** The literature has demonstrated that differentiated cells, such as fibroblasts, may, by retrovirus-mediated transfection, gain extra copies of genes whose expression is associated with pluripotency and thus return to an undifferentiated state, similar to the state found in embryonic stem cells. However, the transfection of genes mediated by retrovirus has limited potential for use in human therapy, because, besides being very low efficiency, may occur the insert of viral genes into the genome of the cells with induced pluripotent by this technique. In this regard, various studies have been conducted in order to reverse these differentiated cells to an embryonic-like state without using the gene transfection. The restoration of pluripotency could be achieved by changes in the expression of genes involved in cell pluripotency without affecting the DNA sequence, in other words, by epigenetic mechanisms, using certain substances that inhibit the action of histone deacetylases enzymes or DNA methyltransferase enzymes. Among the substances capable of inhibiting the action of enzymes with histone deacetylase activity, or promote gene expression is situated sodium butyrate, a fatty acid short-chain. Inhibition of DNA methylation occurs through inhibition of the enzyme DNA methyltransferase (DNMTs). A drug that inhibits the action of DNMTs is hydralazine, a potent arterial vasodilator. **Objective:** This study aims to analyze the effect of hydralazine and sodium butyrate on cell dedifferentiation of healthy and inflamed dental pulp cells. **Methods:** Cells from healthy (NP) and inflamed dental pulp (IP) were analyzed for cell viability, MTT assay and trypan blue staining, for cell morphology, light microscopy and flow cytometry, and gene expression, RT-qPCR, in the presence or absence of sodium butyrate or hydralazine. **Results:** Six subcultures of healthy and inflamed dental pulp did not have their viability altered when treated with sodium butyrate (10 mM) and hydralazine (30  $\mu$ M). Treatment with sodium butyrate (10 mM) led to subtle changes in cell morphology, such as increased cell size and granularity. hydralazine treated cells showed no change in their morphology as compared to untreated cells. Treatment with sodium butyrate (10 mM) did not alter the relative expression of the genes OCT-4 (NP-3, IP-1, IP-2, IP-3); collagen type I (NP-1, PN-3; PI-2, PI-3). Treatment with sodium butyrate decreased the relative expression of genes: OCT-4 (NP-1, NP-2), collagen III (NP-1, NP-2, NP-3, IP-1, IP-2, IP-3), collagen type I (IP-1) and increased the relative expression of collagen type I gene (NP-2). Treatment with hydralazine (30 mM) did not alter the relative expression of genes: Oct-4 (NP-2, NP-3, IP-1, IP-2, IP-3); collagen type I (NP-2, NP-3, IP-1, IP-2, IP-3), type III collagen (NP-1, NP-2, NP-

3, IP-1, IP-2, IP-3). Treatment with hydralazine (30 mM) decreased the relative expression of OCT-4 gene (NP-1) and increased the relative expression of type I collagen gene (NP-1).

**Conclusion:** Sodium butyrate and hydralazine did not induce cellular dedifferentiation of cells from inflamed and healthy dental pulp.

**Keywords:** cellular dedifferentiation; dental pulp stem cells; sodium butyrate; hydralazine;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Diferentes nichos de células-tronco dentais (Modificado de Krasner, 2011).	2
Figura 02	Figura 2. Corte histológico de polpa dental ( <a href="http://atlasdehistologia.wordpress.com/">http://atlasdehistologia.wordpress.com/</a> ).	4
Figura 03	Figura 3. Representação esquemática de um nucleossomo e da cromatina. (A) Cada nucleossomo é constituído por um eixo de quatro tipos de histonas, duas cópias de cada, H2A, H2B, H3 e H4, dois giros de DNA e uma molécula H1 localizada fora do filamento de DNA. (B) A interação das histonas com o DNA pode ser diminuída pela acetilação de histonas (linha azul) ou desmetilação de citosinas. <a href="http://www.colby.edu/.../blumberg-colby-keynote">www.colby.edu/.../blumberg-colby-keynote</a> , com adaptações.	6
Figura 04	Estrutura molecular do butirato de sódio	8
Figura 05	Estrutura molecular da hidralazina.	8
Figura 06	Regulação transcricional em células-tronco embrionárias humanas. A) Exemplo de Circuito Regulatório Transcricional de alimentação direta. Reguladores são representados em círculos azuis; promotores de genes são representados em retângulos vermelhos. A ligação de um promotor gênico é indicada por uma seta. Genes que codificam reguladores são ligados por setas não contínuas aos seus respectivos reguladores. B) O loop regulatório interconectado formado por OCT-4, Sox-2 e Nanog. (Boyer et alli, 2005)	10
Figura 07	Imagem ilustrativa do perfil eletroforético em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) do RNA total extraído de células de polpa dental.	22
Figura 08	Avaliação da citotoxicidade in vitro do butirato de sódio em células de polpa dental hígida (A) e inflamada (B) por meio do ensaio de MTT. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio em diferentes concentrações. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. As barras de erros representam duas vezes o erro padrão e os asteriscos representam diferença significativa (p<0,05) em relação ao respectivo controle.	26
Figura 09	Avaliação da citotoxicidade in vitro da hidralazina em células de polpa dental hígida (A) e inflamada (B) por meio do ensaio de MTT. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de hidralazina em diferentes concentrações. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. As barras de erros representam duas	27

vezes o erro padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle.

- Figura 10 Avaliação da citotoxicidade in vitro da hidralazina e do butirato de sódio em células de polpa dental hígida e inflamada por meio do ensaio de coloração com Azul Tripano. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. 29
- Figura 11 Micrografias de células de polpa dental humana. (A) Células de polpa dental hígida sem tratamento. (B) Células de polpa dental hígida tratadas com 10 mM de butirato de sódio. (C) Células de polpa dental hígida tratadas com 30  $\mu$ M de hidralazina. (D) Células de polpa dental inflamada sem tratamento. (E) Células de polpa dental inflamada tratadas com 10 mM de butirato de sódio. (F) e Células de polpa dental inflamada tratadas com 30  $\mu$ M de hidralazina. 30
- Figura 12 Análise da morfologia celular por citometria de fluxo. Tamanho determinado pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) (u.a) de células cultivadas por 48 horas na presença de butirato de sódio e hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente. As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle. 31
- Figura 13 Análise da morfologia celular por citometria de fluxo. Granulosidade determinada pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) (u.a) de células cultivadas por 48 horas na presença de butirato de sódio e hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente. As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle. 32
- Figura 14 Análise da morfologia celular por citometria de fluxo de células de polpa hígida (PN-1; PN-2; PN-3). As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M tiveram o tamanho e a da granulosidade determinados respectivamente pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) e pela Dispersão Lateral da Luz (SSC). Esses dados são representativos das triplicatas dos tratamentos das células de polpa dental hígida. 33
- Figura 15 Análise da morfologia celular por citometria de fluxo de células de polpa inflamada (PI-1; PI-2; PI-3). As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina 34

respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M tiveram o tamanho e da granulidade determinados respectivamente pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) e pela Dispersão Lateral da Luz (SSC). Esses dados são representativos das triplicatas dos tratamentos das células de polpa dental inflamada.

- Figura 16 Amplificação dos primers NANOG, SOX-2, Colágeno tipo I (COL1A1) e Colágeno tipo III (COL3A1). Os tamanhos de fragmentos esperados eram de 103, 104, 100 e 110 pares de bases respectivamente. O marcador usado é 1 Kb plus da Invitrogen. 35
- Figura 17 Expressão relativa do gene OCT-4 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\* =  $p < 0,0005$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ). 36
- Figura 18 Expressão relativa do gene COL1A1 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \* =  $p < 0,05$ ). 37
- Figura 19 Expressão relativa do gene COL3A1 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \* =  $p < 0,05$ ). 37

## LISTA DE TABELAS

Tabela I	Características da população doadora do tecido pulpar	14
Tabela II	Tratamentos administrados às células de polpa dental humana, hígida e inflamada, para definir a concentração máxima das drogas que as células conseguem suportar sem o comprometimento de sua viabilidade.	16
Tabela III	Tratamentos administrados às células de polpa dental humana, hígida e inflamada, para avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão de genes relacionados à pluripotência e normalmente expressos na polpa dental	19
Tabela IV	Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.	22
Tabela V	Concentração dos reagentes utilizados para avaliar a amplificação dos primers em PCR qualitativa em três reações independentes.	23
Tabela VI	Características dos indivíduos cujas células pulpares foram utilizados nos ensaios de morfologia e expressão gênica.	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância ( <i>Analysis of variance</i> )
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea-2
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COL1A1	Cadeia $\alpha$ do colágeno tipo I
COL3A1	Cadeia $\alpha$ do colágeno tipo III
CT	Ciclo limiar ( <i>cycle threshold</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>Desoxirribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxirribonuclease
DMEM	Meio de cultura DMEM ( <i>Dulbecco`s Modified Eagles Medium</i> )
DNMTs	Enzimas DNA metiltransferases
DNMT-1	DNA metiltransferase 1
dNTP	Deoxinucleotídeos
DPSC	Células-tronco da polpa dental ( <i>Dental pulp stem cells</i> )
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FSC	Dispersão Frontal da Luz
<i>g</i>	Aceleração devida à gravidade na superfície da Terra
GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
H1	Histona 1
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Desacetilase
hESC	Células-tronco embrionárias humanas

iPSCs	Células-tronco de pluripotência induzida
kb	Quilobases
kDa	Quilo Dalton
KLF4	Fator 4 similar à Kruppel
M	Molar
mg	Miligrama
μM	Micromolar
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NANOG	homeobox Nanog
NLS	Sinal de localização nuclear ( <i>nuclear localization signal</i> )
nm	Nanometro
OCT-3/4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 ou domínio POU, classe 5, fator de transcrição 1
OCT-4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 ou domínio POU, classe 5, fator de transcrição 1
PBS	Solução salina tamponada ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PI	Polpa dental inflamada
PN	Polpa dental normal
RNA	Ácido ribonucléico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RNAse	Ribonuclease
SFB	Soro fetal bovino
SOX-2	SRY (gene determinante sexual do cromossomo Y)-caixa 2
SSC	Dispersão Lateral da Luz
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação da polimerase em cadeia ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico

qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNAse	Ribonuclease
TGF- $\beta$	Fator transformante de crescimento $\beta$ (Transforming growth factor beta)
U	Unidades
%	Por cento

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	14
3.1 Obtenção das células de polpa dental	14
3.2 Manutenção e propagação das células de polpa dental	14
3.3 Ensaio de viabilidade celular	15
3.3.1 Análise do metabolismo celular	15
3.3.2 Ensaio de citotoxicidade por meio da coloração com Azul de Tripano	16
3.3.3 Análise estatística	17
3.4 Análise da morfologia celular	17
3.4.1 Análise morfológica das células de polpa dental hígida e inflamada ao microscópio de luz	17
3.4.2.1 Análise da morfologia das células de polpa dental hígida e inflamada por meio de citometria de fluxo	18
3.4.2.2 Análise estatística	18
3.5 Análise da expressão diferencial de genes em células de polpa dental humana hígida e inflamada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real	19
3.5.1 Extração de RNA	19
3.5.2 Tratamento do RNA com DNase	20
3.5.2.1 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA extraído e tratado com DNase	20
3.5.3 Síntese do DNA complementar	21
3.6 Desenho e validação dos primers	21
3.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real	23
3.7.1 Análise Estatística	24
<b>4. RESULTADOS</b>	25
4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	25
4.2 Ensaio de viabilidade celular por corante vital Azul de Tripano	28
4.3 Análise da morfologia das células de polpa dental hígida e inflamada	29
4.4 Validação dos primers por meio de PCR convencional	35
4.5 PCR quantitativo em tempo real	35
<b>5. DISCUSSÃO</b>	38
<b>6. CONCLUSÃO</b>	48
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50

<b>ANEXO A</b> - Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília	61
<b>ANEXO B</b> - Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde – SES-DF	62

A perda, total ou parcial, da função de um órgão ou de um tecido é um problema de saúde pública, principalmente devido à escassez mundial de doadores de órgãos (Langer & Vacanti, 1993). Uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais de um órgão seria a reposição do mesmo por meio de transplante de tecidos produzidos em laboratório e/ou de células ou moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas do organismo. Nesse cenário, uma gama de pesquisas que visam à reprodução total ou parcial de estruturas anatômicas humanas tem sido relatada na literatura (Orlic, 2004; Casagrande, 2011). O estudo feito por Orlic demonstrou que células-tronco da medula óssea, implantadas no miocárdio de camundongos infartados, se diferenciaram em células musculares; essas células implantadas ocuparam 68% da área afetada pelo infarto, apenas nove dias após a sua indução (Orlic, 2001). Já o estudo realizado por Casagrande conseguiu gerar tecidos com características morfológicas e funcionais semelhantes à polpa dental humana, usando células-tronco dentais. Um estudo recentemente publicado, por Levi (2012) mostra que células-tronco com pluripotência induzida podem ser usadas para tratamentos de defeitos cranianos. Essas células foram introduzidas em camundongos em enxertos que continham hidroxiapatita e ácido poli-L-láctico. Esses enxertos também liberavam a proteína morfogenética óssea-2, BMP-2. Essa técnica além de levar essas células a se diferenciarem em tecido ósseo, não induziu a formação de teratomas.

Embora o cultivo de células seja realizado há muitos anos, o transplante de células por meio de técnicas da bioengenharia é recente. Este tipo de processo envolve o desenvolvimento de estruturas artificiais tridimensionais para facilitar o crescimento ou a capacidade regenerativa dos tecidos existentes, a ativação das células nas proximidades do local a ser recomposto, com sinais morfogênicos necessários para induzir as células a regenerarem o tecido ou o órgão, ou ainda, o transplante de células apropriadas para o local a ser regenerado ou renovado (Casagrande *et alli*, 2011). Para esse fim, destaca-se a utilização de células-tronco como nova opção para regeneração de tecidos, pois são células que possuem capacidade de auto renovação, isto é, a capacidade de originar células idênticas a si mesmas e com potencial de se transformarem, por meio de um processo de diferenciação celular, em outros tipos celulares e assim serem responsáveis pela formação e manutenção de órgãos.

Tal processo de diferenciação celular, além de ocorrer em condições fisiológicas normais, pode ser induzido em certas condições experimentais. Células-tronco adultas provenientes da medula óssea e da polpa dental podem diferenciar-se em osteoblastos na presença de uma matriz de colágeno do tipo I (Mizuno *et alli*, 2000), pela adição de

glicerolfosfato, dexametasona e ácido ascórbico ao meio de cultura (Pereira *et alli*, 2012) , ou até mesmo pela adição ao meio de cultura de nano partículas magnéticas (Kanczler *et alli*, 2010).

Nos humanos, assim como em todos os mamíferos, existem dois tipos de células-tronco: as embrionárias, que são encontradas em embriões com até 32 células e as adultas, que são encontradas em diferentes tecidos do organismo (Fuchs & Segre, 2000; Blau *et alli*, 2001), incluindo medula óssea (Bianco *et alli*, 2001), pele, retina, epitélios e tecidos neural (Harada *et alli*, 1999) e adiposo (Shen *et alli*, 2012). As células-tronco embrionárias são aquelas capazes de originar todos os tipos celulares do organismo e tecidos extraembrionários; elas podem se diferenciar em todos os tipos celulares encontrados no organismo, sendo assim denominadas de totipotentes. Já as células-tronco adultas variam quanto a sua capacidade de diferenciação *in vivo*, sendo geralmente limitada aos tipos celulares do órgão de origem. Por exemplo, células-tronco encontradas no coração diferenciam-se em células musculares cardíacas, mas não está claro se elas podem se diferenciar em outras células do corpo ([http://www.isscr.org/Glossary\\_of\\_Stem\\_Cell\\_Related\\_Terms/2957.htm#adult](http://www.isscr.org/Glossary_of_Stem_Cell_Related_Terms/2957.htm#adult)); por isso essas células são denominadas de multipotentes (National Institutes of Health, 2002).

Em tecidos dentais (Figura 1) as células-tronco adultas foram primeiramente detectadas na polpa de dentes permanentes, e por isso foram nomeadas células-tronco da polpa dental (Gronthos *et alli*, 2000). Entretanto, células-tronco dentais também existem em dentes decíduos humanos esfoliados (Miura *et alli.*, 2003), na papila apical (Sonoyama *et alli*; 2006; 2008), no folículo dental (Morsczech *et alli*, 2005) e no ligamento periodontal (Seo *et alli* , 2004).



**Figura 1.** Diferentes nichos de células-tronco dentais (Modificado de Krasner, 2011).

As células-tronco dentais pulpares, por serem multipotentes isto é, por poderem diferenciar-se em vários tipos celulares, constituem um alvo de estudos de engenharia tecidual. Em estudos *in vitro*, essas células foram capazes de se diferenciarem em células adiposas, neurais (Gronthos *et alli*, 2002), ósseas (Laino *et alli*, 2006; D'aquino, *et alli*, 2007), cartilagenosas e musculares (Zhang, *et alli*, 2006), o que mostra a sua grande plasticidade e o seu grande potencial de diferenciação. Dessa forma, essas células constituem uma fonte atrativa de células-tronco para serem utilizadas em um espectro de cenários clínicos, como a reparação ou a regeneração de vários tecidos do organismo.

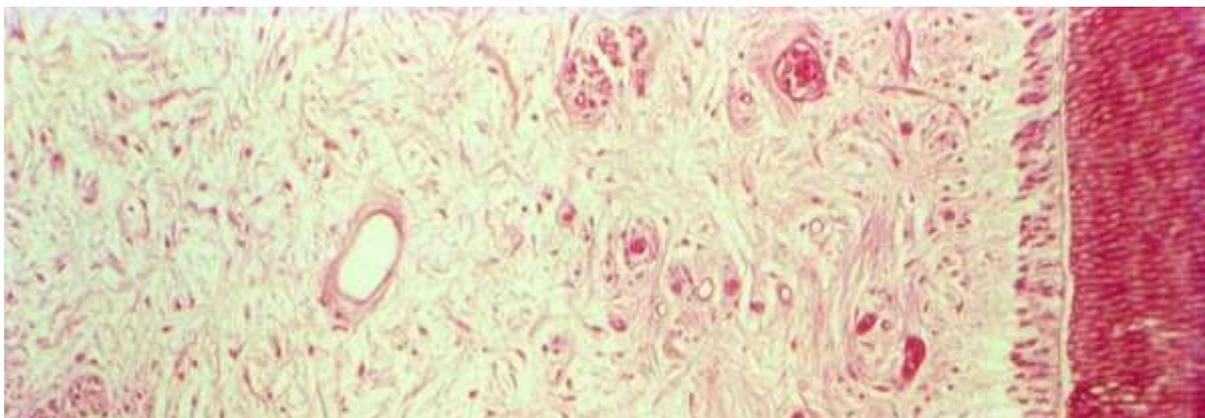
A utilização de células-tronco pulpares na regeneração de tecidos é vantajosa, pois essas células podem ser obtidas do próprio paciente *in situ* e cultivadas em laboratório (Rimondini & Mele, 2009). Exemplos promissores para o uso de células-tronco em Odontologia são os tratamentos de regeneração pulpar (Locke, 2009), de ossos dentários (D'aquino, *et alli*, 2009) e a formação de osso para implantes dentários (Mangano *et alli*, 2010). Além desses estudos, as células pulpares são usadas na avaliação da citotoxicidade de selantes a base de resina (Trubiani, *et alli*, 2010) e em testes que avaliam os efeitos de drogas sobre a diferenciação de células-tronco pulpares, como a Estatina, um indutor da formação de ossos, que mostrou acelerar o processo de diferenciação de células tronco pulpares em odontoblastos (Okamoto *et alli*, 2009).

