



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GLEYCE OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS DO LRP6 E FRIZZLED6 NA DIFERENCIAÇÃO
ENDOTELIAL DE DPSC**

2015

GLEYCE OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS DO LRP6 E FRIZZLED6 NA DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL
DE DPSC**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2015.

Silva, Gleyce Oliveira

Efeitos do LRP6 e Frizzled6 na diferenciação endotelial de DPSC /
Gleyce Oliveira Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.

91 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo.

1. Engenharia Tecidual. 2. Vasos Sanguíneos. 3. Via de Sinalização
Wnt. 4. Neovascularização Fisiológica. 5. Célula-tronco. I. Camargo,
Carlos Henrique Ribeiro, orient. II. Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.
III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV.
UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 31 de julho de 2015

E-mail: gleyce_olisil@msn.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Renata de Azevedo Canevari

Faculdade de Ciências da Saúde
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera Garakis

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 31 de julho de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Edna Célia de Oliveira Silva e José Antônio da Silva, por todo apoio e incentivo a que me foi dado durante todo meu crescimento pessoal e profissional.

Vocês são minha fonte de inspiração e meu suporte.

Obrigada por todo o carinho e amor!

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar minhas escolhas e colocar em minha vida pessoas inesquecíveis e insubstituíveis.

À minha querida irmã Glaucia:

Obrigada por todo carinho, amor e amizade. Tenho imenso orgulho de tê-la ao meu lado e tenho certeza que seu futuro será brilhante. Te amo!

Ao meu namorado David:

Obrigada meu amor, por ser meu namorado, meu companheiro e estar ao meu lado mesmo quando a distância nos separava, me dando suporte no decorrer dos meus estudos. Amo você!

Aos meus familiares:

Agradeço por todo o incentivo e por fazerem parte do meu crescimento. Amo vocês!

Às minhas queridas amigas, Alessandra, Aline, Danielly, Débora, Fernanda, Juliana, Ligia, Marcela, Michelle, Paula, Tamara, Bárbara, Camila, Cristina, Graziela, Wivian e Lívia. Obrigada por todos os momentos de alegria e descontração em nossas conversas de grupo e pelos encontros escassos, mas sempre animados. Adoro vocês!

Lu, obrigada por ser minha amiga e estar sempre disposta a me escutar. Te amo!

Aletéia, Camila, Flávia, Marcella, Polyana, Rafaela, Tatiana e Lilian, a pós-graduação me deu grandes presentes, e a amizade de vocês é um deles. Acredito muito no sucesso de vocês! Obrigada pela amizade e companheirismo. Amigas para a vida toda. Amo vocês!

À todos os amigos de pós-graduação do Departamento de Odontologia Restauradora e do Departamento de Biociência e Diagnóstico Bucal, pelo compartilhamento de mesmas emoções durante todo o período em que convivemos no ICT-UNESP.

Aos professores da disciplina de endodontia: Profa. Ana Paula, Prof. Cláudio e Prof. Frederico. Obrigada pela contribuição em minha formação acadêmica.

À Prof. Márcia, minha primeira orientadora, a quem tenho grande admiração. Com certeza plantou a sementinha da pesquisa em mim enquanto eu ainda estava na graduação. Obrigada por todo suporte!

À querida Prof. Samira, pela disposição em ajudar sempre. Com você dei meus primeiros passos no laboratório de cultura de células. Muito Obrigada!

Ao Prof. Bruno, querido orientador mesmo que não formalmente. Exemplo de pessoa e profissional. Só tenho a agradecer por todo o auxílio prestado e incentivo, principalmente para a realização do meu estágio no exterior. E a sua esposa, Prof. Marcia, sempre disposta a ajudar, com todo seu carinho e alegria. Obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Carlos Henrique Ribeiro Camargo. Nessa longa jornada de pós-graduação sempre acreditou no meu potencial, me

incentivando e auxiliando no meu crescimento profissional. Com você eu adquiri paixão pela pesquisa. Muito Obrigada!

Ao meu orientador no exterior, Prof. Jacques Eduardo Nör, por me receber tão bem em seu laboratório, acreditar em mim e compartilhar sua sabedoria. Foi um ano enriquecedor, de muito estudo e aprendizado. Sua excelente orientação me fez seguir meu próprio caminho na pesquisa. Muito obrigada!

À todos os alunos e ex-alunos de iniciação científica, por todo o tempo de pesquisa e de aprendizado que adquirimos juntos.

À toda equipe do Nör's Lab, Kristy, Min, Jake, Sunny, April, Sara, Kelsey, Alex, Soumya, Luciana, Gerson, Carolina, Adriana, Evandro e Álvaro, por toda a experiência compartilhada e pelo bom convívio em laboratório durante todo o tempo em Michigan. Em especial ao Zhang, que me ensinou os experimentos realizados sempre com boa vontade e alegria.

Às funcionárias da Universidade de Michigan, Susan e Renita, pela ajuda nos processos do doutorado sanduíche.

Aos amigos que fiz na *Dental School*, Camila, Luciana, Douglas, Constanza, John, Vivian e Manoela. Obrigada pelos almoços de todos os dias, momento de muita conversa e risada. Com vocês os dias se tornaram mais agradáveis.

À todos os amigos que fiz em Ann Arbor, que me ajudaram a aliviar toda a saudade de casa durante todo período que estive longe. Vocês estarão sempre em meu coração!

À UNESP – Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e vice diretor Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa da Coordenadora Profa. Titular Marcia Carneiro Valera.

Aos docentes do programa de Odontologia Restauradora.

À FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado.

À secretária Rosângela, do Departamento de Odontologia Restauradora, pelas informações e atenção prestadas.

As técnicas de laboratório, Josiana e Fernanda, pelo suporte aos trabalhos realizados.

Aos secretários da Pós-Graduação, Erena, Rosemary, Bruno e Ivan, pela ajuda sempre que solicitada e informações prestadas.

À todos os docentes, docentes e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

À todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis". José de Alencar

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Células tronco da polpa dentária.....	23
2.2 Angiogênese e diferenciação endotelial de células-tronco da polpa dentária.....	24
2.3 Via de sinalização Wnt/β-catenina.....	27
2.4 Diferenciação endotelial e sinalização Wnt/ β-catenina..	30
2.5 Células tronco de origem dental e sinalização Wnt/β-catenina.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Obtenção das células e condições de cultivo celular....	36
4.1.1 Descongelamento.....	36
4.1.2 Troca de meio.....	37
4.1.3 Subcultura	37
4.1.4 Contagem de células.....	38
4.1.5 Congelamento.....	39
4.2 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina em DPSC por VEGF e Wnt1.....	39
4.2.1 Western Blot para a detecção das proteínas LRP6, Frizzled6, β -catenina ativa, GSK3- β total e fosforilada, AKT total e fosforilada e GAPDH.....	39
4.3 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/β-	

catenina em DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 por VEGF e Wnt1.....	42
4.3.1 Silenciamento gênico de LRP6 e Frizzled6 nas células DPSC.....	42
4.3.2 Western Blot para a detecção das proteínas β -catenina total e ativa, GSK3- β total e fosforilada, AKT total e fosforilada, BMI1, BCL2 e GAPDH.....	44
4.4 Indução da diferenciação de DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 em células endoteliais.....	44
4.4.1 RT-PCR para a detecção de RNAm para VEGFR1, VEGFR2, CD31, Tie-2 e GAPDH.....	44
4.4.2 Western Blot para a detecção das proteínas VEGFR1, VEGFR2, CD31, β -actina.....	47
4.4.3 ELISA para a quantificação das formas solúveis das proteínas VEGF e IL8.....	47
4.4.4 Ensaio de proliferação de capilares em Matrigel.....	48
4.5 Detecção de células DPSC eGFP positivas transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 nas paredes de vasos sanguíneos, <i>in vivo</i>.....	49
4.5.1 Preparo dos discos de dentina e matrizes condutivas.....	49
4.5.2 Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos.....	51
4.5.3 Eutanásia dos animais e remoção dos implantes.....	53
4.5.4 Análise imunohistoquímica para eGFP.....	53
4.6 Análise estatística.....	55
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina em DPSC por VEGF e Wnt1.....	57
5.2 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/β- shRNA-catenina em DPSC transduzidas com vetores lentivirais LRP6 e	

shRNA-Frizzled6 por VEGF e Wnt1.....	58
5.3 Indução da diferenciação de DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 em células endoteliais.....	62
5.4 Detecção de células DPSC eGFP positivas transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 nas paredes de vasos sanguíneos, <i>in vivo</i>	68
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO.....	84
8 REFERÊNCIAS.....	85
9 ANEXO.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Preparo das fatias dentárias. (A) Máquina de corte. (B) Lâmina de corte. (C) Cortes realizados na junção amelo-cementária. (D) Fatia dentária.....	50
Figura 2 – Matriz condutiva (<i>scaffold</i>) após dissolução de NaCl.....	51
Figura 3 – Células DPSC em Matrigel semeadas em fatias dentárias antes da implantação em camundongos imunodeprimidos.....	52
Figura 4 – Figura dos procedimentos para implantação dos espécimes. (A) Remoção dos pelos. (B) Incisão. (C) Divulsão do tecido. (D e E) Implantação dos espécimes. (F) Sutura.....	54
Figura 5 – Figura dos procedimentos para remoção dos espécimes. (A) Camundongo imunodeprimido com dois implantes no dorso. (B) Fatia dentária antes da remoção. (C) Remoção da fatia dentária com auxílio de lâmina de bisturi. (D) Fatia dentária após remoção mostrando vascularização do tecido pulpar.....	55
Figura 6 - Proteínas da via de sinalização Wnt/Beta-catenina em DPSC. (A) Western blots para marcar a expressão de proteínas da via Wnt/Beta-catenina em DPSC tratadas com 50 ng/ml de rhVEGF ou rhWnt1 por 24 h. (B) Western blots para avaliar o tratamento com 50 ng/ml de rhWnt1 por 15 min até 24 h na expressão de proteínas da via Wnt/Beta-catenina.....	58

Figura 7 - Silenciamento de LRP6 e Frizzled6 em DPSC. (A) Western blots para confirmar o silenciamento de Frizzled6 em DPSC comparado com DPSC transduzida com vetor lentiviral controle. (B) Western blots para confirmar o silenciamento de LRP6 em DPSC comparado com DPSC transduzida com vetor lentiviral controle. (C) Imagem de microscopia de fluorescência confirmando as células marcadas com eGFP (100x)..... 59

Figura 8 - Western blots para avaliar os efeitos do tratamento com 0; 0,5; 5 e 50 ng/ml de rhWnt1 por 24 h na expressão dos receptores da via Wnt/Beta-catenina, fosforilação de AKT e expressão de Bmi-1 e Bcl-2 em DPSC transduzida com shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6..... 61

Figura 9 - Western blots para avaliar os efeitos do tratamento com 0; 0,5; 5 e 50 ng/ml de rhVEGF por 24 h na expressão dos receptores da via Wnt/Beta-catenina, fosforilação de AKT e expressão de Bmi-1 e Bcl-2 em DPSC transduzida com shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6..... 62

Figura 10 - Expressão gênica dos marcadores endoteliais CD31, Tie-2, VEGFR1 e VEGFR2 em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhWnt1 e EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e rhWnt1 por 7 dias..... 63

Figura 11 – Expressão proteica dos marcadores endoteliais CD31, VEGFR1 e VEGFR2 em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e rhWnt1 por 7

dias.....	64
Figura 12 - Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-controle cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.....	65
Figura 13 - Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-Frizzled6 cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.....	65
Figura 14 - Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-LRP6 cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.....	66
Figura 15 - Gráfico de barras dos valores médios das concentrações da proteína solúvel VEGF (pg/ml) em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, obtidos pelo teste de ELISA. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes.....	67
Figura 16 - Gráfico de barras dos valores médios das concentrações da proteína solúvel IL8 (pg/ml) em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, obtidos pelo teste de ELISA. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes.....	67

Figura 17 - Gráfico de linhas do número de túbulos formados por DPSC-shRNA-LRP6, DPSC-shRNA-Frizzled6 e DPSC-shRNA-controle em Matrigel e estimuladas com EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF. Células HDMEC foram usadas como controle positivo. Os dados representam os valores médios e desvio padrão ($p = 0,0000$).....	68
Figura 18 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por HDMEC cultivadas com EGM-2MV em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h, mostrando a diminuição da estruturas tubulares conforme aumento de horas.....	70
Figura 19 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-controle cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.....	71
Figura 20 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-Frizzled6 cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.....	71
Figura 21 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-LRP6 cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.....	72
Figura 22 - Imagem microscópica de fatia dentária/ <i>scaffold</i> semeada com DPSC-shRNA-controle e implantada em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corada por HE, demonstrando formação de tecido vascularizado dentro da fatia.....	72

Figura 23 – Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA-controle e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos, as vermelhas de células odontoblasto-*like* e as verdes de prolongamentos odontoblásticos..... 73

Figura 24 - Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA-Frizzled6 e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos, as vermelhas de células odontoblasto-*like* e as verdes de prolongamentos odontoblásticos..... 73

Figura 25 - Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA-LRP6 e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos e as setas vermelhas de células odontoblasto-*like*..... 74

Figura 26 – Gráfico de barras representativo do número de vasos sanguíneos marcados por imuno-histoquímica em fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC transduzidas com shRNA-LRP6, shRNA-Frizzled6 e shRNA-C em camundongos imunodeficientes por 28 dias. Os dados representam os valores médios e desvio padrão..... 74

Figura 27 – Imunohistoquímica das fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA em camundongos imunodeficientes por 28 dias. As setas indicam os capilares sanguíneos formados imuno-coradas..... 75

Silva GO. Efeitos do LRP6 e Frizzled6 na diferenciação endotelial de DPSC [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a função da via de sinalização Wnt/ β -catenina através dos receptores LRP6 e Frizzled6 na diferenciação de células-tronco de polpa dental de dentes permanentes (DPSC) em células endoteliais. DPSC foram transduzidas com marcadores eGFP e vetores lentivirais shRNA (LRP6, Frizzled6 ou vetor vazio - controle) para os experimentos. Os testes *in vitro* avaliaram a expressão de GSK3- β e β -catenina por western blot na presença de rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅ e de VEGF e CXCL-8 (IL-8) por ELISA. A expressão de marcadores endoteliais (western blot e PCR) e formação de túbulos capilares foram analisados após a diferenciação endotelial das DPSCs. *In vivo*, fatias dentárias/matrizes condutivas semeadas com DPSCs-shRNA foram implantadas em subcutâneo de dorso de camundongos imunodeprimidos por 28 dias e o número de vasos sanguíneos foi determinado por imunohistoquímica para eGFP e coloração por HE. β -catenina ativa foi mais expressa em shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 que nas células controle, e sua expressão aumentou com a suplementação com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1. A expressão de GSK3- β fosforilado foi menor, porém também aumenta ou permanece estável com rhVEGF₁₆₅ ou rhWnt1. Quanto à expressão de VEGF, em shRNA-Frizzled6 foi maior que nas células controle e em shRNA-LRP6 ($p < 0,05$), enquanto que a expressão de IL8 foi menor em shRNA-LRP6, diferindo estatisticamente das outras células. A expressão dos marcadores endoteliais CD31 e VEGFR2 diminuiu nas células shRNA-LRP6, enquanto que em shRNA-Frizzled6 a expressão de VEGFR2 foi aumentada. A formação de túbulos capilares de shRNA-Frizzled6 e shRNA-LRP6 foi menor quando comparado ao controle, porém shRNA-Frizzled6 obteve uma tendência de aumento na proliferação de capilares em 144h. *In vivo*, DPSC-shRNA-LRP6 apresentou menor número de capilares formados quando comparados com as outras duas células ($p < 0,05$). Coletivamente, os resultados deste estudo sugerem que a via de sinalização Wnt/ β -catenina regula a diferenciação endotelial de DPSC através de LRP6.

Palavras-chave: Engenharia tecidual. Vasos sanguíneos. Via de Sinalização Wnt. Neovascularização Fisiológica. Célula-tronco.

Silva GO. *LRP6 and Frizzled6 effects in the endothelial differentiation of DPSC [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the function of Wnt/ β -catenin signaling through LRP-6 and Frizzled-6 receptors in the differentiation of dental pulp stem cells from permanent teeth (DPSC) into endothelial cells. DPSC were transduced with GFP-tagged lentiviral shRNA vectors (LRP6, Frizzled6 or empty vector - control) for experiments. In vitro assay evaluated GSK3- β and β -catenin expression by western blot in rhWnt1 and rhVEGF₁₆₅ presence, and VEGF and CXCL-8 (IL-8) expression by ELISA. Endothelial markers expression (western blot and PCR) and tube formation were analyzed after endothelial differentiation of DPSCs. In vivo, tooth slices/scaffolds seeded with transduced DPSCs were implanted subcutaneously in back of immunodeficient mice and blood vessels were counted per immunohistochemistry for eGFP and HE staining. Active β -catenin was more expressed in shRNA-LRP6 and shRNA-Frizzled6 than in control cells, and increased with rhVEGF₁₆₅ and rhWnt1 supplementation. Phosphorylated GSK3- β expression was lower, however also increased or maintained with rhVEGF₁₆₅ or rhWnt1. VEGF expression was higher in shRNA-Frizzled6 than in control and shRNA-LRP6 ($p < 0,05$), IL8 expression was lower in shRNA-LRP6, with statistically difference of the others cells. Endothelial markers CD31 and VEGFR2 expression decreased in shRNA-LRP6, but VEGFR2 expression increased in shRNA-Frizzled6. shRNA-Frizzled6 and shRNA-LRP6 tube formation was lower when compared to control, however shRNA-Frizzled6 had tendency to increase proliferation in 144h. In vivo, shRNA-LRP6 showed fewer blood vessels formed than other cells ($p < 0,05$). Collectively, the results of this study suggest that Wnt/ β -catenin signaling regulates endothelial differentiation of DPSC through LRP6.

Keywords: Tissue engineering. Blood vessels. Wnt Signaling Pathway. Neovascularization, Physiologic. Stem cells.

1 INTRODUÇÃO

O objetivo da odontologia restauradora moderna é restabelecer funcional e esteticamente a estrutura dentária perdida (Edwards, Mason, 2006). Injúrias aos tecidos dentários podem causar danos ao tecido pulpar, sendo que agentes irritantes de origem mecânica, química, térmica e microbiana, podem ativar o processo inflamatório, levando a pulpites e/ou necrose da polpa dentária (Bjorndal, Mjor, 2001). Essas alterações, por sua vez, em geral demandam a realização do tratamento endodôntico, que consiste na remoção do tecido pulpar e obturação com material compatível biologicamente. Neste contexto, foi introduzido o conceito de engenharia do tecido pulpar, associado à terapia celular, como estratégia para revitalizar dentes, fornecendo uma alternativa para o tratamento endodôntico em casos selecionados (Mooney et al., 1996).

A bioengenharia é baseada na interação de três componentes essenciais: uma matriz que funciona como arcabouço, células-tronco ou progenitoras, e proteínas sinalizadoras (Nakashima, Akamine, 2005; Nör, 2006), denominadas fatores de crescimento, como estímulo para diferenciação celular. A matriz fornece um ambiente que permite migração e proliferação celular (Nakashima, Akamine, 2005). As características físico-químicas da matriz são determinantes críticos do comportamento celular e, conseqüentemente, da formação tecidual (Graziano et al., 2008; Demarco et al., 2010). Além disso, as matrizes podem ser funcionalizadas com moléculas bioativas, como fatores de crescimento, para guiar formação tecidual e o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Wei et al., 2006).

Já as células-tronco são células indiferenciadas com vários graus de potência e plasticidade, capazes de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens (Raff, 2003; Nör, 2006). As células-tronco da polpa dentária são de origem mesenquimal e podem ser obtidas tanto de dentes permanentes, denominadas células-tronco da polpa dental de dentes permanentes (DPSC) (Gronthos et al., 2000), quanto de dentes decíduos, denominadas células-tronco da polpa de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED) (Miura et al., 2003). Estas células têm habilidade para se diferenciarem em células odontoblásticas, fibroblastos pulpares, células adipogênicas, neurogênicas, e células endoteliais (Gronthos et al., 2002; Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010).

No que diz respeito aos fatores extracelulares na engenharia tecidual, as proteínas morfogenéticas, também chamadas sinalizadoras, induzem a sinalização celular e influenciam funções críticas como divisão celular, síntese de matriz e proliferação (Nör, 2006). Estas moléculas têm papel importante em vários eventos como a formação de dentina terciária e reparadora (Tziafas, 1995). A matriz dentinária funciona como reserva de fatores de crescimento capazes de estimular resposta tecidual após serem mobilizadas (Smith et al., 2008).

Acredita-se que fatores de crescimento e moléculas bioativas sequestradas da matriz dentinária possam ser capazes de sinalizar processos reparadores que levam à diferenciação de células-tronco em odontoblastos (Goldberg, Smith, 2004; Murray et al., 2007). Sinalizadores morfogenéticos derivados da dentina, principalmente BMP-2 (proteína morfogenética óssea 2), são necessários e suficientes para induzir a diferenciação de células-tronco em odontoblastos (Casagrande et al., 2010). Além disso, estudo recente mostra que os componentes da matriz dentinária apresentam atividade pró-angiogênica em baixas concentrações em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC),

enquanto em altas concentrações causam supressão (Zhang R et al., 2011).

Wnt é uma proteína conhecida por ativar a via de sinalização Wnt/ β -catenina podendo promover proliferação celular (Wright et al., 1999). A via de sinalização Wnt tem papel em vários processos durante o desenvolvimento incluindo proliferação celular e diferenciação celular, destino das células, apoptose, polaridade axial e guia axonal (Cadigan, Nusse, 1997; Nelson, Nusse, 2004). A chave mediadora desta via de sinalização é a proteína β -catenina que é encontrada de modo dinâmico em múltiplas localizações subcelulares, incluindo junções, citoplasma e núcleo (Voronkov, Krauss, 2013). Wnt/ β -catenina é uma via que resulta na entrada da proteína citoplasmática β -catenina no núcleo para modular a transcrição. A sinalização é iniciada quando ligantes do Wnt engatam ao seu complexo receptor cognato, um membro da família Frizzled, e um membro da família LDL (lipoproteína de baixa intensidade) – LRP5/6 (proteína receptora relacionada 5/6). Na ausência de Wnt, β -catenina é constantemente fosforilada por um complexo multi-proteico, que inclui a enzima GSK-3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta) e degradada pelo complexo de proteínas proteassoma 26S (Reya, Clevers, 2005).

Na presença de Wnt, através de Frizzled e LRP5/6, β -catenina é acumulada e translocada para o núcleo onde interage com a família de proteínas fator celular-T/fator intensificador linfóide (TCF/LEF) modulando a expressão da cascata de genes, como os mediadores da angiogênese VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), CXCL8 (interleucina 8) e VEGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) (Zhang X et al., 2001; Masckauchán et al., 2005; Lindsley et al., 2006). Frizzled funciona como um receptor acoplado à proteína G (GPCR) que preferencialmente se acopla às subunidades G_{α} das proteínas G (Nichols et al., 2013). Há evidências de que as proteínas G têm papel na ativação da via de sinalização Wnt através da inibição da fosforilação de

β -catenina pelo GSK-3. Também, tem sido proposto que a subunidade $G\beta\gamma$ promove o recrutamento de GSK-3 da membrana plasmática para aumentar a fosforilação e ativação de LRP6 (Jernigan et al., 2010).

A atividade desta via de sinalização tem sido detectada em vasculatura *in vivo* e na diferenciação de células-tronco em odontoblastos, cementoblastos/osteoblastos e células neurais (Maretto et al., 2003; Ye et al., 2009; Scheller et al., 2008; Silvério et al., 2012; Feng et al., 2013). Embora existam alguns trabalhos relacionando a via de sinalização Wnt/ β -catenina e a diferenciação de células tronco de origem dental, ainda faltam estudos associando a diferenciação endotelial de DPSCs com esta via. Aqui, nós usamos uma combinação de estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o papel da via Wnt/ β -catenina através de LRP6 e Frizzled6 na diferenciação de DPSC em células endoteliais.

A hipótese deste estudo é que a via de sinalização Wnt/ β -catenina tem função na diferenciação endotelial de células tronco da polpa dental de dentes permanentes através dos receptores LRP6 e Frizzled6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco da polpa dentária

A polpa dental é um tecido mesenquimal altamente especializado caracterizado pela presença de odontoblastos e é cercado por um tecido mineralizado rígido (Nor, 2006). É infiltrado por uma rede de vasos sanguíneos e feixes nervosos que emergem da região apical, além de conter células-tronco que potencialmente se diferenciam em odontoblastos em resposta às proteínas morfogenéticas (BMPs) (Nakashima, Akamine, 2005).

DPSC são células clonogênicas com alta capacidade de proliferação originárias do tecido pulpar de dentes permanentes, isoladas por meio da digestão enzimática da polpa dentária (Gronthos et al., 2000) e expressam marcadores de células-tronco mesenquimais como STRO-1, CD29, CD90, CD105 e CD146 (Lei et al., 2014). Estas células tem habilidade de se diferenciarem em células odontoblásticas, fibroblastos pulpares, adipócitos e células neurais (Gronthos et al., 2002). *In vitro*, DPSC são capazes de formar nódulos mineralizados com elevados níveis de cálcio (Gronthos et al., 2000) e expressam marcadores odontoblásticos DMP-1 (proteína da matriz dentinária 1), DSPP (fosfoproteína dentinária) e MEPE (proteína fosforilada da matriz extracelular) quando cultivados na presença de dentina e matriz condutiva (*scaffold*) (Demarco et al., 2010). Estas células apresentam as mesmas características após transplantadas em dorso de rato e novamente isoladas (Lei et al., 2014). E expressam BMI1 (proteína do complexo

polycomb), sugerindo capacidade de auto-renovação e proliferação (Iohara et al., 2006).

Estudo recente demonstrou que DPSCs são capazes de induzir a angiogênese de forma parácrina, produzindo grande quantidade de moléculas angiogênicas como o VEGF e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), além de possuir capacidade para estimular migração de células endoteliais pela ativação das sinalizações PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase) e MEK/ERK (proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular) nas células endoteliais). *In vivo*, estas células são capazes de induzir a formação de vasos sanguíneos (Bronckaers et al., 2013).

SHED é uma população de células clonogênicas originadas da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados humanos, altamente proliferativas, capazes de se diferenciarem em células neurais, adipócitos e odontoblastos, além de induzir formação óssea e dentina (Miura et al., 2003). Também diferenciam-se em células endoteliais vasculares que formam vasos sanguíneos funcionais que se anastomosam com a vasculatura adjacente (Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010).

2.2 Angiogênese e diferenciação endotelial de células-tronco da polpa dentária

A angiogênese é definida como a formação de novos capilares sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes (Carmeliet, Jain, 2011). Atua como papel principal em locais de crescimento tecidual, durante inflamação, cicatrização de feridas, e é essencial para o crescimento tumoral e formação de metástase (Carmeliet, Jain, 2000; Distler O et al., 2002).

O primeiro passo da angiogênese é a vasodilatação de vasos preexistentes com o envolvimento do óxido nítrico (Carmeliet, Jain, 2000) regulado pelo VEGF, que também aumenta a permeabilidade das células endoteliais. Angiopietina 2 e proteases incluindo ativadores plasminogênicos, quimases e metaloproteinases da matriz (MMPs) são responsáveis pela desestabilização dos vasos e degradação da matriz para que haja a formação de novos capilares sanguíneos. A proliferação e migração endotelial é realizada por moléculas angiogênicas incluindo membros da família do VEGF e FGF (fator de crescimento fibroblástico), angiopietinas 1 e 2, angiogenina, EGF (fator de crescimento epidermal), quimiocinas CXC e IGF-1 (fator de crescimento insulínico). Estruturas tubulares são formadas quando as células endoteliais atingem as áreas vasculares com densidade reduzida. Finalmente, o tubo vascular é estabilizado por células murais, células mesenquimais diferenciadas em pericitos (Distler JH et al., 2003).

O VEGF (também conhecido como VEGF-A) é um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes (Pandya et al., 2006), podendo iniciar a cascata de eventos envolvidos na angiogênese, atuando como fator de proliferação, migração e sobrevivência para células endoteliais, tanto *in vivo* como *in vitro* (Costa et al., 2004; Ferrara, 2004; Pandya et al., 2006). E tem sido considerado o principal fator de crescimento para o desenvolvimento de células endoteliais, sendo que diversos estudos demonstram seus efeitos estritamente dose-dependentes no desenvolvimento vascular embrionário (Hirashima et al., 2003). A atividade angiogênica deste fator pode ser em parte à sua habilidade de aumentar a sobrevivência de células endoteliais pela indução da expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (linfoma de células B 2) (Nör et al., 1991). Além disso, esse fator de crescimento potencializa a permeabilidade vascular, a qual pode tanto preceder ou acompanhar a angiogênese (Ferrara, 2004, Hoeben et al., 2004). Seus efeitos biológicos são determinados pela ligação com dois receptores de tirosina quinase de

alta afinidade: VEGFR1 (receptor 1 do fator de crescimento vascular) e VEGFR2 (Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Hirashima et al., 2003).

VEGFR1, também conhecido como FLT-1 modera a quantidade de VEGF livre disponível para ativar VEGFR2, explicando porque a perda de VEGFR1 resulta em falha do desenvolvimento vascular (Hirashima et al., 2003) e possui atividades importantes na hematopoiese e no recrutamento de células mononucleares (Ferrara, 2004).

O VEGFR2 possui papel chave na angiogênese embrionária e na hematopoiese. Esse receptor é considerado o principal mediador dos efeitos angiogênicos, mitogênicos e de aumento de permeabilidade do VEGF (Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004, 2009). É expresso principalmente em células endoteliais em proliferação, enquanto é pobremente expressa em vasos sanguíneos maduros (Ferrara et al., 2003).

Neuropilinas como NRP1 e NRP2 são co-receptores de VEGF que realçam a atividade de VEGFR2, mas também apresentam sinais independentes (Neufeld, Kessler, 2008).

Além dos receptores de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2, células endoteliais também expressam CD31 (PECAM-1, molécula de adesão plaqueta-célula), fator de Von Willebrand, TIE2 (tirosina quinase com domínios semelhantes à imunoglobulina e ao EGF 2), VCAM1 (molécula de adesão celular-vascular 1) e caderina-VE (caderina endotelial vascular) que são considerados marcadores de diferenciação endotelial (Jazayeri et al., 2008).

Com relação a formação de vasos sanguíneos pelas células-tronco da polpa dentária, estudos recentes demonstraram a capacidade destas células de se diferenciarem em células endoteliais em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010). E VEGF tem sido considerado como indutor de diferenciação de células-tronco em células endoteliais, sozinho ou em associação com outros

fatores de crescimento (Mullane et al., 2008; Sakai et al., 2010; Zhang R et al., 2011; Bento et al., 2013).

Cordeiro et al., 2008 demonstrou pela primeira vez que células-tronco da polpa dentária (SHED) foram capazes de se diferenciarem em células endoteliais que formaram vasos sanguíneos funcionais que se uniram a vasculatura existente, quando implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos em um modelo de estudo composto de fatia dentária/matriz condutiva de PLLA (Ácido poli-L-lático).

Posteriormente, foi demonstrado que as SHED foram capazes de se diferenciarem em células endoteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro*, induzidas pelos fatores provenientes da matriz dentinária, principalmente o VEGF. *In vitro*, VEGF induziu SHED a expressar os marcadores endoteliais VEGFR2, CD31 e caderina-VE. Também foi demonstrado que o VEGF foi capaz de ativar as rotas de sinalização AKT e MEK, indicativos de diferenciação, e de inativar STAT-3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3), além da presença de dois receptores (VEGFR1 e NRP1) para esse fator de crescimento (Sakai et al., 2010).

Mais recente, células-tronco da polpa dentária foram capazes de se diferenciarem em células endoteliais depois de induzidas com meio de cultura para células endoteliais (EGM-2MV) suplementado com VEGF. *In vivo*, células-tronco que tiveram VEGFR1 silenciadas inibiram a diferenciação endotelial destas células. Estes autores também revelaram que a diferenciação endotelial das células-tronco de polpa dentária é resultado da regulação inversa e recíproca da atividade de STAT3 e ERK pelo desencadeamento da via de sinalização VEGF/MEK1 (Bento et al., 2013).

2.3 Via de sinalização Wnt/ β -catenina

A sinalização Wnt inclui as vias de sinalização canônica dependente de β -catenina e não canônica independente de β -catenina. Wnt/ β -catenina é ramificação de uma extensa rede funcional que se desenvolveu em torno de uma classe de proteínas, proteínas *armadillo*, que datam antes dos primeiros metazoários anaeróbicos. Esta via está amplamente envolvida no sistema biológico, incluindo biologia de células tronco, desenvolvimento biológico e sistemas orgânicos adultos (Voronkov, Kraus, 2013). Também tem papel fundamental na determinação do destino celular, proliferação, polaridade e morte celular durante o desenvolvimento embriogênico, assim como na homeostase tecidual em adultos (Saito-Diaz et al., 2013).

Wnt são proteínas morfogênicas ricas em cisteína de ~350-400 aminoácidos que podem atuar em sinalizações curtas e longas. Há 19 Wnts em vertebrados, e todos parecem ser capazes de ativar a via de sinalização. A sinalização é iniciada quando os ligantes solúveis de Wnt ligam-se a membros da família Frizzled de sete receptores de domínio transmembrânicos, que tem similaridade estrutural com os receptores de proteína G (GPCRs) (Saito-Diaz et al., 2013) promovendo um link com um membro da família LDL –LRP5/6 (Reya, Clevers, 2005).

A chave mediadora da via de sinalização Wnt é a proteína β -catenina que é encontrada de modo dinâmico em múltiplas localizações subcelulares, incluindo junções, citoplasma e núcleo (Voronkov, Krauss, 2013). β -catenina foi pela primeira vez identificada como componente estrutural do complexo de adesão celular (*cell-cell adhesion*) que diretamente se liga a molécula de adesão caderina (McCrea et al., 1991). Quando a via não é ativada, β -catenina é produto de um “ciclo fútil” de síntese contínua e destruição pelo complexo de destruição da β -catenina, composta por supressores de tumor polipose adenomatosa coli (APC) e Axin (regulador negativo da via Wnt) e proteínas quinases GSK3 e caseína quinase 1 (CK1), que sequencialmente fosforizam um conjunto de resíduos conservados de serina e treonina quinases no terminal amino

da β -catenina. O resultado da fosforilação recruta uma β -TrCP (proteína com repetições de beta-transducina) contendo uma ligase ubiquinina E3, que leva a β -catenina para degradação no proteossoma 26S (Reya, Clevers, 2005) (ANEXO A).

A sinalização do Wnt inibe a atividade quinase do complexo de destruição por um incompleto entendimento do mecanismo envolvendo a interação direta do axin com LRP5/6, e/ou das ações da molécula que se liga ao axin, Dishvelled, estabilizando β -catenina que entra no núcleo, onde interage com TCF/LEF, para mediar a transcrição, modulando a expressão da cascata de genes, como os mediadores da angiogênese VEGF, CXCL8 e VEGFR2 (Zhang X et al., 2001; Masckauchan et al., 2005; Lindsley et al., 2006).

Estudo recente evidencia que a ativação de β -catenina nas sinalizações Wnt e AKT é coordenada pela N-caderina, uma molécula de adesão celular. Na presença de Wnt, N-caderina regula a fosforilação de LRP6, enquanto que em sua ausência, N-caderina também regula a ativação da atividade de transcrição de β -catenina via fosforilação de β -catenina no terminal serina 552 mediada pelo AKT (Zhang J et al., 2013).

A interação de Frizzled e Wnt, sem o co-receptor LRP5/6, ativa a via de sinalização não canônica de Wnt. LRP5/6 é capaz de prevenir a ativação da via não canônica através da direta interação com Frizzled (Ren et al., 2015). Na via canônica, LRP6 é capaz de inibir diretamente a atividade de GSK, bloqueando a fosforilação e degradação de β -catenina e aumentando a β -catenina citosólica (Beagle et al., 2009; Wu et al., 2009). A expressão de LRP6 também aumenta a atividade de TCF/LEF-1, que pode ser um resultado indireto do aumento da estabilização de β -catenina (Beagle et al., 2009). Além disso, LRP6 pode translocar para o núcleo reprimindo a atividade de TCF/LEF-1, e desta forma, modular a atividade de transcrição dependendo da localização subcelular e diferentes interações proteína-proteína (Beagle, Johnson, 2010).

Frizzled tem importante papel como um receptor acoplado à proteína G (GPCR) não tradicional, com altos níveis de atividade quando acoplado à $G\alpha$ (Nichols et al., 2013). Estudo evidencia que $G\alpha_o$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{i2}$ e $G\beta_\gamma$ tem capacidade de inibir a fosforilação e degradação de β -catenina pelo GSK3. É proposto que $G\beta_\gamma$ promove o recrutamento de GSK3 para a membrana plasmática para aumentar a fosforilação e ativação de LRP6 (Jernigan et al., 2010). O receptor Frizzled6 foi identificado como um regulador negativo da sinalização Wnt/ β -catenina, sua interação com Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt4 ou Wnt5a não mostrou aumento da atividade de TCF/LEF. Por outro lado, Frizzled6 inibiu a atividade de transcrição de TCF/LEF induzida por Frizzled1 e Wnt3a. Este efeito inibitório de Frizzled6 está relacionado a ativação de diferentes vias de sinalização, que conduz à fosforilação de TCF/LEF reduzindo sua ligação com o gene alvo (Golan et al., 2004).

2.4 Diferenciação endotelial e sinalização Wnt/ β -catenina

Em 1999, Wright et al. demonstraram pela primeira vez que a sinalização de Wnt e β -catenina tem função em células vasculares. Uma análise de RT-PCR mostrou que células endoteliais primárias, tanto de camundongos quanto de humanos, expressam membros do Wnt e de seu receptor Frizzled. A transfecção de um vetor de expressão para Wnt-1 em células endoteliais primárias aumentou a quantidade de β -catenina livre e a transcrição de LEF/TCF. Expressão de *Wnt1* também estimulou proliferação de culturas de células endoteliais primárias. Os dados mostram que Wnt e Frizzled podem regular o sinal de transdução, pela β -catenina, em células endoteliais. Este estudo sugeriu que a via de sinalização Wnt pode ser parte essencial na diferenciação da vasculatura normal assim como na patológica.

Maretto et al., 2003, geraram camundongos transgênicos reportados com β -catenina transgênica ativada que conduziam expressão de β -galactosidase nuclear (BAT-gal) e que expressavam o gene *lacZ* (enzima que cliva a lactose em glucose e galactose) sob o controle dos elementos responsivos β -catenina/Fator T celular. Camundongos BAT-gal desvelaram a complexidade do Wnt/ β -catenina em mamíferos, como na notocorda, endotélio e áreas do cérebro adulto, e teve amplos potenciais de aplicação para a identificação de populações celulares Wnt responsivas no desenvolvimento e doença.

Outro estudo reportou que os receptores do Wnt e os efetores transcripcionais são expressos em células endoteliais humanas primárias e que a via de sinalização Wnt/ β -catenina promove angiogênese. Células HUVEC e HDMEC (células endoteliais da microvasculatura da derme) expressaram receptores do Wnt, Frizzled-4, -5, -6 e β -catenina associados a fatores de transcrição, Tcf-1, -3, -4 e Lef-1. Nas células endoteliais, a expressão ectópica de Wnt1 estabilizou a β -catenina do citosol, demonstrando a ativação da via de sinalização canônica de Wnt/ β -catenina. A expressão de Wnt1 ou a forma ativa ou estável de β -catenina, β -cateninaS37A, promoveu proliferação endotelial, formação de capilares em Matrigel e induziu transcrição de Interleucina-8 e de proteínas secretadas. A proliferação induzida pela sinalização Wnt/ β -catenina foi melhorada na presença de β FGF (fator de crescimento fibroblástico básico). A expressão de β -cateninaS37A em células endoteliais promoveu sobrevivência celular mesmo depois da privação de fatores de crescimento. Análise de *microarray* foi usado para comparar a expressão de Wnt de células endoteliais com células controle para definir os efetores da função angiogênica de Wnt. Também, Interleucina-8 foi identificada como alvo de transcrição da sinalização de Wnt/ β -catenina em células endoteliais. Os autores concluíram que a sinalização de Wnt/ β -catenina promove angiogênese possivelmente pela indução de

conhecidos fatores angiogênicos como a Interleucina-8 (Masckauchán et al., 2005).

Esta via também estabelece base para a doença de hipovascularização retinal. A perda da sinalização de Frizzled 4 em células endoteliais causa defeito no crescimento vascular, que conduz para o crônico, mas reversível, silenciamento dos neurônios da retina. A perda de Frizzled 4 em todas as células endoteliais rompe a barreira sanguínea cerebral no cerebelo, enquanto que o excesso de Frizzled 4 rompe a angiogênese embriogênica. Sox 17, um fator de transcrição regulado por Norrin (proteína da doença Norrie)/Frizzled 4/LRP, atua como papel central na indução do programa angiogênico controlado pelo Norrin/Frizzled 4/LRP (Ye et al., 2009).