Diversos autores já demonstraram que células-tronco pulpares provenientes de pacientes com dentes com pulpíte irreversível possuem potencial de diferenciação similar ao encontrado em células-tronco pulpares híginas (Alongi *et alli*, 2010; Wang *et alli*, 2010; Pereira *et alli*, 2012). Desse modo, considerando que a pulpíte irreversível é um quadro inflamatório agudo que tem sido tratado apenas com a remoção completa da polpa ou até do próprio dente, é plausível acreditar que a terapia com essas células-tronco pulpares poderia possibilitar uma reabilitação mais fisiológica do que implantes ou restaurações de diferentes materiais (Yu *et alli*, 2008).

Uma das barreiras para a utilização de células-tronco na rotina diária de hospitais e consultórios dentários é a dificuldade de acessibilidade a essas células. Assim, a descoberta de fontes de células-tronco adultas que possam ser facilmente obtidas, como as células-tronco dentais, fornece uma possível solução a esse problema (Krasner, 2011). Vale ressaltar que, no Brasil, cerca de nove milhões de dentes são extraídos por ano (Tescarollo, 2007); e, na maioria das vezes, as polpas desses dentes tornam-se lixo biológico quando poderiam

constituir uma excelente fonte de células-tronco capazes de se diferenciarem em vários tipos celulares do organismo humano, e assim servir como fonte de tratamento de várias doenças.

É importante salientar que a polpa dental é constituída de tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado (Figura 2) onde, além de células-tronco, existem células diferenciadas, entre elas, odontoblastos, fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e nervosas.



**Figura 2.** Corte histológico de polpa dental (<http://atlasdehistologia.wordpress.com/>).

Como todo tecido conjuntivo, além de células, a polpa dental possui uma matriz extracelular. Essa matriz possui um papel bioativo na regulação celular, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função. As principais macromoléculas presentes nessa matriz são de natureza proteica: parte dessa matriz (34%) é constituída de proteínas colágeno, principalmente os colágenos do tipo I e do tipo III, que formam uma rede de fibras que apoiam as células em uma arquitetura tecidual (Abrahamo *et alli*, 2006). O colágeno do tipo I pode estar envolvido na diferenciação de odontoblastos a partir de células mesenquimais enquanto que o colágeno do tipo III está relacionado com a maior elasticidade do tecido, propriedade necessária para o desenvolvimento dental. (Andujar *et alli*, 1988; Mao *et alli*, 1990). O colágeno tipo I é sintetizado por odontoblastos e por fibroblastos da polpa dental e o colágeno tipo III é sintetizado somente por fibroblastos (Huang *et alli*, 2006). Desse modo, a reprogramação das células da polpa dental a um estágio de células-tronco embrionárias deve envolver o silenciamento dos genes que codificam essas proteínas.

A literatura tem demonstrado que células diferenciadas, fibroblastos, por exemplo, podem ser reprogramadas a células-tronco pluripotentes, de forma similar ao encontrado em células-tronco embrionárias, por meio da transfecção, mediada por retrovírus, de cópias extras dos genes OCT-3/4, SOX-2, KLF-4 e c-Myc, genes cuja expressão está associada à pluripotência (Takahashi *et alli*, 2007). Dessa forma, as células com pluripotência induzida têm a habilidade de auto renovação e formação de derivados das três camadas embrionárias,

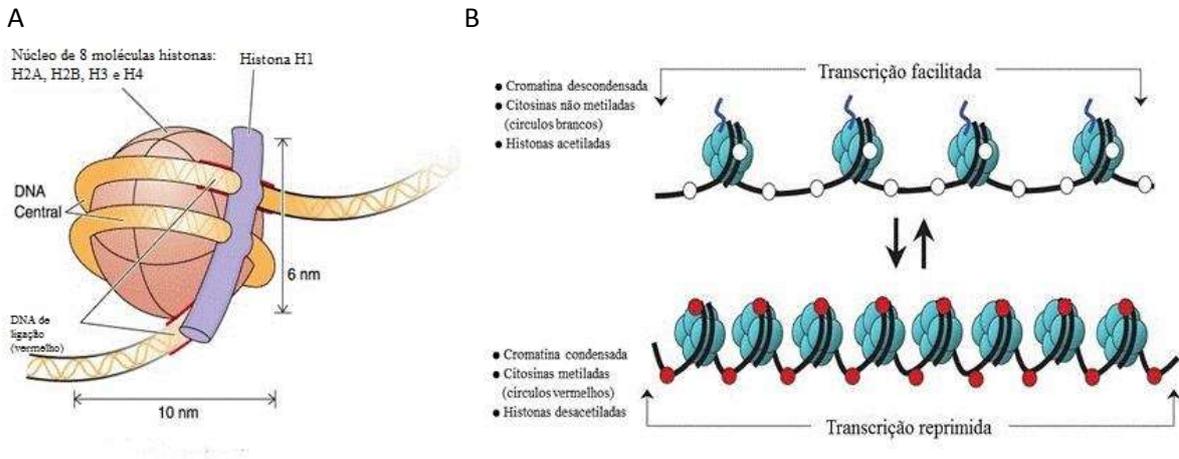
com exceção dos tecidos extraembrionários e por isso são denominadas de pluripotentes (Drews *et alli*, 2012) e quando são implantadas em camundongos produzem teratomas (Takahashi *et alli*, 2007).

Entretanto, a transfecção de genes mediada por retrovírus tem potencial restrito para uso em terapias humanas, pois além da inserção do gene de interesse, pode ocorrer também à inserção de genes virais nas células humanas, o que pode alterar a expressão de genes do receptor. Assim, diversos estudos têm sido desenvolvidos de modo a reverter essas células diferenciadas a um estado similar ao embrionário sem a transfecção de genes mediada por vírus. Em 2009, Page *et alli* demonstraram que a expressão dos genes OCT-4, SOX-2 e NANOG, que estão reprimidos nas células diferenciadas, pôde ser induzida pela diminuição da quantidade de oxigênio a que as células eram expostas e pela adição ao meio de cultura de uma proteína vital para a manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias – o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2). Okita *et alli* (2008) conseguiram por meio da transfecção de três plasmídeos, contendo os DNAs complementares (cDNAs) dos genes OCT3/4, SOX 2 e Klf 4, transformar fibroblastos de camundongos em células-tronco pluripotentes. Essas células pluripotentes não apresentaram indícios de integração do plasmídeo em seu genoma e quando implantadas em camundongos formaram teratomas. Essas células reprogramadas a um estado similar ao embrionário são denominadas de células-tronco de pluripotência induzida – iPSCs.

Ainda que células-tronco de pluripotência induzida possam ser geradas de forma reprodutível, a eficiência do processo é muito baixa, normalmente menos de 1% dos fibroblastos transfectados se tornam iPSCs. Por isso, vários métodos vêm tentando, não só produzir essas células de forma mais segura, mas também aumentar sua eficiência. (Hirai *et alli*, 2011). Nesse contexto, o restabelecimento da pluripotência de células diferenciadas de polpa dental, hígida ou inflamada, poderia também ser induzido por alterações na expressão de genes envolvidos na pluripotência celular sem a modificação da sequência do DNA, ou seja, por meio de mecanismos epigenéticos. Vale lembrar que, alterações epigenéticas podem alterar a expressão gênica, sem alterar a sequência de DNA e essas alterações são mitótica e/ou meioticamente herdadas. Segundo Collas (2009), a expressão gênica regulada por processos epigenéticos confere uma conformação específica à cromatina nas regiões codantes e regulatórias de genes.

No núcleo interfásico das células de polpa dental, assim como no de quase todas as células de eucariotos, as moléculas de DNA estão fortemente associadas a proteínas básicas,

principalmente histonas, H1 H2A, H2B, H3 e H4. Essa associação do DNA a proteínas histônicas forma os nucleossomos, o primeiro nível de organização da cromatina, Figura 3A.



**Figura 3.** Representação esquemática de um nucleossomo e da cromatina. (A) Cada nucleossomo é constituído por um eixo de quatro tipos de histonas, duas cópias de cada, H2A, H2B, H3 e H4, dois giros de DNA e uma molécula H1 localizada fora do filamento de DNA. (B) A interação das histonas com o DNA pode ser diminuída pela acetilação de histonas (linha azul) ou desmetilação de citosinas. [www.colby.edu/.../blumberg-colby-keynote](http://www.colby.edu/.../blumberg-colby-keynote), com adaptações.

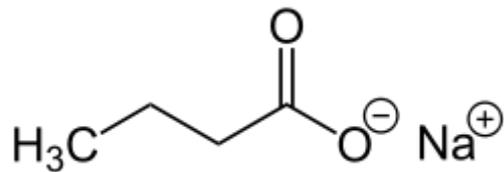
Cada nucleossomo consiste de um eixo de quatro tipos de histonas, duas cópias de cada de histonas, H2A, H2B, H3 e H4, e dois giros de DNA, com cerca de 200 pares de bases, ao redor do eixo de histonas. A histona H1 faz a ligação cruzada com a molécula de DNA. Dependendo da intensidade da interação do DNA com as proteínas que compõem o nucleossomo, a expressão gênica pode ser facilitada ou reprimida. Assim, o controle transcricional, que depende da acessibilidade dos fatores de transcrição e da enzima RNA polimerase ao DNA, pode ser regulado por modificações epigenéticas, tais como: a acetilação de proteínas histônicas (Narlikar *et alli*, 2002) e a metilação de DNA (Phillips, 2008), Figura 3B.

A acetilação das proteínas histônicas ocorre nos resíduos de lisina da porção N-terminal e é catalisada por enzimas com atividade histona acetiltransferase, as HAT, e a desacetilação é catalisada por enzimas com atividade histona desacetilase, as HDAC. (Alberts *et alli*, 2002). A acetilação de histonas neutraliza a carga positiva dessas proteínas, diminuindo a sua interação com o DNA, o que promove à cromatina uma conformação menos compactada, facilitando, assim, o acesso dos fatores de transcrição e da enzima RNA polimerase ao DNA. Inversamente, a desacetilação das histonas, pelas HDAC, possibilita maior interação dessas com o DNA, o que promove à cromatina uma conformação mais compacta, dificultando o acesso dos fatores de transcrição e da enzima RNA polimerase, e, consequentemente, a transcrição gênica.

Já a metilação do DNA envolve, por meio da ação de enzimas DNA metiltransferases, DNMTs, a adição de um grupo metil ao quinto carbono do anel do núcleo de bases citosinas, quase que exclusivamente nas que são seguidas imediatamente por uma base guanina, os dinucleotídeos CpG - citosina e guanina separadas por um fosfato (Gruenbaum *et alli*, 1981). A presença de 5-metil citosina, geralmente favorece o silenciamento gênico, pois previne a ligação de fatores de transcrição e promove o recrutamento de proteínas repressoras (Silva, 2011). A maior parte do genoma mostra uma clara depleção dos dinucleotídeos CpG, e os que estão presentes estão quase sempre metilados. Em contraste, pequenas porções de DNA, chamadas ilhas CpG, são comparativamente ricas em nucleotídeos CpG e quase sempre estão livres de metilação. Em humanos, as ilhas CpG estão frequentemente localizadas na região promotora dos genes e a metilação de bases dentro dessas ilhas está associada à inativação da transcrição do gene correspondente; em células normais, por exemplo, as ilhas CpG dos promotores de genes supressores de tumor não são metiladas, mas em células neoplásicas estão hipermetiladas, levando a supressão da expressão desses genes (Lima *et alli*, 2008). Embora, o mecanismo molecular responsável pela manutenção do estado de metilação livre das ilhas CpG ainda seja desconhecido, em células embrionárias parece servir como local de ligação de proteínas específicas que impedem a metilação *de novo*.

Estudos *in vitro* mostram que a diferenciação de células-tronco embrionárias e de células de carcinoma embrionário está correlacionada com a metilação do DNA em regiões promotoras de genes de pluripotência, tais como o OCT-4 e o NANOG (Deb-Rinker *et alli*, 2005; Dahl & Collas, 2007; Freberg *et alli*, 2007).

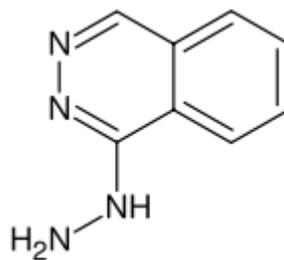
A ação das enzimas que desacetilam histonas ou metilam o DNA pode ser inibida ou estimulada por algumas substâncias. Dentre as substâncias capazes de inibir a ação das enzimas com atividade Histona Desacetilase, ou seja, que favorecem a expressão gênica situa-se o butirato de sódio, um ácido graxo de cadeia curta que é produzido por bactérias anaeróbicas na fermentação de fibras dietéticas (Davie, 2003). O butirato de sódio, que tem como fórmula molecular  $C_4H_7O_2Na$  (Figura 4), é um sal derivado do ácido butírico e que, portanto funciona e atua como um acidificante. O butirato de sódio inibe a maioria das classes de enzimas com atividade Histona Desacetilase, inibindo a classe I de HDACs (HDAC-1; HDAC-2; HDAC-3; HDAC-8) e a classe III, membros da família de proteínas sirtuínas, (SIRT1; SIRT2; SIRT3; SIRT4; SIRT5; SIRT6 e SIRT7).



**Figura 4.** Estrutura molecular do butirato de sódio.

Kobori e colaboradores (2010) demonstraram que a hiperacetilação de histonas induzida pelo butirato de sódio em células epiteliais aumenta a expressão da interleucina 32 $\alpha$ . O butirato de sódio também foi capaz de induzir a regressão de células-tronco embrionárias humanas a um estágio mais indiferenciado, antes da inativação de um dos cromossomos X (Ware *et alli*, 2009). Outro efeito do butirato de sódio foi demonstrado por Mali e colaboradores em 2010. Esses autores mostraram a capacidade do butirato de sódio em facilitar a geração de colônias de células iPS, sugerindo que alterações epigenéticas são importantes no estabelecimento da pluripotência.

Como citado anteriormente, a regulação epigenética ocorre também por meio de alterações na metilação do DNA, que podem ser induzidas ou inibidas por drogas. Nesse caso, a inibição da metilação do DNA ocorre por meio da inibição da atividade de DNMTs. Uma das drogas que inibe a ação de DNMTs é a hidralazina (Figura 5) um vasodilatador comumente utilizado como anti-hipertensivo gestacional.



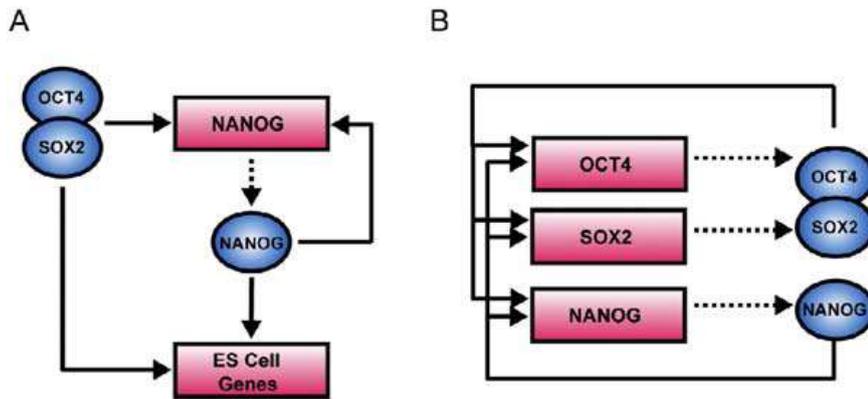
**Figura 5.** Estrutura molecular da hidralazina.

A hidralazina atua diretamente na musculatura lisa de células da parede de artérias e arteríolas, com leve efeito sobre as veias (Herting & Hunter, 1967; Klein *et alli*, 2003). O seu mecanismo de ação parece estar relacionado ao fato de esse fármaco ativar a enzima guanilato ciclase, que, por sua vez, induz um aumento dos níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que inibe a entrada de cálcio na célula muscular lisa. Desse modo não ocorre a fosforilação da cadeia leve de miosina (Rang *et alli*, 1999; Ellershaw & Gurney, 2001), que é cálcio dependente. A miosina desfosforilada não pode, então, se unir aos filamentos de actina para produzir contração celular. Os níveis máximos de concentração plasmática de hidralazina

são atingidos cerca de 60 minutos após a ingestão (Ludden *et alli.*, 1982). O efeito hipotensor máximo ocorre 2-4 horas após a ingestão e pode persistir por até 24 horas (Barker, 1995). Sua eliminação ocorre principalmente através da urina, pela qual cerca de 70% da dose total é excretada em 24 horas (<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/hydral.htm>).

A capacidade da hidralazina de inibir a metilação do DNA foi descoberta após estudos realizados para elucidar o modo como essa droga era capaz de induzir uma síndrome similar à síndrome de Lúpus, concomitantemente a outros estudos que demonstraram que essa síndrome ocorria devido a uma desordem na metilação de DNA (Arce *et alli.*, 2006); quinze por cento dos pacientes que tomam 400 mg ou mais de hidralazina diariamente apresentam essa síndrome (<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/hydral.htm>). Nesses pacientes a hidralazina parece inibir a metilação do DNA em linfócitos T; possivelmente essa inibição da metilação do DNA induza a auto-reatividade de linfócitos T, levando, assim à doença. A hidralazina foi capaz também de desmetilar e favorecer a expressão de genes supressores de tumor em células neoplásicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Segura-Pacheco *et alli.*, 2003). A atividade da hidralazina pode ser explicada pela interação entre seus átomos de nitrogênio e os resíduos dos aminoácidos lisina162 e arginina 240 no sítio ativo da DNA metiltransferase 1 (DNMT-1) (Singh *et alli.*, 2009). Além disso, a hidralazina também tem mostrado diminuir a expressão da enzima DNA metiltransferase 1, resultado demonstrado em células Jurkat, por Cruz-Hernandez e colaboradores (2011). Essa alteração, induzida pela hidralazina, tanto na expressão quanto na atividade da enzima DNMT-1, altera o estado da cromatina como um todo, não de forma específica, mas de forma aleatória podendo alterar a expressão de genes.