Em estudo mais recente, foi verificado através de citometria de fluxo e imuno-histoquímica que a indução da sinalização Wnt pela inibição da molécula GSK3 pelo inibidor CHIR99021 permitiu a subsequente diferenciação de hPSCs (células-tronco pluripotentes humanas) em células CD34+CD31+, e que o tratamento com VEGF exógeno não foi requerido para esta diferenciação. Entretanto, a inibição de receptores tirosina quinases, incluindo VEGFR, produziu poucas células CD34+CD31+, sugerindo que a sinalização de VEGF endógeno é importante para a diferenciação de células endoteliais progenitoras estimuladas pelo tratamento com CHIR99021. Ainda, quando a molécula β -catenina foi inibida destas células e induzidas com o inibidor para GSK3, células CD34+CD31+ não foram geradas, indicando que a sinalização Wnt/ β -catenina foi essencial para a indução endotelial (Lian et al., 2014).

2.5 Células tronco de origem dental e sinalização Wnt/ β -catenina

Há poucos estudos relacionando células tronco de origem dental e a via de sinalização Wnt/ β -catenina, entre eles podemos citar os estudos relacionados abaixo.

Células DPSC foram transduzidas com retrovírus expressando hemaglutinina (HA) contendo Wnt1 aumentando a β -catenina presente no citosol e núcleo celular, sugerindo que Wnt-1 estabiliza a β -catenina em células DPSC. Estas células foram induzidas à mineralização, e a atividade de fosfatase alcalina diminuiu cerca de 90% em comparação às células DPSC controle. Quando realizado co-cultura entre os dois tipos celulares, notou-se que a atividade de fosfatase alcalina também diminuiu nas células controle, indicando que a secreção de Wnt-1 pode inibir a atividade da fosfatase alcalina nas células DPSC. Nos ensaios de mineralização com Alizarina vermelha também observou-se que Wnt-1 secretado inibiu a formação de minerais nestas células. As células DPSC também foram transduzidas com S37A β -catenina mutante, que protege a β -catenina de ser fosforilada e degradada pelo GSK3- β , e mostraram pobre mineralização e densidade óssea quando induzidas à mineralização. Os autores concluíram que a via de sinalização canônica pode inibir a diferenciação odontoblástica em DPSC (Scheller et al., 2008).

Resultados semelhantes foram obtidos em células do folículo dental (SVF4) que foram induzidas à diferenciação em cementoblasto/osteoblasto mediada por BMP2. Wnt3A aumentou a estabilidade de β -catenina e aprimorou a atividade de transcrição dependente de TCF/LEF nestas células. Células tratadas com Wnt3A por 5 dias tiveram expressão diminuída de ocitocina (*Ocn*), porém a expressão de sialoproteína óssea (*Bsp*) foi aumentada. Após 15 dias de tratamento, Wnt3A bloqueou a indução de mineralização de BMP2 em testes de coloração de Von Kossa e Alizarina vermelha. Resultados obtidos pela amplificação de PCR de células com a via de sinalização Wnt inativa mostrou um aumento na expressão dos marcadores de atividade

osteoblástica (*Runx2* - fator de transcrição relacionado ao Runt 2, *Alp* – fosfatase alcalina e *Ocn*). Quando as células foram reduzidas de 70% da transcrição de β -catenina (siRNA) houve diminuição dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Alp* e *Ocn*, enquanto que a inibição total da transcrição de β -catenina resultou em aumento de *Bsp*, indicando que a via de sinalização Wnt/ β -catenina endógena é requerida para a indução de alguma expressão de marcadores de osteoblasto/cementoblasto por BMP2 (Silvério et al., 2012).

Em outro estudo, Feng et al. estudaram a associação entre capacidade de diferenciação neurogênica idade-dependente com a expressão de proteínas relacionadas a via de sinalização Wnt. Para este estudo, os autores utilizaram células SHED, provenientes da polpa dental de dentes decíduos e células DPSC, provenientes da polpa de dente permanente. Após indução por 7 dias com meio de diferenciação neural, foi observado que DPSC diminuiu consideravelmente a expressão de marcadores neurais (β -tubulina, MAP2 - proteína associada a microtúbulo 2, Nestin e TH- tirosina hidroxilase) em comparação às SHED. Também foi encontrado que a expressão de β -catenina total foi significativamente baixa em DPSC enquanto que a expressão de GSK-3 β foi consideravelmente alta comparado às células SHED. Também foi observado que a expressão de β -catenina nuclear e citoplasmática foi significativamente baixa em DPSC que em SHED. Entretanto, o tratamento com 100ng/ml de Wnt1 aumentou a expressão de β -catenina e diminuiu a de GSK-3 β nas células DPSC. A expressão de dos marcadores neurais nas células DPSC aumentou consideravelmente na presença de Wnt1, revertendo a capacidade de diferenciação neurogênica nestas células (Feng et al., 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar a atuação dos receptores Frizzled6 e LRP6 da via de sinalização Wnt/ β -catenina na diferenciação de DPSC em células endoteliais, através da:

- a) Análise da expressão proteica de GSK-3 β (total e fosforilada), β -catenina (total e ativa), Frizzled6 e LRP6, responsáveis pela ativação da via de sinalização Wnt, nas células DPSC;
- b) Análise da expressão proteica de GSK-3 β (total e fosforilada), β -catenina (total e ativa) em células DPSC transduzidas com vetores lentivirais sh-RNA-LRP6 ou shRNA-Frizzled6;
- c) Análise das expressões proteica e gênica dos marcadores endoteliais (CD31; VEGFR2; VEGFR1; Tie 2) e análise de formação tubular de células DPSC silenciadas induzidas à diferenciação endotelial;
- d) Detecção de DPSC eGFP positivas, transduzidas com vetores lentivirais sh-RNA-LRP6 ou shRNA-Frizzled6 nas paredes dos vasos sanguíneos após o implante em camundongos imunodeprimidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das células e condições de cultivo celular

As células DPSCs (Gronthos et al., 2000) utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Dr. Songtao Shi (University of Southern California, Los Angeles, CA, EUA) e cultivadas em meio mínimo essencial, variação alfa (alfa-MEM; Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 15% de soro fetal bovino inativado por calor (SBF; Gibco) e 1% de solução antimicótica-antibiótica (AA; Gibco) e mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida de 5% de CO₂. Diferenciação endotelial foi induzida pelo cultivo de células DPSC com meio de crescimento endotelial celular (EGM-2MV; Lonza, Walkersville, MD, EUA) suplementado com 50ng/ml de rhVEGF165 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e/ou 50ng/ml de rhWnt-1 (Cell Sciences, Canton, MA, EUA). Células endoteliais de microvasos da derme humanos (HDMEC), usadas como controle positivo, foram mantidas em meio de cultura EGM-2MV. O meio de cultura de todos os experimentos envolvidos foram trocados a cada 2 dias.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro de uma capela de fluxo laminar. Em uma garrafa de 75 cm² foram pipetados 10 ml de meio de cultura em temperatura ambiente; esse procedimento foi

realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. Um tubo criogênico que continha as células foi escolhido e levado imediatamente para o banho-maria até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado na garrafa contendo meio de cultura. O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37 °C com tensão de CO₂ a 5%.

4.1.2 Troca de meio

A cada 48 h o meio de cultura foi trocado. As células foram removidas da estufa e verificadas em microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com 3 ml de solução salina tamponada (PBS; Gibco) para remoção de células mortas. 10 ml de um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco e levado novamente à estufa.

4.1.3 Subcultura

A subcultura foi necessária quando as células crescerem a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência). Desta forma, as células foram passadas de um frasco para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. As células foram lavadas com 3 ml de PBS, que foi aspirado em seguida e, então, foi adicionado ao frasco 3 ml de

tripsina, utilizada para destacar as células. O frasco com tripsina foi levado à estufa onde permaneceu por 5 min. O frasco foi observado em microscópio para que fosse confirmado o destacamento das mesmas. Estando as células prontas, foi adicionado 3 ml de meio de cultura para neutralizar a tripsina. Todo conteúdo foi colocado em um tubo de ensaio do tipo Falcon e levado à centrífuga por 5 min a 800 rpm a 4 °C para obtenção de um precipitado. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 1 ml de meio fresco, e após bem homogêneas, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 10 ml de meio de cultura, preparados previamente. Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento. As células DPSC foram utilizadas entre as passagens 3 e 9, enquanto que as HDMEC foram utilizadas entre passagens 8 a 12.

4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do precipitado; sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 µl, os quais foram levados à câmara de Neubauer, que foi levado ao microscópio de luz invertida para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos.

Para obtenção da quantidade de células por ml, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^4 = n^\circ \text{ células/ml}$$

Onde **C** corresponde à média das células encontradas nos quadriláteros periféricos.

4.1.5 Congelamento

Foram realizados os mesmo passos da subcultura até a ressuspensão das células, porém a quantidade de meio de cultura para a ressuspensão foi de acordo com a quantidade de células que deveria ser congelada (1ml de meio para cada 1×10^6 células). Foi então adicionado 20% de FBS e 10% de DMSO. 1 ml da suspensão foi alocada em tubo criogênico que foi levado a -80°C por 24 horas e então levados ao tubo de nitrogênio líquido.

4.2 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em DPSC por VEGF e Wnt1

4.2.1 Western Blot para a detecção das proteínas LRP6, Frizzled6, β -catenina ativa, GSK3- β total e fosforilada, AKT total e fosforilada e GAPDH

Para análise das proteínas da via de sinalização Wnt/ β -catenina por meio da técnica de Western Blot, 6×10^5 células foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro. Após 24 h, as células foram tratadas com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1, na concentração de 50 ng/mL por 24 h e com rhWnt1 por períodos de 15 e 30 min, e 1, 2, 4, 8, 12 e 24.

Após este período as células foram lavadas com 1 ml de PBS e então foi adicionado 1 ml de PBS novo e as células foram coletadas com o auxílio de um raspador de células para um microtubo. O microtubo foi levado à centrífuga por 1 min, 8.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado buffer NP40 (tampão para lise das células), de acordo com o tamanho do precipitado formado. O conteúdo foi mixado em *vórtex* e deixado em gelo por 10min. O microtubo foi levado novamente a centrífuga por 10 min, 13.200 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado em outro microtubo e a proteína foi quantificada ou armazenada a -80 °C para posterior quantificação.

Para a quantificação das proteínas, foram adicionados a um microtubo de 1 ml, 800 µl de água destilada, 200 µl de corante Bio-Rad e 1 µl de proteína, e a solução mixada. 200 µl da solução foi transferida para um poço de uma placa de 96 poços, e a concentração de proteína foi lida num leitor de microplaca com filtro de 595 nm (Genius Tecan, Tecan, Graz, Áustria) utilizando-se o programa Magellan (Tecan Trading AG, Suíça). O resultado foi dado em concentração de proteína µg/µl.

Para a eletroforese vertical em gel de SDS-poliacrilamida (9% e 12%), foram utilizados 20 µg de proteína por amostra, seguindo a seguinte fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde o volume final de proteína + água destilada é igual a 10 µl. Para esta quantidade de volume final de proteína + água foi adicionado 4 µl do tampão de carregamento (NuPage LDS Sample Buffer 4x, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1,6 µl de 0,5 M de DTT (5M) em microtubos, para o total de 15,6 µl. Os tubos foram levados a bloco aquecido a 95 °C por 5 min e então centrifugados rapidamente.

Os cassetes com gel SDS-poliacrilamida foram colocados na caixa XCell SureLock (Invitrogen) com tampão de corrida composto por Tris (30 g/l), Glicina (144 g/l) e SDS (10 g/l) e o marcador molecular usado foi o PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). O gel foi submetido a 140 V por 1 h e 30 min a 2 h, e então foi transferido para membranas de nitrocelulose (Protran; Whatman, Dassel, Germany) a 40V por 1 h e 30 min em tampão de transferência composto por Tris (2,9g/l), Glicina (14,4g/l) e 20% de metanol. Após o bloqueio de bandas inespecíficas em 5% de leite desnatado diluído em TBST por 30 min, as membranas foram incubadas nos anticorpos primários, em invólucros plásticos sob agitação, durante a noite, a 4°C: camundongo anti- β -catenina ativa (\cong 92kDa; 1:1.000); camundongo anti- β -catenina (\cong 92kDa; 1:5.000); coelho anti-fosfo-GSK3- β (\cong 47kDa; 1.1000); coelho anti-GSK3- β (\cong 47kDa; 1:10.000); coelho anti-LRP6 (\cong 180kDa; 1:1.000); coelho anti-Frizzled6 (\cong 79kDa; 1:1.1000); coelho anti-AKT (\cong 60kDa; 1:5000); coelho anti-fosfo-AKT (\cong 60kDa; 1:1.000); camundongo anti-GAPDH humano (\cong 36kDa; 1:1.000.000).

Após este período, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10 a 20 min com TBST sob agitação em temperatura ambiente e incubados em anticorpo secundário contra IgG de camundongo ou coelho (1:1000) diluídos em TBST por 2 h sob agitação em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas 2 vezes por 10 a 20 min sob agitação em temperatura ambiente, de acordo com o anticorpo utilizado. A detecção do sinal foi realizada com luminescência química utilizando-se o cromógeno SuperSignal® WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) por 5 min sob agitação em temperatura ambiente em recipiente de vidro, e processamento em câmara escura em cassetes e filmes para autorradiografia.

4.3 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 por VEGF e Wnt1

4.3.1 Silenciamento gênico de LRP6 e Frizzled6 nas células DPSC

Silenciamento gênico foi realizado utilizando construções de vetores codificados shRNA, como descrito previamente (Sakai et al., 2010). Os vetores lentivirais foram cultivados em meio de crescimento microbiano LB Broth (Fisher BioReagents, Pittsburgh, PA, EUA) na proporção de 25 gramas de LB Broth em 1 litro de água destilada, e esterilizado em autoclave. Para os vetores shRNA-Frizzled6, shRNA-LRP6 ou shRNA-C (controle) (Vector Core, University of Michigan, MI, EUA) foram adicionados 100 μ g/mL de Ampicilina e 25 μ g/mL de Zeocina e para os psPAX2 e pMD2.G (Vector Core, University of Michigan, MI, EUA) foram adicionados somente 100 μ g/mL de Ampicilina. Os vetores foram adicionados aos meios de cultura em tubos de 50 ml e levados para estufa a 37 °C em agitação de 240 rpm, *overnight*. Após adquirir coloração esverdeada e meio turvo, o tubo foi levado para centrífuga a 4 °C, 3.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado formado foi agitado em *vórtex*. Antes de levar o tubo à centrífuga, 1 ml do meio foi transferido para um tubo criogênico e foi adicionado 20% de Glicerina, misturado em *vórtex* e mantido em -80 °C.

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) foi utilizado para purificação do DNA, seguindo as recomendações do fabricante. Foi adicionado 250 μ l da solução de ressuspensão ao precipitado e o conteúdo foi transferido a um microtubo de 1 ml. Foi então adicionado 10 μ l de protease alcalina e 250 μ l de solução de lise celular. O conteúdo foi agitado três vezes e permaneceu em temperatura ambiente por 5 min. A reação foi parada

utilizando 350 µl de solução de neutralização e novamente agitado fortemente com as mão e levado a centrífuga a 13.200 rpm por 10 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para uma coluna, disponibilizada pelo kit, e centrifugado a 13.200 rpm por 1 min em temperatura ambiente. O líquido filtrado pela coluna foi descartado e foi adicionado à coluna 700 µl de solução de lavagem e novamente centrifugado a 13.200 rpm por 1 min em temperatura ambiente. A lavagem foi repetida uma vez utilizando-se 200 µl de solução de lavagem. A coluna foi transferida para um novo microtubo e 100 µl de água livre de nuclease foi adicionado, mantido 2 min em temperatura ambiente e, então, centrifugado a 13.200 rpm por 1 min. A leitura da quantificação de DNA (µg/µl) foi feita em espectrofotômetro (Genius Tecan, Tecan, Graz, Austria), adicionando-se 99 µl de água destilada e 1 µl de DNA.

Células 293T, cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado com 10% de FBS e 1% de AA, foram transitoriamente co-transfectadas com vetores lentivirais shRNA-C (controle), shRNA-Frizzled6 ou shRNA-LRP6 usando-se fosfato de cálcio. 3×10^6 células 293T foram cultivadas em placas de cultura celular de 10 cm de diâmetro e deixadas para aderir durante a noite. Então, o meio foi trocado e 6 ml de meio novo foi adicionado por placa. O coquetel de transfecção foi preparado adicionando 10 µg de shRNA, 10 µg de psPAX2, 5 µg de pMD2.G, 62 µl de 2M CaCl₂, 500 µl de 2 x HBS e água ao total de 1 ml, e deixado em temperatura ambiente por 15 a 20 min. O coquetel foi adicionado às células 293T previamente plaqueadas, de forma lenta para que as células não se destacassem do fundo da placa, e então, deixadas em estufa de 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C por 8 horas. O meio foi removido e adicionou-se 12 ml de meio DMEM fresco, que foi coletado em 24, 48 e 72 h e centrifugado a 3.000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi coletado para o preparo do coquetel de infecção.

O coquetel de infecção foi preparado adicionando-se 3 ml do sobrenadante coletado das células 293T, 3 ml de meio alfa-MEM e 1 µl/ml de polibrene [4 µg/ml]. Células DPSC foram previamente cultivadas em frascos de 75 cm³ e, quando atingiram 60% de confluência, foram infectadas com o coquetel de infecção preparado e deixadas em estufa a 5% de CO₂, temperatura de 37 °C e 100% de umidade relativa. O coquetel de infecção foi trocado 2 vezes a cada 4 h e, após 24 h, foi adicionado meio de cultura alfa-MEM por mais 24 h para que as células fossem estabilizadas, e então foi trocado por meio com 1 µg/ml de puromicina (1 mg/ml; InVivogen, San Diego, CA, EUA) para seleção das células infectadas por pelo menos 1 semana. A eficiência da infecção foi determinada por fluorescência e o silenciamento gênico por Western Blot.

4.3.2 Western Blot para a detecção das proteínas β-catenina total e ativa, GSK3-β total e fosforilada, AKT total e fosforilada, BMI1, BCL2 e GAPDH

DPSCs (6x10⁵), infectadas com os vetores shRNA (Frizzled6, LRP6 ou controle), foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro. Após 24 h, foi adicionado meio de cultura sem soro fetal bovino durante a noite para estabilizar as células, e então as células foram tratadas com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1, nas concentrações 0,5; 5 e 50 ng/mL por 24 h. As células foram então coletadas em PBS para Western Blot, descrito no item 4.2.1.

4.4 Indução da diferenciação de DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 em células endoteliais

4.4.1 RT-PCR para a detecção de RNAm para VEGFR1, VEGFR2, CD31, Tie-2 e GAPDH

DPSC-shRNA (1×10^4) foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro durante 14 dias com os meios de cultura alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF₁₆₅, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhWnt1 e EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF₁₆₅ e 50 ng/ml de rhWnt1.

As células foram lavadas 1 vez com PBS e coletadas em microtubo com 1 ml de Trizol (Invitrogen) e deixadas por 5 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol e o conteúdo foi homogeneizado com as mãos e incubado por 2 min em temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C e a fase aquosa (aproximadamente 400 µl) foi transferida para um novo microtubo. O RNA foi precipitado adicionando-se 500 µl de álcool isopropil, deixado em temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75%, misturado (*vórtex*) e novamente levado a centrífuga a 7.500 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado formado foi deixado de 5 a 10 min em temperatura ambiente para a secagem. O RNA foi dissolvido em água livre de RNase de acordo com o tamanho do precipitado formado (15 a 50 µl). A leitura da quantificação de RNA foi feita em espectrofotômetro (Genius Tecan, Tecan, Graz, Austria), adicionando-se 99 µl de água destilada e 1 µl de RNA.

O kit *SuperScript III First Strand* (Invitrogen) foi utilizado para a síntese de cDNA. Em um tubo de 200 µl foram adicionados 1 µl de OligoDT, 1 µl de 10mM dNTP, 1 µg de RNA e água para o total de 10 µl, e levado para banho maria a 65°C por 5 min, e então, deixados em gelo por 2 a 4 min. Após, foi adicionado ao conteúdo do tubo o *2X Reaction MIX*, preparado previamente: 2 µl de 10X *RT buffer*, 4 µl de 25 mM MgCl₂, 2 µl de 0,1 M DTT e 1 µl de *RNase out* (40 u/µl), para cada cDNA. O conteúdo foi rapidamente centrifugado e levado para banho maria a 42 °C por 2 min. Foi adicionado 1 µl de *SuperScript III RT* em cada tubo, centrifugado

rapidamente e levado a banho maria a 42 °C por 50 min. A reação foi terminada em banho maria a 70 °C por 15 min e esfriado em gelo, foi adicionado 1 µl de *RNase H* em cada tubo e levado para banho maria a 37 °C por 20 min.