O silenciamento de genes de pluripotência celular é um mecanismo importante para a diferenciação celular. A partir do momento que a especificação celular tem início, esses mesmos genes, conhecidos como marcadores de pluripotência, tornam-se silenciados (Stewart *et alli.*, 2008). Entre os genes marcadores de pluripotência, devido à sua ativação em células indiferenciadas, estão os genes NANOG, OCT-4 e SOX-2, Figura 6, pois as proteínas codificadas por esses genes exercem um papel essencial e coordenado na repressão da expressão de genes promotores dos processos de diferenciação celular (Nichols *et alli.*, 1998; Niwa *et alli.*, 2000; Chambers *et alli.*, 2003; Mitsui *et alli.*, 2003; Boyer *et alli.*, 2005; Takahashi *et alli.*, 2007).



**Figura 6.** Regulação transcricional em células-tronco embrionárias humanas. A) Exemplo de Circuito Regulatório Transcricional de alimentação direta. Reguladores são representados em círculos azuis; promotores de genes são representados em retângulos vermelhos. A ligação de um promotor gênico é indicada por uma seta. Genes que codificam reguladores são ligados por setas não contínuas aos seus respectivos reguladores. B) O *loop* regulatório interconectado formado por OCT-4, SOX-2 e NANOG (Boyer *et alli*, 2005).

Os fatores de transcrição NANOG, OCT-4 e SOX-2 parecem ser centrais à hierarquia regulatória de transcrição que determina a identidade de uma célula-tronco embrionária. Isso é devido aos seus padrões de expressões únicos e seus papéis essenciais durante o desenvolvimento inicial do embrião.

O gene NANOG está situado no braço curto do cromossomo 12, na região 13.31 e codifica uma proteína de 34,6 kDa, com 305 resíduos de aminoácidos, que atua principalmente mantendo a capacidade de auto-renovação das células e o seu estado indiferenciado (Darr *et alli*, 2006). As células-tronco embrionárias NANOG negativas têm capacidade reduzida de auto-renovação, o que está correlacionado com uma tendência a se diferenciarem, enquanto que as células que expressam constitutivamente níveis elevados de NANOG são, aparentemente, resistentes aos estímulos para diferenciação (Zaehres *et alli*, 2005; Fischer *et alli*, 2010).

O gene OCT-4, expresso na fase de blastocisto e nas células germinativas, codifica uma proteína de 360 aminoácidos. Essa proteína é um fator de transcrição da família dos fatores de transcrição POU. A proteína OCT-4 depende de dois domínios de transativação no DNA para exercer suas atividades de transcrição (Pan *et alli*, 2002). Depois de sintetizada é transportada para o núcleo por meio do sinal de localização nuclear, NLS (*nuclear localization signal*) (Pan *et alli*, 2004). O NLS do OCT-4 é necessário para a sua atividade como fator de transcrição, sem o qual ocorre diferenciação das células-tronco embrionárias. Durante o desenvolvimento embrionário, o gene OCT-4 é expresso em todos os blastômeros. Em seguida, sua expressão fica restrita à camada interna de células do blastocisto, e fica

reprimida no trofoderma e na endoderme primitiva. A ativação do gene OCT-4 é importante na formação da mórula e do trofoectoderma e no estágio de pré-implantação, com formação do epiblasto pluripotente e do ectoderma primitivo (Alberio *et alli*, 2006). Células-tronco embrionárias humanas que possuem desligamento específico do gene OCT-4 se diferenciam, mesmo estando em condições que promovem a auto-renovação, sugerindo que OCT-4 é necessário para a manutenção da pluripotência (Zaehres *et alli*, 2005). Uma análise quantitativa da expressão de OCT-4 revelou que uma alta expressão de OCT-4 leva as células-tronco embrionárias a linhagens mesodérmicas ou endodérmicas extra-embrionárias, enquanto que células com baixos níveis de OCT-4 tornam-se células do trofoderma e células com nível normal de OCT-4 permanecem em um estado de pluripotência. (Niwa *et alli*, 2000). Vale ressaltar que, a proteína OCT-4 não é necessária para a expressão do gene NANOG, porém a proteína NANOG não exerce a sua função na ausência da proteína OCT-4.

O gene SOX-2 pertence a uma família de fatores de transcrição que são cruciais no desenvolvimento embrionário e na organogênese de vários tecidos. A expressão desses fatores obedece a um padrão espaço-temporal. Por exemplo, a superexpressão de SOX-2 em células-tronco neurais em camundongos bloqueia a sua diferenciação e, inversamente a sua depleção nessas células causa a sua saída prematura do ciclo celular e, conseqüentemente, a sua diferenciação em neurônios (Graham *et alli*, 2003; Dong *et alli*, 2004). Já no intestino primitivo, SOX-2 é um regulador chave do desenvolvimento embrionário e sua expressão é encontrada em todas as células da endoderme que formam o intestino primitivo não dividido. Também durante a formação de brônquios, no desenvolvimento do pulmão, a expressão de SOX-2 é precisamente regulada e uma superexpressão forçada de SOX-2 leva a um bloqueio da ramificação das vias aéreas.

As proteínas codificadas pelos genes NANOG, OCT-4 e SOX-2 atuam de forma bastante interessante. Elas formam um circuito auto-regulador interligado, tendo como alvo tanto os seus próprios promotores como os de cada um dos outros (Figura 6). Quando em quantidades balanceadas, OCT-4, SOX-2 e NANOG agem em parceria, ligando especificamente uma série de genes que instruem a célula a se manter dividindo, além de ativar genes de diferentes vias importantes para a diferenciação celular. Dessa forma, esses fatores de transcrição formam um sistema de retroalimentação capaz de manter sempre os níveis proteicos na quantidade desejada, contribuindo assim para a manutenção estável de pluripotência.

Um estudo realizado em células-tronco embrionárias humanas (hESC) mostrou que aproximadamente metade das regiões promotoras ocupadas pelo regulador de células-tronco OCT-4 também são ocupadas pelo regulador SOX-2 (Boyer *et alli*, 2005). Além disso, mais de 90% dessas regiões promotoras também é ocupada pelo regulador de células-tronco NANOG. Esses três fatores de transcrição ocupam pelo menos 353 genes em hESC, que são regulados por meio de alças de alimentação direta. Os dados desse estudo sugerem que os genes OCT-4, SOX-2 e NANOG contribuem para a pluripotência e auto renovação celular ativando seus próprios genes e genes que são componentes chave das principais vias de sinalização de hESC, como na via do Tgf- $\beta$  e do Wnt. Além disso, eles atuam como repressores de genes que são fundamentais para os processos de desenvolvimento embrionário, como os genes ESX11, HOXB1, MEIS1, PAX6, LHX5, LBX1, MYF5 e ONECUT1, esses genes codificam fatores de transcrição que são importantes para a diferenciação de linhagens de origem extra-embriônica, endodérmica, mesodérmica e exodérmica. Ainda não é claro como eles podem ativar alguns genes e reprimir a expressão de outros. É possível que a atividade desses fatores de transcrição chaves seja controlada por outros cofatores, a partir de níveis precisos de OCT-4, SOX-2 e NANOG, e por meio de modificações feitas após a tradução.

Considerando que a manutenção do estado indiferenciado de uma célula deve-se a uma rede complexa de sinalização, cujo núcleo central pode ser reduzido a três genes que codificam fatores de transcrição - NANOG, OCT-4 e SOX-2 - é plausível supor que a reprogramação de células diferenciadas ao estado indiferenciado poderia ser alcançada por meio da ativação desses fatores de pluripotência utilizando-se substâncias capazes de desmetilar o DNA ou acetilar proteínas histônicas como a hidralazina e o butirato de sódio, respectivamente. Além disso, as alterações epigenéticas induzidas por essas drogas poderiam também afetar a expressão de genes cujos produtos estão normalmente expressos na polpa dental, como o colágeno do tipo I e III.

## **2.Objetivos**

Diante do exposto acima, o objetivo geral deste estudo consistiu em analisar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio na reprogramação de células de polpa dental humana hígida e inflamada.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- determinar a concentração máxima da hidralazina e do butirato de sódio que as células de polpa dental humana hígida e inflamada em cultura conseguem suportar sem o comprometimento de sua viabilidade.
- avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a morfologia de células de polpa dental humana hígida e inflamada
- avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão de genes relacionados à pluripotência – SOX2, OCT-4 e NANOG – em células da polpa dental humana hígida e inflamada.
- avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão de genes normalmente expressos na polpa dental, como o Colágeno tipo I e o tipo III.

### 3.1. Obtenção das células de polpa dental

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

As culturas de polpas dentais utilizadas neste estudo foram cedidas e estabelecidas pela odontóloga Dra. Luciana Oliveira Pereira conforme descrito por Gronthos e colaboradores (2000). A diferenciação entre polpa dental hígida e inflamada também foi determinada pela Dra. Luciana Oliveira Pereira. Dentes hígidos foram considerados aqueles que se apresentavam assintomáticos, com superfície íntegra e vitalidade pulpar e que não apresentavam lesões de cárie, erosão, abrasão nem fratura. Os dentes com pulpite irreversível incluídos neste estudo apresentavam vitalidade pulpar e dor espontânea associada à extensa lesão de cárie (Pereira, 2012).

As células pulpares utilizadas neste estudo foram obtidas de polpas dentais hígidas e inflamadas de 11 indivíduos, cujas características estão ilustradas na Tabela I.

**Tabela I** – Características da população doadora do tecido pulpar

<b>Indivíduo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Dente</b>	<b>Forma de coleta</b>	<b>Tecido</b>
PN-1	Feminino	30	38	Dente extraído	Polpa hígida
PN-2	Feminino	17	28	Dente extraído	Polpa hígida
PN-3	Feminino	21	18	Dente extraído	Polpa hígida
PN-4	Feminino	17	28	Dente extraído	Polpa hígida
PN-5	Feminino	27	48	Dente extraído	Polpa hígida
PN-6	Feminino	20	18	Dente extraído	Polpa hígida
PI-1	Masculino	10	46	Dente extraído	Polpa inflamada
PI-2	Feminino	26	38	Pulpectomia	Polpa inflamada
PI-3	Feminino	26	26	Pulpectomia	Polpa inflamada
PI-4	Feminino	42	45	Pulpectomia	Polpa inflamada
PI-5	Feminino	38	13	Dente extraído	Polpa inflamada

### 3.2 Manutenção e propagação das células de polpa dental

As culturas de células eram mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles Medium* com baixo teor de glicose (DMEM) (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO-BRL), penicilina (100µg/mL) (GIBCO-BRL) e estreptomicina (100µg/mL) (GIBCO-BRL). O meio de cultura era trocado a cada dois ou três dias. Para estabelecimento de subculturas as células

eram desprendidas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA (GIBCO-BRL) a 37 °C. Após três minutos, a suspensão de células era transferida para um tubo de centrifuga contendo meio de cultura com SFB para inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada a 750 g por 5 minutos.

### **3.3 Ensaio de viabilidade celular**

#### **3.3.1 Análise do metabolismo celular**

De modo a determinar as concentrações de hidralazina e de Butirato de sódio a serem administradas às culturas para a realização dos ensaios biológicos, foram realizados, em quintuplicata, testes de viabilidade celular por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio, ensaio de MTT. O ensaio de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que avalia a metabolização celular e, assim a viabilidade e a proliferação celular (Mosmann, 1983). Esse ensaio tem como base a capacidade das enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), MTT, em um composto conhecido como formazan. Assim a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, e por isso, esse ensaio é frequentemente utilizado para avaliar a citotoxicidade induzida por diferentes estímulos. Para a realização deste ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços nas quais em cada poço eram semeadas  $5 \times 10^3$  células de cada paciente e incubadas nas mesmas condições descritas na secção 3.1.

Após 24 horas, foram adicionadas às culturas hidralazina ou butirato de sódio diluído sem água nanopura em diferentes concentrações conforme ilustrado na Tabela II. Vale ressaltar que, todos os tratamentos, inclusive o controle negativo, receberam a mesma quantidade de meio de cultura e que as diluições das drogas eram realizadas minutos antes das mesmas serem adicionadas às culturas.

**Tabela II.** Tratamentos administrados às células de polpa dental humana, hígida e inflamada, para definir a concentração máxima das drogas que as células conseguem suportar sem o comprometimento de sua viabilidade.

<b>Tratamento</b>	<b>Concentração</b>
Sem tratamento	-
butirato de sódio	20 mM
butirato de sódio	10 mM
butirato de sódio	2 mM
butirato de sódio	1 mM
hidralazina	60 µM
hidralazina	30 µM
hidralazina	15 µM
hidralazina	7,5 µM

Após 48 horas de tratamento, o meio de cultura foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) diluído em meio de cultura suplementado. As células foram então incubadas 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade por três horas. Em seguida, retirou-se a solução de MTT e foram adicionados 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich Co., EUA) em cada poço que continha as células para a solubilização dos cristais de formazan. Os cristais de formazan foram, então, quantificados em espectrofotômetro (Bio-Rad, model 3550-UV) no comprimento de onda de 595 nm.

### **3.3.2 Ensaio de citotoxicidade por meio da coloração com Azul de Tripano**

Com o intuito de confirmar os dados obtidos no ensaio do MTT, células de polpa dentais humanas tratadas com hidralazina e butirato de sódio foram coradas com Azul de Tripano e analisadas ao microscópio de luz. Vale lembrar, que o corante Azul de Tripano só penetra em células cuja integridade da membrana celular foi perdida. Assim células não viáveis se coram e células viáveis permanecem transparentes.

Para esse ensaio, células de polpa dental hígida e inflamada foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo em cada poço  $4 \times 10^4$  células. Após 24 horas, tempo para a adesão celular, foi adicionado ao meio de cultura butirato de sódio (10 mM) e hidralazina (30 µM) e o novo meio de cultura para o controle, que não possui nenhum tratamento. Após 48 horas, o meio de cultura foi retirado e separado em eppendorf de 1,5 mL, dessa forma, qualquer célula que tenha perdido sua viabilidade e adesão durante o tratamento não iria ser descartada, mas seria contada no teste. Em cada poço foi adicionado 0,5 mL de solução de tripsina-EDTA (GIBCO-BRL) por três minutos e essa solução foi então ressuspensa no

poço e então colocada no eppendorf onde havia sido colocado o correspondente sobrenadante. Cada eppendorf foi então centrifugado a 2000 rpm ou 1380 g por cinco minutos a temperatura de 10 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de PBS. Vinte microlitros (20 µL) dessa solução foram então ressuspensionados em novo eppendorf com 80 µL de Azul de Tripiano (Merck) (0,4% em PBS). Dez microlitros (10 µL) dessa solução de células com o corante Azul de Tripiano foi colocado em câmara de Neubauer para que fossem contadas as células viáveis e as células não viáveis. Este ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.3.3 Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de MTT e Azul de Tripiano foram realizadas utilizando-se o programa SPSS (IBM) versão 17.0. Considerando que o objetivo foi comparar o efeito das drogas nas diferentes concentrações em relação ao grupo controle por paciente, os resultados obtidos para cada indivíduo nos ensaios de viabilidade celular foram isoladamente submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos foi aplicado o teste de Dunnet, sendo o nível de significância adotado de  $p < 0,05$ .

### **3.4 Análise da morfologia celular**

Para avaliar se o tratamento com butirato de sódio e com a hidralazina, apesar de não alterar a viabilidade celular, altera ou não a morfologia de células de polpa dental hígida e inflamada foi realizado um ensaio em que as células tinham a sua morfologia analisada em microscopia de luz e em citometria de fluxo.

#### **3.4.1 Análise morfológica das células de polpa dental hígida e inflamada ao microscópio de luz**

Para a análise da morfologia por microscopia de luz, células de polpa dental hígida e inflamada foram semeadas em microplacas de 12 poços contendo em cada poço  $10^4$  células. Após 24 horas, tempo necessário para a adesão celular, adicionado às culturas, butirato de sódio (10 mM) e hidralazina (30 µM). Para o grupo controle o meio de cultura foi apenas renovado, sem a adição de qualquer tratamento. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 48 horas na presença dos respectivos tratamentos, o meio de cultura contendo as drogas foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS e então fixadas e coradas utilizando-se o kit *Instant Prov* (NEWPROV) conforme as recomendações do fabricante. Uma vez coradas, as células foram lavadas com PBS e imediatamente fotografadas ao microscópio de luz (Axiovert 100, Zeiss).

#### **3.4.2.1 Análise da morfologia das células de polpa dental hígida e inflamada por meio de citometria de fluxo**

Neste ensaio, a análise da morfologia celular foi realizada considerando parâmetros tais como o tamanho e a granulosidade das células, uma vez que, a citometria de fluxo permite determinar a dispersão frontal da luz, FSC, que é diretamente proporcional ao tamanho das células, além de permitir determinar a dispersão lateral da luz, SSC, que é proporcional à complexidade, granulosidade das células.

Para a avaliação dos parâmetros SSC e FSC, células de polpa dental hígida e inflamada foram semeadas em microplacas de 12 poços contendo  $4 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas, tempo necessário para a adesão celular, adicionado às culturas, butirato de sódio (10 mM) e hidralazina (30  $\mu$ M). No grupo controle, o meio de cultura foi apenas renovado, sem a adição de qualquer tratamento. Após 48 horas de tratamento, todas as células aderidas e em suspensão foram coletadas, centrifugadas à 2000 rpm ou 1380xg por cinco minutos a temperatura de 10 °C e ressuspensas em 1000  $\mu$ L de PBS. Quinze mil eventos, por amostra, foram então analisadas em citômetro de fluxo, Cyflow Space (Partec Germany), quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) no comprimento de onda de 488 nm. Os resultados obtidos foram capturados pelo software FloMax 2.4 e analisados pelo software FlowJo Versão 10.0.6. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.4.2.2 Análise Estatística**

Os dados obtidos análise da morfologia das células de polpa dental hígida e inflamada por meio de citometria de fluxo foram submetidos à análise comparação de populações pelo software FlowJo Versão 10.0.6. o teste aplicado foi o teste do qui-quadrado sendo o nível de significância adotado de  $p < 0,01$ .

### 3.5 Análise da expressão diferencial de genes em células de polpa dental humana hígida e inflamada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

O efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão de genes relacionados à pluripotência em células de polpa dental humana, hígida e inflamada, foi determinado por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, qRT-PCR. Para a realização desse ensaio, células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e cultivadas conforme descrito no sub-item 3.1. Após 24 horas de cultivo foi adicionado ao meio de cultura hidralazina ou butirato de sódio em diferentes concentrações, conforme ilustrado na Tabela III, concentrações essas definidas a partir dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela III.** Tratamentos administrados às células de polpa dental humana, hígida e inflamada, para avaliar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão de genes relacionados à pluripotência e normalmente expressos na polpa dental.

Tecido	Indivíduo	Sexo	Idade	Tratamento	
				butirato de sódio (mM)	hidralazina (µM)
Polpa hígida	PN-1	F	30	10	30
Polpa hígida	PN-2	F	17	10	30
Polpa hígida	PN-3	F	21	10	30
Polpa inflamada	PI-1	M	10	10	30
Polpa inflamada	PI-2	F	26	10	30
Polpa inflamada	PI-3	F	26	10	30

#### 3.5.1 Extração de RNA

Após 48 horas de exposição à hidralazina ou ao butirato de sódio, o RNA total das células foi extraído utilizando-se o método do reagente Trizol (Invitrogen, Carsbad, CA, USA), conforme instrução do fabricante. Em seguida, foram adicionados aos lisados celulares 200 µL de clorofórmio. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de isopropanol e, após dez minutos à temperatura ambiente, a solução foi incubada a -20 °C. Depois de dois dias, de modo a aumentar o rendimento da precipitação do RNA, a solução foi centrifugada a 12.000 g por dez minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com etanol 75% e então submetido a um novo ciclo de centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então removido e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois ressuscitado em 40 µL de água nanopura. Após esse procedimento, a

integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em condição livre de RNase e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoVue Plus ®- GE Healthcare).

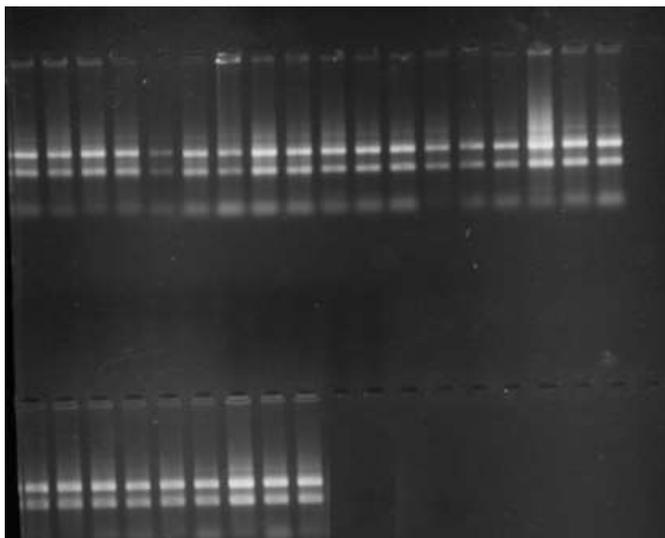
### **3.5.2 Tratamento do RNA com DNase**

Este ensaio foi realizado para eliminação de qualquer traço residual de DNA genômico das amostras. Desse modo, cinco microgramas do RNA total obtido de cada indivíduo foi tratado com a enzima DNase I livre de RNase (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Esse ensaio foi realizado a 37 °C, utilizando-se dez µL de tampão de reação 10X (Promega) e 5 U da enzima DNase I livre de RNase e água nanopura para um volume final de 100 µL. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL do tampão de parada (Promega) e as amostras foram então mantidas a 65° C por dez minutos.

Após a reação, o RNA foi precipitado adicionando-se 11 µL acetato de sódio 3M pH 5,2 e 302,5 µL de etanol 100% e incubado a - 20° C por pelo menos 24h. Após esse período, a suspensão foi novamente centrifugada a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. Depois disso o sedimento foi lavado com etanol 75%, 12.000 g por cinco minutos a 4°C, seco à temperatura ambiente por 30 min e ressuspendido em 20 µL de água nanopura. Após esse procedimento, a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em condição livre de RNase e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoVue Plus ®- GE Healthcare).

#### **3.5.2.1 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA extraído e tratado com DNase**

A verificação da integridade do RNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram avaliadas as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal, conforme exemplificado na Figura 7.



**Figura 7.** Imagem ilustrativa do perfil eletroforético em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) do RNA total extraído de células de polpa dental.

Além disso, foi realizada também a quantificação do RNA em espectrofotômetro nas absorvâncias 260/280, 260/230 (NanoVue Plus ®- GE Healthcare).

### **3.5.3 Síntese do DNA complementar**

Para a síntese do DNA complementar, cDNA, um micrograma de RNA total já tratado com a enzima DNase I foi utilizado para cada reação. A reação iniciou adicionando-se um microlitro de iniciador oligonucleotídeo (Technologies)<sub>20</sub> (Invitrogen) e água nanopura para um volume final de 13 µL. A solução foi incubada a 65 °C por dez minutos e logo em seguida, colocada no gelo. Após um minuto, foram adicionados quatro microlitros de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen); um microlitro de ditioneitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen); um microlitro de RNaseOUT<sup>®</sup> (Invitrogen) e 200 U da enzima transcriptase reversa (SuperScript<sup>®</sup> III, Invitrogen) incubando-se a 50 °C por 60 minutos. Após esse tempo, a solução foi mantida a 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima transcriptase reversa e conseqüente finalização da reação.

### **3.6 Desenho e validação dos *primers***

Os *primers* foram desenhados com base nas sequências de nucleotídeos representativas do mRNA existentes em banco de dados do NCBI (Information)

(www.ncbi.nlm.nih.gov). Os conjuntos de *primers* (universal e reverso), Tabela IV, apresentaram as características necessárias para a utilização no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System: *primers* com tamanho entre 17 a 23 pb, temperatura de anelamento entre 58 e 60 °C, percentagem de GC entre 55 a 77% e com fragmentos resultantes de tamanho variando entre 95 a 110 pb. Para o desenho dos *primers* foram utilizadas as seguintes ferramentas de bioinformática: Primer 3 (Primer) (<http://frodo.wi.mit.edu/>), Oligo Analiser versão 3.1 (Technologies) (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), Primer express (programa fornecido pelo fabricante do equipamento de qRT-PCR).

**Tabela IV.** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.

Tipo de Gene	Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento	
Gene constitutivo	β-actina*	Senso	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140
		Antissenso	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
Genes de pluripotência	OCT-4**	Senso	GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA	202
		Antissenso	TACAGAACCACACTCGGACCA	
	SOX-2	Senso	AAACAGCATGGAGAAAACCCG	104
		Antissenso	GATGGGATTGGTGTCTCTTTTG	
	NANOG	Senso	GAGCCTAATCAGCGAGGTTTCTT	103
		Antissenso	GACAGAGCAAGACTCCGTTTCA	
Genes expressos na Polpa	Colágeno tipo I (COL1A1)	Senso	CCCTCCTAGTCTGTCTGCGT	100
		Antissenso	TCTTTTGCTTCCTCCACCC	
	Colágeno tipo III (COL3A1)	Senso	CTGTTGGACCCAGTGGACCT	110
		Antissenso	GGAGCCCTCAGATCCTCTTTC	

\* (Vandesompele *et alii*, 2002); \*\* (Huang *et alii*, 2009)

De modo a verificar se os *primers* estariam amplificando eficientemente na região desejada da amostra e não em regiões inespecíficas, foi realizado um experimento de PCR qualitativa, onde todos os *primers* foram submetidos a diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, de dNTP, de enzima Taq polimerase e dos próprios *primers*, conforme ilustrado na Tabela V. Todas as reações foram feitas com o seu próprio controle negativo, sem DNA, o restante foi feito com 10 ng de DNA.

**Tabela V.** Concentração dos reagentes utilizados para avaliar a amplificação dos *primers* em PCR qualitativa em três reações independentes.

Reagentes	Reação 1 (µL)	Reação 2 (µL)	Reação 3 (µL)
Tampão 10x	2.5	2.5	2.5
dNTP (2,5 mM)	1.25	1.5	1.0
Oligonucleotídeo (F) (10µM)	0.5	1.0	1.0
Oligonucleotídeo (R) (10µM)	0.5	1.0	1.0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.25	0.75	0.38
Taq-Polimerase (5 U/µL)	0.5	0.3	0.3
H <sub>2</sub> O	14.5	13.95	14.82
Volume total da reação	25.0	25.0	25.0

As condições de termociclagem foram 50 °C por dois minutos, 95 °C por dois minutos e 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 segundos, seguida de 60 °C por 30 segundos, para a anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A temperatura de anelamento foi determinada a partir da temperatura de funcionamento do equipamento de PCR quantitativa em tempo real.

### 3.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Para analisar o efeito do butirato de sódio e da hidralazina na expressão de genes ligados à pluripotência e de genes que codificam proteínas fibrilares típicas de tecido pulpar foram realizados experimentos de PCR em tempo real utilizando-se o sistema de detecção por SYBR Green<sup>®</sup>, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em reações de 10 µL contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 5 µL de solução completa para PCR contendo SYBR FAST MASTERMIX (2X) (Kapa Biosystems) e 1 µl do cDNA sintetizado na reação descrita acima. Após a desnaturação inicial a 95 °C por 20 seg, as amplificações foram realizadas por 50 ciclos a 95 °C por 3 s e 60°C por 20 seg. A fim de confirmar a especificidade das amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à análise das respectivas curvas de desnaturação. O método de comparação do ciclo limiar (CT- “*cyclethreshold*”) (Livak e Schmittgen, 2001) foi empregado para a avaliação da variação da expressão dos genes que evidenciam a diferenciação, sendo utilizado o gene constitutivo β-actina para normalização. O CT é o número do ciclo no qual a quantidade do gene-alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida, definido pelo pesquisador. O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{\text{experimento}} - \Delta CT_{\text{controle}})$ , sendo que  $\Delta CT_{\text{experimento}} = CT$  do gene de interesse

no experimento – CT do gene constitutivo no experimento e  $\Delta CT_{\text{controle}} = CT$  do gene de interesse no controle – CT do gene constitutivo no controle. O valor calculado nesta equação corresponde à expressão gênica relativa de um gene-alvo numa condição experimental em relação a uma condição controle. Os experimentos foram realizados em duplicata para todos os genes analisados.

### **3.7.1 Análise Estatística**

Os dados obtidos da análise de expressão gênica foram submetidos análise de ao teste t pareado ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o programa GraphPad<sup>®</sup>. Os resultados dos experimentos de PCR em tempo real estão expressos como valores de expressão gênica relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) ( $\pm$  desvio padrão).

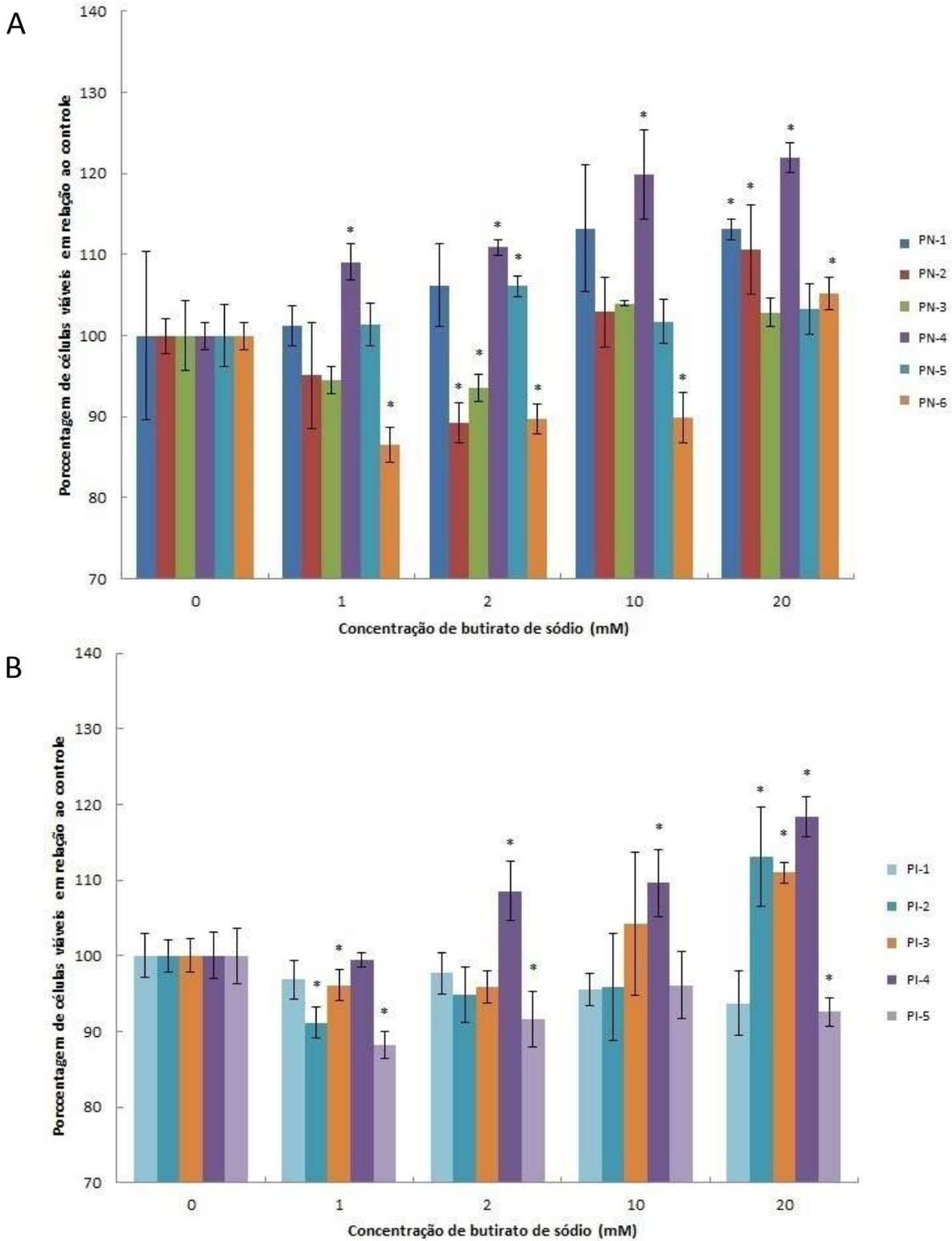
#### **4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

Para analisar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio na reprogramação de células de polpa dental humana hígida e inflamada fez-se necessário primeiramente determinar as concentrações de hidralazina e de butirato de sódio que as células conseguem suportar sem o comprometimento de sua viabilidade. Para tal realizaram-se ensaios MTT cujos resultados estão descritos a seguir.

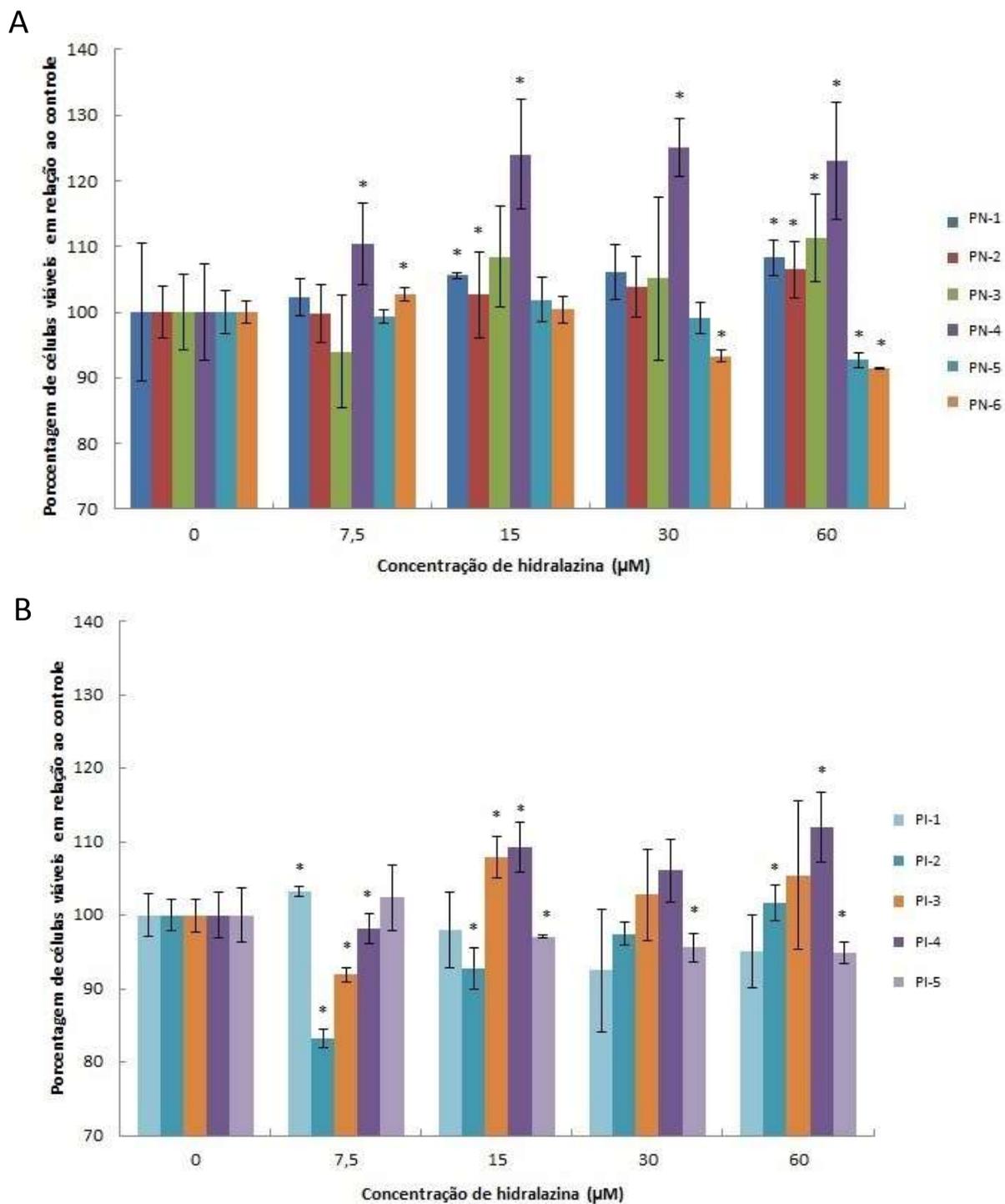
Como ilustra a Figura 8, as células de polpa dental hígida do paciente PN-1 mostraram-se sensíveis ao butirato de sódio na concentração de 20 mM e à hidralazina nas concentrações de 15 e 60  $\mu$ M. Já as células do paciente PN-2 mostraram-se sensíveis ao butirato de sódio na concentração de 2 mM e à hidralazina nas concentrações de 15 e 60  $\mu$ M. As células do paciente PN-3 mostraram-se sensíveis ao butirato de sódio nas concentrações de 2 e 20 mM e à hidralazina na concentração de 60  $\mu$ M.

A Figura 9 ilustra os resultados obtidos a partir de células de polpa inflamada. As células do paciente PI-1 não se mostraram sensíveis ao butirato de sódio em nenhuma das concentrações testadas, mas foram sensíveis à hidralazina na concentração de 7,5  $\mu$ M. As células do paciente PI-2 também se mostraram sensíveis ao butirato de sódio nas concentrações de 1 e 20 mM e à hidralazina nas concentrações de 7,5, 15 e 60  $\mu$ M. Já as células do paciente PI-3 mostraram-se sensíveis ao butirato de sódio nas concentrações de 1 e 20 mM e à hidralazina nas concentrações de 7,5; 15 e 60  $\mu$ M.