RNA foi diluído a 0,1 µg/µl em água livre de DNase e RNase e a reação de PCR foi realizada utilizando-se o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Para cada amostra foram adicionados 1 µl de 10 mM dntp, 5 µl de 10x PCR buffer, 2 µl de 50 mM MgCl₂, 0,4 µl Taq DNA, 1 µl de 10 mM sense, 1 µl de 10 mM antisense, 1 µl de cDNA e 38,6 µl de água, num total de 50 µl. Os primers utilizados foram: VEGFR1 humano (sense 5'-ÇCTCACTGCCACTCTAATTGTC-3' e antisense 5'-ACAGTTTCAGGTCCTCTCCTTC-3'; 475pb); VEGFR2 humano (sense 5'-CTCATGTCTGAACTCAAGATCC-3' e antisense 5'-CCAGAATCCTCTTCCATGCTCA-3'; 928 pb); CD31 humano (sense 5'-GAGTCCTGCTGACCCTTCTG e antisense 5'-ACAGTTGACCCTCACGATCC-3'; 416 pb); Tie2 humano (sense 5'-TACACCTGCCTCATGCTCAG-3' e antisense 5'-GCAGAGACATCCTTGGAAGC-3'; 467 pb); GAPDH humano, usado como gene de referência constitutivo, (sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e antisense 5'-ACCACCTTCTTGATGTCATC-3'; 683 pb).

O processo de ciclagem térmica consistiu de 35 ciclos de amplificação pela PCR. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento (55 °C por 30 s) e extensão (72 °C durante 1 min). As amostras foram incubados por mais 10 min a 72 °C para extensão final após o término do último ciclo.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,64 µg/ml), a 80 V por 45 min. 10 µl de cada amostra foi adicionado a cada poço do gel e o peso molecular foi determinado pela comparação com um marcador com intervalos de peso molecular igual a 100 pb. O cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta

para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados.

4.4.2 Western Blot para a detecção das proteínas VEGFR1, VEGFR2, CD31, β -actina

DPSCs (1×10^5), infectadas com os vetores shRNA (Frizzled-6, LRP-6 ou controle) foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro, por período de 7 dias. As células foram tratadas com meio de diferenciação endotelial EGM-2MV, adicionados ou não de rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1, na concentração de 50ng/mL. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. As células foram coletadas para Western Blot, descrito no item 4.2.1. OS anticorpos primários utilizados foram: camundongo anti-CD31 ($\cong 135\text{kDa}$; 1:1.000); coelho anti-VEGFR1 ($\cong 151\text{kDa}$; 1:1.000); coelho anti-VEGFR2 ($\cong 220\text{kDa}$; 1:1.000); anti- β -actina ($\cong 42\text{kDa}$; 1:200.000).

4.4.3 ELISA para a quantificação das formas solúveis das proteínas VEGF e IL8

DPSCs (6×10^5), infectadas com os vetores shRNA (Frizzled6, LRP6 ou controle) foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro por 24 h. O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para o ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando-se o kit Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISAs (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Para a análise de VEGF, foram adicionados 50 μl de *Diluent assay* em cada poço da placa de 96 poços, previamente

sensibilizados por anticorpos anti-VEGF pelo fabricante, e em seguida adicionados 200 μ l do padrão, controle e amostras (em duplicata) e selados. Após 2 h em temperatura ambiente, os poços foram lavados 3 vezes com buffer de lavagem. Foi adicionado 200 μ l do conjugado em cada poço, a placa foi selada, e após 2 h em temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente 3 vezes. 200 μ l da solução de substrato foi adicionada em cada poço, por 20 min, protegido da luz e, então, 50 μ l da solução de parada foi adicionado.

Para a análise de IL-8, foram adicionados 100 μ l de *Diluent assay* em cada poço da placa de 96 poços, previamente sensibilizados por anticorpos anti-IL-8 pelo fabricante, e em seguida adicionados 50 μ l do padrão, controle e amostras (em duplicata) e selados. Após 2 h em temperatura ambiente, os poços foram lavados 4 vezes com buffer de lavagem. Foi adicionado 100 μ l do conjugado em cada poço, a placa foi selada, e após 1 h em temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente 4 vezes. 200 μ l da solução de substrato foi adicionada em cada poço, por 30 min, protegido da luz e, então, 50 μ l da solução de parada foi adicionado. A leitura dos poços foi realizada imediatamente em espectrofotômetro (Genius Tecan) com filtro de comprimento de onda 450 nm.

4.4.4 Ensaio de proliferação de capilares em Matrigel

DPSCs (5×10^4), infectadas com os vetores shRNA (Frizzled6, LRP6 ou controle) e células HDMECs (5×10^4) foram cultivadas em Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EUA). 200 μ l de Matrigel foram adicionados em poços da placa de 24 poços e deixados 1 h em estufa para a polimerização. As células foram semeadas com meio de diferenciação endotelial (EGM-2MV) suplementado com 50ng/ml de

VEGF e trocado a cada 2 dias. O número de estruturas tubulares foi contado todos os dias durante 6 dias, em microscópio de fase com aumento de 100x. Dez campos foram analisados por poço, com três poços por tratamento.

4.5 Detecção de células DPSC eGFP positivas transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 nas paredes de vasos sanguíneos, *in vivo*

4.5.1 Preparo dos discos de dentina e matrizes condutivas

Este projeto foi aprovado pelo Conselho de Revisão Interna (Ciências da Saúde) da *University of Michigan*.

As fatias dentárias foram preparadas utilizando terceiros molares (superiores e inferiores) hígidos, os quais foram previamente extraídos por razões ortodônticas. Os espécimes foram coletados em um meio de cultura estéril a 37 °C, usado somente para o transporte do espécime até a área de intervenção do mesmo (meio Dulbecco modificado por Eagle – DMEM, Sigma Chemical Co, contendo 5 ml de L-Glutamine – 200 mM (Gibco), suplementado com 5 ml de 10.000 unidades de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina (Gibco) e 1,25 mg de anfotericina B (Sigma). Após a extração, os dentes foram levados no interior de um tubo de 15 ml contendo o meio de transporte até a área de intervenção. Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar.

Os dentes foram fixados com resina acrílica ativada quimicamente na região do ápice e coroa, deixando a porção radicular livre para a obtenção das fatias dentárias. As fatias dentárias foram cortadas transversalmente numa espessura de 1,3 mm, com o auxílio de

um disco de corte diamantado. Os tecidos pulpares foram removidos com o auxílio de uma sonda clínica, evitando-se tocar nas paredes dentinárias e danificar a camada de pré-dentina (Cordeiro et al., 2008) (Figura 1).

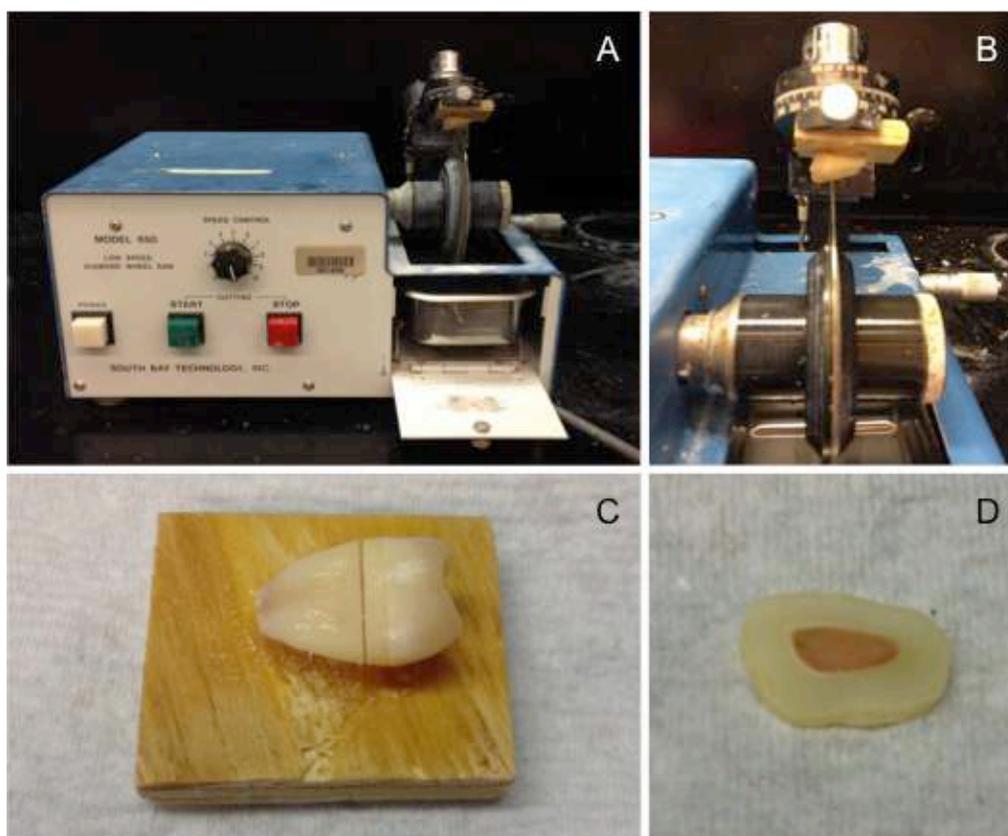


Figura 1 – Preparo das fatias dentárias. (A) Máquina de corte. (B) Lâmina de corte. (C) Cortes realizados na junção amelo-cementária. (D) Fatia dentária.

Para o preparo das matrizes condutivas, partículas de cloreto de sódio (NaCl) com tamanho entre 250 e 425 μm foram colocadas no interior da câmara pulpar. PLLA (Boehringer Ingelheim, Germany) foram dissolvidos em clorofórmio para produzir uma solução de polímero 5% (peso/volume), a qual foi gotejada sobre o sal. Após polimerização do PLLA, o conjunto fatias dentárias/matrizes condutivas foram imersos em água destilada por 48 h para que o sal fosse dissolvido, a água foi trocada 3 vezes ao dia (Nör et al., 2001) (Figura 2).

Um dia antes do cultivo celular, os conjuntos fatias de dentes e matrizes condutivas porosas foram imersas em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) durante 10 min cada e, em seguida, lavados com PBS estéril. Os conjuntos foram deixados em PBS durante a noite a 4 °C (Nör et al., 2001). Imediatamente antes do cultivo, as fatias de dentes e matrizes foram tratadas com EDTA 10%, pH 7,2 durante 1 min, e novamente lavadas com PBS estéril 3 vezes, durante 10 min cada.

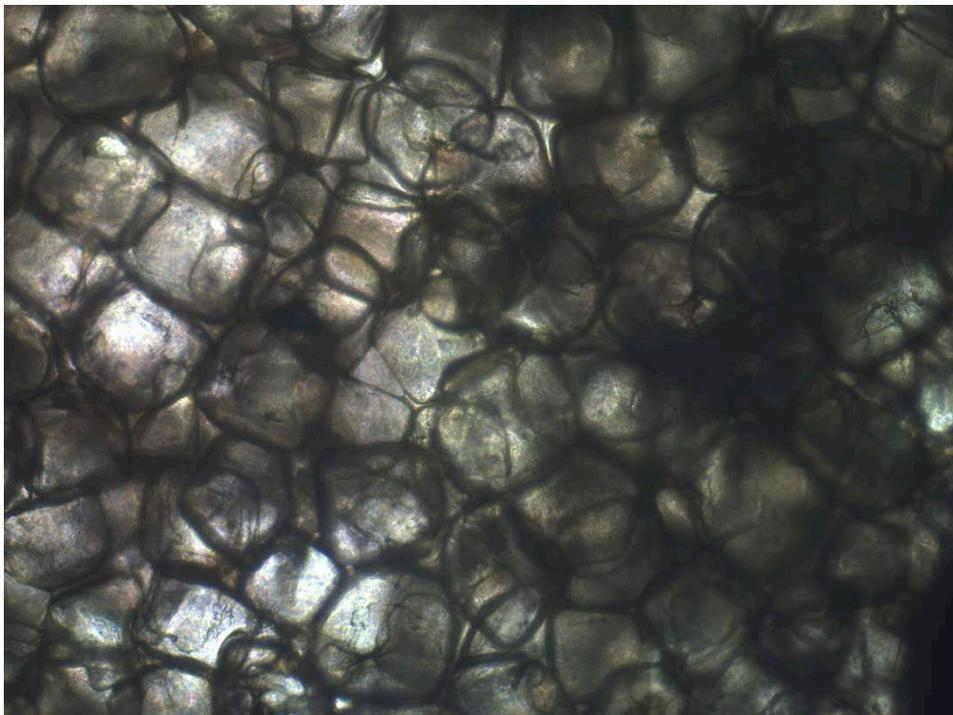


Figura 2 – Matriz condutiva (*scaffold*) após dissolução de NaCl.

4.5.2 Implantação dos espécimes em camundongos imunodeprimidos

Células shRNA-controle, shRNA-Frizzled6 e shRNA-LRP6, na contagem de 6×10^5 , foram ressuspensas em uma mistura de volumes iguais de Matrigel e alfa-MEM (10 μ L cada), e 20 μ L foram

colocados sobre as fatias dentárias com matrizes condutivas. Estas permaneceram em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ por 30 min para permitir adesão inicial das células (Figura 3).

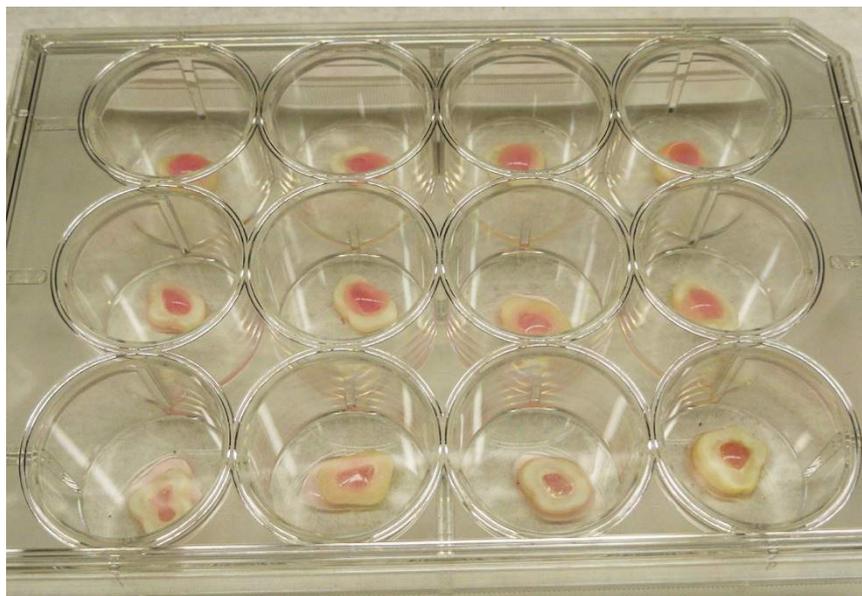


Figura 3 – Células DPSC em Matrigel semeadas em fatias dentárias antes da implantação em camundongos imunodeprimidos.

As fatias dentárias tratadas foram implantadas bilateralmente na região subcutânea do dorso de quinze camundongos machos com imunodeficiência combinada grave (SCID) com idade entre 5 e 7 semanas (CB.17 SCID; Charles River, Wilmington, MA, EUA).

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com uma associação de 85% de ketamina (4.25 mg/kg, Ketaset, Fort Dodge, IA, EUA) e 14% de xilazina (0.25 mg/kg, AnaSed, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA, EUA) e tiveram seus pelos removidos da região a ser operada. A região foi limpa com álcool 70%, uma incisão foi realizada no sentido crânio-caudal, e o tecido foi divulsionado a fim de se criar um espaço para inserção de duas fatias de dentes (uma em cada lado da incisão). As duas bordas da incisão foram

unidas e coladas (3M™ Vetbond™ Tissue Adhesive, 3M, St. Paul, MN, EUA) (Figura 4).

Todos os procedimentos foram realizados com instrumentos estéreis e técnica asséptica dentro de um fluxo laminar para se evitar contaminação. Pelo menos 10 fatias dentárias com matriz PLLA foram avaliados por grupo experimental.

4.5.3 Eutanásia dos animais e remoção dos implantes

Após 28 dias do transplante, os animais foram sacrificados em câmeras de CO₂ e deslocados cervicalmente, e os implantes recuperados (Figura 5) colocados em solução de formaldeído 10% a 4 °C por 24 h, para fixação. Em seguida, os espécimes foram desmineralizados em solução a base de ácido clorídrico e EDTA (Decalcifier II, Surgipath Medical Industries, Richmond, IL, EUA) de 24 a 48 h em temperatura ambiente, e os espécimes preparados para histologia. As lâminas histológicas foram coradas com HE ou deixadas para realização de imunohistoquímica.

4.5.4 Análise imunohistoquímica para eGFP

Para corar a rede de micro vasos formada pelas células DPSC implantadas, a coloração por imunoperoxidase foi conduzida usando anticorpo eGFP turbo de camundongo (diluição 1:100; Lab Vision, Fremont, CA, EUA) e o kit Mach 3 (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). As lâminas foram aquecidas a 60 °C por 20 min para início da desparafinização. Em seguida, passaram por dois banhos de xilol, dois

banhos de álcool absoluto, um de álcool 95% e um de álcool 75% por 3 min cada em temperatura ambiente. Uma diluição de tripsina 0,125% (Sigma) foi usada para pré tratar as secções por 2 h a 37 °C . Foi utilizada uma solução de 0,1% de Triton-100 por 20 min em temperatura ambiente.

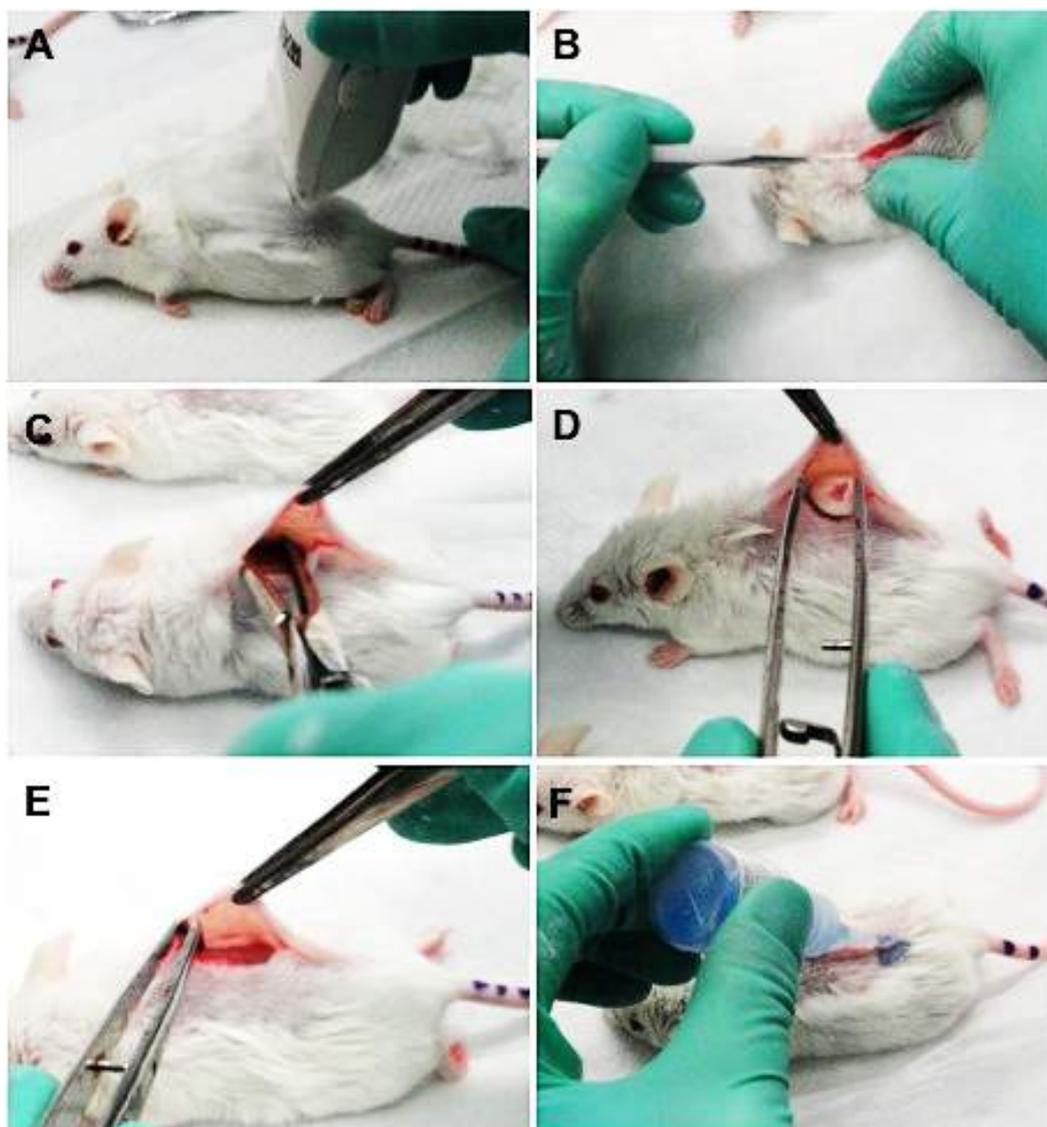


Figura 4 – Figura dos procedimentos para implantação dos espécimes. (A) Remoção dos pelos. (B) Incisão. (C) Divulsão do tecido. (D e E) Implantação dos espécimes. (F) Sutura.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação com 3% de peróxido de hidrogênio por 10 min em temperatura

ambiente. Os anticorpos primários, anti-eGFP turbo e IgG, foram incubados *overnight* a 4 °C. No dia seguinte as amostras foram incubadas com anticorpo secundário Probe por 20 min e então foi adicionado o polímero HRP por 20 min. As amostras foram cobertas com cromógeno DAB de 3 a 30 min e então reveladas. A reação foi parada em água destilada. As lâminas foram montadas com vecta mount e lamínula.