Com base nos resultados acima expostos, decidiu-se então utilizar somente as células de polpa dental hígida dos pacientes PN-1, PN-2, PN-3 e PN-5 e as de polpa inflamada dos pacientes PI-1, PI-2 e PI-3. Decidiu-se também que as células seriam expostas ao butirato de sódio e à hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente, pois essas foram as concentrações máximas dessas drogas que em 48 horas não alteraram a viabilidade das células. Depois dos ensaios de MTT as células do paciente PN-5 entraram em senescência replicativa e por isso foram excluídas da amostra.



**Figura 8.** Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do butirato de sódio em células de polpa dental hígida (A) e inflamada (B) por meio do ensaio de MTT. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio em diferentes concentrações. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. As barras de erros representam duas vezes o erro padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle.



**Figura 9.** Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da hidralazina em células de polpa dental hígida (A) e inflamada (B) por meio do ensaio de MTT. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de hidralazina em diferentes concentrações. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo. As barras de erros representam duas vezes o erro padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle.

As células de polpa hígida dos pacientes PN-4 e PN-6 e as de polpa inflamada dos pacientes PI-4 e PI-5 mostraram-se sensíveis a pelo menos uma das drogas, na concentração máxima escolhida e por isso foram eliminados da análise de expressão gênica, ou seja, não tiveram seu RNA total extraído.

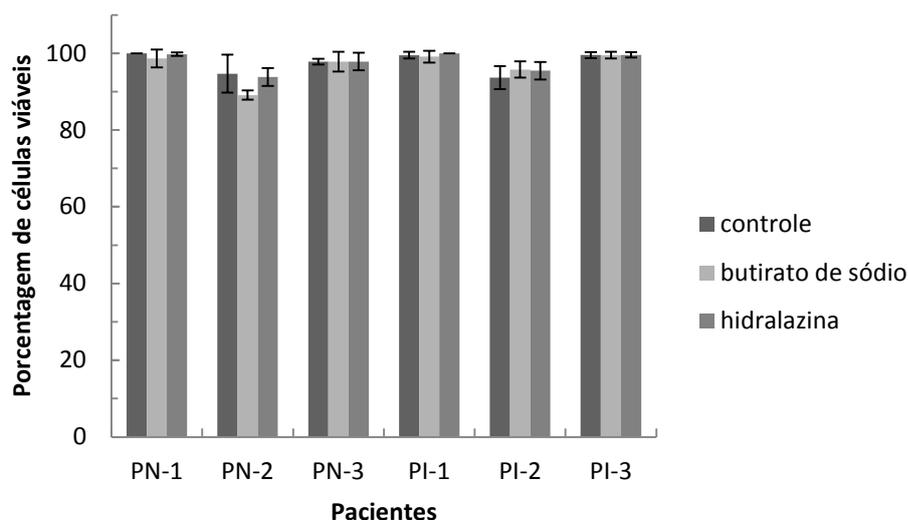
A Tabela VI resume as características dos pacientes cujas células foram utilizadas nos ensaios de morfologia e de expressão gênica.

**Tabela VI** – Características dos indivíduos cujas células pulpareas foram utilizados nos ensaios de morfologia e expressão gênica.

<b>Tecido</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>
Polpa hígida	PN-1	Feminino	30
Polpa hígida	PN-2	Feminino	17
Polpa hígida	PN-3	Feminino	21
Polpa inflamada	PI-1	Masculino	10
Polpa inflamada	PI-2	Feminino	26
Polpa inflamada	PI-3	Feminino	26

#### **4.2 Ensaio de viabilidade celular por corante vital Azul de Tripiano**

Para confirmar os resultados do Ensaio MTT, em que as células de polpa dental hígida dos pacientes PN-1, PN-2 e PN-3 e de polpa inflamada dos pacientes PI-1, PI-2 e PI-3, quando tratadas com butirato de sódio na concentração de 10 mM e com hidralazina na concentração de 30  $\mu$ M, não apresentaram diferenças significativas na taxa de viabilidade celular em relação ao seu próprio controle, foi realizado um novo teste de viabilidade celular por meio de coloração com Azul de Tripiano. Os resultados estão apresentados na Figura 10. Como se pode observar nessa figura, os dados obtidos neste ensaio confirmaram os obtidos por meio do ensaio do MTT, ou seja, o butirato de sódio na concentração de 10 mM e a hidralazina na concentração de 30  $\mu$ M não alteraram a taxa de viabilidade de células de polpa dental hígida dos pacientes PN-1, PN-2 e PN-3 e nem das células de polpa inflamada dos pacientes PI-1, PI-2 e PI-3.



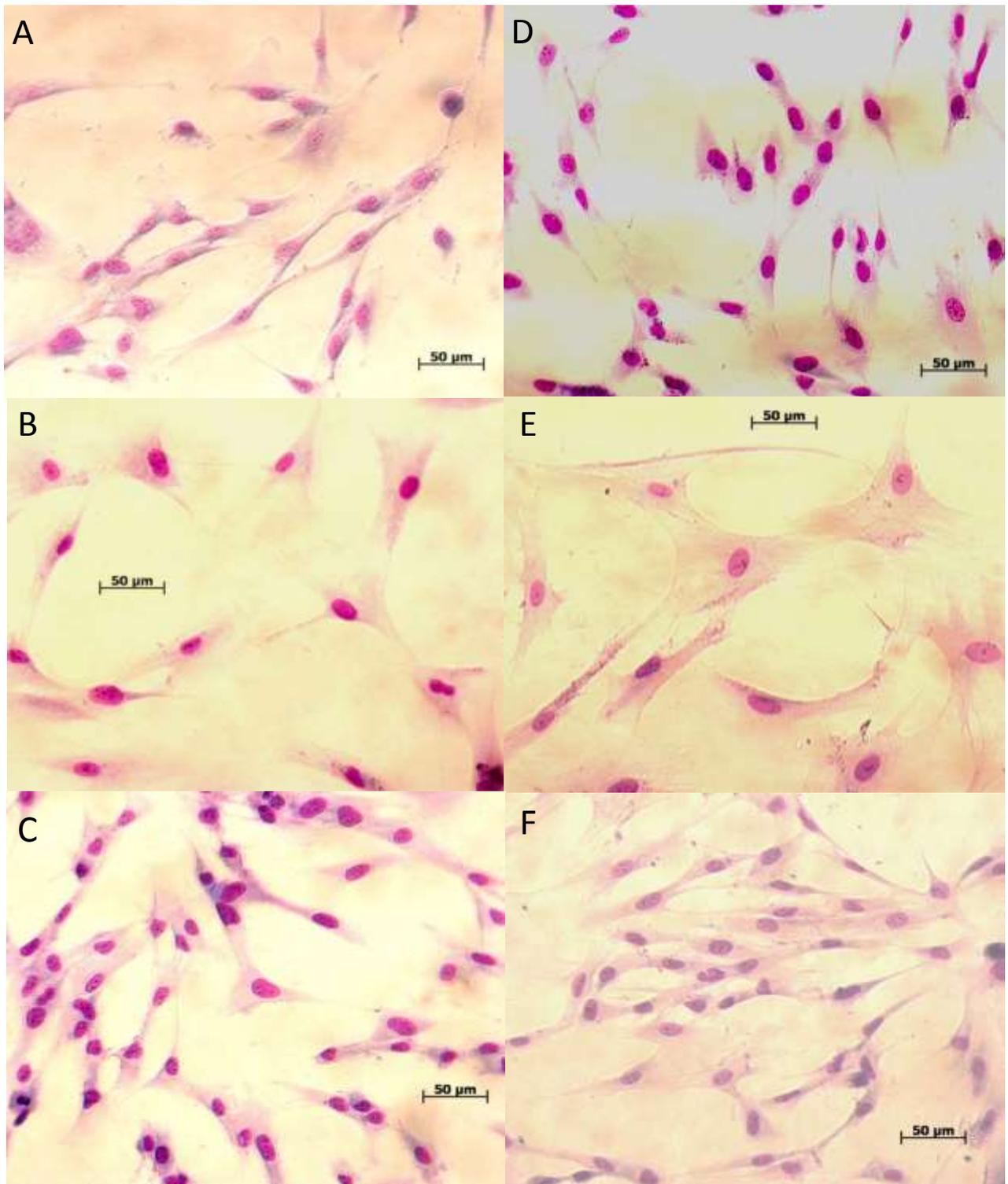
**Figura 10.** Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da hidralazina e do butirato de sódio em células de polpa dental hígida e inflamada por meio do ensaio de coloração com Azul Tripano. As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M. Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo.

### 4.3 Análise da morfologia das células de polpa dental hígida e inflamada

Para avaliar se o butirato de sódio, na concentração de 10 mM e a hidralazina na concentração de 30  $\mu$ M, mesmo não alterando a viabilidade celular, poderiam alterar a morfologia das células foram realizados ensaios de análise da morfologia por microscopia de luz (Figura 11) e por citometria de fluxo (Figuras 12 e 13).

Ao microscópio de luz, a maioria das células de polpa dental hígida e inflamada quando sem tratamento apresenta morfologia fusiforme, com projeções citoplasmáticas, que ligam uma célula à outra. O núcleo mostra-se esférico, às vezes ovóide, com um ou mais nucléolos evidentes. O citossol apresenta aspecto relativamente homogêneo, conforme ilustrado na Figura 11A e 11D.

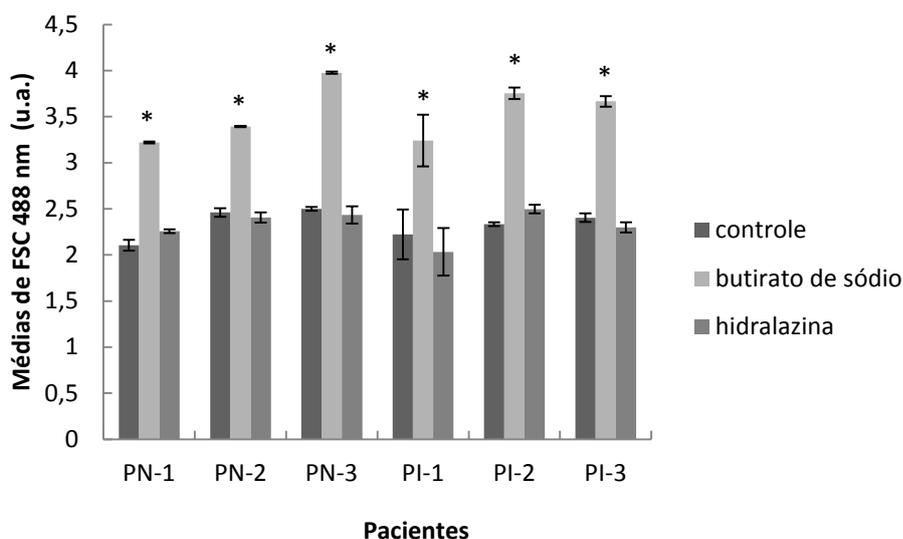
Porém, quando tratadas com butirato de sódio as células apresentaram-se mais volumosas e com as projeções citoplasmáticas maiores do que as das células sem tratamento (Figura 11B e 11E). Essa alteração não foi visualizada nas células tratadas com a hidralazina (Figura 11C e 11F).



**Figura 11.** Micrografias de células de polpa dental humana. (A) Células de polpa dental hígida sem tratamento. (B) Células de polpa dental hígida tratadas com 10 mM de butirato de sódio. (C) Células de polpa dental hígida tratadas com 30  $\mu$ M de Hidralazina. (D) Células de polpa dental inflamada sem tratamento. (E) Células de polpa dental inflamada tratadas com 10 mM de butirato de sódio. (F) e Células de polpa dental inflamada tratadas com 30  $\mu$ M de hidralazina.

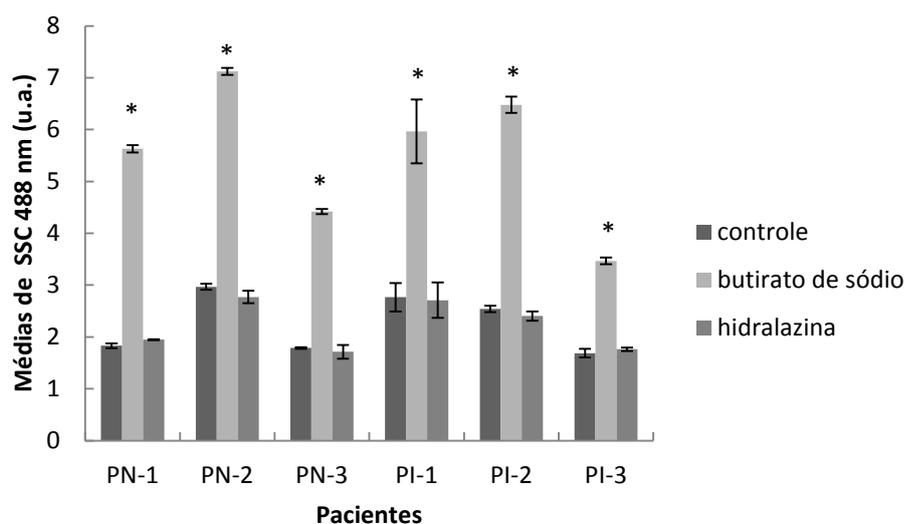
Na citometria de fluxo, a morfologia das células foi avaliada por dois parâmetros; tamanho, FSC, e granulosidade, SSC. Vale ressaltar que quanto maior o valor de FSC maior será o tamanho das células e que quanto maior for o valor de SSC maior será a sua granulosidade. Os resultados estão apresentados respectivamente nas figuras 12 e 13.

Conforme ilustrado na Figura 12, as células crescidas na presença de butirato de sódio apresentaram-se maiores médias de FSC do que as células crescidas sem tratamento. Já as células tratadas com hidralazina mostraram médias de FSC similares aos das células sem tratamento.



**Figura 12.** Análise da morfologia celular por citometria de fluxo. Tamanho determinado pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) (u.a) de células cultivadas por 48 horas na presença de butirato de sódio e hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente. As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle.

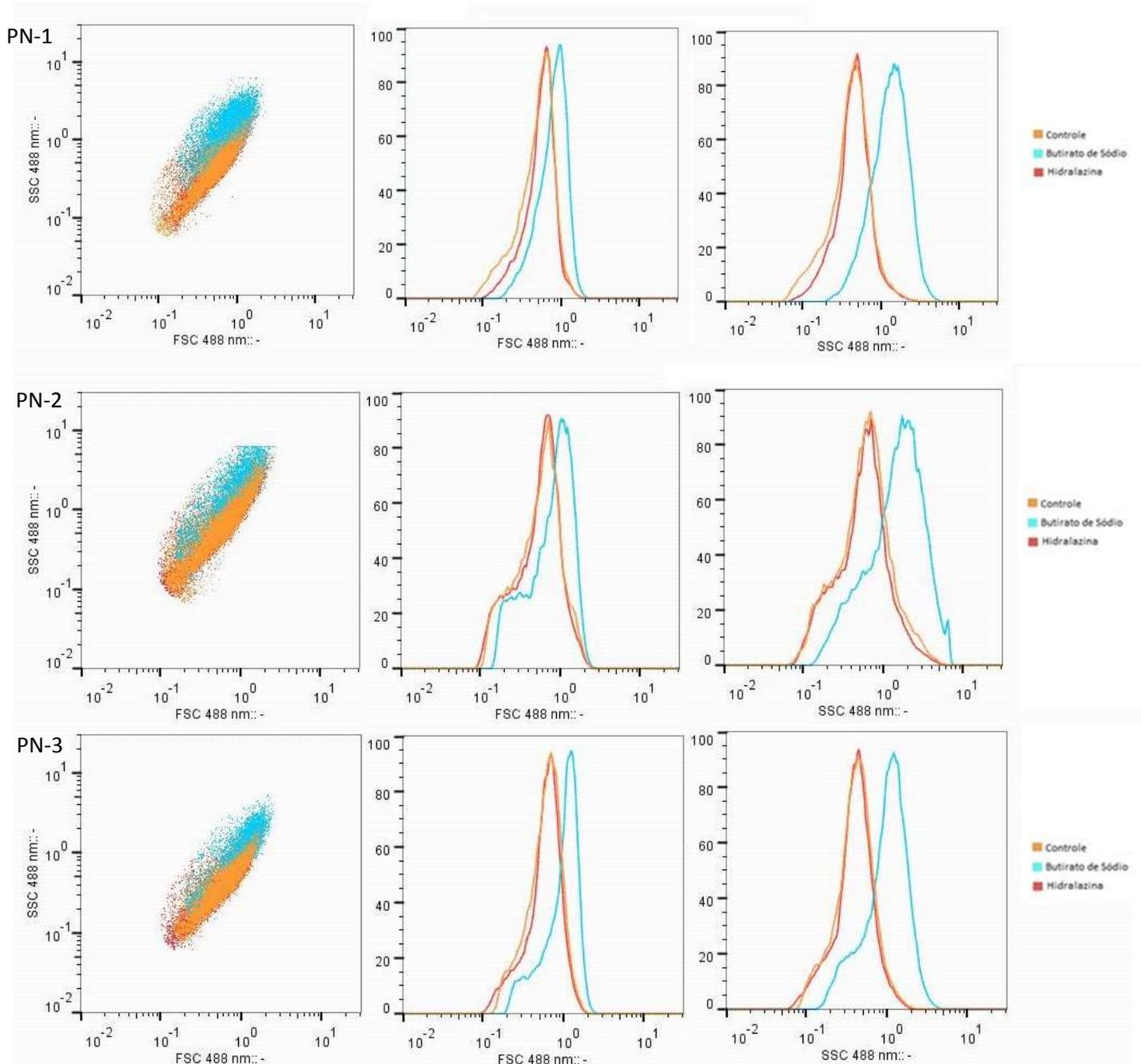
Na citometria de fluxo também se determinou a intensidade da granulosidade das células. Quando crescidas na presença de butirato de sódio, as células apresentaram intensidade de granulosidade maior do que as células crescidas sem tratamento. Já as células tratadas com hidralazina mostraram granulosidade similar a das células sem tratamento (Figura 13).



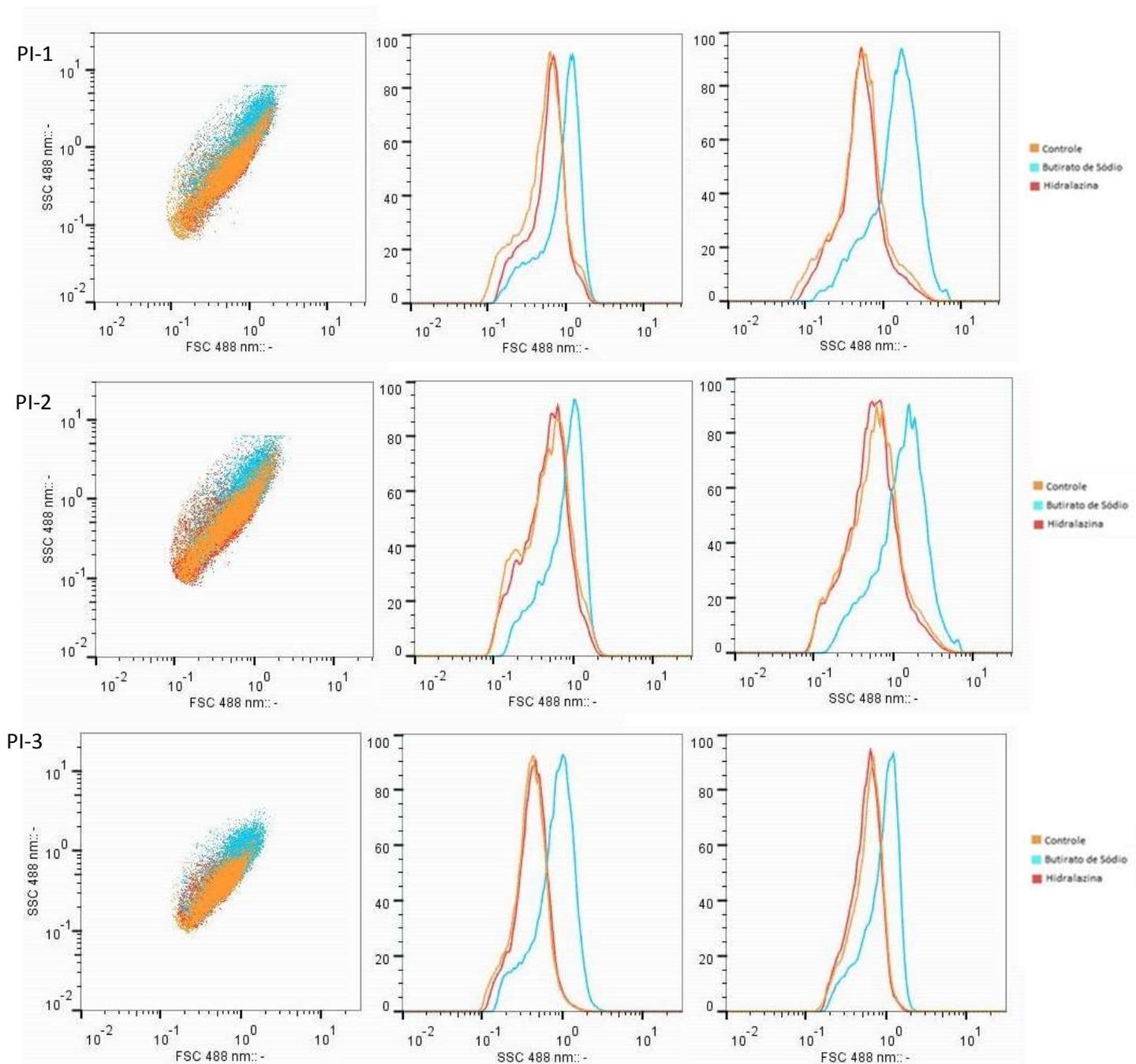
**Figura 13.** Análise da morfologia celular por citometria de fluxo. Granulosidade determinada pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) (u.a) de células cultivadas por 48 horas na presença de butirato de sódio e hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente. As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo controle.

As figuras 14 e 15 demonstram o deslocamento dos histogramas de FSC e SSC para a direita nas células tratadas com butirato de sódio. Enquanto que os histogramas de FSC e SSC obtidos a partir das células tratadas com hidralazina e com as células sem tratamento mostram-se sobrepostos, ou seja, as células tratadas com hidralazina apresentam morfologia similar às células sem tratamento.

Esses dados confirmam os dados obtidos por meio da Microscopia de Luz, por meio da qual foi observado que células tratadas com butirato de sódio apresentaram tamanho maior em relação às células sem tratamento.



**Figura 14.** Análise da morfologia celular por citometria de fluxo de células de polpa hígida (PN-1; PN-2; PN-3). As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M tiveram o tamanho e a da granulosidade determinados respectivamente pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) e pela Dispersão Lateral da Luz (SSC). Esses dados são representativos das triplicatas dos tratamentos das células de polpa dental hígida.



**Figura 15.** Análise da morfologia celular por citometria de fluxo de células de polpa inflamada (PI-1; PI-2; PI-3). As células foram cultivadas, por 48 horas, na presença de butirato de sódio e hidralazina respectivamente nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M tiveram o tamanho e da granulosidade determinados respectivamente pela Dispersão Frontal da Luz (FSC) e pela Dispersão Lateral da Luz (SSC). Esses dados são representativos das triplicatas dos tratamentos das células de polpa dental inflamada.

#### 4.4 Validação dos *primers* por meio de PCR convencional

Considerando que o objetivo principal deste estudo foi verificar se a o butirato de sódio e a hidralazina eram capazes de induzir células de polpa dental, hígida e inflamada, a uma desdiferenciação fez-se necessário à validação dos *primers* a serem utilizados na análise da expressão dos genes de pluripotência SOX-2, OCT-4 e NANOG e de genes normalmente expressos na polpa dental, como o colágeno tipo I e III, ou seja, verificar se os *primers* estariam amplificando eficientemente na região genômica desejada da amostra e não em regiões inespecíficas. Para isso foi realizado um experimento de PCR qualitativa, onde todos os *primers* foram submetidos a diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, de dNTP, de enzima Taq polimerase e dos próprios *primers*. Como ilustra a Figura 16 os *primers* dos genes de interesse deste estudo amplificaram nas regiões específicas do DNA humano.

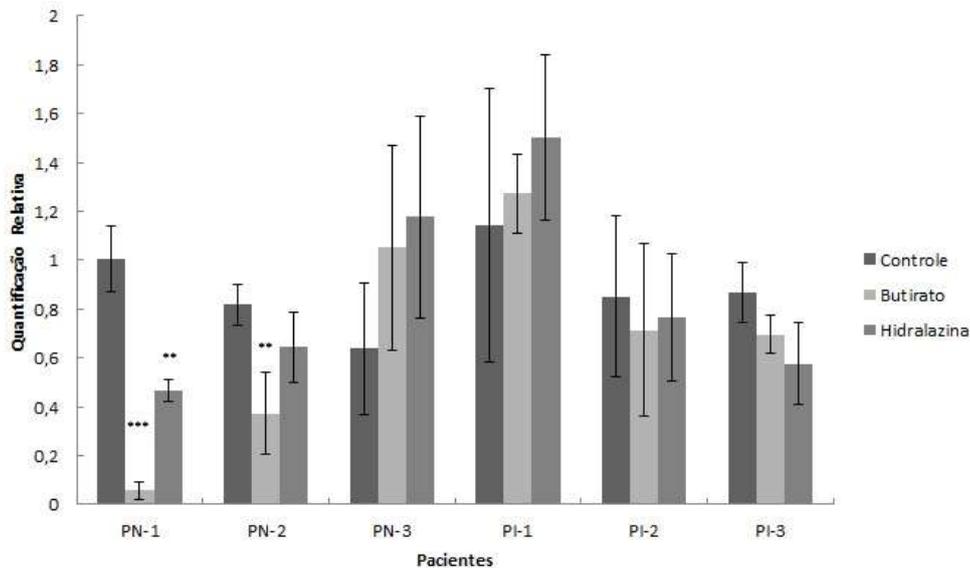


**Figura 16.** Amplificação dos primers NANOG, SOX-2, Colágeno tipo I (COL1A1) e Colágeno tipo III (COL3A1). Os tamanhos de fragmentos esperados eram de 103, 104, 100 e 110 pares de bases respectivamente. O marcador usado é 1 Kb plus da Invitrogen.

#### 4.5 PCR quantitativo em tempo real

Uma vez validados os *primers* pôde-se então realizar a qPCR em tempo real para a avaliar o efeito do butirato de sódio e da hidralazina sobre a expressão de genes de pluripotência e colágenos, tipo I e III (COL1A1 E COL3A1).

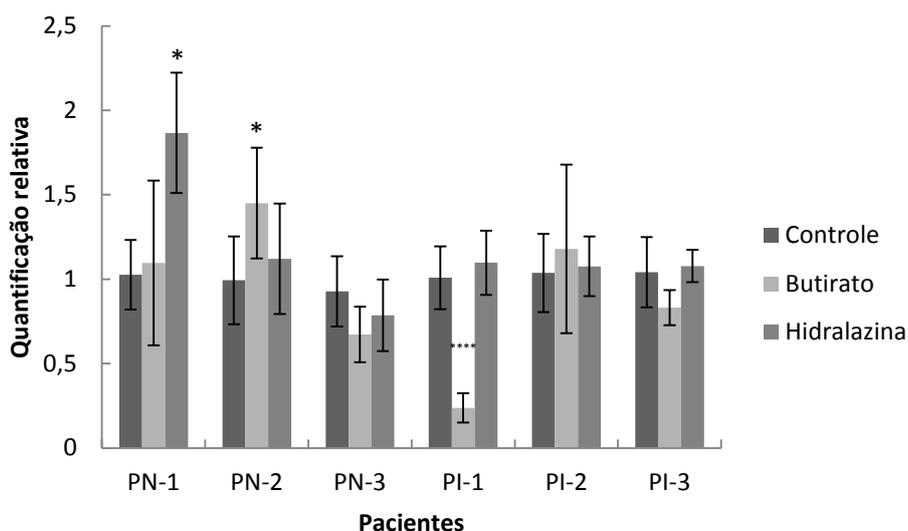
Na Figura 17 pode-se observar diminuição significativa da expressão do gene OCT-4 em células de polpa dental hígida dos pacientes, PN-1 e PN-2. Em células do paciente PN-1 a diminuição da expressão do gene OCT-4 ocorreu quando as mesmas foram tratadas com butirato de sódio e com hidralazina. Já em células do paciente PN-2 a diminuição da expressão do gene OCT-4 ocorreu somente quando as células foram tratadas com butirato de sódio.



**Figura 17.** Expressão relativa do gene OCT-4 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\*) =  $p < 0,0005$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ).

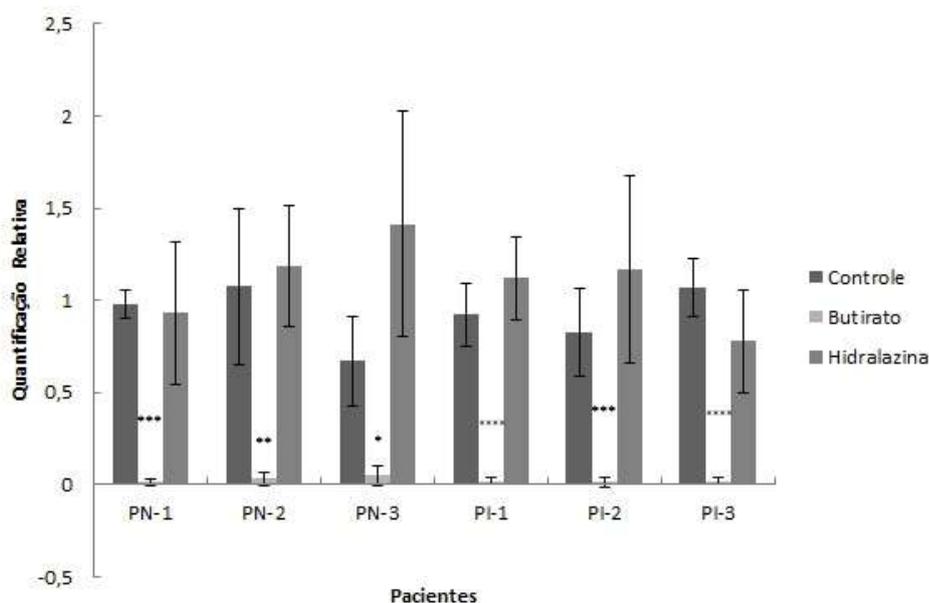
A expressão dos genes NANOG e SOX-2 não pode ser detectada por meio da técnica de qPCR em tempo real, mesmo utilizando o cDNA sem qualquer diluição e aumentando a quantidade de ciclos da qPCR para 50, mostrando que nas células de polpa dental hígida e inflamada dos pacientes utilizados neste estudo há uma quantidade extremamente baixa desses transcritos.

Com relação ao gene COL1A1 foi possível determinar a sua quantificação relativa por meio de qPCR em tempo real (Figura 18). Nessa figura pode-se observar que células do paciente PN-1 mostraram aumento da expressão desse gene somente quando tratadas com a hidralazina. Quando tratadas com butirato de sódio a expressão relativa de COL1A1 mostrou-se similar a do controle. Já as células do paciente PN-2 mostraram aumento da expressão do gene COL1A1 somente quando tratadas com butirato de sódio. Quando tratadas com hidralazina a expressão relativa desse gene mostrou-se similar a do controle. Entretanto as células do paciente PI-1 mostraram redução na expressão desse mesmo gene quando tratadas com butirato de sódio. Quando tratadas com hidralazina a expressão relativa desse gene mostrou-se similar a do controle.



**Figura 18.** Expressão relativa do gene COL1A1 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \* =  $p < 0,05$ ).

Já para o gene COL3A1 (Figura 19), as células de todos os pacientes mostraram redução significativa na expressão relativa desse gene quando tratadas com butirato de sódio. Entretanto quando tratadas com hidralazina essas mesmas células não mostraram alterações na expressão do gene COL3A1.



**Figura 19.** Expressão relativa do gene COL3A1 em células dos diferentes pacientes submetidas ao butirato de sódio (10 mM) e à hidralazina (30  $\mu$ M). As barras de erros representam o desvio padrão e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa em relação à expressão relativa do controle (\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \* =  $p < 0,05$ ).

O conhecimento da biologia das células-tronco tem mostrado o potencial dessas células para serem utilizadas em testes de novos fármacos, identificação dos mecanismos de desenvolvimento de doenças, além de constituírem fonte para terapias regenerativas (Bragança *et alli*, 2010). Isso porque as células-tronco apresentam duas propriedades básicas: a capacidade de se auto renovarem indefinidamente em um estado indiferenciado e a possibilidade de se diferenciarem em um ou mais tipos de células especializadas. As células-tronco são classificadas em dois tipos: (i) células-tronco embrionárias, aquelas capazes de originar todos os tipos celulares do organismo e tecidos extraembrionários; (ii) células-tronco adultas cuja capacidade de diferenciação é geralmente limitada aos tipos celulares do órgão de origem.

Mesmo que ainda não existam tecnologias para o desenvolvimento de órgãos completos *in vitro*, células-tronco com pluripotência induzida podem diferenciar-se em todas as células que existem em determinado órgão. Assim, seria interessante induzir células de um paciente a um estágio de indiferenciação, ou seja, a um estágio de pluripotência, assim como as células-tronco embrionárias, pois essas células poderiam ser utilizadas no tratamento de doenças ou na regeneração de tecidos do próprio paciente, sem serem imunorreativas. Um exemplo dessa medicina personalizada seria a utilização dessas células com pluripotência induzida para o desenvolvimento de uma “terceira dentição” que permitisse o restabelecimento das funções mastigatória e estéticas (Casagrande *et alli*, 2011). Considerando que as células dessa terceira dentição seriam do próprio paciente a possibilidade de rejeição seria baixa, não havendo a necessidade de esse paciente ser levado a um estado de imunossupressão. Outra modalidade terapêutica interessante seria a reabilitação de um paciente que, por exemplo, apresentasse um estágio avançado de cirrose hepática, com o fígado funcionalmente comprometido. Ao invés de submeter esse paciente a um transplante homólogo, ele poderia receber um enxerto que contivesse suas próprias células previamente submetidas a um processo de indiferenciação e posteriormente induzidas a diferenciar-se em células do tecido hepático.

Normalmente, a indução da pluripotência em células diferenciadas é realizada por meio da transfecção, mediada por retrovírus, de cópias extras de genes tais quais: o OCT3/4, o SOX2, o KLF4 e o c-Myc. Entretanto, esse procedimento também pode levar à inserção de genes virais nas células humanas receptoras, podendo alterar a sua biologia, o que torna as células pluripotentes obtidas por essa técnica, apesar de bastante usadas na pesquisa básica, inadequadas para o uso clínico. Além disso, essa técnica possui baixíssima eficiência, o que

dificulta a sua utilização rotineira como modalidade terapêutica na medicina personalizada. Além disso, os métodos empregados para a indução da pluripotência e para a produção de células tumorais *in vitro* são similares; a inserção de cópias extras de genes de pluripotência e de proliferação celular pode transformá-los em oncogênicos (Riggs *et alli*, 2013). Desse modo, é promissor o desenvolvimento de novos procedimentos que possibilitem a reversão de células diferenciadas a um estado similar ao embrionário sem a transfecção de genes, mediada por vírus ou por qualquer outro carreador.

Uma técnica a ser utilizada para indução da pluripotência celular poderia ser uma que envolvesse a utilização de drogas epigenéticas, uma vez que essas substâncias ao alterar a expressão de genes poderiam promover a expressão de genes relacionados à pluripotência celular.

Dentre as diversas drogas com ação epigenética pode-se citar o butirato de sódio e a hidralazina. A ação do butirato de sódio está relacionada à sua capacidade de hiperacetilar histonas, podendo, por isso, alterar a expressão de genes. Como citado anteriormente no capítulo referente à Introdução deste estudo, Mali e colaboradores (2010) demonstraram que o butirato de sódio facilita a geração de colônias de células com pluripotência induzida. Já a ação epigenética da hidralazina está relacionada ao fato de ela inibir a ação e a expressão da enzima DNA metiltransferase 1 e assim alterar a expressão de alguns genes. Desse modo, é plausível acreditar que essas duas drogas ao interferir na expressão gênica, poderiam ser utilizadas para reprogramar qualquer tipo de célula diferenciada a um estado de pluripotência.

Normalmente o tipo celular mais utilizado em estudos de reprogramação celular é o fibroblasto, célula tipicamente encontrada em tecido conjuntivo propriamente dito, como o tecido pulpar. Uma das vantagens da utilização do tecido pulpar em estudos de reprogramação celular deve-se a facilidade de acesso a esse tecido, visto que milhões de dentes, por ano, são extraídos no Brasil e considerados lixo biológico. Por isso, neste estudo utilizaram-se células de polpas dentais híginas e inflamadas para verificar, por meio da expressão de genes marcadores de pluripotência, se a hidralazina e o butirato de sódio poderiam ser utilizados em procedimentos de reprogramação celular.

Para tal, considerando que quanto maior a concentração de butirato de sódio e de hidralazina, maior seria o efeito dessas drogas na inibição respectivamente, das enzimas histonas desacetilases (Boffa *et alli*, 1978) e da expressão e atividade da enzima DNMT-1 (Cruz-Hernandez *et alli*, 2011), no presente estudo fez-se necessário primeiramente determinar a concentração máxima dessas drogas que pudessem ser utilizadas sem

comprometer a viabilidade das células pulpares. Desse modo as células dos diferentes pacientes deste estudo foram cultivadas na presença dessas drogas em diferentes concentrações.