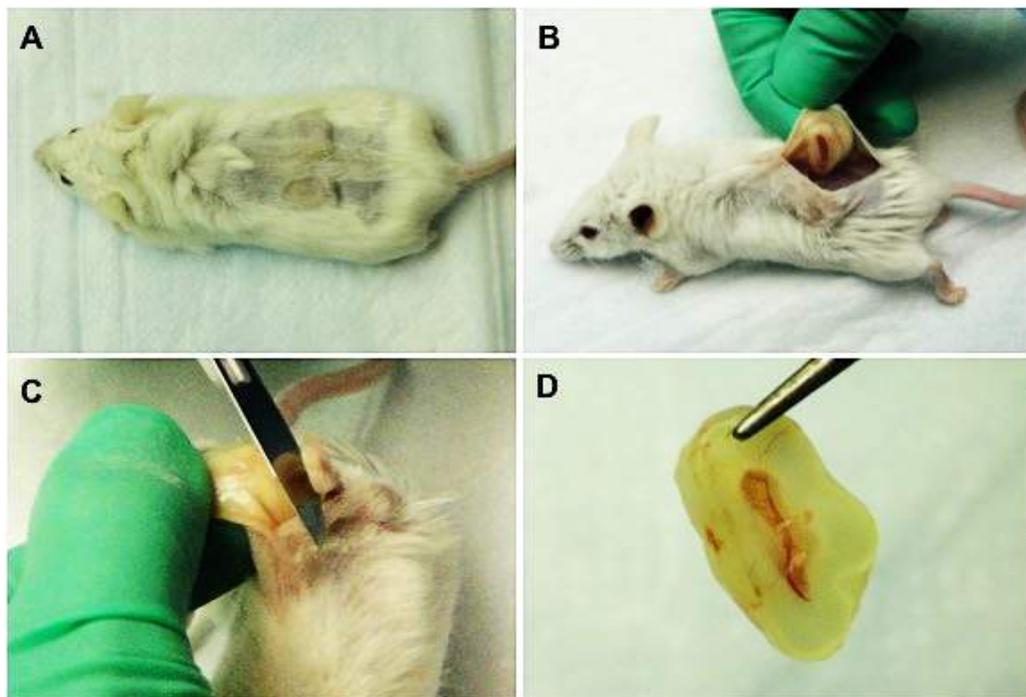


Figura 5 – Figura dos procedimentos para remoção dos espécimes. (A) Camundongo imunodeprimido com dois implantes no dorso. (B) Fatia dentária antes da remoção. (C) Remoção da fatia dentária com auxílio de lâmina de bisturi. (D) Fatia dentária após remoção mostrando vascularização do tecido pulpar.

4.6 Análise estatística

Os testes ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$) (STATISTIX for Windows – version 8.0, StatSoft Inc, 2000) foram utilizados para as

análises estatísticas da expressão de proteínas VEGF e CXCL8 e número de microvasos formados.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em DPSC por VEGF e Wnt1

Inicialmente, uma análise de western blot foi realizada para verificar se as células DPSC expressavam proteínas importantes na via de sinalização Wnt/ β -catenina. 6×10^5 células DPSC foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro, após 24 h foram estabilizadas com meio de cultura alfa-MEM sem FBS e sem antibiótico overnight, e então foram tratadas com 50 ng/ml de rhVEGF₁₆₅ ou rhWnt1 por 24 h. Como esperado, a suplementação do meio de cultura com esses fatores de crescimento aumentou a expressão das proteínas responsáveis pela via de sinalização Wnt/ β -catenina (Figura 6A).

Para estudar os efeitos do Wnt1, foi realizado um estudo avaliando variáveis tempos de tratamento com este fator. 6×10^5 células DPSC foram cultivadas em placas de 60mm de diâmetro, após 24 h foram estabilizadas com meio de cultura alfa-MEM sem FBS e sem antibiótico overnight, e então foram tratadas com 50 ng/ml de rhWnt1 por 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h. Foi observado que em 15min de tratamento a expressão de GSK3- β fosforilado foi menor em relação as células não tratadas. Nos tempos avaliados de 30 min a 2 h, 12 h e 24 h a expressão de GSK3- β fosforilado e AKT fosforilado aumentou. Desta forma, podemos escolher o tempo de 24 horas como ideal para realizar os experimentos que seguem este estudo (Figura 6B).

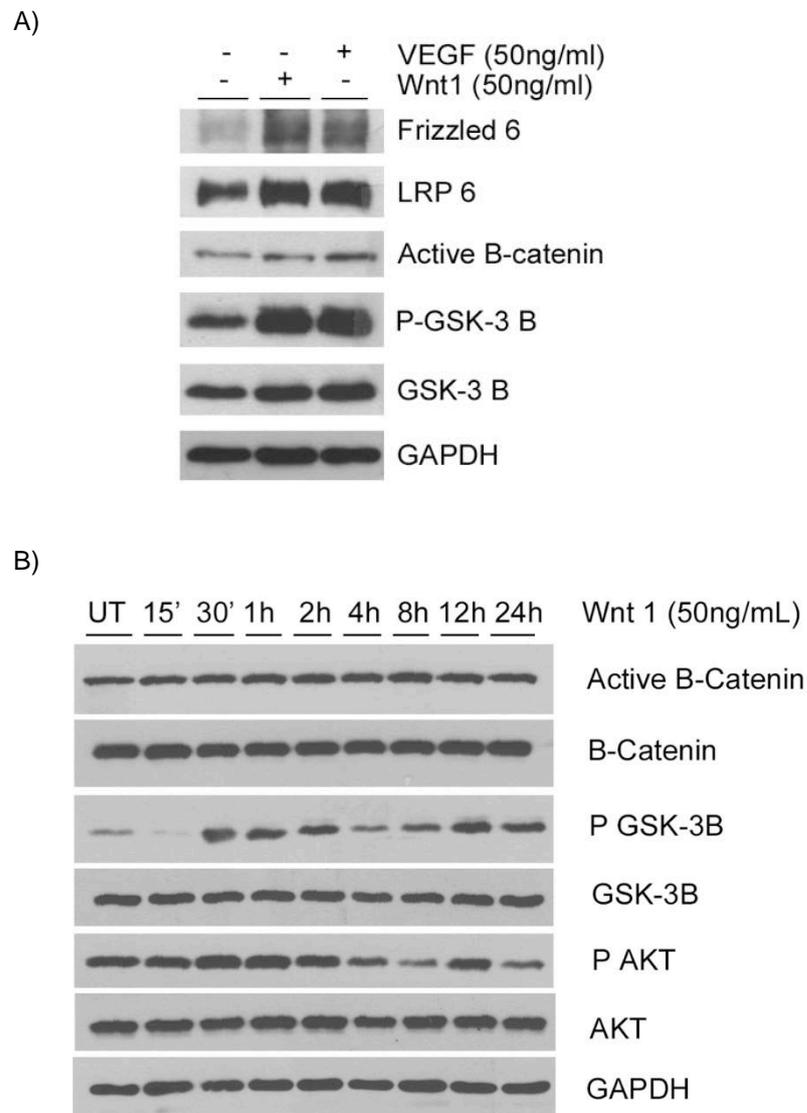


Figura 6 - Proteínas da via de sinalização Wnt/Beta-catenina em DPSC. (A) Western blots para marcar a expressão de proteínas da via Wnt/Beta-catenina em DPSC tratadas com 50 ng/ml de rhVEGF ou rhWnt1 por 24 h. (B) Western blots para avaliar o tratamento com 50 ng/ml de rhWnt1 por 15 min até 24 h na expressão de proteínas da via Wnt/Beta-catenina.

5.2 Análise da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 por VEGF e Wnt1

A análise dos efeitos de Frizzled6 e LRP6 na diferenciação de DPSCs em células endoteliais foi realizada através das células silenciadas com vetores shRNA-Frizzled6, shRNA-LRP6 ou DPSC transduzidas com vetor antiviral controle (shRNA-C). A análise de western blot confirmou o silenciamento e o vetor escolhido. Para realizar todos os experimentos seguintes foram escolhidos os seguintes vetores: shRNA-Frizzled6 número 30 e shRNA-LRP6 número 1, que apresentaram inibição da expressão de Frizzled6 e LRP6, respectivamente (Figura 7A e 7B). Figura 7C mostra a imagem de microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i, camera: QImaging EXi Aqua) das células marcadas com eGFP.

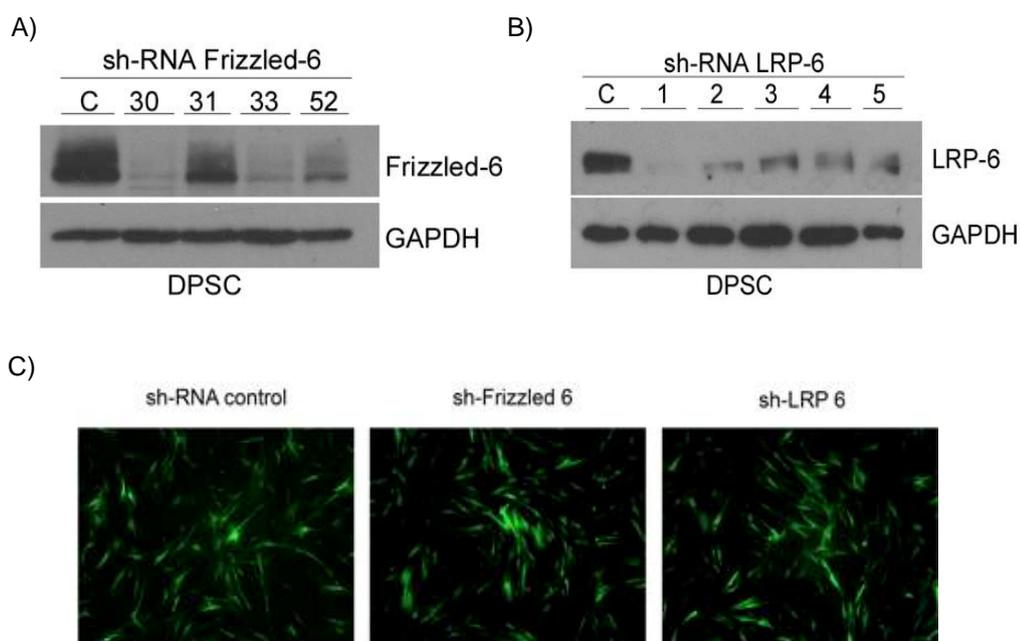


Figura 7 - Silenciamento de LRP6 e Frizzled6 em DPSC. (A) Western blots para confirmar o silenciamento de Frizzled6 em DPSC comparado com DPSC transduzida com vetor lentiviral controle. (B) Western blots para confirmar o silenciamento de LRP6 em DPSC comparado com DPSC transduzida com vetor lentiviral controle. (C) Imagem de microscopia de fluorescência confirmando as células marcadas com eGFP (100x).

Para avaliar os efeitos de LRP6 e Frizzled6 na via Wnt/ β -catenina, células DPSC silenciadas foram tratadas com três diferentes concentrações de rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅ (0,5; 5; 50 ng/ml) por 24 h (Figura 8 e 9). Interessantemente, a expressão de β -catenina ativa foi maior em shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 que em shRNA-C, quando as células não foram tratadas. Por outro lado, parece não haver diferença na expressão de GSK3- β fosforilado. A expressão de BCL-2 foi maior em shRNA-LRP6 que em shRNA-C, e menor em shRNA-Frizzled6. Quando analisamos a expressão de AKT fosforilado é observado que em shRNA-Frizzled6 ela é um pouco maior que nas outras células. Foi observado pouca diferença na expressão de β -catenina, GSK3- β , AKT e Bmi-1 entre as células estudadas.

Analizando o tratamento com rhWnt1 (Figura 8), foi observado que quanto maior a concentração, maior a expressão de β -catenina ativa em shRNA-C, entretanto a expressão na concentração 0,5 ng/ml é menor do que na célula não tratada. O mesmo acontece com a expressão de GSK3- β fosforilado. Quando estudamos shRNA-LRP6 podemos observar que a expressão de β -catenina ativa é maior na concentração de 50 ng/ml e menor em 5 ng/ml. O oposto ocorre na expressão de GSK3- β fosforilado, em que é maior em 5 ng/ml e menor em 50 ng/ml. A expressão de AKT fosforilado aumenta com a concentração. Em shRNA-Frizzled6, a expressão de β -catenina ativa e GSK3- β fosforilado diminui com o aumento da concentração, entretanto a expressão é menos intensa que na célula não tratada. A expressão de AKT fosforilado é maior no grupo não tratado do que nos grupos tratados com Wnt1, entretanto em 50 ng/ml a expressão é maior do que nas concentrações mais baixas.

Nas concentrações de rhVEGF₁₆₅ (Figura 9), a expressão de β -catenina ativa, β -catenina, AKT e Bmi-1 aumentou em shRNA-C de acordo com a concentração, mas a diferença entre elas é mínima. A expressão de GSK3- β fosforilada aumentou em todas as concentrações

quando comparado ao grupo não tratado. A expressão de AKT fosforilado é maior mas não muito forte em 5 e 50ng/ml que em não tratado e 0,5 ng/ml. Para shRNA-LRP6, a expressão de β -catenina ativa e GSK3- β fosforilado é maior em 5 ng/ml quando comparado as outras concentrações e a célula não tratada. Expressão de AKT é maior em todas as três concentrações que no grupo não tratado, porém com diferença mínima. Em shRNA-Frizzled6, foi notado aumento na expressão de β -catenina ativa, β -catenina e β -catenina quando tratado com as concentrações de rhVEGF₁₆₅ com nenhuma diferença entre elas. Entretanto, a concentração 50 ng/ml expressou mais GSK3- β que as outras.

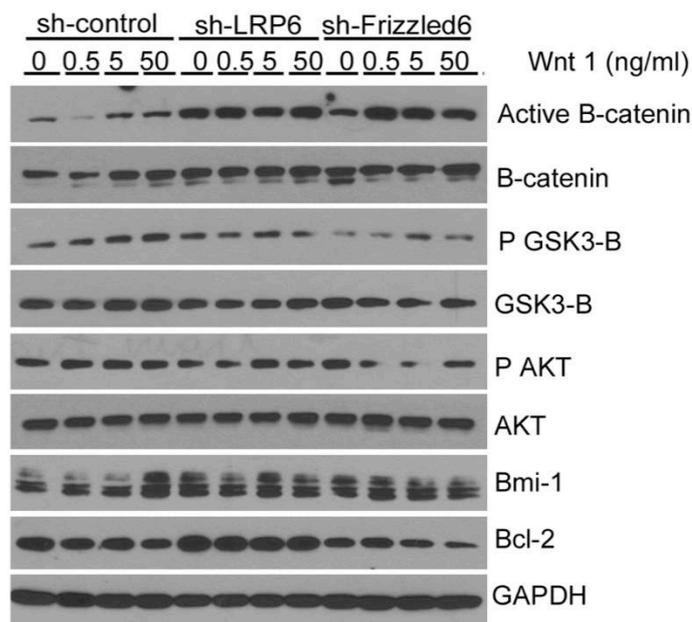


Figura 8 - Western blots para avaliar os efeitos do tratamento com 0; 0,5; 5 e 50 ng/ml de rhWnt1 por 24 h na expressão dos receptores da via Wnt/Beta-catenina, fosforilação de AKT e expressão de Bmi-1 e Bcl-2 em DPSC transduzida com shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6.

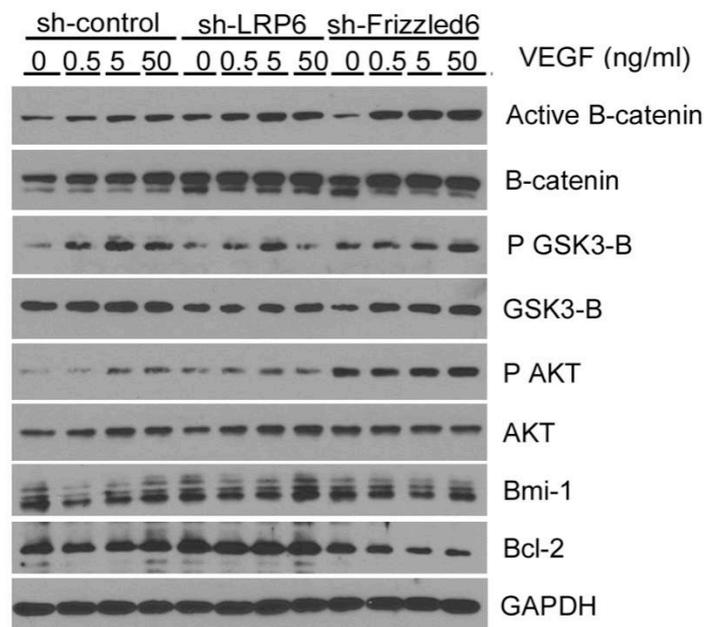


Figura 9 - Western blots para avaliar os efeitos do tratamento com 0; 0,5; 5 e 50 ng/ml de rhVEGF por 24 h na expressão dos receptores da via Wnt/Beta-catenina, fosforilação de AKT e expressão de Bmi-1 e Bcl-2 em DPSC transduzida com shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6.

5.3 Indução da diferenciação de DPSC transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 em células endoteliais

A expressão gênica de shRNA-LRP6, shRNA-Frizzled6 e shRNA-C cultivadas com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF₁₆₅ e/ou rhWnt1 por 14 dias foi avaliada. Todas as amostras expressaram Tie-2, um receptor para angiopoietina que promove angiogênese. Estas células também expressaram CD31, mas em shRNA-C a expressão é maior quando as células são tratadas com EGM-2MV suplementado com rhVEGF₁₆₅ ou rhWnt1 do que quando há associação dos dois. Como esperado, shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 expressaram menos CD31 que as células controle. Entretanto, quando houve associação de rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅ a expressão de CD31 foi aumentada em shRNA-LRP6. Interessantemente, shRNA-C não

expressou VEGFR1 em nenhum tratamento. Por outro lado, shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 expressaram VEGFR1 em todos os tratamentos, mas a expressão foi maior quando tratado com alfa-MEM. As células HDMEC foram usadas como controle positivo (Figura 10).

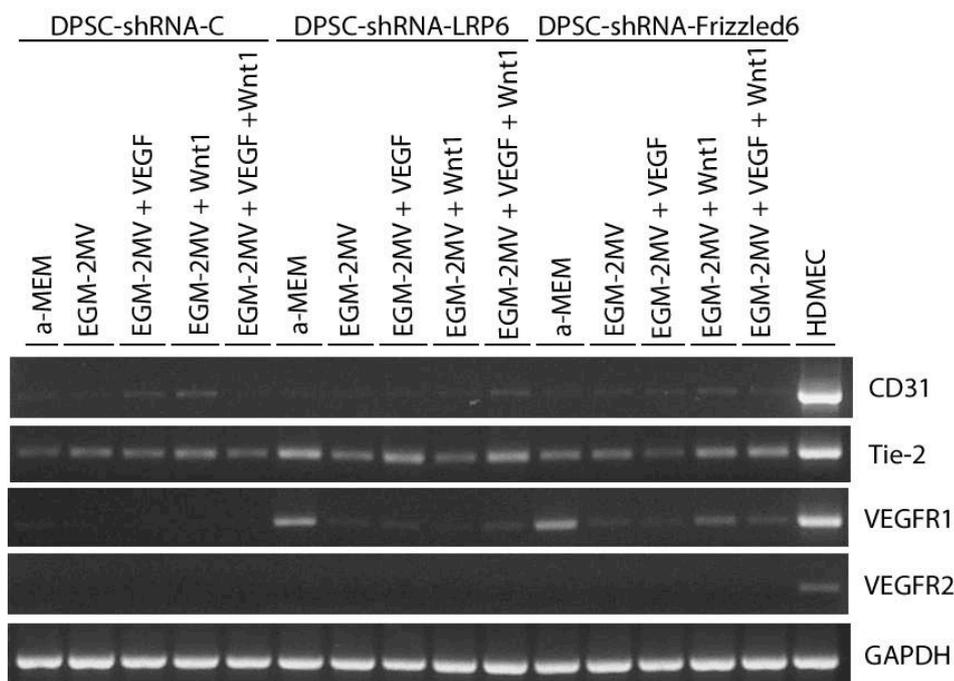


Figura 10 - Expressão gênica dos marcadores endoteliais CD31, Tie-2, VEGFR1 e VEGFR2 em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhWnt1 e EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e rhWnt1 por 7 dias.

Também foi observado se as DPSC adquiriram expressão proteica de marcadores endoteliais (VEGFR1, VEGFR2 e CD31) após cultivadas em meio EGM-2MV suplementado com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1 por 7 dias. Células expostas ao alfa-MEM não expressou ou pouco expressou VEGFR2 e CD31. Todas as células expressaram VEGFR1, porém shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 expressaram mais que shRNA-C. Interessantemente, shRNA-Frizzled6 expressou menos CD31 quando tratado com rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅ do que quando tratado somente com EGM-2MV suplementado ou não com VEGF, enquanto que shRNA-LRP6

e shRNA-C expressaram mais com esse tratamento. A expressão de CD31 é similar entre as células, porém a expressão de VEGFR2 é menos intensa em DPSC-shRNA-LRP6 (Figura 11).

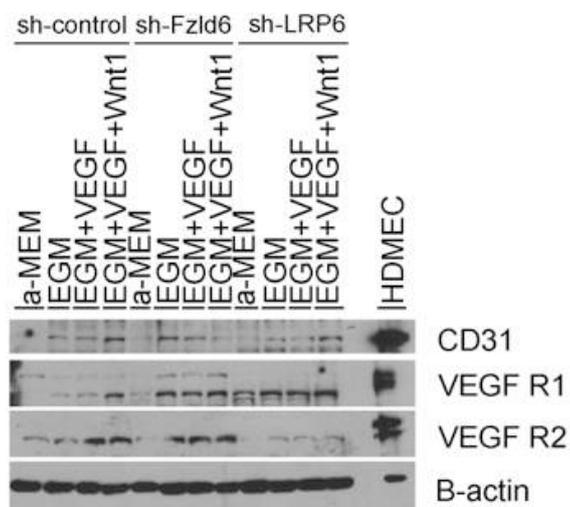


Figura 11 - Expressão proteica dos marcadores endoteliais CD31, VEGFR1 e VEGFR2 em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e rhWnt1 por 7 dias.

Morfologia celular foi analisada depois de 7 dias de tratamento com alfa-MEM, EGM-2MV, EGM-MV suplementado com rhVEGF₁₆₅ e EGM-2MV suplementado com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1. Não foi observado alteração morfológica nas células tratadas com alfa-MEM. Entretanto, as células estudadas tratadas com meio de diferenciação endotelial tornaram-se alongadas (Figuras 12, 13 e 14).

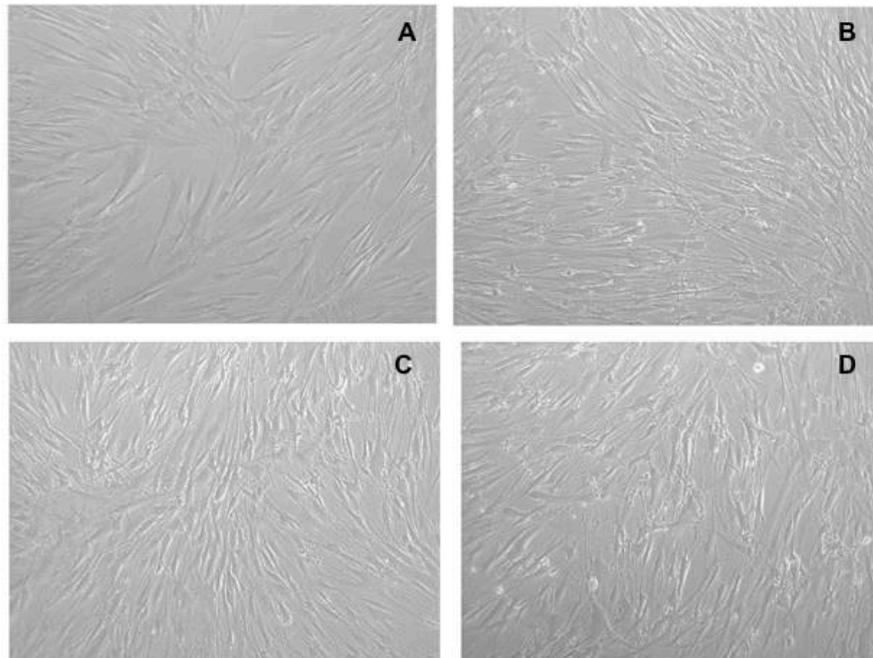


Figura 12 - Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-controle cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.

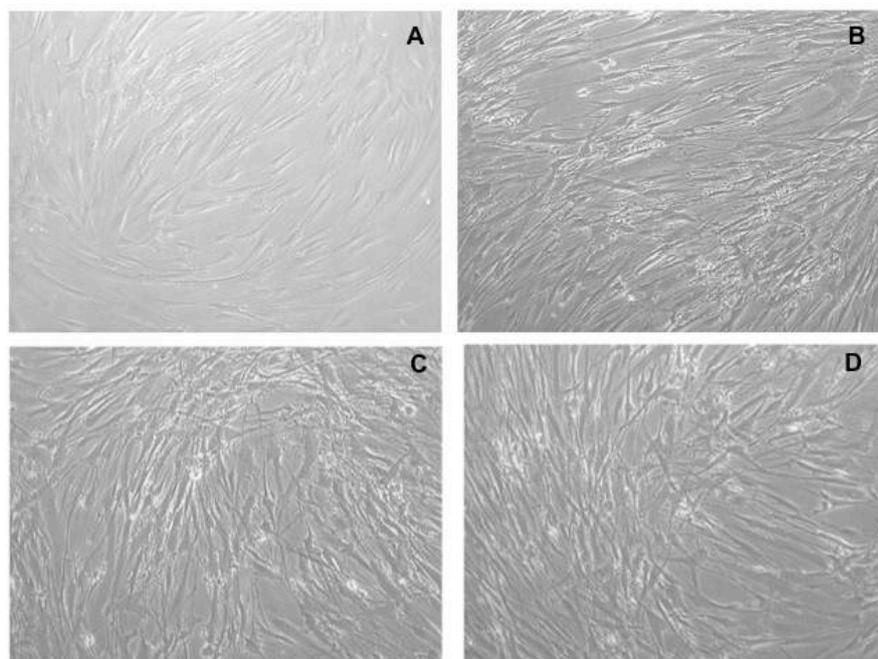


Figura 13 - Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-Frizzled6 cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.

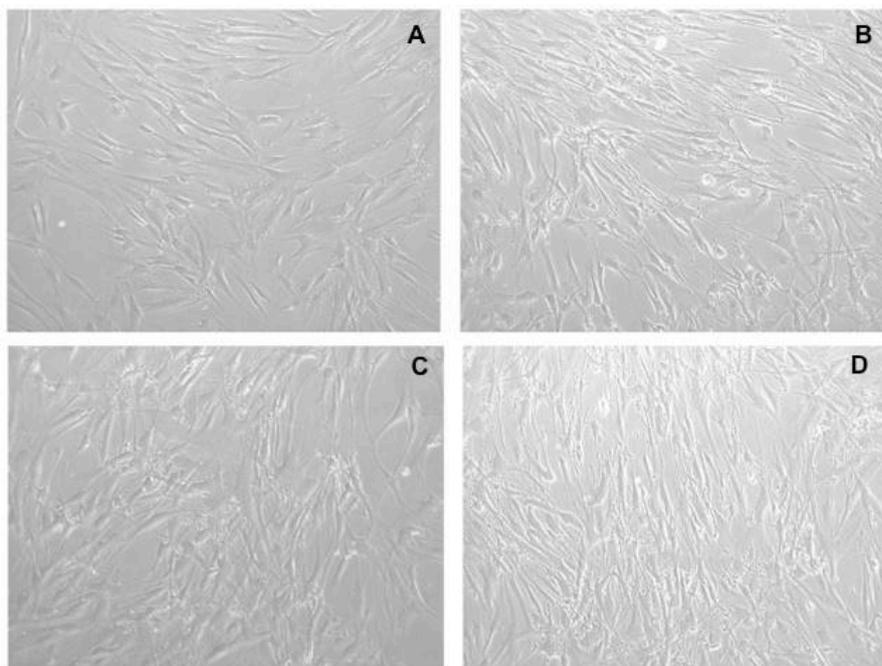
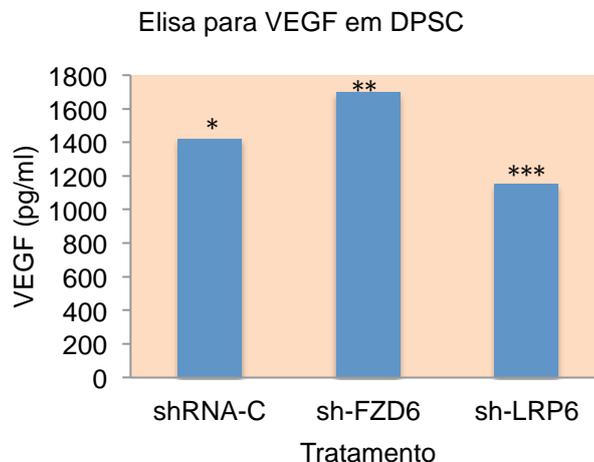


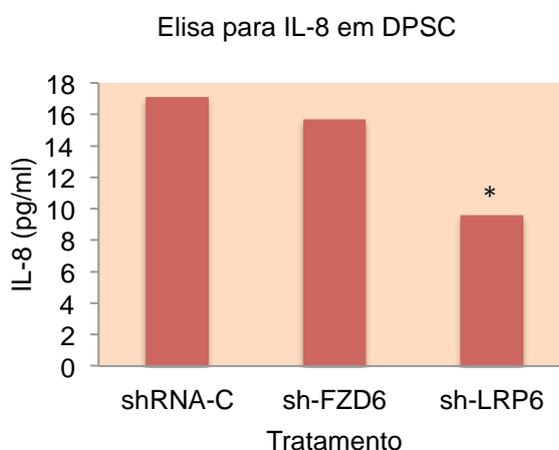
Figura 14 – Aspecto microscópico da morfologia celular de DPSC-shRNA-LRP6 cultivadas em meios de cultura (A) alfa-MEM, (B) EGM-2MV, (C) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml rhVEGF e (D) EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF e 50 ng/ml de rhWnt1.

Quanto a expressão das proteínas VEGF e IL8 no ensaio de ELISA, houve diferença estatística entre todas as células analisadas quanto a expressão de VEGF ($p < 0,05$), sendo que shRNA-Frizzled6 foi a que expressou mais, enquanto shRNA-LRP6 expressou menos, em relação ao controle (Figura 15). Quanto à expressão de IL-8, houve diferença estatística entre as células shRNA-LRP6 e as células shRNA-Frizzled6 e controle, com menor expressão pelas primeiras (Figura 16).



*, ** e *** Diferenças estatísticas entre as células estudadas ($p = 0,0000$).

Figura 15 – Gráfico de barras dos valores médios das concentrações da proteína solúvel VEGF (pg/ml) em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, obtidos pelo teste de ELISA. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes.



* Diferença estatística entre as células estudadas ($p = 0,0000$).

Figura 16 – Gráfico de barras dos valores médios das concentrações da proteína solúvel IL8 (pg/ml) em células DPSC cultivadas com alfa-MEM, obtidos pelo teste de ELISA. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes.

A capacidade destas células de formar tubos capilares foi analisado pelo teste de formação de capilares em Matrigel. Para todas as células analisadas, não houve formação de túbulos capilares até o período de 72 h. Após 96 horas as células DPSC foram capazes de

formar estruturas tubulares e o número de túbulos aumentou até o período de 144 h. Diferença estatística foi observada após 120 h entre shRNA-C e as outras células ($p = 0,0000$) (Figura 17). Quanto a morfologia, as células HDMEC formaram túbulos mais organizados que as DPSC, porém o número de formações tubulares é decrescente conforme períodos analisados (Figura 18, 19, 20 e 21).

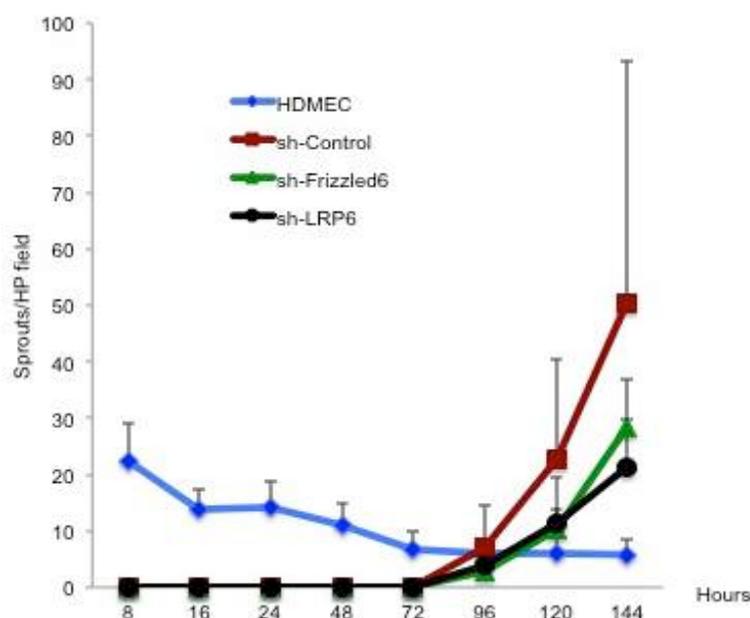


Figura 17 - Gráfico de linhas do número de túbulos formados por DPSC-shRNA-LRP6, DPSC-shRNA-Frizzled6 e DPSC-shRNA-controle em Matrigel e estimuladas com EGM-2MV suplementado com 50 ng/ml de rhVEGF. Células HDMEC foram usadas como controle positivo. Os dados representam os valores médios e desvio padrão ($p = 0,0000$).

5.4 Detecção de células DPSC eGFP positivas transduzidas com vetores lentivirais shRNA-LRP6 e shRNA-Frizzled6 nas paredes de vasos sanguíneos, *in vivo*

Para verificar se a via de sinalização Wnt/ β -catenina participa do processo de angiogênese da polpa dental, o destino de DPSC depois de transplantados em camundongos imunodeficientes foi avaliado através do uso de células transduzidas com shRNA-LRP6 e

shRNA-Frizzled6 e shRNA-C, marcadas com eGFP.

A figura 22 mostra corte histológico de uma fatia dentária obtida neste estudo apresentando tecido formado em todo seu interior semelhante a polpa dental. As figuras 23, 24 e 25 mostram imagens em maior aumento de cortes histológicos das fatias dentárias implantadas semeadas com as células DPSC-shRNA. Pode-se notar que o tecido formado pelas células shRNA-controle (Figura 23) é bem organizado e composto por muitas células, com presença de células cuboides semelhantes a odontoblastos delimitando a dentina com prolongamentos no interior dos túbulos dentinários e vasos sanguíneos bem delimitados. O tecido formado pelas células shRNA-Frizzled6, é semelhante ao formado pelas células controle, porém apresenta-se menos organizado, e as células odontoblasto-*like* são menos cuboides. Já o tecido formado pelas células shRNA-LRP6, como o formado pelas células shRNA-Frizzled6, apresenta-se menos organizados e com células que delimitam a dentina com formato fusiforme e poucos prolongamentos no interior dos túbulos dentinários.

Os capilares sanguíneos dos tecidos formados foram contados de acordo com a coloração acastanhada presente nos mesmos, marcados por imuno-coloração para eGFP. Interessantemente, shRNA-Frizzled6 não mostrou diferença estatística quanto ao número de capilares formados (média = 20,433; dp = 4,8258) quando comparado ao formado pelas células controle (média = 22,733; dp = 4,7338). Entretanto, pode-se observar pelas lâminas imuno-coradas que os vasos sanguíneos formados por shRNA-Frizzled6 apresentaram-se com morfologia alterada. As células shRNA-LRP6 formaram menos capilares sanguíneos quando comparado às outras células (média = 10.767; dp = 2.6351), diferindo estatisticamente das mesmas ($p = 0,0000$)(Figura 26). A Figura 27 mostra as células marcadas pela imuno-coloração nas paredes dos vasos sanguíneos formados.

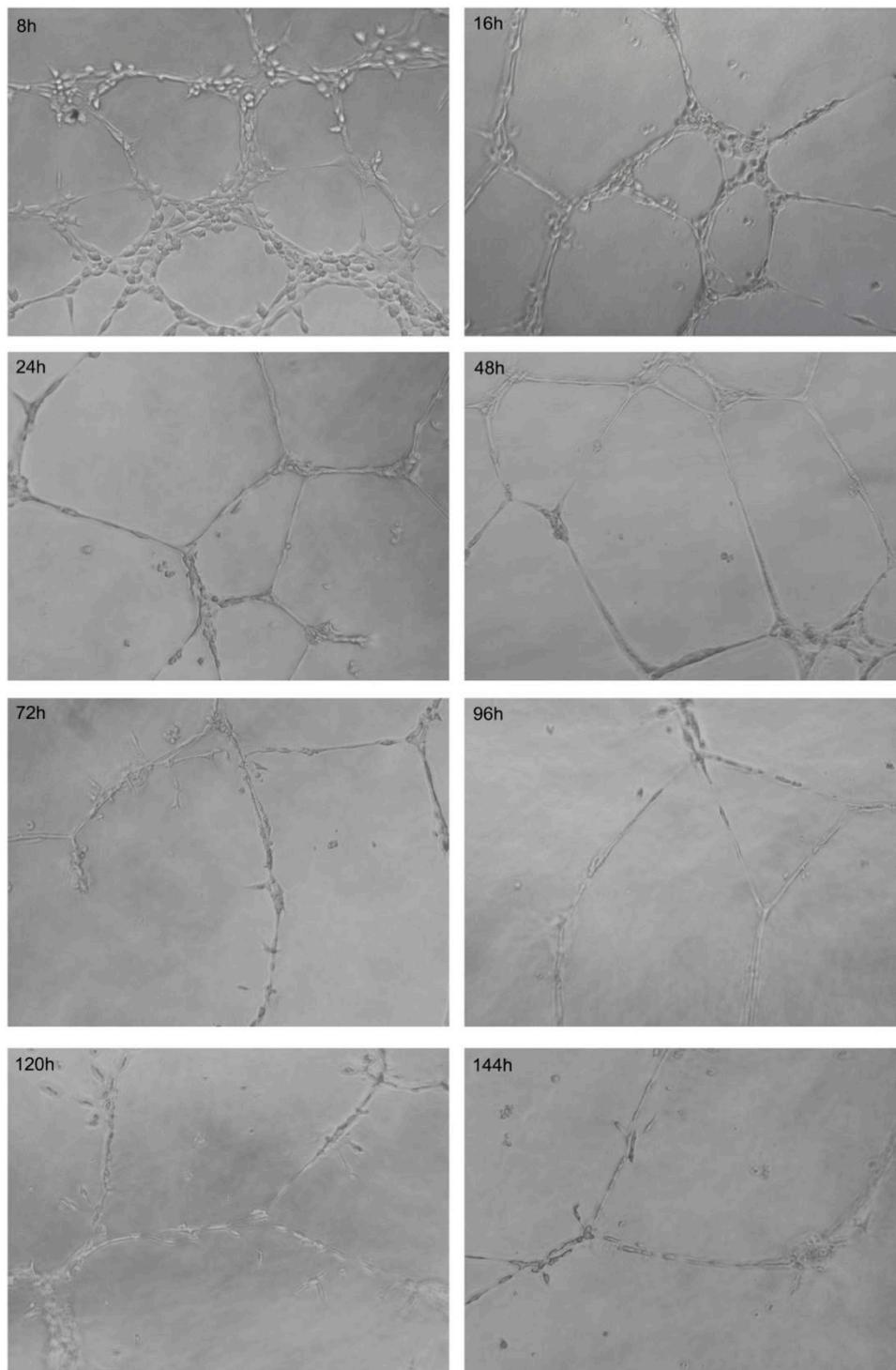


Figura 18 – Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por HDMEC cultivadas com EGM-2MV em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h, mostrando a diminuição da estruturas tubulares conforme aumento de horas.

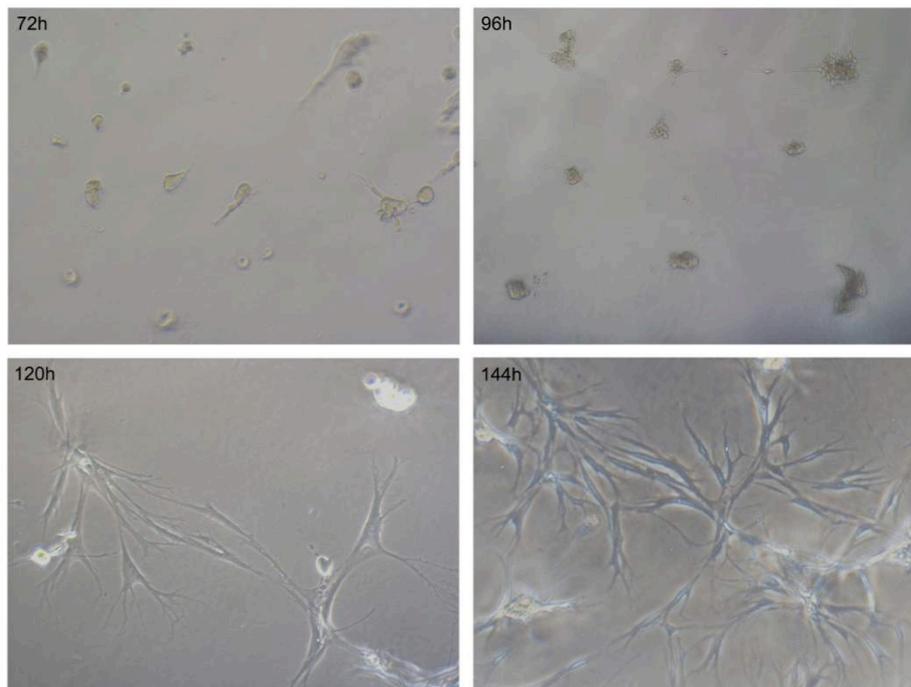


Figura 19 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-control cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.

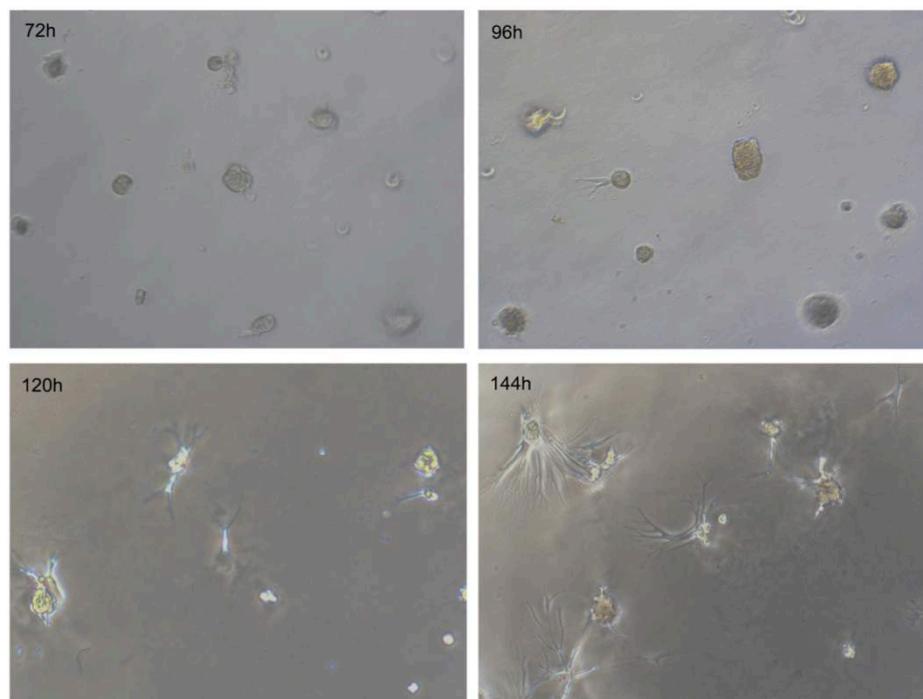


Figura 20 - Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-Frizzled6 cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.

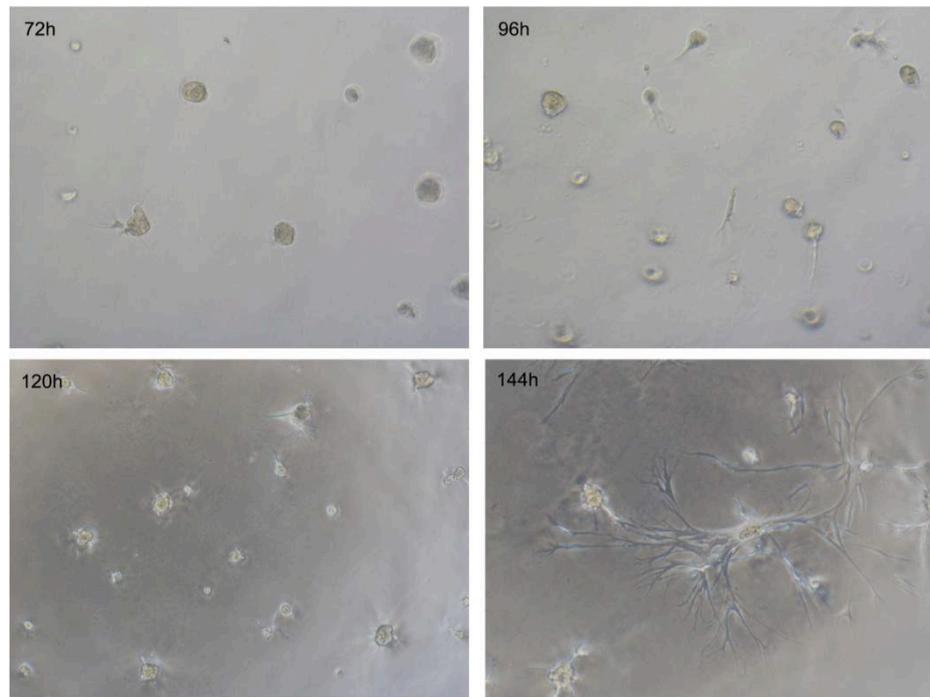


Figura 21 – Imagem microscópica de estruturas tubulares formadas por DPSC-shRNA-LRP6 cultivadas com EGM-2MV suplementadas com 50 ng/ml de rhVEGF em Matrigel nos tempos de 8 a 144 h.



Figura 22 – Imagem microscópica de fatia dentária/scaffold semeada com DPSC-shRNA-controle e implantada em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corada por HE, demonstrando formação de tecido vascularizado dentro da fatia.

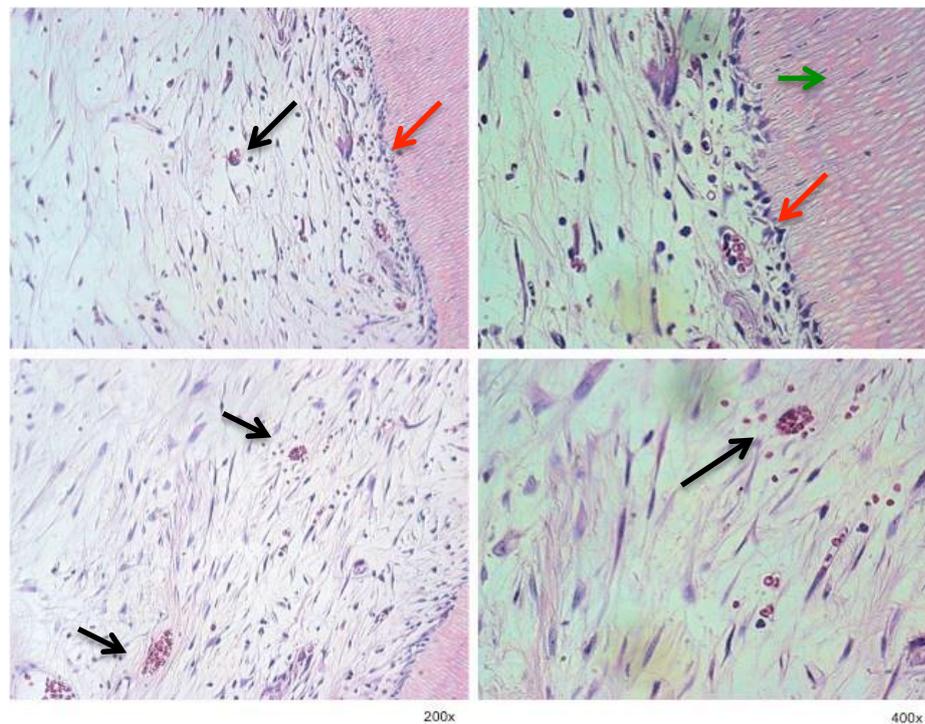


Figura 23 – Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA-controle e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos, as vermelhas de células odontoblasto-*like* e as verdes de prolongamentos odontoblásticos.

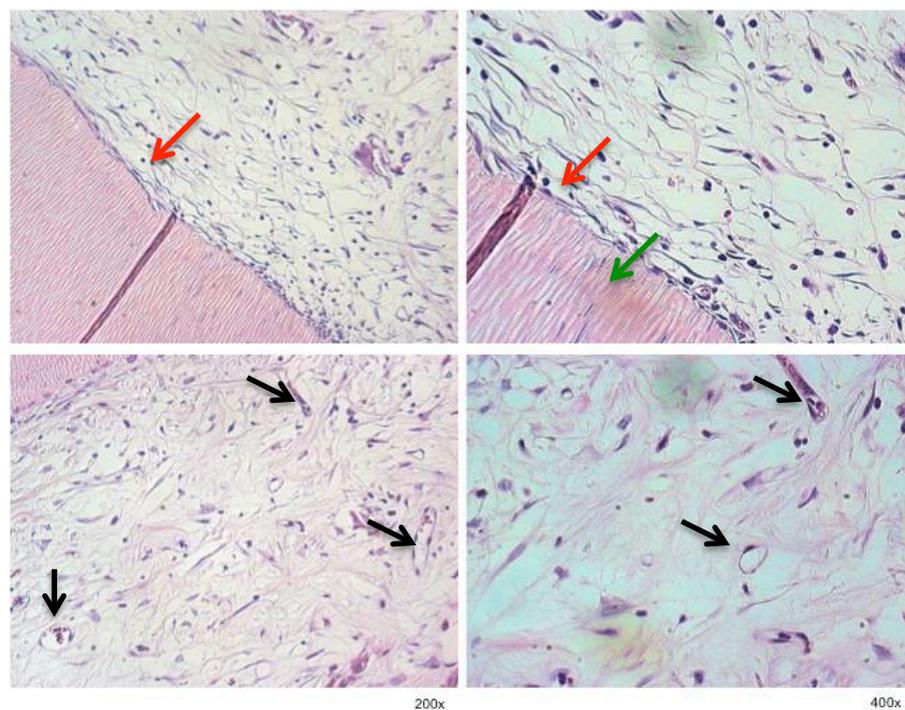


Figura 24 - Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA- Frizzled6 e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos, as vermelhas de células odontoblasto-*like* e as verdes de prolongamentos odontoblásticos.

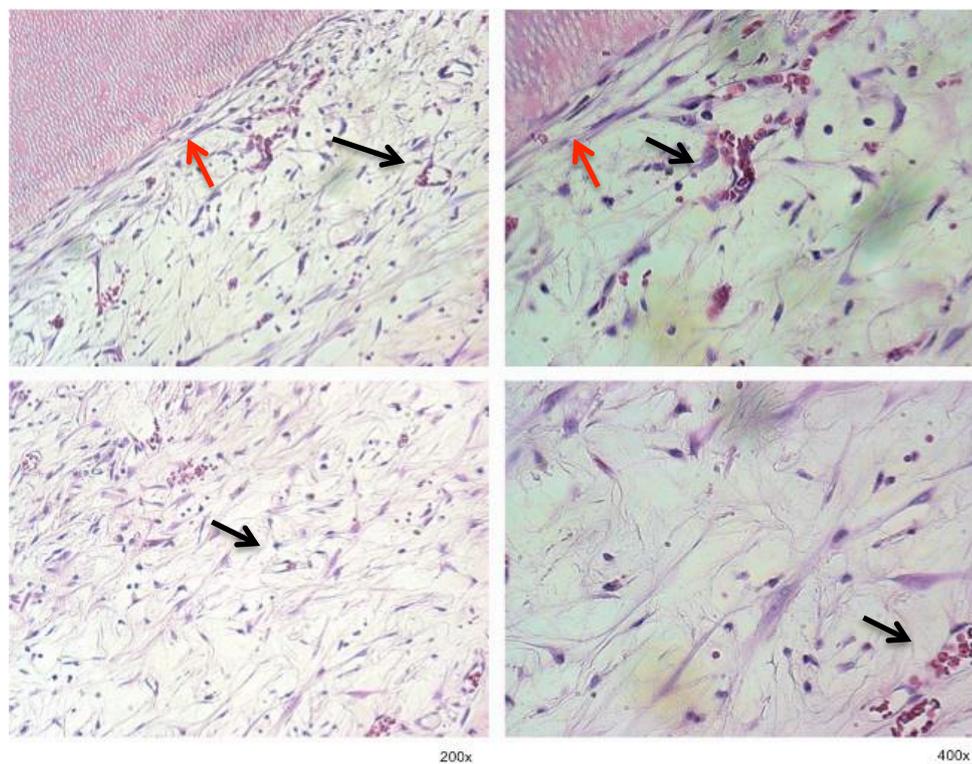
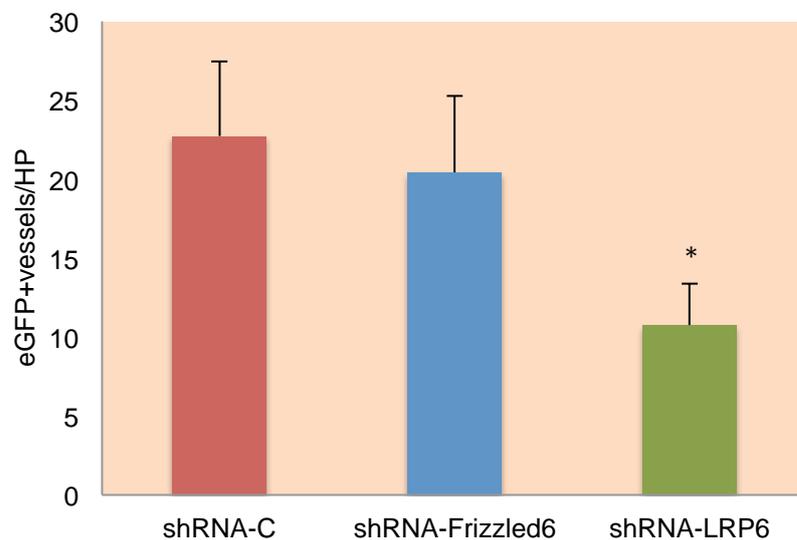


Figura 25 - Imagem microscópica de fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC-shRNA-LRP6 e implantadas em camundongos imunodeficientes por 28 dias, corados em HE. As setas pretas indicam a presença de capilares sanguíneos e as setas vermelhas de células odontoblasto-*like*.



* Diferença estatística entre os grupos ($p=0,0000$).

Figura 26 – Gráfico de barras representativo do número de vasos sanguíneos marcados por imuno-histoquímica em fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com DPSC transduzidas com shRNA-LRP6, shRNA-Frizzled6 e shRNA-C em camundongos imunodeficientes por 28 dias. Os dados representam os valores médios e desvio padrão.

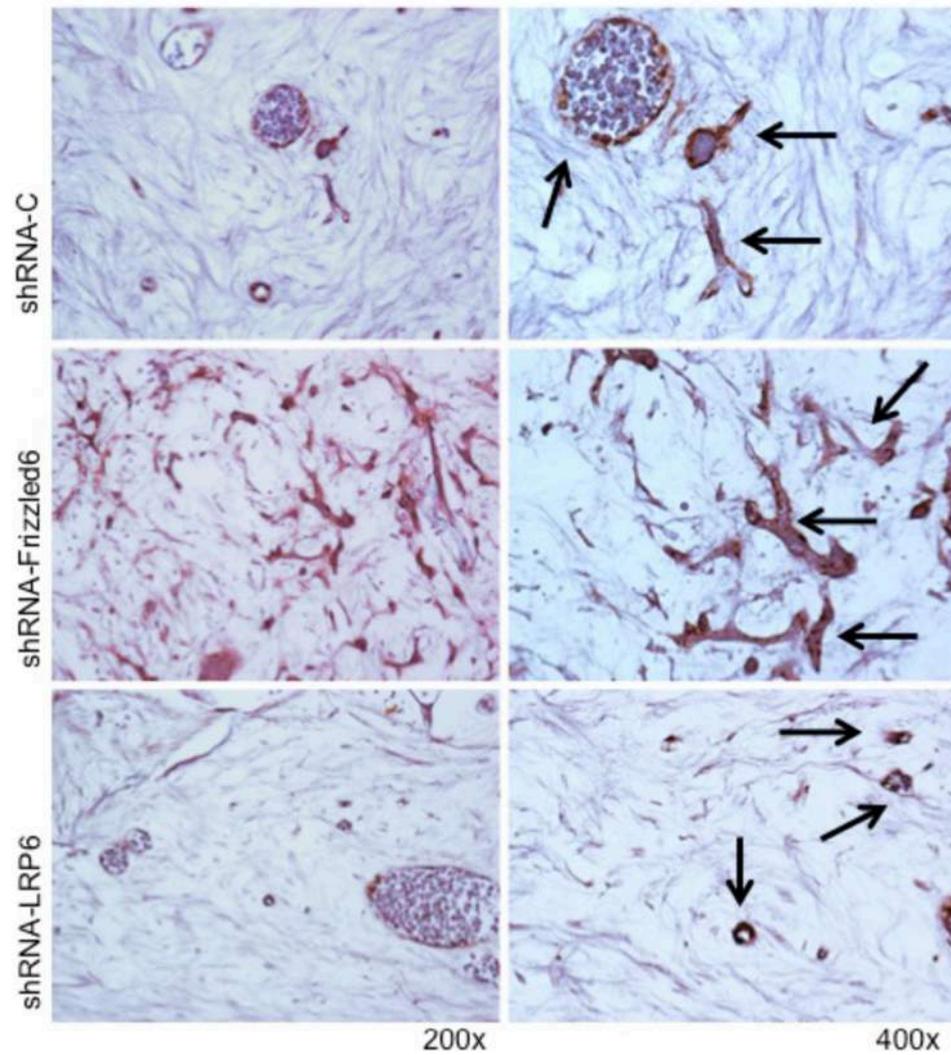


Figura 27 – Imunohistoquímica das fatias dentárias/*scaffolds* sementeas com DPSC-shRNA em camundongos imunodeficientes por 28 dias. As setas indicam os capilares sanguíneos formados imuno-corados com e-GFP.

6 DISCUSSÃO

A engenharia de tecido é uma ciência interdisciplinar emergente, com o objetivo de desenvolver estratégias para a regeneração de órgãos e tecidos danificados, baseado em princípios que envolvem a identificação de células apropriadas, o desenvolvimento de matrizes condutoras (*scaffolds*) e a compreensão dos sinais morfogênicos requeridos para induzir células a se regenerarem no tecido que foi perdido (Nör, 2006).

As células tronco originadas da polpa dental tem habilidade para se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares (Gronthos et al., 2002; Cordeiro et al., 2008; Sakai et al., 2010) sendo uma fonte viável para a engenharia de tecidos da polpa dental (Cordeiro et al., 2008). Neste trabalho optou-se por estudar os mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidos no processo de vasculogênese em células tronco de polpa dental. Wrigth et al., em 1999, demonstraram pela primeira vez que a via de sinalização Wnt/ β -catenina tem função em células vasculares. Desde então, alguns estudos têm sido relatados relacionando esta sinalização com células endoteliais e mais recentemente com células tronco de polpa dental (Scheller et al., 2008; Silvério et al., 2012; Feng et al., 2013). Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar a relação desta via de sinalização com a diferenciação endotelial de células tronco de origem pulpar.

Inicialmente foram realizados estudos pilotos para avaliar as células tronco de origem de dentes permanentes – DPSC, e de origem de dentes decíduos – SHED frente a expressão dos receptores da proteína Wnt, Frizzled (3, 4, 5 e 6) e LRP (5 e 6), e também das proteínas GSK-3 β (total e fosforilada) e β -catenina (total e ativa). Os dois tipos celulares expressaram todas as proteínas estudadas, porém, apesar de

SHED apresentar maior expressão destas proteínas que DPSC, optamos por utilizar as últimas pois apresentavam melhor crescimento celular e morfologia até a passagem 10. Além disso, um estudo comparativo entre SHED e DPSC quanto a diferenciação neurogênica destas células, verificou que o processo de envelhecimento das células (DPSC) resulta em inibição da via Wnt/ β -catenina, porém a ativação desta via pode reverter este processo, tendo as duas células igual potencial para a terapia de regeneração tecidual (Feng et al., 2013).

Neste estudo, quando DPSC foram induzidas com os fatores rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅, verificou-se aumento da expressão proteica dos receptores Frizzled6 e LRP6 e das proteínas GSK-3 β (total e fosforilada) e β -catenina (ativa). O aumento da expressão de β -catenina ativa sugere que Wnt1 estabiliza β -catenina em DPSC, como verificado anteriormente (Wright et al., 1999; Scheller et al., 2008). O fator rhWnt1 foi utilizado pois promove a proliferação endotelial, formação de capilares em Matrigel e indução da transcrição de Interleucina-8 em células endoteliais humanas (Wright et al., 1999; Masckauchán et al., 2005). É importante salientar que neste estudo foi utilizado também o fator rhVEGF₁₆₅ para analisar o papel da via de sinalização Wnt/ β -catenina na diferenciação endotelial de células tronco. VEGF é um dos fatores pró-angiogênicos que pode iniciar as cascatas de eventos envolvidos na angiogênese, além de ser um indutor de diferenciação endotelial de células-tronco, sozinho ou em associação com outros fatores de crescimento (Mullane et al., 2008; Sakai et al., 2010; Zhang R et al., 2011; Bento et al., 2013). Além disso, estudo demonstrou que o aumento de VEGF é regulado pela via de sinalização Wnt (Zhang X et al., 2001).

Após observar que a via de sinalização Wnt/ β -catenina é ativada pelos fatores rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1, a importância dos receptores Frizzled6 e LRP6 na função de diferenciação endotelial das células tronco de polpa dental foi verificada. Para isto, Frizzled6 e LRP6 foram silenciados individualmente com vetores shRNA em células DPSC e

posteriormente estimuladas com os fatores rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1 em concentrações de 0,5; 5 e 50 ng/ml. Inicialmente verificou-se as alterações ocorridas nas células silenciadas quanto à ativação da via de sinalização Wnt em comparação com as células utilizadas como controle. Diferentes concentrações de Wnt1 (0,5; 5; 50 ng/ml) alteraram proporcionalmente a ativação desta via através da expressão de β -catenina ativa, com maior expressão na maior concentração, indicando que quanto maior a concentração de Wnt1, maior é a ativação desta via de sinalização. Interessantemente, a expressão de β -catenina ativa foi maior nas células transduzidas com shRNA-LRP6 e com shRNA-Frizzled6, quando comparado com as células controle. Quando estas células foram tratadas com rhVEGF₁₆₅ e rhWnt1 a expressão de β -catenina ativa foi ainda maior. Quanto à expressão de GSK3- β fosforilada não foi observado grande diferença entre as células estudadas, nem mesmo quando as células receberam rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅, com exceção das células shRNA-Frizzled6 que diminuiu a quantidade de GSK3- β fosforilada.

A β -catenina ativa é aquela que não foi fosforilada pelo GSK3- β no citoplasma e portanto estaria funcionalmente ativa na via canônica da sinalização Wnt translocando para o núcleo e iniciando a transcrição de uma cascata de genes, indicando a ativação da sinalização Wnt (Reya, Clevers, 2005; Scheller et al., 2008; Zhang J et al., 2013; Feng et al., 2013). Os resultados desta pesquisa são intrigantes uma vez que uma das funções do LRP6 é a inibição do complexo de destruição da β -catenina através da direta inibição da atividade de GSK3- β contra a β -catenina (Reya, Clevers, 2005; Lian et al., 2014), e desta forma a ausência de LRP6, deveria diminuir a expressão da proteína β -catenina ativa, devido a fosforilação e degradação da mesma pelo seu complexo de destruição. Entretanto, é importante ressaltar que a β -catenina e o GSK3- β podem ter participação em outros mecanismos como a via de sinalização AKT, verificado pela presença da proteína AKT total e

fosforilada nas células estudadas, ou como componente estrutural ao complexo de adesão celular (Zhang J et al., 2013; Golan et al., 2004; McCrea et al., 1991). Além disso, LRP6 e Frizzled6 também podem atuar como reguladores negativos da via Wnt/ β -catenina através do controle da atividade de TCF/LEF (Beagle, Johnson, 2010; Golan et al., 2004). Desta forma, sugere-se que a ausência de LRP6 e Frizzled6 pode causar desregulamento da quantidade de β -catenina ativa presente em células DPSC, porém os mecanismos moleculares relacionados ainda não foram bem elucidados.

Também foi verificado que as células DPSC estudadas, independente de indução com rhWnt1 ou rhVEGF₁₆₅, apresentaram expressão da proteína BMI-1 indicativo da regulação de senescência e morte celular, como em estudo anterior (Iohara et al., 2006), além de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2, que ao contrário de outros autores, não aumentou com a indução de VEGF (Nör et al., 1999). Entretanto, a ausência de LRP6 estimulou a expressão de BCL-2, enquanto que a ausência de Frizzled6 diminuiu a expressão desta proteína, sugerindo que a via de sinalização Wnt/ β -catenina pode estar associada a expressão desta proteína, uma vez que tem papel fundamental na determinação do destino celular, proliferação, polaridade e morte celular (Saito-Diaz et al., 2013).

A diferenciação endotelial das células estudadas foram avaliadas *in vitro* através da expressão de marcadores endoteliais. Pouca ou nenhuma expressão proteica dos marcadores endoteliais CD31 e VEGFR2 das células estudadas cultivadas com alfa-MEM em período de 7 dias foi verificado. Igualmente, SHED não expressaram marcadores endoteliais em meio de cultura alfa-MEM em até 28 dias (Bento et al., 2013). Entretanto, SHED cultivadas em fatias dentárias/*scaffolds* e tratadas com VEGF, expressaram estes marcadores endoteliais após 28 dias (Sakai et al., 2010), indicando a importância dos componentes da matriz dentinária para diferenciação endotelial (Zhang R et al., 2011).

DPSC induzidas com meio de cultura para diferenciação endotelial EGM2-MV, que contém rhEGF, hidrocortisona, 5% de soro fetal bovino, rh β FGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico e ng/ml de rhVEGF, suplementado ou não com VEGF, expressaram marcadores endoteliais CD31 e VEGFR2 no período de 7 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por Bento et al., 2013, onde verificou que EGM2-MV suplementado com rhVEGF₁₆₅ atua como meio de diferenciação endotelial para células SHED *in vitro*. A associação deste meio de diferenciação endotelial ao fator rhWnt-1, aumentou ainda mais a expressão dos marcadores endoteliais estudados. Sugere-se que este fator promove a diferenciação endotelial de DPSC, como descrito por outros autores quando avaliaram células endoteliais humanas (Wright et al., 1999; Masckauchán et al., 2005).

Semelhante às células DPSC controle, as células DPSC transduzidas com shRNA-Frizzled6 cultivadas em meio EGM2-MV, suplementado ou não com rhVEGF₁₆₅, expressaram todos os marcadores endoteliais no período de 7 dias. A ausência de Frizzled6 parece não alterar a atividade de transcrição de LEF/TCF quanto à ativação de genes VEGFR1 e VEGFR2 para a diferenciação endotelial, entretanto em presença de rhWnt1 e rhVEGF₁₆₅ a expressão de CD31 é diminuída. Por outro lado, as células DPSC transduzidas com shRNA-LRP6 diminuiu expressivamente a expressão de CD31 e VEGFR2, e diferentemente do que ocorreu nas células shRNA-Frizzled6, a expressão de CD31 aumentou com a suplementação do meio com rhWnt-1. A diminuição da expressão de marcadores endoteliais na ausência de LRP6, indica a necessidade deste receptor para a atividade de LEF/TCF (Beagle et al., 2009; Wu et al., 2009).

No período de 7 dias a expressão de VEGFR1 foi presente em todas as células e tratamentos estudados, entretanto mostrou-se maior nas células transduzidas com os vetores shRNA-Frizzled6 e shRNA-LRP6. VEGFR1 foi sugerido por ter papel importante

na diferenciação endotelial de SHED (Sakai et al., 2010; Bento et al., 2013), modula a angiogênese através de sua habilidade para sequestrar VEGF livre e reduz a sinalização através de VEGFR2 (Hirashima et al., 2003; Ferrara, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos em períodos de 15 dias quanto à expressão de mRNA dos marcadores endoteliais. Entretanto, nenhuma célula expressou VEGFR2, visto que ele é pobremente expressado em vasos sanguíneos maduros (Ferrara et al., 2003).

Neste estudo, encontrou-se que células DPSC não induzidas à diferenciação endotelial expressaram as proteínas solúveis dos fatores angiogênicos IL8 e VEGF, reportado previamente (Bronckaers et al., 2013). Células silenciadas com shRNA-LRP6, mostraram baixos níveis de expressão proteica destes fatores. Esta baixa expressão pode estar relacionada a atuação da via Wnt/ β -catenina que é responsável pela transcrição dos fatores IL8 e VEGF (Zhang X et al., 2001; Masckauchán et al., 2005). Apesar das células shRNA-Frizzled6 apresentarem expressão de VEGF maior que as células controle, podemos sugerir que este receptor também tem função na via Wnt/ β -catenina, porém na regulação negativa da transcrição deste fator angiogênico (Golan et al., 2004).

Nos ensaios de formação de túbulos capilares em Matrigel, ficou evidente a importância da via Wnt/ β -catenina na diferenciação endotelial das células DPSC. Apesar da formação tubular iniciar somente após o período de 96 h (4 dias) para todas as células, pode-se verificar que o número de túbulos formados pelas células controle foi maior em todos os períodos estudados, 96 – 144 h. Quando houve silenciamento de Frizzled6 e LRP6, o número de túbulos formados foi consideravelmente menor a partir de 120 h, demonstrando que há formação de túbulos capilares, porém de maneira extremamente lenta. Interessantemente, no período de 144 h houve formação mais rápida de túbulos pelas células shRNA-Frizzled6 que em shRNA-LRP6. Resultados

semelhante foram encontrados por outros autores, que também demonstraram a função de Wnt/ β -catenina em células endoteliais (Wright et al., 1999; Maretto et al., 2003; Masckauchán et al., 2005; Ye et al., 2009; Lian et al., 2014).

In vivo, as células estudadas foram semeadas em fatias dentárias/*scaffolds* e implantadas por 28 dias no dorso de camundongos imunodeprimidos. Os tecidos formados após este período são semelhantes a polpa dentária (Cordeiro et al., 2008) para as fatias dentárias/*scaffolds* semeadas com células controle e shRNA-Frizzled6, apresentando células cubóides ao longo da dentina e prolongamentos semelhantes aos dos odontoblastos dentro dos túbulos dentinários. O tecido formado pelas shRNA-LRP6 apresentaram células com núcleos maiores e mais achatados que as outras células, além de apresentarem poucas células semelhantes a odontoblastos próximos a dentina. Pode-se observar que o número de capilares formados pelas células controle foi significativamente maior que em células shRNA-LRP6 e ligeiramente maior que em shRNA-Frizzled6. Entretanto, apesar de não haver diferença significativa entre o número de vasos sanguíneos formados pelas células shRNA-controle e sh-RNA-Frizzled6, as últimas formaram vasos sanguíneos alterados morfológicamente, observados pela imunocoloração. Essa alteração morfológica pode indicar falta de maturação dos vasos sanguíneos formados por estas células.

Sabendo que *in vivo* as moléculas que podem sinalizar a proliferação, migração e diferenciação celular na polpa não são controladas, e que a dentina fornece fatores que apresentam atividade angiogênica (Zhang R et al., 2011), pode-se sugerir que Wnt/ β -catenina tem função na diferenciação endotelial de DPSC pela incapacidade de formação de capilares maduros em células com ausência de Frizzled6 e, de capilares na ausência de LRP6. Contudo, o mecanismo como LRP6 e Frizzled6 funcionam não são bem esclarecidos, principalmente por apresentarem função de ativação e inibição na atividade de transcrição de

TCF/LEF.

Ainda, é importante ressaltar que o processo de diferenciação endotelial pelas células tronco, assim como a vasculogênese, é um mecanismo complexo que envolve outras vias de sinalização e vários fatores de crescimento. E que estudos mais aprofundados devem ser realizados antes de levarmos a terapia de regeneração tecidual para a prática clínica. Entretanto, não está longe a aplicação de células tronco de origem dental no restabelecimento da estrutura dental perdida.

7 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste trabalho pode-se sugerir que a via de sinalização Wnt/ β -catenina atua na diferenciação endotelial de células-tronco da polpa dental (DPSC) através do receptor Frizzled6 e co-receptor LRP6:

- a) Wnt-1 e VEGF promovem a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em células DPSC pelo aumento das expressões proteicas de β -catenina, GSK3- β , Frizzled6 e LRP6;
- b) Wnt-1 e VEGF estimulam a diferenciação endotelial em células DPSC, verificado pelo aumento da expressão proteica e gênica de marcadores endoteliais;
- c) LRP6 e Frizzled6 são requeridos para formação de estruturas tubulares e diferenciação de DPSC em células endoteliais;
- d) DPSC não são capazes de formar capilares sanguíneos *in vivo* em ausência de LRP6, indicando a necessidade deste receptor para diferenciação endotelial de DPSC;
- e) DPSC são capazes de formar capilares sanguíneos *in vivo* em ausência de Frizzled6, porém é requerido para que ocorra maturação dos mesmos.

8 REFERÊNCIAS*

Beagle B, Mi K, Johnson GV. Phosphorylation of PPP(S/T)P motif of the free LRP6 intracellular domain is not required to activate the Wnt/beta-catenin pathway and attenuate GSK3beta activity. *J Cell Biochem.* 2009;108(4):886–95.

Beagle B, Johnson GV. Differential modulation of TCF/LEF-1 activity by the soluble LRP6-ICD. *PLoS One.* 2010;5(7):e11821.

Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, et al. Endothelial Differentiation of SHED Requires MEK1/ERK Signaling. *J Dent Res.* 2013;92(1):51-7.

Bjorndal L, Mjor IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries-characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence Int.* 2001;32(9):717-36.

Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, et al. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71104.

Brey EM, Uriel S, Greisler HP, McIntire LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. *Tissue Eng.* 2005;11(3-4):567-84.

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997;11(24):3286-305.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-57.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*. 2010;89(6):603-8.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.

Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 2004;112(7-8):402-12.

Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010;36(11):1805-11.

Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*. 2003;47(3):149-61.

Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*. 2002;21(1):33-49.

Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration. *Head Face Med*. 2006;25(2):16.

Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B, Xu Y, et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(8):1023-31.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.

Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*. 2009;20(4):158-63.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.

Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt/ β -catenin signaling cascade. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14879-88.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):13-27.

Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G, et al. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):166-72.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.

Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Matsumura K, Kawasaki K, Shibuya M. A chemically defined culture of VEGFR2+ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. *Blood.* 2003;101(6):2261-7.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80.

Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells.* 2006;24:2493–503.

Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri SH, Piryaei A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2008;32(10):1183-92.

Jernigan KK, Cselenyi CS, Thorne CA, Hanson AJ, Tahinci E, Hajicek N, et al. Gbetagamma activates GSK3 to promote LRP6-mediated beta-catenin transcriptional activity. *Sci Signal.* 2010;3(121):ra37.

Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials.* 2014;35(24):6332-43.

Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors

via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Reports*. 2014;3(5):804-16.

Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, Murphy TL, Murphy KM. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*. 2006;133(19):3787-96.

Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, et al. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3299-304.

Masckauchán TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*. 2005;8(1):43-51.

McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 1991;254:1359-61.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*. 1996;12(6):865-8.

Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008;12(2):113-8.

Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC, Botero TM, Holland GR, et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res*. 2008;87(12):1144-8.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007;33(4):377-90.

Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*. 2005;31(10):711-8.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.

Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):632-45.

Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. Frizzled receptors signal through G proteins. *Cell Signal*. 2013;25(6):1468-75.

Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent*. 2006;31(6):633-42.

Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Poverini PJ. Vascular endothelial growth factor (vegf)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of bcl-2 expression. *Am J Pathol*. 1999;154(2):375-84.

Nör J, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*. 2001;81(4):453-63.

Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*. 2006;44(5):265-74.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:1-22.

Ren D, Chen J, Li Z, Yan H, Yin Y, Wo D, et al. LRP5/6 directly bind to Frizzled and prevent Frizzled-regulated tumour metastasis. *Nat Commun*. 2015;22(6):6906.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(2005):843-50.

Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-Mccaw A, Lee E. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors*. 2013;31(1):1-31.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89(8):791-6.

Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *J Dent Res*. 2008;87(2):126-30.

Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontal Res*. 2012;47(3):309-19.

Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials: a partnership. *Clin Oral Investig*. 2008;12(2):103-8.

Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):281-90.

Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2013;19(4):634-64.

Wei G, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX. Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB. *J Control Release*. 2006;112(1):103-10.

Wright M, Aikawa M, Szeto W, Papkoff J. Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263(2):384-8.

Wu G, Huang H, Abreu JG, He X. Inhibition of GSK3 Phosphorylation of β -Catenin via Phosphorylated PPPSPXS Motifs of Wnt Coreceptor LRP6. *PLoS One*. 2009;4(3):e4926.

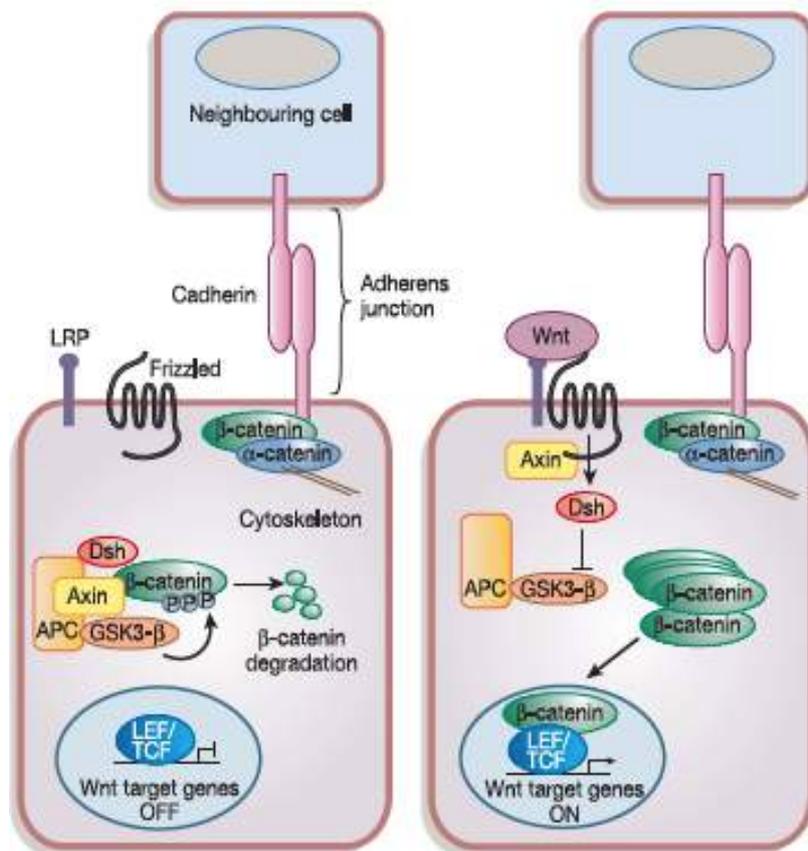
Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, Smallwood PM, et al. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell*. 2009;139(2):285-98.

Zhang J, Shemezis JR, McQuinn ER, Wang J, Sverdlov M, Chenn A. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Dev*. 2013;8:7. Doi:10.1186/1749-8104-8-7.

Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod*. 2011;37(1):26-30.

Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001;61(16):6050-4.

ANEXO A – Desenho esquemático da via de sinalização Wnt/Beta-catenina



(Reya, Clevers, 2005).