Com base nos resultados ilustrados nas figuras 8 e 9, decidiu-se que para os ensaios de expressão gênica as células seriam expostas ao butirato de sódio e à hidralazina nas concentrações de 10 mM e 30  $\mu$ M, respectivamente, pois foi nessas concentrações que as células da maioria dos pacientes não mostraram alteração na taxa de viabilidade celular. Essa concentração de butirato de sódio foi também utilizada por Sun e colaboradores (2001). Esses autores demonstraram que nessa concentração o butirato de sódio é capaz de alterar drasticamente, em duas horas, a quantidade de acetilação nas histonas em células de câncer de mama. Ou seja, nessa concentração o butirato de sódio inibiu a ação de enzimas Histona Desacetilases. Da mesma forma, Kao e colaboradores (2011) demonstraram que a hidralazina, na concentração de 30  $\mu$ M foi capaz de induzir, em células musculares atriais de camundongo, a diminuição da metilação do gene SERCA2a, gene que codifica uma proteína essencial na homeostase do cálcio, e assim aumentar a sua expressão, por diminuir a expressão da enzima DNMT-1.

Neste estudo as células de polpa dental dos pacientes cuja viabilidade celular não foi afetada por esses tratamentos foram as dos pacientes PN-1, PN-2, PN-3, PN-5, PI-1, PI-2 e PI-3. Esses dados mostram que a citotoxicidade dessas drogas não foi dependente do estado do tecido pulpar, inflamado ou hígido, mas sim dependente da origem, ou seja, do doador das culturas. Apesar de em todos os experimentos todas as subculturas dos diferentes pacientes terem sido utilizadas com o mesmo número de passagens, não se sabe ao certo qual o tipo celular que predominava nessas subculturas, visto que essas subculturas, além de terem sido isoladas de diferentes indivíduos, ao longo das passagens pode ter ocorrido uma proliferação diferencial de um tipo celular em detrimento a outro, o que poderia explicar a sensibilidade diferencial dessas subculturas às drogas butirato de sódio e hidralazina. Embora na maioria dos estudos as subculturas, tanto de um tecido de polpa hígida quanto as de um tecido de polpa inflamada, mesmo não sendo caracterizadas, suas células são denominadas de células-tronco de polpa dental (Gronthos *et alli*, 2000, 2002; Alongi *et alli*, 2010; Govindasamy *et alli*, 2010; Hung *et alli*, 2011). É importante salientar que mesmo sejam células-tronco essas células são células-tronco adultas e não embrionárias. Vale ressaltar ainda que, esses indivíduos doadores das subculturas apresentam variações fenotípicas entre si, e essas variações poderiam resultar em respostas diferentes ao butirato de sódio e à hidralazina. Por

exemplo, esses pacientes poderiam apresentar variações fenotípicas em relação a proteínas de resistência a multidrogas. Essas proteínas de membrana, da superfamília ABC, funcionam como uma bomba de efluxo de drogas. Nesse sentido, variações fenotípicas entre os indivíduos com relação a essas proteínas poderiam causar diferenças nas concentrações intracelulares das drogas utilizadas neste estudo, o que explicaria a sensibilidade diferencial dessas culturas celulares com relação ao butirato de sódio e à hidralazina. A expressão dessas proteínas de membrana que funcionam como uma bomba de efluxo de drogas foi demonstrada por Ohkura e colaboradores (2012) em tecido de polpa dental, tanto hígida quanto inflamada.

Os dados acima discutidos foram obtidos por meio de ensaio MTT, um dos ensaios mais utilizados em estudos de citotoxicidade. Com o intuito revalidar esses dados, células de polpa dentais humanas tratadas com butirato de sódio (10 mM) e hidralazina (30  $\mu$ M) foram também coradas com Azul de Tripano e analisadas ao microscópio de luz. O ensaio MTT analisa o metabolismo mitocondrial e assim de forma indireta a viabilidade celular. Já o ensaio com o corante Azul de Tripano analisa diretamente a viabilidade celular, pois esse corante só penetra em células cuja integridade da membrana celular foi perdida; desse modo, células não viáveis se coram e células viáveis permanecem transparentes, o que permite uma aferição direta da taxa de viabilidade celular ([http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf)). Porém, a obtenção de dados por meio do ensaio de coloração com Azul de Tripano é realizada de forma manual, conseqüentemente mais propensa a erros, já o ensaio de MTT é realizado de forma automática por espectrometria de luz, podendo serem aferidas até 96 amostras por leitura, com menor probabilidade de erros do que a técnica de coloração com Azul de Tripano. Apesar dessas diferenças nas técnicas, os resultados obtidos neste estudo por meio desses ensaios foram similares, ou seja, as células de polpa hígida dos indivíduos PN-1, PN-2 e PN-3 e de polpa inflamada dos pacientes PI-1, PI-2 e PI-3 não mostraram diferenças nas taxas de viabilidade quando expostas ao butirato de sódio na concentração de 10 mM nem à hidralazina na concentração de 30  $\mu$ M, por isso foram selecionadas para fazer parte da amostra deste estudo. Já as células do paciente PN-5, que não tiveram a taxa de viabilidade alterada nos diferentes tratamentos nas concentrações definidas neste estudo, não foram utilizadas no ensaio de coloração com Azul de Tripano, pois entraram em senescência replicativa e assim foram excluídas dos próximos ensaios.

Mesmo confirmado que o butirato de sódio, na concentração de 10 mM, e a hidralazina na concentração de 30  $\mu$ M, não afetavam a viabilidade das células dos pacientes

PN-1, PN-2 e PN-3 e PI-1, PI-2 e PI-3 decidiu-se investigar se nessas concentrações essas drogas induziriam alteração na morfologia das células, visto que algumas alterações na morfologia estavam sendo observadas nas subculturas tratadas com o butirato de sódio. Para isso realizaram-se ensaios de análise morfológica por microscopia de luz e por citometria de fluxo.

Ao microscópio de luz somente as células tratadas com o butirato de sódio (10 mM) mostraram alterações morfológicas discretas tais como: aumento do volume citoplasmático e dos prolongamentos celulares. Resultados similares foram demonstrados por Ginsburg e colaboradores (1973). Esses autores mostraram, 7-8 horas após o tratamento com o butirato de sódio na concentração de 5 mM, a indução de alterações morfológicas em células HeLa, tais como aumento dos prolongamentos celulares.

O aumento do tamanho celular (FSC) observado neste estudo também foi detectado por citometria de fluxo que mostrou também aumento da granulosidade das células (SSC). Esses dados corroboram os demonstrados por Qualtrough e colaboradores (2002) em células de adenocarcinoma do cólon HT-29, que, quando tratadas com butirato de sódio na concentração de 3 mM, concentração menor do que a utilizada no presente estudo (10 mM), apresentam aumento do tamanho (FSC) e da granulosidade celular (SSC). Esse aumento do volume celular pode estar relacionado ao fato de diversas células estarem com as estruturas citoplasmáticas duplicadas, pois estariam preparando-se para a divisão celular, ou seja, se encontrariam na fase G1 do ciclo celular. Abramova e colaboradores (2006) demonstraram que o butirato de sódio pode induzir um atraso no ciclo celular, por inibir, entre outros, a expressão de ciclina D1. Como a diminuição da ciclina D1 faz com que a proteína RB não seja fosforilada as células com ciclina D1 reduzida permanecem em G1, com volume citoplasmático aumentado, por estarem preparando-se para a divisão celular.

No entanto, é importante ressaltar que na polpa dental existe uma variedade de tipos celulares e assim as primeiras subculturas utilizadas neste estudo eram heterogêneas. À medida que as subculturas foram repicadas, as células com maior capacidade de proliferação predominaram na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuíam taxa normal de proliferação (Moraes e colaboradores, 2007). No presente estudo, não foi realizada caracterização de modo a determinar os tipos celulares que permaneceram nas culturas após diversas passagens. Mesmo que se tivesse realizado essa caracterização, muito provavelmente as células de uma mesma subcultura não se encontram na mesma fase do ciclo celular. Assim,

mesmo que o butirato de sódio tenha induzido um atraso no ciclo celular muito provavelmente não o fez em todas as células da subcultura. Nesse sentido, as alterações observadas em 48 horas poderiam não ser observadas algum tempo depois. De acordo com Prasad & Sinha (1976) as alterações induzidas *in vitro* pelo butirato de sódio na morfologia de diferentes tipos de células de mamíferos são reversíveis. É importante lembrar que apesar de induzir alterações na morfologia o butirato de sódio não alterou a taxa de viabilidade celular. Alterações na morfologia celular que não afetam a taxa de viabilidade celular como verificadas neste estudo também foram demonstradas por Johnson e colaboradores (1971). Esses autores mostraram que o butirato de sódio (1 mM) apesar de ter alterado a morfologia de células de sarcoma, em 24 horas, não alterou a taxa de viabilidade celular.

Uma vez determinada a concentração máxima do butirato de sódio e da hidralazina que não afetaram, em 48 horas, a taxa de viabilidade celular das células dos pacientes de polpa hígida e inflamada e a validade dos *primers* pode-se então realizar os ensaios de expressão gênica de modo a verificar o efeito desses moduladores epigenéticos sobre a expressão de genes relacionados à pluripotência, OCT-4, NANOG e SOX-2, e, a expressão da principal proteína da matriz de tecido conjuntivo, a saber, colágeno. Para isso utilizou-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real, técnica que combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência.

Quarenta e oito horas após a exposição ao butirato de sódio, a expressão relativa do gene OCT-4 não foi alterada nas células da maioria dos pacientes (PN-3; PI-1; PI-2; PI-3) (Figura 17). Esses dados corroboram os demonstrados por Baltus e colaboradores (2009) que trataram células-tronco embrionárias murinas com butirato de sódio (5 mM), por seis horas. Segundo esses autores, a não alteração da expressão desse gene foi devido ao fato de o butirato de sódio não ter conseguido alterar o estado ativo do resíduo de lisina-4 na histona H3, o que pode ter também acontecido neste estudo.

Entretanto nas células dos pacientes PN-1 e PN-2, na presença do butirato de sódio a expressão do gene OCT-4 foi diminuída. Essa repressão pode estar relacionada a um aumento na acetilação de histonas relacionadas ao estado inativo do promotor do gene OCT-4. Paskova e colaboradores (2013) demonstraram em células de câncer de próstata aumento da acetilação no resíduo da lisina na posição 8 e 12 da histona H4 induzido pelo butirato de sódio, o que levou a diminuição da expressão do gene que codifica o receptor de andrógeno e do gene que codifica o antígeno específico de próstata.

As células da maioria dos pacientes tratadas com hidralazina (30  $\mu$ M) mostraram expressão relativa do gene OCT-4 similar à encontrada nas células sem tratamento. Exceção a isso foram as células do paciente PN-1, que mostraram expressão relativa desse gene diminuída. Ao alterar a expressão e a atividade da enzima DNMT-1 a hidralazina não exerce efeito especificamente na região do gene OCT-4, mas sim na cromatina como um todo, podendo alterar o padrão de metilação de ilhas CpG. Desse modo, a diminuição da expressão do OCT-4 em células do paciente PN-1 pode ser justificada pelo aumento da expressão do inibidor do gene OCT-4.

Como o conjunto de modificações epigenéticas, denominado epigenoma, é característico de cada indivíduo, além de ser específico para cada tipo celular, ele fornece mecanismos à diversidade e à diferenciação celular, por meio da regulação da acessibilidade à informação genética na maquinaria celular (Oliveira, 2012). Assim, os diferentes tipos celulares presentes nas subculturas dos diferentes indivíduos podem apresentar diferentes respostas a moduladores epigenéticos. Neste sentido, como neste estudo não foi verificado quais tipos celulares faziam parte de cada uma das diferentes subculturas, é plausível acreditar que possa ter ocorrido uma alteração diferencial no padrão da expressão gênica nas diversos tipos celulares dos diferentes pacientes, além do fato de que, como citado anteriormente, o epigenoma difere de indivíduo pra indivíduo. Por isso, neste trabalho, cada subcultura dos diferentes pacientes foi considerada uma linhagem celular.

Neste estudo, não foi possível ser determinado, por meio da PCR quantitativa em tempo real, o nível da expressão dos genes NANOG, e SOX-2 em células de polpa dental hígida e inflamada tratadas ou não pelos moduladores epigenéticos butirato de sódio e hidralazina. Isso talvez tenha ocorrido, porque a expressão desses genes é extremamente baixa nessas subculturas, haja vista que nem no próprio controle foi possível determinar a expressão dos mesmos; níveis tão baixos que não foram detectáveis pela técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizando Sybr Green. Outros autores (Govindasamy *et alli*, 2010) demonstraram que em células de polpa dental humana, em quinta passagem, mesmo número de passagens na qual as células foram utilizadas neste estudo, a expressão dos genes, OCT-4, NANOG e SOX-2, era menor do que em células-tronco de medula óssea. Vale ressaltar que, ao invés de subculturas de diferentes pacientes, os autores utilizaram um *pool* de subculturas de diferentes pacientes, impedindo a detecção de quaisquer diferenças na expressão das células de uma subcultura de determinado paciente em relação à outra de outro paciente. Vale ressaltar ainda que no presente estudo o uso de *pools* de subculturas foi utilizado em testes de viabilidade

celular, ensaio MTT, mas não nos experimentos de morfologia e expressão gênica, visto que os experimentos deste ensaio mostraram grande variação nas respostas das células aos diferentes tratamentos (dados não mostrados), o que não permitiu determinar qual concentração dos moduladores epigenéticos poderia ser utilizada nos experimentos de morfologia e expressão gênica. Por isso neste estudo utilizou-se as subculturas de cada paciente separadamente e não em *pool*. Considerando que o objetivo deste estudo era aumentar a expressão desses genes pode-se supor que o butirato de sódio e a hidralazina, nas condições utilizadas neste estudo, não alteraram o padrão de acetilação das histonas e a metilação do DNA na região promotora desses genes.

Pierantozzi e colaboradores (2010) demonstraram que células-tronco mesenquimais da medula óssea, do tecido adiposo e do coração não expressam SOX-2. Entretanto, esses autores demonstraram a expressão do gene NANOG nessas células, mas não mostraram a expressão do gene OCT-4, como encontrada nesse estudo. Vale ressaltar ainda que esses autores utilizaram uma metodologia de detecção da expressão gênica diferente da utilizada neste estudo. Enquanto neste estudo a expressão gênica foi determinada por meio PCR quantitativo em tempo real, usando SybrGreen, esses autores utilizaram a PCR em tempo real com o sistema de amplificação AmpliTaq Gold Polymerase.

O tecido pulpar, como um tecido conjuntivo propriamente dito, possui grande quantidade de matriz extracelular composta, sobretudo, por proteínas fibrilares e substância fundamental. Dentre as proteínas fibrilares, destaca-se, na polpa dental, o colágeno tipo I e o colágeno tipo III. O colágeno tipo I é o tipo predominante e pode contribuir no estabelecimento da arquitetura pulpar. A proporção relativa do colágeno tipo III também é alta, 42,6 % do colágeno encontrado na polpa dental humana. Essa alta proporção do colágeno tipo III pode fornecer à polpa certa capacidade elástica. (Hargreaves & Goodis, 2009) Assim sendo, é esperado que nas subculturas existissem células que produzem o colágeno tipo I e III. Nesse sentido seria interessante avaliar se o butirato de sódio e a hidralazina, como moduladores epigenéticos, poderiam alterar a expressão desses genes que caracterizam o seu tecido de origem, o tecido conjuntivo. Se existisse uma desdiferenciação dessas células seria esperado que as mesmas não expressassem proteínas típicas de tecido conjuntivo. Nesse sentido, neste estudo também foi avaliado a expressão dos genes COL1A1, gene que codifica a cadeia  $\alpha$  da proteína colágeno tipo I e COL3A1, gene que codifica a cadeia  $\alpha$  da proteína colágeno tipo III.

Com relação ao gene COL1A1, a análise dos dados mostra que em células de polpa dental, hígida e inflamada, da maioria dos pacientes, não ocorreu alteração nos níveis de expressão desse gene, quando as mesmas foram tratadas com butirato de sódio. Como referido anteriormente, a não alteração da expressão desse gene pode ser devido ao fato de o butirato de sódio não ter conseguido modificar o padrão de acetilação de diferentes resíduos de histonas, alterando a expressão desse gene. Somente em células do paciente PN-2 tratadas com butirato de sódio, observou-se aumento da expressão do gene de COL1A1. Niki e colaboradores (1999) demonstraram aumento de 68% na expressão desse gene em células hepáticas tratadas com butirato de sódio na concentração de 1 mM. De acordo com os autores esse aumento não foi convertido em aumento da biossíntese do colágeno tipo I. Já Karna e colaboradores (2006) demonstraram aumento da biossíntese do colágeno tipo I quando fibroblastos em cultura foram tratados com diferentes concentrações de butirato de sódio.

O presente estudo demonstrou também que em células de polpa dental, hígida e inflamada, tratadas com hidralazina, da maioria dos pacientes não ocorreu alteração nos níveis de expressão do gene COL1A1; muito provavelmente devido ao fato da hidralazina não ter alterado a metilação de ilhas CpG da região promotora desse gene. Entretanto, em células do paciente PN-1 houve aumento da expressão do gene COL1A1 quando essas foram tratadas com hidralazina. Um estudo recente realizado por Karna e colaboradores (2013) mostrou aumento da biossíntese desse colágeno em fibroblastos tratados com diferentes concentrações de hidralazina. Esse aumento da biossíntese do colágeno tipo I pode não estar diretamente relacionado com o aumento dos níveis de mRNA do colágeno tipo I, assim como no estudo de Niki e colaboradores (1999), um aumento da expressão do RNA mensageiro codificador para a proteína de colágeno tipo I não resultou em aumento da biossíntese dessa proteína.

Todas as subculturas, tanto de polpa hígida e como inflamada, dos diferentes pacientes mostraram expressão diminuída do gene COL3A1 quando tratadas somente com butirato de sódio. Esse efeito do butirato de sódio já havia sido demonstrado por Niki e colaboradores (1999). Apesar de terem trabalhado com células hepáticas de ratos e com concentrações menores do que a utilizada neste estudo, 1 mM, esse modulador epigenético induziu uma diminuição de 40% na expressão desse gene.

Já o tratamento com a hidralazina não causou efeitos na expressão do gene COL3A1, ou seja, a hidralazina, na concentração de 30  $\mu$ M, pode não ter sido capaz de alterar a metilação de ilhas CpG das regiões promotoras do gene COL3A1.

Os dados deste estudo demonstram que o aumento da expressão de genes relacionados à pluripotência não pôde ser induzida pelos moduladores epigenéticos butirato de sódio e hidralazina, talvez pelo fato de esses moduladores não terem ação gene específica, mas sim alterarem o estado da cromatina de forma aleatória. Apesar disso o butirato de sódio parece alterar as células de polpa dental hígida e inflamada, por estar diminuindo a expressão do gene de colágeno tipo III além de alterar a morfologia dessas células.

Os resultados aqui obtidos neste estudo podem se somar a outras da literatura e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a reprogramação celular por meio de moduladores epigenéticos. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados de modo a superar as limitações desta pesquisa, podendo utilizar outros moduladores epigenéticos, outro tempo de tratamento e assim obter células com pluripotência induzida, a partir de células de polpa dental hígida e inflamada, que possam ser utilizadas para a formação da terceira dentição ou na regeneração de tecidos e órgãos.

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo consistiu em analisar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio na reprogramação de células de polpa dental humana hígida e inflamada.

Com base nos resultados obtidos, é licito concluir que:

- a concentração máxima do butirato de sódio e da hidralazina que as células de polpa dental humana hígida e inflamada em cultura conseguem suportar sem o comprometimento de sua viabilidade é respectivamente 10 mM e 30  $\mu$ M.
- o butirato de sódio, na concentração de 10 mM, induz alterações morfológicas discretas como aumento do tamanho e da granulosidade das células de polpa dental humana hígida e inflamada enquanto que a hidralazina, na concentração de 30  $\mu$ M, não altera a morfologia de células de polpa dental humana hígida e inflamada.
- o butirato de sódio, na concentração de 10 mM, não alterou a expressão dos genes OCT-4 em células dos pacientes PN-3; PI-1; PI-2; PI-3. Mas induziu a diminuição da expressão desse gene em células dos pacientes PN-1 e PN-2.
- a hidralazina, na concentração de 30  $\mu$ M, não alterou a expressão dos genes OCT-4 das células dos pacientes PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3. Mas induziu a diminuição da expressão desse gene em células dos pacientes PN-1.
- Não foi possível detectar o efeito da hidralazina e do butirato de sódio sobre a expressão dos genes SOX2 e NANOG por meio da PCR quantitativa em tempo real.
- o butirato de sódio não alterou a expressão do gene COL1A1, colágeno tipo I, em células dos pacientes PN-1; PN-3; PI-2; PI-3, mas induziu aumento da expressão desse gene em células do paciente PN-2 e diminuiu a expressão desse gene em células do paciente PI-1.

- a hidralazina, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , não alterou a expressão do gene COL1A1, colágeno tipo I, em células dos pacientes PN-2; PN-3; PI-1; PI-2; PI-3, mas induz o aumento da expressão desse gene em células do paciente PN-1.
  
- o butirato de sódio, na concentração de 10 mM, reprimiu a expressão do gene COL3A1, colágeno tipo III, em células de todos os pacientes que constituíram a amostra deste estudo.
  
- a hidralazina, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , não alterou a expressão do gene COL3A1, colágeno tipo III, em células de nenhum dos pacientes que constituíram a amostra deste estudo.

ABRAHAO, I. J. et al. Collagen analysis in human tooth germ papillae. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 3, p. 208-12, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17262126>>.

ABRAMOVA, M.V., et al. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. **Journal of Biological Chemistry**, 281(30):21040-51. Jul, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16717102>>.

ALBERIO, R.; CAMPBELL, K. H.; JOHNSON, A. D. Reprogramming somatic cells into stem cells. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 709-20, Nov, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071772>>.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell, 4<sup>a</sup> edição New York: **Garland Science**; 2002. ISBN-10: 0-8153-3218-1 ISBN-10: 0-8153-4072-9

ALONGI, D. J. et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. **Regenerative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 617-31, Jul 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465527>>.

ANDUJAR, M. B. et al. Distribution and synthesis of type I and type III collagens in developing mouse molar tooth root. **Histochemistry**, v. 88, n. 2, p. 131-40, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450079>>.

ARCE, C. et al. Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. **Journal of Translational Medicine**, v. 4, p. 10, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507100>>.

BALTUS, G. A. et al. A Positive Regulatory Role for the mSin3A-HDAC Complex in Pluripotency through NANOG and SOX2. **Journal of Biological Chemistry**, 284(11): 6998–7006. March, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652339/>>.

BARKER, L. R. Hypertension in Principles of Ambulatory Medicine (4th ed.). p:803-845, 1995

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359943>>.

BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829-41, Jun 29, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439179>>.

BOFFA, L. C., et al. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. **Journal of Biological Chemistry**, 253(10):3364-6. 25 May, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/649576>>.

BOYER, L. A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-56, Sep 23 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153702>>.

BRAGANÇA J., TAVARES, A. BELO, A. J. Células estaminais e medicina regenerativa. **Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica**. n.º 7 setembro/janeiro/abril, 2010. Disponível em: <[http://canalbq.spb.pt/docs/canalBQ\\_0007.pdf](http://canalbq.spb.pt/docs/canalBQ_0007.pdf)>.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 1-7, Jan, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271319>>.

CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of NANOG, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643-55, May 30, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787505>>.

COLLAS, P. Epigenetic states in stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 9, p. 900-5, Sep, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013220>>.

CRUZ-HERNÁNDEZ, E., et al. Transcriptional changes induced by epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate in cervical carcinoma. **Oncology Reports**, 25(2):399-407. doi: 10.3892/or.2010.1086 Feb, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152880>>.

D'AQUINO, R. et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 6, p. 1162-71, Jun, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347663>>.

D'AQUINO, R. et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. **Journal of European Cells and Materials**, v. 18, p. 75-83, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19908196>>.

DAHL, J. A.; COLLAS, P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 1037-46, Apr, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17272500>>.

DARR, H.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. **Development**, v. 133, n. 6, p. 1193-201, Mar, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501172>>.

DAVIE, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 7 Suppl, p. 2485S-2493S, Jul, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12840228>>.

DEB-RINKER, P. et al. Sequential DNA methylation of the NANOG and OCT-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6257-60, Feb 25, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615706> >.

DONG C., WILHELM D., KOOPMAN P. SOX genes and cancer. **Cytogenetic & Genome Research** 105: 442–447. doi: 10.1073/pnas.97.8.4198., 2004 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15237232>>.

DREWS, K., et al. Human induced pluripotent stem cells--from mechanisms to clinical applications. **Journal of Molecular Medicine**, 90(7):735-45. doi: 10.1007/s00109-012-0913-0. Epub 2012 May 30 Jul, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22643868>>.

ELLERSHAW D.C.; GURNEY A. M. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, 134(3):621-31. Oct, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1572994/> >.

FISCHER, Y. et al. NANOG Reporter Cell Lines Generated by Gene Targeting in Human Embryonic Stem Cells. **PLoS ONE**, 5(9): e12533, 2010. Disponível em: < <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0012533>>.

FREBERG, C. T. et al. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 5, p. 1543-53, May, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314394> >.

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-55, Jan 7, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647939> >.

GINSBURG, E., et al. Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** 70:2457-2461, 1973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548>>.

GOVINDASAMY, V. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. **Journal of Endodontics**,. 36(9):1504-15. doi: 10.1016/j.joen.2010.05.006 Sep, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728718>>.

GRAHAM V., et al. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. **Neuron**, Aug 28;39(5):749-65., 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948443>>.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec 5, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087820> >.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-5, Aug, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147742> >.

GRUENBAUM, Y. et al. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. **FEBS Letters**, v. 124, n. 1, p. 67-71, Feb 9, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7215556> >.

HARADA, H. et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 1, p. 105-20, OCT 4, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508859> >.

HARGREAVES, K. M.; GOODIS, H. E. Polpa Dentária de Seltzer e Bender. **Quintessence São Paulo** ISBN: 9788587425713, 2009.

HERTING, R. L.; HUNTER, H. L. The physiologic and pharmacologic basis for the clinical treatment of hypertension. **Medical Clinics of North America**, v. 51, n. 1, p. 25-37, Jan, 1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4869241> >.

HIRAI H. et al. Radical acceleration of nuclear reprogramming by chromatin remodeling with the transactivation domain of MyoD. **Stem Cells** (9):1349-61., 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732495> >.

HUANG, G. T. et al. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. **Cell Tissue Res**, v. 324, n. 2, p. 225-36, May, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16440193> >.

HUANG, G. T. J. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 6, p. 379-386, 2008. ISSN 0300-5712.

HUANG, G. T. et al. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. **Journal of Endodontics**, 35(5):673-81. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.019. May, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410081>>.

HUNG, C.N., et al. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. **Biomaterials**, 32(29):6995-7005. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.086. Oct, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696818>>.

INFORMATION, N. C. F. B., SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [ Homo sapiens ] 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> >. Acesso em: 15 de janeiro.

INSTITUTE, N. C. High Surplus Energy Status Blocks Protective Breast Cancer Gene. Disponível em: < <http://home.ccr.cancer.gov/inthejournals/gardner.asp> >. Acesso em: 14 de dezembro.

JOHNSON G. S., FRIEDMAN R. M., PASTAN I. Restoration of Several Morphological Characteristics of Normal Fibroblasts in Sarcoma Cells Treated with Adenosine-3':5'-Cyclic Monophosphate and Its Derivatives **Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.** February; 68(2): 425–429, 1971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC388953/>>.

KANCZLER et al. Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology. **Tissue Engineering Part A**, Oct;16(10):3241-50, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504072>>.

KAO Y. H. et al. Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. **Laboratory Investigation** 91, 1291–1297, 2011. Disponível em: < <http://www.nature.com/labinvest/journal/v91/n9/abs/labinvest201192a.html>>.

KARNA, E.; MILTYK, W.; PAŁKA, J.A. Butyrate-induced collagen biosynthesis in cultured fibroblasts is independent on alpha2beta1 integrin signalling and undergoes through IGF-I receptor cascade. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 286(1-2):147-52. Jun, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541197>>.7

KARNA, E.; SZOKA, L.; PALKA, J. A.; The mechanism of hydralazine-induced collagen biosynthesis in cultured fibroblasts. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 386(4): 303–309. April, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597333/>>.

KLEIN, L. et al. Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. **American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 9A, p. 18F-40F, May 8, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12729848> >.

KOBORI, A. et al. Butyrate stimulates IL-32alpha expression in human intestinal epithelial cell lines. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 19, p. 2355-61, May 21, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480520> >.

KRASNER. P.; VERLANDER P. Stem cells in dentistry and medicine: the dentist's role. **Dentistry Today**, 30(1):128, 130-4; quiz 135, Jan, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21306072>>.

LAINO, G. et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 3, p. 511-5, May, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770190> >.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, May 14, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493529> >.

LEVI, B. et al. Differentiating stem cells *in vivo* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 109, 20379 –20384, 2012. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/109/50/20379> >

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15153459](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15153459) >.

LIMA, P. S. P. et al. DNA methylation analysis of the tumor suppressor gene CDKN2B in Brazilian leukemia patients. **Genetics and Molecular Biology**, vol.31 no.3 São Paulo, 2008. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572008000400005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572008000400005) >.

LOCKE, E. Tissue characterization in teeth treated with a regeneration protocol, 2009. Disponível em: < <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00881907> >. Acesso em: 15 de dezembro.

LUDDEN, TM et al. Clinical Pharmacokinetics of Hydralazine. **Clinical Pharmacokinetics**, 7: 185-205., 1982. Disponível em: < <http://link.springer.com/content/pdf/10.2165/00003088-198207030-00001> >.

MALI, P. et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. **Stem Cells**, v. 28, n. 4, p. 713-20, Apr, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201064> >.

MANGANNO, C. et al. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3543-51, May, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122719> >.

MAO, Y. Q.; OHSAKI, Y.; KURISU, K. Immunohistochemical study of the relationship between extracellular matrix and root bifurcation in the mouse molar. **Archives of Oral Biology**, v. 35, n. 8, p. 583-91, 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256813> >.

MITSUI, K. et al. The homeoprotein NANOG is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631-42, May 30, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504> >.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, May 13, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716973> >.

MIZUNO M., FUJISAWA R., KUBOKI Y. Type I Collagen-Induced Osteoblastic Differentiation of Bone-Marrow Cells Mediated by Collagen- $\alpha 2\beta 1$  Integrin Interaction.

**Journal Of Cellular Physiology**, 184:207–213, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867645> >.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica. **ROCA** São Paulo, 2007.

MORSCZECK, C. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biology**, v. 24, n. 2, p. 155-65, Apr, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890265> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16, 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MUSEUM, N. H. Nucleosome. 1999-2009. Disponível em: < <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/nucleosome.php> >. Acesso em: 14 de dezembro.

NARLIKAR, G. J.; FAN, H. Y.; KINGSTON, R. E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 475-87, Feb 22, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909519> >.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Stem Cell Basics: Introduction. In Stem Cell Information [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2002. Disponível em: < <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>>.

NICHOLS, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor OCT4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-91, Oct 30, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814708> >.

NIKI, T. et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. **Hepatology**, 29(3):858-67. Mar, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051490>>.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of OCT-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 372-6, Apr, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742100> >.

OKAMOTO, Y. et al. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 3, p. 367-72, Mar, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249597> >.

OHKURA N., et al. Gene expression analysis of membrane transport proteins in normal and lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. **Journal of Endodontics**, 38(5):648-52 May, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22515894>>.

OLIVEIRA, J. C. Epigenética e doenças humanas **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 21-34, jan./jun, 2012. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/download/6957/11067>>.

ORLIC D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(18):10344-9 28 Agosto, 2001 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504914>>.

ORLIC, D. The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. **International Journal of Cardiology**, v. 95 Suppl 1, p. S16-9, Jun, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336838> >.

OKITA K. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**. 322(5903):949-53. Nov 7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845712>>

PAGE, R. L. et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 3, p. 417-26, Sep, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622035> >.

PAN, G. J. et al. Stem cell pluripotency and transcription factor OCT4. **Cell Research**, v. 12, n. 5-6, p. 321-9, Dec, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528890> >.

PAN, G. et al. Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 37013-20, Aug 27, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218026> >.

PASKOVA, L. Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells. **Toxicology in Vitro** 27(5):1489-95, Aug 2013 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524101>>.

PEREIRA, L. O. et al. Comparison of stem cells properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. **International Endodontic Journal** Volume 45, Issue 12, pages 1080–1090, 2012. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2591.2012.02068.x/abstract>>.

PEREIRA, L. O. Estudo in vitro de células mesenquimais isoladas da polpa de dentes permanentes com e sem inflamação: caracterização e indução de diferenciação. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde, 2012. 167 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11120/1/2012\\_LucianaOliveiraPereira.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11120/1/2012_LucianaOliveiraPereira.pdf)>

PIERANTOZZI E., et al. Pluripotency Regulators in Human Mesenchymal Stem Cells: Expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. **Stem Cells and Development**, May

20(5): 915-923, 2011. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2010.0353>>.

PHILLIPS, T. The role of methylation in gene expression. **Nature Education**, 2008. Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-role-of-methylation-in-gene-expression-1070>>.

PRASAD K. N., SINHA P. K. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. **In Vitro**, Feb;12(2):125-32, 1976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548>>.

PRIMER. Disponível em: < <http://frodo.wi.mit.edu/> >. Acesso em: 15 de janeiro.

QUALTROUGH, D. et al. Expression of CDX2 in normal and neoplastic human colon tissue and during differentiation of an in vitro model system. **Gut**. Aug;51(2):184-90, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117877>>.

RANG H. et. al Pharmacology. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999.

REIS E SILVA, Adriana Rodrigues. Dinâmica da metilação do DNA em embriões de coelho no período pré-implantação. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011. 63 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Disponível em: <[http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/8646/1/2011\\_AdrianaRodriguesReiseSilva.pdf](http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/8646/1/2011_AdrianaRodriguesReiseSilva.pdf)>

RESEARCH, I. S. F. S. C. Glossary of Stem Cell-Related Terms. 2011. Disponível em: < [http://www.isscr.org/Glossary\\_of\\_Stem\\_Cell\\_Related\\_Terms/2957.htm#adult](http://www.isscr.org/Glossary_of_Stem_Cell_Related_Terms/2957.htm#adult) >. Acesso em: 15 de dezembro.

RIGGS, J.W., et al. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. **Stem Cells and Development**, 22(1):37-50. doi: 10.1089/scd.2012.0375. Epub 2012 Oct 26, Jan 1, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998387>>.

RIMONDINI, L.; MELE, S. Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. **Minerva Stomatol**, v. 58, n. 10, p. 483-500, Oct, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893474> >.

SEGURA-PACHECO, B. et al. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1596-603, May, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738711> >.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-55, Jul 10-16, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246727> >.

SINGH, N. et al. Molecular modeling and molecular dynamics studies of hydralazine with human DNA methyltransferase 1. **ChemMedChem**, v. 4, n. 5, p. 792-9, May, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322801> >.

SHEN C.C.; YANG Y.C.; LIU B.S. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Jan;100(1):48-63. Oct 4, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21972223>>.

SONOYAMA, W. et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PLoS One**, v. 1, p. e79, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183711> >.

SONOYAMA, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 2, p. 166-71, Feb, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215674> >.

STEWART, R. et al. Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 505-22, Jul, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588473> >.

SUN, J. M.; CHEN, H. Y; DAVIE, J. R. Effect of estradiol on histone acetylation dynamics in human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 28;276(52):49435-42., Dec, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682483>>.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 30, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408> >.

TECNOLOGIES, I.-I. D. OligoAnalyzer 3.1. Disponível em: < <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> >. Acesso em: 15 de janeiro.

TESCAROLLO A. O futuro da odontologia. Associação Brasileira de Odontologia, 2007. Disponível em < <http://www.abo.org.br/revista/88/materia8.php>> Acesso em: 10 de março.

TRUBIANI, O. et al. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 8, p. 646-53, Aug, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456513> >.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**,3(7):RESEARCH0034 Jun 18, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>>.

WANG, Z. et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 5, p. 820-5, May, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416426>>. >.

WARE, C. B. et al. Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 4, p. 359-69, Apr 3, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341625>>.

YU, J.; SHI, J.; JIN, Y. Current approaches and challenges in making a bio-tooth. **Tissue Engineering Part B**, v. 14, n. 3, p. 307-19, Sep, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18665759> >.

ZAEHRES, H. et al. High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, 23: 299–305. doi: 10.1634/stemcells.2004-0252, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749924>>.

ZHANG, W. et al. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2813-23, Oct, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518650> >.

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



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 023/08

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

Pesquisadora Responsável: Luciana Oliveira Pereira

Data de Entrada: 26/03/2008

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 023/2008 com o título: “Estudo *in vitro* de células-tronco pulpares de dentes com e sem inflamação; caracterização e indução de regeneração” Analisado na 3ª Reunião Ordinária, realizada no dia 08 de Abril de 2008.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB

Comitê de Ética em Pesquisa  
Seres Humanos - CEP/FS

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



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER Nº 71/2010**

**PROTOCOLO Nº DO PROJETO:** 34/10 – Estudo in vitro de células tronco pulpare de dentes com e sem inflamação: caracterização e indução de regeneração.

**Instituição Pesquisada:** Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

**Área Temática Especial:** Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

**Validade do Parecer:** 08/03/2012

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 12 de março de 2010.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE