

Andreza Maria Fábio Aranha

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS PULPARES
HUMANAS EM HIPÓXIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

ARARAQUARA

2008

ANDREZA MARIA FÁBIO ARANHA

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS PULPARES
HUMANAS EM HIPÓXIA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör

3º Examinador: Prof. Dr Flávio Fernando Demarco

4º Examinador: Prof. Dr. Joni Cirelli

5º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara, 22 de setembro de 2008.

DADOS CURRICULARES

Andreza Maria Fábio Aranha

NASCIMENTO	19.11.76 - Bauru - SP
FILIAÇÃO	Antonio Carlos Bourgogne Aranha Maria Salete Fábio Aranha
1995/1998	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, São Paulo, Brasil.
2000/2002	Especialização em Odontopediatria. Hospital de Reabilitação de Anomalias Crâniofaciais, USP, SP, Brasil.
2002/2004	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Odontopediatria, Nível Mestrado, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, São Paulo, Brasil.
2005/2008	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológica, Área de concentração em Odontopediatria, Nível Doutorado, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, São Paulo, Brasil.
2007	Estágio de Doutorado no Exterior, na Universidade de Michigan, Faculdade de Odontologia, Laboratório de Angiogênese, Ann Arbor, Michigan, EUA

MESMO ASSIM

AS PESSOAS SÃO IRRACIONAIS, ILÓGICAS E EGOCÊNTRICAS.

AME-AS **MESMO ASSIM.**

SE TEM SUCESSO EM SUAS REALIZAÇÕES, GANHARÁ FALSOS AMIGOS E
VERDADEIROS INIMIGOS.

TENHA SUCESSO **MESMO ASSIM.**

O BEM QUE FAZ SERÁ ESQUECIDO AMANHÃ.

FAÇA O BEM **MESMO ASSIM.**

A HONESTIDADE E A FRANQUEZA O TORNAM VULNERÁVEL.

SEJA HONESTO **MESMO ASSIM.**

AQUILO QUE LEVOU ANOS PARA CONSTRUIR PODE SER DESTRUÍDO DE UM
DIA PARA O OUTRO.

CONSTRUA **MESMO ASSIM.**

OS POBRES TÊM VERDADEIRAMENTE NECESSIDADE DE AJUDA, MAS ALGUNS
DELES PODEM ATACÁ-LO SE VOCÊ OS AJUDAR.

AJUDE-OS **MESMO ASSIM.**

SE DER AO MUNDO E AOS OUTROS O MELHOR DE SI MESMO, CORRE O RISCO
DE SE MACHUCAR.

DÊ O QUE VOCÊ TEM DE MELHOR **MESMO ASSIM.**

VEJA QUE, NO FINAL DAS CONTAS, É ENTRE VOCÊ E DEUS.

NUNCA FOI ENTRE VOCÊ E OUTRAS PESSOAS.

Madre Teresa de Calcutá

DEDICO ESTE TRABALHO...

À Deus, por estar ao meu lado durante todos os momentos, iluminando meus caminhos e me guiando. Obrigada, Senhor !!!

À minha querida família e em especial a meus pais, **Antônio Carlos e Maria Salete**, meus irmãos, **Gustavo e Maíra** e meu cunhado, **Douglas** pelo amor e apoio incondicional durante toda esta jornada. Amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Souza Costa, meu querido orientador, por sua confiança, apoio e fundamental contribuição para a concretização de um grande sonho. Muito obrigada por me ajudar a torná-lo realidade. A um exemplo de profissional honesto, responsável e dedicado, minha eterna admiração e gratidão!!!

Ao Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, por sua atenção e disponibilidade durante meu estágio em Ann Arbor na Universidade de Michigan. O meu aprendizado durante sua orientação foi fundamental para meu amadurecimento profissional e para o futuro da minha carreira acadêmica.

Á Profa. Dra. Josimeri Hebling, por sua total disponibilidade durante toda minha jornada acadêmica, por quem tenho grande admiração e carinho e pelo auxílio na análise estatística deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, nas pessoas de seu ex-diretor, Profa. Dra. Rosimary Adriana Chiérici Marcantônio, diretor, Prof. Dr. Luis Cláudio Martins Segalla e o vice-diretor, Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria, Josimeri Hebling, Elisa Maria Aparecida Giro, Lourdes Aparecida dos Santos-Pinto, Fábio C. Braga de Abreu e Lima, Cyneu Aguiar Pansani, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela dedicação e por minha formação acadêmica.

Aos demais professores do Programa de Doutorado em Ciências Odontológicas, área de concentração de Odontopediatria e da Pós-Graduação, pela atenção e disponibilidade.

À coordenação da Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pela coordenadora Profa. Dra. Josimeri Hebling e pelo vice-coordenador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, Érika Botelho, Fábio Scanavino, Fernanda Lessa, Hermes Pretel, Jonas Rodrigues, Júnia Ferrari, Luciana Lima, Mariana Emi Sanabi,

Murilo Guimarães e aos colegas de outras turmas, **Ana Lúcia de Oliveira, Camila Fávero, Cármén Coldebella, Elcilaine Azevedo, Herica Ricci, Indri Nogueira, Juliana Gondim, Lícia Cavalcanti, Michele Diniz, Márcia Tanaka, Nancy Sacono e Simone di Salvo**, pela convivência, alegria e companheirismo.

Às minhas queridas amigas do coração e companheiras de todos os momentos, em especial, **Fernanda Bello, Fernanda Lessa, Yeon Kim, Lícia Cavalcanti, Carol Pawloski, Ângela Amaral, Aline Viana, Midori Yamato, Sabrina Serra, Mylene Pasin, Myrele Pasin e Virgínia Peixoto** que estiveram sempre ao meu lado durante todo este trabalho. Por todos os conselhos e sugestões, pela amizade, carinho e apoio. Amo vocês!!!

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, **Adriano Mendonça, Ana Paula Ribeiro, Andreza Almeida, Camila Fávero de Oliveira, Carmen Coldebella, Carolina Brito, Castelo Cidade, Cláudia Huck, Daniela Cristina Barbosa, Darlon Martins, Fernanda Lessa, Fernanda Vargas, Flávia Coimbra, Flávia Trindade, Indri Nogueira, João Kina, Juliana Gondim, Juliana Pirola, Nancy, Indri, Karina Neves, Keren Jordão, Luciana Coimbra, Marcela Tagliani, Maria da Glória Celli, Nancy Sacono, Patrícia Frederico**, por compartilharmos conhecimentos, pelas sugestões e pelas risadas e descontração durante as apresentações e experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Angiogênese da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, **Kathleen Neiva, Eoin Mullane, Zaocheng Zhang, Zhihong Dong, Ilan Maltz, Tatiana Botero, Naoki, Bill Love, Elliot Hill, Kristy Warner, Ben Zeitlin, Sudha Krishnamurthy, Isabel Lauxen, Paloma Telles, Flávio Demarco, Sandra Tarquin, Luciano Casagrande, Vichu, Alexandra Jakery e Marta Myiazawa** e aos amigos de outros departamentos, **Christopher Strayhorn, Ruth Eberhart, Renita Bellmore** por terem me recebido com tanto carinho em Ann Arbor, pela atenção e disponibilidade durante a execução de meus experimentos.

Aos meu companheiros e amigos eternos, **Bruno Teixeira, Luciano Casagrande, Ilan Maltz, Ana Gabriela Maris, Renata Soares, Natália Branco e Keith Pertile** que estiveram ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades durante minha experiência no exterior.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil e do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, em especial a **Juliana Pirola**.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, **Rosângela, Alexandre, Flávia** e em especial, **Mara**, pelo auxílio e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à **Sílvia**, **Adriano** e **Eliane** pelo bom humor e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela bolsa de estudo concedida durante o Programa e pelo apoio financeiro ao meu Estágio de Doutorado no exterior .

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

MY SINCERE THANKS TO ...

My labmates at Dr. Nör's lab, Kathleen Neiva, Eoin Mullane, Zaocheng Zhang, Zhihong Dong, Ian Maltz, Tatiana Botero, Naoki, Bill Love, Elliot Hill, Kristy Warner, Ben Zeitlin, Sudha Krishnamurthy, Isabel Lauxen, Paloma Telles, Flávio Demarco, Sandra Tarquin, Luciano Casagrande, Vichu, Alexandra Jakery e Marta Myiazawa, friends from other departments, Christopher Strayhorn, Ruth Eberhart, Renita Bellmore for all the support you gave me during my stay at Ann Arbor. Staying there was a huge and extremely important experience to me. Most of the things were completely new: **in the personal side**, arriving at a foreign country, finding a place to live, getting home furniture and equipments, learning how to get around at the city, facing the low temperature and exercising communication in a foreign language, ...**in the professional side**, moving to a new and more specific area of knowledge, with the consequent theoretical and methodological universe to grasp, a modified research project, all this made the whole year a very challenging task. Your share of knowledge and experience with patience, kindness and caring were the tools that made it possible for me to grow and develop as a person and as a scientist. Thank you from the deep of my heart!

SPECIAL THANKS TO ...

Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, who permitted me to enjoy a wonderful experience when he accepted me at his laboratory, in attention to Dr. Carlos Alberto Souza Costa's indication. Dr. Nör established the conditions for me to be introduced to a very important area of knowledge and sophisticated program, to go through a complex learning process and to get new directions to my professional life. I thank you, Dr. Nör, for your attention and availability during the time I had the honor to work with your research group. The learning you made accessible was essential for my professional development and for the future of my academic career.

Kathleen, an intelligent, competent and kind person, who besides giving me all the professional support I needed to develop as a scientist, became a real friend, a very important person in my life! Your friendship, as well as your professional competence gave me support to learn, to find a direction, to move through the progressive steps of the process and finally, to reach my goals. Thank you, amore!

Zhang, a deep source of knowledge, experience and competence, shared with me with grace and caring! In his humble and quiet way, he became a solid support and a good friend. You know that you

were the person I turned to every time I got stuck in some step of the process, and methodological procedure. And you ALWAYS were there for me! Thank you, Zhang! You were an essential part in my development process!

Eoin, a steady fountain of friendship, support and caring. Your kindness was essential for me during last year in Ann Arbor. Thank you for your support, Irish!!!!

SUMÁRIO

Resumo	17
Abstract	20
INTRODUÇÃO	22
REVISÃO DA LITERATURA	26
PROPOSIÇÃO	95
MATERIAL E MÉTODO	96
RESULTADO	108
DISCUSSÃO	121
CONCLUSÃO	139
REFERÊNCIAS	139

Lista de abreviações e símbolos

DPSC	Células-tronco de polpa de dentes permanentes humanos
HDPF	Fibroblastos de polpa dentária humana
HDMEC	Células endoteliais microvasculares da derme humana
VEGF (VEGF A)	Fator de crescimento endotelial vascular
bFGF (FGF-2)	Fator de crescimento fibroblástico básico
PGF (PlGF)	Fator de crescimento de placenta
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
TGF	Fator de crescimento de transformação
EGF	Fator de crescimento epidérmico
VPF	Fator de permeabilidade vascular
HIF-1 (HIF-1 α / β)	Fator de transcrição induzido pela hipóxia 1
SDS	Sulfato dodecil-sódico
GAPDH	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase
DAB	Tetracloreto de diaminobenzidina
YC1	Inibidor de HIF-1 α
CM	Meio de condicionamento
NX	Normóxia
HX	Hipóxia
CM DPSC NX ou HX	Meio de condicionamento das DPSC em normóxia ou hipóxia
CM HDPF NX ou HX	Meio de condicionamento dos HDPF em normóxia ou hipóxia

hipóxia

EGM-2MV	Meio de cultura para as HDMEC
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – meio de cultura para as células HDPF e DPSC
FBS	Soro fetal bovino
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
TBS	Solução Salina Tamponada Tris
TBST	Solução Salina Tamponada Tris + 0.1% de Tween 20
ELISA	Teste de imunoensaio (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
WST-1	Teste colorimétrico de viabilidade celular
WB	Western blot
<i>Sprouts/Sprouting</i>	Estruturas semelhantes a tubos capilares / Formação de estruturas semelhantes a tubos capilares

Aranha AMF. Potencial angiogênico de células pulpaes humanas em hipóxia [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

Luxações dentárias resultam em injúrias ao feixe vâsculo-nervoso, o que pode causar redução significativa no nível de oxigênio das polpas dentárias, ou mesmo morte deste tecido conjuntivo especializado. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta das células pulpaes à hipóxia pode melhorar o prognóstico dos tratamentos das luxações dentárias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de células-tronco (DPSC) e de fibroblastos (HDPF) de polpas dentárias humanas em condições de hipóxia e a capacidade destas em estimular a proliferação e formação de tubos capilares por células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). As análises do western blot e imunocitoquímica foram realizadas para avaliar o efeito da hipóxia na ativação do fator de transcrição induzido pela hipóxia 1 (HIF-1 α). A expressão dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fibroblástico básico (bFGF) foi avaliada pelos testes de imunoensaio ELISA. O efeito do HIF-1 α na expressão do VEGF foi avaliado pelo tratamento das células DPSC e HDPF com 40 μ M YC-1, inibidor do HIF-1 α . Para a avaliação da angiogênese *in vitro*, os testes de

proliferação celular (WST-1) e de formação de tubos capilares em gel de colágeno foram realizados após tratamento das células HDMEC com os meios de acondicionamento das células DPSC ou HDPF, em condições de normóxia ou hipóxia.. A análise dos dados obtidos foi realizada por testes estatísticos não-paramétricos com nível de significância de 5%. Aumento da atividade do HIF-1alfa e da expressão de VEGF foram observados nas células DPSC e HDPF em condições de hipóxia. Entretanto, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de bFGF. A expressão do HIF-1alfa foi inibida por 40 μ M de YC-1, em ambas as linhagens celulares, reduzindo significativamente a secreção de VEGF pelas DPSCs em hipóxia. As células HDPF em hipóxia aumentaram em 50% a formação de tubos capilares quando comparadas às mesmas células em normóxia e em 30% quando comparadas às DPSC em hipóxia. O aumento da taxa de proliferação das células HDMEC foi tempo-dependente. Após 72 horas, os fibroblastos em hipóxia estimularam a proliferação das HDMECs em 30% quando comparados com as DPSCs em hipóxia. Os resultados indicaram que o HIF-1alfa é regulado pela hipóxia nas DPSCs e HDPFs e está envolvido na regulação da expressão de VEGF pelas células DPSC. Notavelmente, a hipóxia é suficiente para aumentar o potencial angiogênico das células pulpares humanas.

Palavras-chave: Neovascularização fisiológica; polpa dentária; anóxia; agentes moduladores da angiogênese

Aranha AMF. The angiogenic potential of human dental pulp cells in hypoxia [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

Dental luxations can result in the severing of the dental pulp and the creation of a hypoxic environment that might lead to the death of the pulp tissue. Improved understanding of the mechanisms underlying the response of dental pulp cells to hypoxic conditions might lead to better treatment of dental luxations. The purpose of this work was to evaluate the behavior of Dental Pulp Stem Cells (DPSC) and Human Dental Pulp Fibroblasts (HDPF) under hypoxia and their ability to stimulate proliferation and sprouting of endothelial cells. Western blots and immunohistochemistry were used to evaluate the effect of hypoxia on the activation of the transcriptional factor HIF-1 α . Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) expression was evaluated by ELISA. The effect of HIF-1 α on VEGF expression was evaluated by treating DPSC or HDPF with 40 μ M YC-1, an inhibitor of HIF-1 α . To evaluate the angiogenic potential of dental pulp cells *in vitro*, human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were treated with conditioned medium from DPSC or HDPF in normoxia or hypoxia. Sprouting and WST-1 assays were used to

evaluate capillaries tubes-like formation and cell proliferation rate, respectively. The statistic analysis was performed by non-parametric tests. HIF-1 α activity and VEGF expression were up-regulated in DPSC and HDPF under hypoxic conditions. However, no changes in the expression levels of bFGF were observed. YC-1 40 μ M was able to inhibit HIF-1 α in both cell lines and it also reduced VEGF expression in DPSCs in hypoxia. HDPF under hypoxia increased HDMEC sprouting by 50% when compared to HDPF in normoxia, and by 30% when compared to DPSC in hypoxia. Notably, HDPF under hypoxia stimulated HDMEC proliferation by 30% when compared to DPSC in hypoxia. It was concluded that HIF-1 α and VEGF are regulated by hypoxia in DPSCs and in HDPFs. HIF-1 α is involved in the regulation of VEGF expression in DPSCs under hypoxia. Notably, the hypoxia is sufficient to enhance the angiogenic potential of human dental pulp cells.

Key-words: Angiogenesis; dental pulp; anoxia; angiogenesis modulating agents.

INTRODUÇÃO

Os traumas dentários ocorrem com frequência em crianças e adolescentes em idade escolar e em fase de crescimento ^{3, 48}. Os dentes anteriores superiores e, em especial, os incisivos centrais são os mais afetados ⁵ tendo como causas mais frequentes as quedas, colisões, acidentes automobilísticos e atividades esportivas ^{16, 48, 49}.

Nos deslocamentos de dentes traumatizados, como nas luxações extrusivas parciais, luxações intrusivas e principalmente nas avulsões dentárias, redução severa do suprimento vascular sanguíneo pelo rompimento do feixe vâsculo-nervoso e ruptura do ligamento periodontal, são observados ^{2, 4, 5, 6, 16, 48}. Nos casos de avulsão dentária, o reimplante do elemento deslocado representa o tratamento de escolha, embora possam ocorrer complicações como dor, anquilose, necrose pulpar, obliteração dos canais radiculares, reabsorção radicular externa e perda óssea de sustentação ^{4, 5}. Alguns fatores são determinantes para a revascularização, processo indicador de sucesso no tratamento de dentes reimplantados, como o estágio de formação radicular, o período de tempo entre o trauma e o tratamento, a presença de contaminação e o meio de armazenamento da estrutura dentária ⁵. A revascularização do tecido

pulpar foi observada em 34% dos dentes reimplantados com ápice aberto

4.

A regulação da angiogênese, processo de neovascularização a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, pela hipóxia, é uma estratégia importante dos mecanismos de controle homeostático que ligam o suprimento vascular de oxigênio dos sistemas cárdio-pulmonar às necessidades locais metabólicas dos tecidos^{29, 38, 67}.

A regulação do fator de transcrição induzido pela hipóxia 1 (HIF-1) representa o mecanismo molecular mais bem definido e responsável pela manutenção da homeostasia de oxigênio em metazoários³⁸. O HIF-1, proteína heterodimérica composta por duas subunidades, uma subunidade sensível ao oxigênio (HIF-1alfa) e a outra constitutiva (HIF-1beta), é expresso por diferentes tipos celulares^{42, 89, 90}. A expressão da subunidade da proteína HIF-1alfa aumenta imediatamente em condições de hipóxia e após reoxigenação, a proteína é degradada^{1, 32, 72, 87, 88, 90}.

O fator transcricional HIF-1alfa apresenta papel crítico no processo da angiogênese pela ativação da transcrição de genes que codificam fatores de crescimento pró-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), angiopoetina 1 (ANG1) e 2 (ANG2), fator de crescimento da placenta (PGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFB)^{25, 32, 46, 50, 66, 84, 92}. Estes fatores de crescimento são secretados por células hipóxicas,

as quais estimulam a reorganização estrutural de células endoteliais, aquisição de fenótipo invasivo, proliferação e formação de tubos estruturas vasculares (*sprouts*)^{24, 76}.

O VEGF é considerado o principal fator de crescimento pró-angiogênico que regula processos fisiológicos e patológicos de angiogênese^{22, 47, 58}. A expressão de VEGF influencia a resposta angiogênica, sendo responsável pela estimulação da degradação da matriz extracelular ao redor das células endoteliais, promovendo a proliferação, migração e organização destas células em estruturas tubulares^{9, 37, 56, 60}.

Não menos importante, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) também está envolvido com a regulação da angiogênese *in vitro* e *in vivo*, induzindo proliferação e quimiotaxia de células endoteliais e produção de proteases^{66, 70}.

Como a regulação da expressão do HIF-1alfa depende do tipo celular⁴⁶ e existem poucas evidências da resposta das células pulpares à hipóxia e dos mecanismos moleculares envolvendo a resistência destas células às condições hipóxicas, estudos são necessários para explorar o comportamento das células pulpares em hipóxia na regulação da angiogênese *in vitro*.

A transição para a situação clínica dos eventos de sinalização envolvendo a regulação transcricional de fatores pró-angiogênicos pode futuramente representar forte impacto no tratamento das injúrias

traumáticas dentárias, especialmente das avulsões dentárias. Dentro deste contexto, desenvolveu-se a presente pesquisa, cujo objetivo principal foi avaliar o efeito da hipóxia no potencial angiogênico de células pulpaes humanas, examinando, pela primeira vez, respostas angiogênicas de células-tronco derivadas de tecidos pulpaes.

REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a leitura deste capítulo, a literatura científica revisada foi subdividida em tópicos de acordo com o assunto de interesse.

A. TRAUMA DENTÁRIO RELACIONADO À HIPÓXIA E À ANGIOGÊNESE

Stanley et al.⁷⁸ (1978) descreveram o fenômeno do infartamento isquêmico da polpa dentária pós-trauma. Para esta finalidade, cento e cinquenta dentes traumatizados (sub-luxados, luxados, avulsionados e reimplantados) tiveram seus tecidos pulparem extirpados e submetidos à análise histopatológica. Os autores demonstraram que alguns tipos de traumas dentários comprimiram os vasos sanguíneos no ápice radicular, tempo suficiente para romper o suprimento sanguíneo, induzindo a polpa a condição de anóxia. O grau de privação de sangue e oxigênio derivado dos episódios traumáticos determinou a rapidez com que os tecidos pulparem se converteram totalmente em uma massa homogênea vermelho-escarlate à pink, com alterações de suas características histológicas normais. Quando as artérias pulparem principais foram obstruídas, os vasos sanguíneos dos canais acessórios passaram a agir como arteríolas periféricas, permitindo a difusão de sangue. Em seguida, os capilares sofreram dilatação, congestão e

posterior degeneração, permitindo a difusão de eritrócitos através da polpa dentária. Com o tempo, os eritrócitos se rompem e liberam grânulos de hemoglobina na coloração vermelho-escarlate. Os autores sugeriram que a coloração pink dos dentes traumatizados indicou morte agressiva do tecido pulpar com acúmulo de células vermelhas sanguíneas em seu interior. Na ausência de macrófagos para conversão destas células em hemossiderina, a hemoglobina se rompeu em partículas vermelhas, determinando a coloração pink á vermelha do tecido.

Cipriano, Walton ¹⁴ (1986) examinaram a incidência e as características de infartamento isquêmico no tecido pulpar por meio de biópsias pulpares obtidas de 42 dentes traumatizados, assintomáticos, com ausência de história de patologia periapical, exposição pulpar ou sensibilidade pulpar negativa através da técnica da microscopia de luz. Apenas cinco polpas dentárias demonstraram infartamento isquêmico, que foram também avaliados com a microscopia eletrônica de transmissão. Quando comparados com polpas em condições normais, os tecidos pulpares considerados com infartamento mostraram-se marcadamente alterados. Algumas áreas indicaram inflamação, alteração nuclear, alteração de feixes nervosos e perda de colágeno. Os tecidos analisados em microscopia eletrônica mostraram evidências de necrose, padrão de degradação nuclear, avascularização relativa, degeneração de fibras nervosas e desorganização

de colágeno. De acordo com os resultados, pôde ser concluído que o fenômeno do infartamento isquêmico em polpas traumatizadas ocorre ocasionalmente, mas apresenta uma variedade de alterações estruturais indicando degeneração tecidual.

Andreasen et al.² (1995) investigaram a chance de revascularização de 94 dentes reimplantados com formação incompleta da raiz no momento da injúria. A revascularização do tecido pulpar determinada pela presença de sensibilidade pulpar positiva, ocorreu em 34% dos casos. A sensibilidade pulpar positiva e sinais radiográficos de obliteração do canal pulpar foram observados após 6 meses, enquanto que a necrose pulpar foi diagnosticada após 3 semanas dos reimplantes. O efeito de diversos fatores clínicos foi examinado, como gênero, idade, tipo de dente reimplantado, estágio de formação da raiz, tipo e período de tempo de armazenamento extra alveolar, contaminação clínica e procedimentos para limpeza da superfície radicular, além do tipo e período de tempo da contenção dentária e uso de antibióticos. O tamanho do forame apical e o comprimento radicular foram determinados radiograficamente no momento da injúria. Os dados obtidos revelaram que a revascularização pulpar foi mais freqüente em dentes com comprimentos radiculares mais curtos e em dentes armazenados em meio úmido (solução salina e/ou saliva) por mais de 5 minutos. O reimplante dentário imediato (menos de 5 minutos) mostrou

maior frequência de revascularização pulpar e embora não houve diferença estatística significativa, as contenções dentárias semi-rígidas apresentaram tendência em aumentar a frequência de cura do tecido quando comparadas as contenções rígidas.

Claus et al.¹⁵ (2004) observaram as alterações pulparem em dentes unirradiculares imaturos de cães, após remoção dos tecidos pulpar e transplantes dos dentes extraídos nos lugares de seus contra-laterais. Dezesesseis dentes de ápices abertos foram utilizados e nos dias 0, 9, 16 e 23, quatro dentes foram extraídos e auto-transplantados. Os dentes foram extraídos e submetidos à análise histológica após 7, 14, 21 e 30 dias. Os resultados mostraram que após 7 dias, houve crescimento de um novo tecido no interior do canal radicular na região apical em 50% dos dentes. No 14º dia, todos os dentes apresentaram formação de um novo tecido conjuntivo rico em células em ¼ das raízes. Vinte e um dias após o auto-transplante, 75% das camadas pulparem estavam preenchidas, enquanto que aos 30 dias, reparo completo foi observado em 50% dos dentes e os vasos sanguíneos foram diferenciados em artérias e veias. Desta forma, pôde-se concluir que em dentes imaturos transplantados, após remoção dos tecidos pulparem originais, há formação de um novo tecido conjuntivo organizado e vascularizado.

Ritter et al.⁶⁹ (2004) investigaram o efeito tópico de antibióticos na revascularização pulpar em dentes reimplantados como controle de infecção bacteriana. Para tal finalidade, 34 dentes imaturos, com ápices abertos, foram selecionados de três cães. Radiografias iniciais e leitura do fluxo sanguíneo pelo Laser Doppler (LDF) foram utilizados para a análise. Os dentes foram extraídos e divididos aleatoriamente em quatro grupos: G1 - tratados com minociclina, G2 - tratados com doxiciclina e G3 - tratados com solução salina (controle negativo). Após tratamento, os dentes foram imediatamente reimplantados. Dentes não extraídos foram utilizados como controle (G4). Radiografias pós-operatórias e leituras de fluxo e viabilidade dos tecidos pulpare (LDF) foram realizadas após dois meses do reimplante. A revascularização pulpar ocorreu em 91%, 73% e 33% para os grupos G1, G2 e G3, respectivamente. Através dos resultados, os autores concluíram que a minociclina em forma de microesferas apresentou eficiente ação de liberação lenta do antibiótico de amplo-espectro, permitindo que a revascularização tenha ocorrido em níveis mais altos que a solução de doxiciclina em dentes imaturos reimplantados.

Chappuis, von Arx¹² (2005) avaliaram 34 pacientes com 45 dentes permanentes avulsionados e reimplantados por meio de exames radiográficos, analisando alterações periodontais e pulpare por período de um ano. Todos os dentes avulsionados foram mantidos em meio de

armazenamento especial, contendo aminoácidos, vitaminas e glicose (Dentosafe, GmbH, Iserlohn, Germany) pelo menos por 30 minutos e então imersos em tetraciclina 5% antes do reimplante. Os dentes foram manualmente reimplantados e estabilizados por 7-10 dias. Após este período, apenas os dentes com ápice fechado e aqueles com ápice aberto ou que não foram estocados de forma adequada foram submetidos ao tratamento endodôntico. A tetraciclina foi administrada sistemicamente a todos os pacientes durante 10 dias. Foi observado que dos 95,6% dos dentes reimplantados e mantidos após 1 ano de acompanhamento, 82,2% foram submetidos ao tratamento endodôntico. Não houve revascularização pulpar, mas em 57,7% dos casos houve restabelecimento periodontal normal. Dos 42,3% dos dentes que sofreram reabsorção externa, 28,9% apresentaram reabsorção por substituição. Em apenas 6,7% dos dentes ocorreu reabsorção relacionada a infecção ou reabsorção de superfície.

Strobl et al.⁷⁹ (2005) determinaram se o tipo de luxação dentária seria responsável por alterações da medida do fluxo sanguíneo em dentes permanentes após trauma, reposicionamento e contenção. Em 41 pacientes, 69 incisivos centrais superiores foram analisados através de Laser Doppler para mensurar os valores do fluxo sanguíneo (unidade de perfusão-PU). As unidades de perfusão foram obtidas no dia da remoção da contenção e após 3, 6 e 12 meses. As luxações intrusivas foram associadas

com redução significativa dos valores do fluxo sanguíneo, enquanto que as subluxações, luxações laterais e extrusivas, bem como as avulsões não mostraram diferenças entre as sessões. Os valores do fluxo sanguíneo nas avulsões dentárias foram sempre menores que os valores das subluxações e luxações laterais. Os autores sugeriram que o tipo de luxação dentária interfere na resposta pulpar em dentes traumatizados, sendo a intrusão seguida da avulsão, as injúrias com piores prognósticos.

B. CÉLULAS-TRONCO PULPARES

Gronthos et al.³³ (2000) identificaram e isolaram uma população de células progenitoras odontogênicas de tecidos pulpare adultos de dentes permanentes humanos (DPSCs) e as compararam com células do estroma da medula óssea humana (BMSCs). Para tal finalidade, tecidos pulpare de terceiros molares foram separados das coroas e raízes e digeridos em solução de collagenase tipo I e dispase por uma hora a 37°C e suspensões de célula-única foram obtidas para avaliar a formação de colônias pelas células isoladas. As análises da imunocitoquímica, da atividade da fosfatase alcalina, RT-PCR e hibridização in situ foram realizadas para caracterização das células. As células DPSCs ou BMSCs foram misturadas com pó de hidroxiapatita/fosfato tricálcio e transplantadas no dorso de camundongos imunosuprimidos por 45 dias, quando os

transplantes foram removidos e preparados para análise histológica. Células DPSC isoladas apresentaram frequência de formação de colônias e de número de células proliferativas significativamente maior do que a cultura de células BMSC. Em geral, DPSCs e BMSCs apresentaram padrão de expressão semelhantes para uma variedade de marcadores associados com endotélio (CD146 e VCAM-1), musculatura lisa (α -SM actin), osso (fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteonectina, osteopontina e osteocalcina) e fibroblastos (colágeno tipo III e bFGF). Células DPSCs produziram nódulos densos, calcificados e esporádicos e não formaram adipócitos, enquanto que as BMSCs calcificaram através de camada de células aderentes com formação de agrupamentos de adipócitos. Quando DPSCs foram transplantadas em camundongos, houve formação de tecido semelhante à estrutura dentinária, lineada por células odontoblastóides que circundavam tecido semelhante à polpa dentária. Em contraste, BMSCs formaram osso lamelar contendo osteócitos e osteoblastos ao redor de tecido vascular fibroso com hematopoiese ativa e adipócitos. Os autores concluíram que o tecido pulpar pós-natal contém células clonogênicas altamente proliferativas e capazes de formar complexo semelhante ao dentino-pulpar.

Gronthos et al.³⁴ (2002) caracterizaram a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em multi-linhagens, bem como a eficiência

clonogênica de células-tronco de polpas dentárias humanas (DPSCs). Foi demonstrado que DPSCs são capazes de formar dentina ectópica e tecido pulpar associado in vivo. Células semelhantes às aquelas presentes no estroma de transplantes de DPSCs de três meses foram re-isoladas em culturas de transplantes primários de células DPSC e, re-transplantadas em camundongos imunodeprimidos para gerar tecido semelhante ao dentino-pulpar, demonstrando sua capacidade de auto-renovação. As células DPSCs também foram capazes de se diferenciar em adipócitos e células semelhantes às células neurais. Dois terços de colônias de célula-única foram capazes de formar dentina ectópica abundante in vivo, sugerindo que as colônias derivadas de DPSCs diferem entre si em relação a taxa de odontogênese. Estes resultados demonstraram que DPSCs possuem características de células-tronco, incluindo capacidade de auto-renovação, alta taxa de proliferação e diferenciação em multi-linhagens. Desta forma, os autores sugeriram que as DPSCs podem ser utilizadas como modelo de estudo para diferenciação de células-tronco adultas in vitro e regeneração tecidual in vivo.

Pierdomenico et al.⁶⁴ (2005) investigaram o fenótipo de células-tronco derivadas de polpa de dentes permanente humanos (DP-MSCs) e o compararam com as células-tronco derivadas da medula óssea (BM-MSCs). A análise da citometria de fluxo mostrou que as DP-MSCs e

BM-MSCs foram positivas para SH2, SH3, SH4, CD29 e CD166. A proliferação in vitro de ambas as linhagens celulares foi avaliada pela incorporação do corante 3H-timidina. A função de imunossupressão das células-tronco mesenquimais foi testada através da co-cultura das mesmas com ou sem linfócitos humanos por 3 dias. As células BM-MSC in vitro se diferenciaram em osteócitos, condrócitos e adipócitos, enquanto que as células DP-MSCs mostraram diferenciação adipogênica menos evidente e ausência de diferenciação condrogênica. Foi demonstrado que as DP-MSCs apresentam crescimento rápido in vitro entre os dias 3 e 8 de cultura, o qual diminui no 15^o dia. Por outro lado, BM-MSCs proliferam de forma estável e contínua pelo mesmo período de tempo. A co-cultura da DP-MSCs ou das BM-MSCs resultou em inibição de 91% e 75% das células T, respectivamente. Os autores concluíram que o tecido pulpar é uma fonte eficiente de células-tronco mesenquimais com mecanismos e capacidade de diferenciação distintos das células isoladas da medula óssea. A capacidade de proliferação rápida e as características imunorregulatórias das DP-MSCs indica o uso destas células para tratamento e prevenção de transplantes de órgãos alogênicos.

Yamada et al.⁹¹ (2006) investigaram os padrões de expressão gênica e as classificações funcionais de duas populações de células precursoras: células-tronco de polpa dentária humana (hDPSC) e células-tronco

mesenquimais humanas (hMSC) por meio da análise *microarray* de cDNA. A expressão dos genes da fosfatase alcalina (ALP), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1) e da sialoproteína dentinária (DSPP) foram analisadas pela Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa em Tempo Real (qRT-PCR). As análises do padrão de expressão gênica indicaram vários genes que codificam componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, XIII, XVIII, sialoproteína óssea, metaloproteinase da matriz, trombospondina), moléculas de adesão celular (integrinas α 2, 4, 7, 11, β 2), fatores de crescimento (IGF-1 e II, Interleucina 8 e 11, TNF- α , BMP-2 e 4) e reguladores transcripcionais (Msx1, Jun-B). Análises de formação de agrupamentos celulares (*clusters*) e análises funcionais da diferença no nível de expressão gênica das células-tronco examinadas, revelaram expressão de genes de sinalização, comunicação ou de metabolismo celular. De acordo com os resultados, os autores acreditam que ambas as linhagens de células-tronco podem ser utilizadas no futuro como recursos celulares multipotentes para a tecnologia genética e de engenharia de tecido

C. HIPÓXIA

Respostas celulares à hipóxia

Baumgardner et al.⁸ (1996) examinaram se a substância tritiato misonidazole (^3H -MISO) poderia diferenciar tecidos pulpare e

periapicais em condições de normóxia e hipóxia. As substâncias, ^3H -MISO (tritiato misonidazole), MISO (misonidazole) não marcado, ou solução salina, foram injetadas intra-peritonealmente em ratos e então divididos nos grupos normóxia e hipóxia. Os animais em condições de hipóxia foram mantidos em câmaras hipobáricas a 0.5 atm por 24 horas. A retenção de ^3H -MISO foi avaliada pela análise quantitativa de autoradiografias dos tecidos. Dentes com osso perirradicular foram removidos, fixados e submetidos ao processamento histológico. A taxa de retenção do ^3H -MISO em células dos animais em normóxia mostrou pequena variação com exceção da alta retenção em ameloblastos maduros e odontoblastos imaturos em incisivos em erupção. Nos tecidos pulpaes de ambos os grupos dentários (incisivos e molares), a manutenção dos animais na câmara hipobárica aumentou a retenção de ^3H -MISO quando comparada com os animais em normóxia e do grupo controle. Intensa retenção de ^3H -MISO de células hipóxicas foi observada no cemento, ligamento periodontal, osteócitos e ocasionalmente nos odontoblastos dos cornos pulpaes de molares. Os resultados demonstraram que com técnicas padrão de autoradiografia, o ^3H -MISO pode marcar condições induzidas de hipóxia, com alteração do fluxo sanguíneo na polpa dentária e no periodonto circundante.

Hochachka et al.³⁹ (1996) propuseram uma teoria para a tolerância de alguns tipos celulares à hipóxia, na qual a resposta celular à redução dos níveis de oxigênio ocorreria em duas fases, defesa e resgate. Na primeira fase, uma série de processos moleculares de defesa como o declínio quase total da síntese protéica e a redução da permeabilidade da membrana citoplasmática economizariam grande parte da energia necessária para o metabolismo celular em condições normais, permitindo a sobrevivência das células durante um período prolongado de hipóxia ou anóxia diante dos níveis extremamente baixos do turnover de ATP. Se o período de falta de oxigênio fosse prolongado, o sistema de tolerância à hipóxia ativaria mecanismos de “resgate”, regulando a expressão de diversas proteínas. Nesta segunda fase, mecanismos de sinalização com ativação de fatores chaves de transcrição, como o fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), seriam ativados e os mecanismos da demanda e suprimento de energia para o metabolismo celular seriam suprimidos durante o período hipóxico, transformando as taxas do turnover de ATP durante a normóxia, em um novo e estável estado hipometabólico.

A reparação tecidual envolve a deposição de matriz de colágeno, angiogênese e crescimento de novo tecido. As atividades celulares durante o reparo estão relacionadas com os níveis de oxigênio do tecido. Diante destes dados científicos, Tompach et al.⁸² (1997)

investigaram os efeitos do oxigênio hiperbárico (HBO) em células envolvidas na reparação. Culturas de células endoteliais de aorta bovina e fibroblastos de pele humana foram expostas ao HBO, variando-se a pressão parcial, saturação de oxigênio, duração e frequência da exposição. A proliferação celular foi determinada pela incorporação de timidina marcada por ^3H . Um aumento da pressão parcial de oxigênio no meio de cultura das células cultivadas foi observado quando expostas ao oxigênio hiperbárico, resultando em aumento da proliferação celular. A proliferação das células endoteliais aumentou após 15 minutos de exposição ao HBO, enquanto que 120 minutos de exposição foram necessários para a proliferação dos fibroblastos, que persistiu por 72 horas. O aumento na pressão de 2,4 para 4 atmosferas não potencializou a resposta proliferativa de ambas as linhagens celulares, reduziu significativamente a incorporação da timidina. Os autores sugeriram que bons resultados podem ser obtidos nos processos de reparação tecidual, incluindo a angiogênese, através do aumento dos níveis de oxigênio tecidual, utilizando tratamentos celulares e teciduais com oxigênio hiperbárico.

Giaccia et al.²⁹ (2004) resumiram o atual conhecimento discutido no Encontro de Keystone sobre a biologia da hipóxia. Foi observado que as respostas induzidas pela hipóxia são fortemente

reguladas no desenvolvimento embrionário normal e podem ser desreguladas em diferentes estados das doenças. A identificação das proteínas reguladas pelo oxigênio como os fatores transcricionais da família HIF (fator induzido pela hipóxia) representa um paradigma para a percepção do oxigênio a nível molecular. Todavia, considera-se que esta família seja um dos exemplos envolvidos na regulação da expressão proteica em resposta a hipóxia. Uma variedade de organelas intracelulares também pode estar relacionada com a percepção do oxigênio como, por exemplo, os canais iônicos, mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. O uso de organismos-modelo, incluindo camundongos transgênicos e *knockout* tem sido fundamentais em associar eventos moleculares na percepção do oxigênio com respostas de desenvolvimento, contribuindo para melhor visualização dos aspectos inerentes à percepção do oxigênio mantidos durante evolução. Finalmente, os pesquisadores concluíram que o conhecimento de como as células percebem e respondem a hipóxia é fundamental para entender o papel da hipóxia em doenças, bem como para aprimorar os diagnósticos e tratamentos.

Swiderek et al.⁸¹ (2008) examinaram as alterações celulares e moleculares de uma linhagem de células de mamíferos (NSO) produtoras de anticorpo quimérico de camundongos e humanos, em

condições de hipóxia (< de 1% de O₂). Vários parâmetros celulares, tais como a viabilidade (Análise do Triplan Blue), produtividade (concentração de expressão de anticorpos - teste ELISA e análise de *microarray*), metabolismo (concentração de lactato e glicose), apoptose (Kit) e ciclo celular (citometria de fluxo) foram estudados. Após 12 horas de incubação, houve supressão do crescimento celular e perda significativa da viabilidade celular em detrimento ao baixo teor de oxigênio. Quando as células foram expostas a 48 horas de hipóxia, morte celular foi observada. O mecanismo de produção de anticorpos foi completamente interrompido nas células em hipóxia. A análise de *microarray* revelou que a sobrevivência inicial das células NSO em hipóxia durante as primeiras 12 horas de incubação foi mantida pela supressão de processos consumidores de energia, tal como a síntese de RNA e DNA, e pela estimulação de mecanismos de aquisição de mais energia e de transporte de oxigênio, como o aumento da glicólise e do metabolismo de carboidratos, levando a caminhos alternativos para a produção de ATP e maior disponibilidade de oxigênio. Estes resultados sugeriram que mudanças nos mecanismos e genes foram responsáveis pela aceleração da morte celular em condições de hipóxia.

HIF-1alfa

Semenza, Wang ⁷² (1992) identificaram um fator intensificador (*enhancer*) de 50 nucleotídeos (nt) de um gene humano da eritropoietina (EPO - sequência 3'GCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTC

GACCTACCGGCC) capaz de mediar a indução transcricional em resposta a hipóxia (1% de O₂), em células de hepatoblastoma humano (Hep3B). Os estudos de mutagênese realizados revelaram duas regiões do fator intensificador induzidas pela hipóxia (50 nt), nucleotídeos 4 a 12 (site 1) e 19 a 23 (site 2), que foram essenciais para a indução da expressão gênica induzida pela hipóxia. O *footprint* da DNase I demonstrou a ligação com o fator nuclear constitutivo dos nucleotídeos 26 a 48 (site 3). A atividade de ligação ao DNA do fator intensificador, quando as células estavam em condições hipóxicas, foi inibida pela presença de ciclohexamidina, o que não aconteceu na região constitutiva do mesmo. Estes resultados indicaram que um fator nuclear, denominado de fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), liga-se às sequências necessárias (site 1) para a ativação transcricional do gene EPO em resposta a hipóxia e, a ligação do HIF-1 depende da síntese proteica. Os autores concluíram de acordo com os resultados obtidos, que um fator intensificador induzido pela hipóxia de 50 nucleotídeos, tripartido funcionalmente (sites 1, 2 e 3),

se liga a diversos fatores nucleares, sendo um deles induzido pela hipóxia via síntese proteica.

Wang, Semenza ⁸⁷ (1993) caracterizaram o HIF-1 e a regulação de sua atividade de ligação ao DNA pela hipóxia. A indução do HIF-1 e do RNA da eritropoietina (EPO) foi inibida pelo inibidor da proteína kinase, 2-amonipurina e pela actinomicina D. A ligação do fator transcricional ao DNA foi eliminada pelo tratamento dos extratos nucleares com fosfatase. Os autores demonstraram que o mecanismo de indução do HIF-1 pela hipóxia foi paralelo ao mecanismo de indução transcricional do gene da eritropoietina. A atividade de ligação ao DNA do HIF-1 diminuiu rapidamente quando as células Hep3B foram expostas ao aumento da tensão de oxigênio. A ligação in vitro do HIF-1 ao DNA alcançou condições de equilíbrio em menos de 5 minutos, como era esperado de um regulador transcripcional fisiológico. Entretanto, a meia-vida do complexo DNA-proteína foi menor que 1 minuto. Por meio dos resultados, os autores sugeriram que o fator trascricional HIF-1 é um regulador fisiológico da expressão gênica que responde a alterações na tensão do oxigênio celular.

Com o objetivo de determinar se o HIF-1 apresenta papel na ativação hipóxica da transcrição gênica, Wang, Semenza⁸⁸ (1993) analisaram diferentes linhagens celulares de mamíferos, nas quais o gene da eritropoietina (EPO) não foi expresso. A atividade do HIF-1 esteve presente nos extratos nucleares de células em hipóxia, mas não em normóxia, em todas as linhagens. Os autores demonstraram que a atividade de ligação ao DNA pelo HIF-1 foi induzida pela hipóxia em todas as linhagens celulares testadas, nas quais o gene EPO não era transcrito (fibroblastos de camundongo Ltk⁻, células CHO, fibroblastos Rat1, células 293 embrionárias de fígado humano, células de carcinoma da cervical humana HeLa e mioblastos de camundongo C₂C₁₂). A composição do complexo de ligação ao DNA pelo HIF-1, a subunidade de ligação ao DNA isolada e o mecanismo de ativação do HIF-1 foram semelhantes ou idênticos nas células produtoras ou não do gene EPO. A transcrição de genes contendo o fator intensificador do gene EPO foi induzida pela hipóxia em células não produtoras do gene EPO, sendo que mutações que eliminaram a ligação do HIF-1, inibiram sua capacidade de indução. Estes resultados forneceram evidências de que em diferentes tipos celulares, a hipóxia induz a atividade de ligação do HIF-1 ao DNA com a mesma mobilidade e especificidade de seqüência que a atividade de ligação ao DNA do HIF-1, caracterizada previamente nas células

Hep3B. Portanto, HIF-1 e sua sequência de reconhecimento são elementos comuns de respostas celulares gerais de mamíferos à hipóxia.

Wang, Semenza ⁸⁹ (1995) investigaram as propriedades bioquímicas do HIF-1 e seu papel no mecanismo de transdução dos sinais durante hipóxia. Para tal finalidade, os genes codificadores das subunidades do HIF-1 foram clonados e as células humanas de hepatoma (Hep3B) e de carcinoma cervical (HeLa) foram tratadas com cloreto de cobalto ou submetidas à hipóxia. HIF-1 foi purificado pelo teste de troca iônica DEAE e pela cromatografia de afinidade ao DNA. Análises do HIF-1 isolado revelaram a presença de quatro poli-peptídeos, sendo que os poli-peptídeos de 91-, 93- e 94-KDa apresentaram perfis semelhantes, sugerindo que eles representavam seqüências correlacionadas, enquanto que o polipeptídeo de 120-KDa apresentou perfil diferente. As análises cross-linking UV do HIF-1 purificado indicaram que ambas as subunidades do HIF-1 interagiram diretamente com o DNA. Os autores concluíram que durante o tratamento das células HeLa com cloreto de cobalto e das células Hep3B em hipóxia, o HIF-1 foi expresso e composto por duas diferentes subunidades: HIF-1 alpha de 120-KDa e HIF-1beta de 91-94-KDa.

Wang et al.⁹⁰ (1995) mostraram que ambas as subunidades do HIF-1 são proteínas básicas hélice-loop-hélice (bHLH), contendo domínio PAS (Per-ARNT-AHR-Sim), bHLH-PAS, consistindo de uma subunidade HIF-1alfa com 120kDa associada com uma subunidade HIF-1beta (ARNT- aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) com 91-94 KDa. HIF-1alfa esteve mais relacionado com a proteína *Sim*, enquanto que o HIF-1 beta foi definido como uma série de produtos do gene ARNT que poderia heterodimerizar com o HIF-1alfa ou com a proteína AHR. As moléculas de RNA e os níveis de proteína do HIF-1alfa e do HIF-1beta (ARNT) foram induzidos em células expostas a 1% de O₂, o que foi consistente com o papel do HIF-1 como mediador das respostas transcricionais a hipóxia. Os resultados forneceram evidências de que a atividade de ligação do HIF ao DNA celular é regulada pelos mecanismos transcricionais e pós-transcricionais.

Jiang et al.⁴² (1996) identificaram fatores estruturais da subunidade HIF-1alfa essenciais para a heterodimerização, ligação ao DNA e transativação. As subunidades HIF-1alfa e HIF-1beta (ARNT) ao serem co-imunoprecipitadas de extratos nucleares das células humanas do fígado (Hep3B) em condições de hipóxia (1% de O₂) ou normóxia (20% de O₂), demonstraram heterodimerização na ausência de ligação ao DNA. A translação in vitro do HIF-1alfa e HIF-1beta gerou um complexo HIF-

1/DNA com mobilidade eletroforética e especificidade de sequência semelhantes ao HIF-1 presente nos extratos nucleares das células hipóxicas. A deleção do domínio básico do HIF-1alfa eliminou a união ao DNA sem afetar a heterodimerização das proteínas (HIF-1alfa e HIF-1beta). Em contraposição, com a deleção do terminal carboxil do HIF-1alfa, houve redução significativa da habilidade do HIF-1alfa recombinante (rh- HIF-1alfa) de ativar a transcrição. Nos testes de co-transfecção, a expressão induzida de HIF-1alfa e HIF-1beta recombinantes, ativou a transcrição de genes contendo sequência do fator intensificador EPO (gene da eritropoietina), com presença de sítios de ligação do HIF-1 intactos. A acentuada expressão de HIF-1alfa com deleções nos domínio básico e carboxil bloqueou a ativação gênica pelo HIF-1alfa endógeno em células hipóxicas. Através dos resultados, pode-se sugerir que a transativação de células submetidas a 1% de O₂ foi mediada primariamente pelo domínio carboxil da estrutura do HIF-1alfa, enquanto que outro domínio, como o de transativação do ARNT, apresenta papel importante para células em normóxia (20% de O₂).

Jiang et al.⁴¹ (1996) demonstraram que os níveis de atividade de ligação do HIF-1 ao DNA, das proteínas HIF-1 α e HIF-1 β são inversamente proporcionais à concentração do oxigênio celular, ou seja, aumentaram exponencialmente quando células de carcinoma

cervical humano (HeLa S3) foram submetidas a concentrações decrescentes de O₂ (20% a 0), com resposta média entre 1.5% e 2% de O₂ e resposta máxima a 0,5% de O₂, na presença ou ausência de 1mM KCN (cianeto de potássio). O KCN foi utilizado para bloquear a fosforilação oxidativa, mantendo semelhantes as concentrações de O₂ intracelular e extracelular, inibindo qualquer gradiente de O₂ intracelular para analisar a expressão do HIF-1. Estes resultados mostraram evidências do envolvimento do HIF-1 na homeostasia de O₂ e sugeriram que o sensor de O₂ inicia a transdução do sinal de hipóxia, levando a expressão do HIF-1.

Forsythe et al.²⁵ (1996) demonstraram o envolvimento da proteína heterodimérica que ativa a transcrição do gene humano da eritropoietina (EPO), fator induzido pela hipóxia (HIF-1), em células hipóxicas, com a ativação da transcrição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Pela primeira vez, foi demonstrado, através do isolamento do cDNA codificador das duas subunidades do HIF-1, que o HIF-1 interage com a sequência 5'- do VEGF para mediar a ativação transcricional em células hipóxicas. Este resultado foi determinado pela expressão induzida do HIF-1 α e HIF-1 β (rHIF-1), os quais aumentaram a expressão do VEGF em células expostas a 1% ou 20% de O₂ de forma dose – dependente. O mRNA do VEGF não foi induzido pela hipóxia em

células que não expressaram a subunidade HIF-1 β , sugerindo a importância do HIF-1 na ativação da transcrição do VEGF em células hipóxicas.

Chun et al.¹³ (2001) testaram a possibilidade do YC1 ([3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole]) inibir as respostas induzidas pela hipóxia, como o óxido nítrico (NO). Células de hepatoma (Hep3B) em normóxia (20% O₂) ou em hipóxia (1% O₂) foram utilizadas para observar a indução do gene da eritropoietina (EPO) e do VEGF. Os efeitos do YC1 foram comparados com aqueles do óxido nítrico. Nas células submetidas à hipóxia, YC1 bloqueou a indução dos mRNAs de EPO e do VEGF, além de inibir a atividade de ligação do fator de transcrição HIF-1 ao DNA. O acúmulo, em nível protéico, do HIF-1 α em condições de hipóxia foi suprimido, mas os níveis do mRNA não foram alterados, sugerindo que o YC1 atua bloqueando o HIF-1 α na etapa pós-translacional. O YC1 também inibiu o acúmulo de HIF-1 α induzido pelo cobalto e pela desferrioxamina (DFX), o qual não foi recuperado pelo tratamento das células com antioxidantes. Os resultados indicaram que os efeitos inibitórios do YC1 podem estar associados com o mecanismo das células em perceber as alterações de oxigênio relacionado a metais e não pelo mecanismo de redução celular.

Kelly et al.⁴⁶ (2003) demonstraram que a exposição de culturas primárias de células cardíacas e vasculares à hipóxia ou ao adenovírus, codificando constitutivamente de forma ativa o HIF-1 α (AdCA5), regulou coordenadamente a expressão de genes codificadores de diversos fatores de crescimento angiogênicos críticos, fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) semelhantes aos da placenta (PLGF) e derivados das plaquetas (PDGFB) e angiopoietinas 1 (ANGPT1) e 2 (ANGPT2), de maneira específica para cada tipo celular. Dependendo do tipo celular, a expressão das angiopoietinas ANGPT1 e ANGPT2 foram ativadas ou reprimidas em resposta à hipóxia e ao AdCA5. Em todos os casos, houve concordância entre os resultados dos efeitos da hipóxia e do AdCA5. Para determinar se o aumento da atividade do HIF-1 α seria suficiente para induzir angiogênese em tecidos não-isquêmicos in vivo, os autores analisaram o efeito da injeção sub-retinária do AdCA5 na vascularização da retina de camundongos por meio da imunohistoquímica. Os resultados indicaram que o vetor adenoviral AdCA5 foi responsável por diferentes tipos de neovascularização intraocular na ausência de hipóxia/isquemia. Adicionalmente, concentrações elevadas de um único isoforme do VEGF não foi suficiente para formação e proliferação de novos vasos. Os autores ainda sugeriram um papel proeminente na neovascularização do PLGF induzido pelo AdCA5. A análise da expressão gênica revelou

aumento na expressão do mRNA das ANGPT1 e ANGPT2, do PDGFB, do PLGF e do VEGF em AdCA5 injetado nos olhos dos camundongos.

Yamakawa et al.⁹² (2003) investigaram os eventos moleculares envolvidos na regulação da resposta angiogênica pelo fator transcricional HIF-1alfa durante hipóxia. Para isto, células endoteliais primárias humanas (HPAEC) foram submetidas à hipóxia (1% O₂), tratadas com desferroxamina (DFX) ou infectadas com Ad2/HIF-1 α /VP16, vetor adenoviral codificador de forma híbrida e estável constitutiva do HIF-1 α . A apoptose, a proliferação, a permeabilidade e a formação de tubos capilares *in vitro* pelas células HPAEC foram avaliadas após os diferentes tratamentos. Também foram analisadas a expressão gênica do VEGF e de seus receptores (VEGFR1 e VEGFR2), angiopoietinas (Ang-1, Ang-2 e Ang-4), Tie -2, PLGF e PDGF. Nível baixo de expressão dos fatores angiogênicos foi observado nas células endoteliais em normóxia. Em contraposição, a hipóxia, DFX e a infecção com Ad2/HIF-1 α /VP16 estimularam a expressão de mRNA e dos níveis de proteína do VEGF, VEGFR1, P1GF, PDGF e Ang-4. Hipóxia e DFX também aumentaram os níveis de Ang-2. O tratamento das HPAEC com a proteína recombinante Ang-4 foi capaz de proteger as células endoteliais contra a apoptose induzida pela ausência de soro fetal bovino no meio de cultura, além de aumentar a migração e a formação de

capilares pelas células. O vetor adenoviral, assim como a hipóxia, também aumentaram a migração e a formação de capilares pelas HPAEC, a qual foi significativamente reduzida quando um inibidor dos receptores tirosina-kinase das angiopoietinas (Tie-2), foi utilizado. Através dos resultados, pode-se sugerir que o HIF-1 α media a resposta angiogênica à hipóxia pela regulação de múltiplos fatores angiogênicos, especialmente do VEGF e do sistema da angiopoietinas. Há evidências de que a ativação do sistema angiopoietina/Tie-2 contribui no papel do HIF-1 α em condições hipóxicas.

O HIF-1 α ativa a transcrição de genes codificadores de fatores de crescimento pró-angiogênicos, os quais são secretados por células hipóxicas e estimulam o processo de angiogênese por células endoteliais. Para determinar se o HIF-1 α mediará também resposta celular autônoma à hipóxia, Manalo et al.⁵⁰ (2005) compararam o perfil de expressão gênica em células endoteliais cultivadas em normóxia ou hipóxia e, em células em normóxia infectadas com adenovírus codificando forma constitutivamente ativa do HIF-1 α (AdCA5) ou da beta-galactosidase (AdLacZ-grupo controle). A análise da expressão gênica induzida pela hipóxia e pelo AdCA5 revelou diversas categorias de produtos gênicos como óxido-redutases, colágenos, enzimas modificadoras, citocinas, fatores de crescimento, receptores, proteínas

sinalizadoras e fatores de transcrição. A expressão dos diferentes genes foi aumentada ou reduzida. Grande parte da categoria dos genes com expressão reduzida pela hipóxia ou AdCA5 codificou proteínas envolvidas com o crescimento e proliferação celular. Por outro lado, os genes com expressão aumentada codificaram fatores de crescimento, citocinas, receptores e outras proteínas sinalizadoras. Os fatores de transcrição do maior grupo de genes regulados pelo HIF-1 α , indicaram que este fator de transcrição controla uma rede de respostas transcricionais à hipóxia em células endoteliais. A infecção das células endoteliais com o AdCA5 foi suficiente para induzir aumento da invasão da membrana basal e formação de estruturas tubulares semelhantes às respostas induzidas pela hipóxia, sugerindo que o HIF-1 α regula ativação autônoma de células endoteliais.

Greijer et al.³² (2005) avaliaram genes induzidos pela hipóxia e dentre estes, os genes mediados pelo HIF-1 por meio de análises de expressão do *microarray* cDNA. Os genes regulados pela hipóxia foram identificados comparando-se fibroblastos *wild-type* de camundongos em normóxia e hipóxia (1% de O₂) e diferenças entre duas linhagens de fibroblastos (*wild-type* e HIF-1 α -/-) foram analisadas para estudar a importância do HIF-1 na regulação gênica em condições hipóxicas. Em geral, a hipóxia causou redução da expressão gênica em ambas as linhagens.

O fator transcricional HIF-1alfa foi responsável pela regulação de 89% dos genes que tiveram sua expressão aumentada e apenas 17% dos genes com expressão reduzida. Todas as enzimas glicolíticas sofreram forte aumento na expressão durante hipóxia de forma dependente do HIF-1. Adicionalmente, vários genes novos regulados pelo HIF-1 foram identificados, incluindo os genes envolvidos no metabolismo celular (adenilato kinase 4, galactokinase), na apoptose (galectina 3 e gelsolina) e na invasão celular (RhoA). Os genes de expressão reduzida pela hipóxia foram aqueles envolvidos com a manutenção do citoesqueleto (Rho Kinase), o processamento do mRNA (ribonucleoproteína nuclear heterogênea H1 e fator de *splicing*) e com o reparo do DNA (REV 3). De acordo com os dados científicos obtidos, os autores sugeriram que o HIF-1 parece ter importância no aumento da expressão gênica necessária para suportar o stress causado pela hipóxia e subsequentemente, para a sobrevivência celular.

Dai et al.¹⁷ (2007) examinaram a secreção e a regulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelo fator de transcrição HIF-1alfa em infartamento miocárdico por células-tronco da medula óssea (BMSCs). As BMSC foram obtidas de camundongos transgênicos sobre-expressando proteína verde fluorescente (GFP) e co-cultivadas com cardiomiócitos em condições de hipóxia (1% de O₂) ou anóxia. As análises da liberação de desidrogenase láctica (LDH), do teste de viabilidade celular

do MTT (metiltetrazolium), da fragmentação do DNA e da marcação da apoptose por anexina V foram utilizadas para identificação de dano celular. Os níveis de expressão do HIF-1 α e do VEGF pelo teste ELISA também foram examinados. A expressão de HIF-1 α e do VEGF nas BMSCs foi analisada por meio do PCR quantitativo e imunohistoquímica para localização celular. Após 24 horas de hipóxia, houve aumento da liberação de LDH e redução da viabilidade celular, o que foi prevenido pela co-cultura dos cardiomiócitos com as BMSCs. A secreção do VEGF pelas células-tronco foi significativamente aumentada juntamente com a expressão do HIF-1 α após hipóxia e anóxia de forma tempo-dependente. Embora não tenha ocorrido aumento dos níveis de mRNA do HIF-1 α , sua concentração proteica foi marcadamente aumentada, juntamente com a translocação nuclear. Ao utilizarem inibidor de HIF-1 α , a proteção dos cardiomiócitos pelas BMSCs e a expressão do VEGF foram inibidas. Por estes resultados, os autores demonstraram que as células-tronco de medula óssea foram capazes de proteger os cardiomiócitos pelo aumento da expressão do VEGF regulada pelo HIF-1 α .

Com o objetivo de identificar as moléculas e os mecanismos envolvidos com a troca do fenótipo angiogênico durante a progressão tumoral, Fang et al.²¹ (2008) desenvolveram um modelo de condrosarcoma in vivo. O papel do VEGF e do bFGF e do fator transcricional HIF-1 α foi

examinado nas fases de crescimento avascular e vascular do tumor. Os autores observaram aumento significativo dos níveis de expressão proteica do VEGF em nódulos avasculares do tumor quando comparado aos nódulos vasculares. Quando os nódulos avasculares se vascularizaram, houve redução da expressão do VEGF. Contrariamente, a concentração de bFGF não foi aumentada nos nódulos avasculares, mas foi duas vezes maior nos nódulos vasculares. Como a expressão do VEGF foi regulada transcripcionalmente pelo HIF-1alfa, análises da imunohistoquímica dos nódulos do condrosarcoma revelaram que a translocação nuclear do HIF-1alfa foi detectada exclusivamente em nódulos do tumor avascular. Estes resultados indicaram que o aumento da expressão do VEGF foi mediada pelo fator de transcrição HIF-1alfa, o que não ocorreu para o bFGF na troca do fenótipo angiogênico durante o desenvolvimento tumoral.

Células pulpares reguladas pela hipóxia

Amemiya et al.¹ (2003) investigaram a resposta de células pulpares durante a hipóxia e a reoxigenação. Tecidos pulpares obtidos de trinta e dois pré-molares de cães foram cultivados em meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. No grupo controle, as células foram incubadas em atmosfera umidificada em condições normais de oxigênio (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂ a 37°C), durante 1-4 dias. Para o grupo da hipóxia, as células pulpares foram

mantidas pelo mesmo período em incubadora umidificada com 2% O₂ a 37°C. No grupo da reoxigenação, as células foram primeiramente mantidas sobre condições de hipóxia durante 24 horas e em seguida, foram transferidas para condições de normóxia por mais 1-3 dias. A viabilidade celular (Tryplan Blue), a taxa de metabolismo celular (Teste do MTT), a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina foram avaliadas. A expressão de HSP-70 (proteína de choque térmico) e do VEGF foi examinada através da análise do Western blot. Para a avaliação da expressão do HIF-1 α pelas células pulpareas foi utilizado a análise do RT-PCR. A taxa de crescimento celular e a atividade da fosfatase alcalina no grupo das células submetidas a hipóxia foram significativamente mais altas do que as do grupo controle. Entretanto, após reoxigenação, a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina reduziram ao nível das células do grupo controle, enquanto que houve um aumento da expressão das HSP-70. A expressão do mRNA do HIF-1 α pelas células pulpareas foi observada e a expressão do VEGF regulada pelo HIF-1 α aumentou sob as condições de hipóxia. Os resultados indicaram que as células pulpareas apresentam resposta dinâmica sob condições de hipóxia e de reoxigenação.

D. FATORES PRO-ANGIOGÊNICOS

Tran-Huang et al.⁸⁴ (2008) quantificaram a secreção de fatores de crescimento angiogênicos por células pulpares mecanicamente danificadas. As células pulpares obtidas de terceiros molares humanos foram submetidas ao trauma mecânico realizado com espátula, rompendo a monocamada celular. O meio de acondicionamento obtido após contato por 5 horas, 1, 2 ou 3 dias com as células danificadas ou intactas, foi utilizado para quantificação dos fatores de crescimento pelos testes ELISA. As células pulpares quando traumatizadas aumentaram significativamente o nível de expressão do PDGF-AB, do VEGF e do bFGF, em 150,59%, 20,6% e 23,35%, respectivamente. A concentração destes fatores angiogênicos aumentou apenas nas primeiras 5 horas após injúria e então, retornou aos valores iniciais após 24 horas. Os resultados indicaram que as células pulpares secretam fatores de crescimento que apresentam papel fundamental na angiogênese. O fator PDGF-AB parece ser o principal responsável pela reparação do complexo dentino-pulpar por ter sido mais secretado por células mecanicamente danificadas.

VEGF

Senger et al.⁷³ (1986) examinaram a secreção do fator de permeabilidade vascular (VPF), proteína isolada em células tumorais de roedores com peso molecular entre 34-42 KDa, por sete linhagens de células

tumorais humanas. O teste de permeabilidade de Miles foi utilizado para mensurar, quantitativamente, o aumento da permeabilidade vascular em cobaias em resposta a injeção intra-dérmica das células tumorais em cultura ou, das células associadas a imunoglobulina de coelhos (controle), ou das células associadas a IgG de coelhos após injeção intra-dérmica de VPF (antígeno). A secreção de VPF foi observada em cinco das sete linhagens de células de sarcoma e carcinomas avaliadas. O anticorpo IgG obtido pela presença do antígeno VPF neutralizou a permeabilidade vascular em 90% nos animais que foram tratados com as linhagens celulares secretoras do VPF. Estes resultados suportaram a hipótese de que o fator de permeabilidade vascular é responsável por grande parte do aumento da permeabilidade vascular e do acúmulo de fluído, que são associados com doenças neoplásicas. Desta forma, os autores sugeriram que a expressão desta proteína por células tumorais e o conseqüente aumento da permeabilidade vascular possa ser fundamental para o crescimento tumoral.

Ferrara, Henzel ²³ (1989) identificaram fator de crescimento de células endoteliais vasculares no meio de acondicionamento de células foliculares pituitárias de bovinos, o qual foi purificado e homogeneizado. O fator de crescimento era uma proteína catiônica, estável ao calor, relativamente estável em meio ácido e com peso molecular de aproximadamente 45 KDa em condições não redutoras e cerca de 23 KDa

em condições redutoras. A proteína purificada apresentou efeito mitogênico máximo na concentração de 1-1,2 ng/mL em células endoteliais de capilares derivadas do córtex adrenal. A caracterização da bioatividade do fator de crescimento revelou que a proteína também apresentou atividade mitogênica em células endoteliais vasculares isoladas de outros locais, células epiteliais do cristalino ocular, células endoteliais da córnea, fibroblastos BHK-21 ou queratinócitos, indicando que a especificidade das células-alvo deste fator de crescimento foi diferente de qualquer outro fator de crescimento previamente caracterizado. Adicionalmente, a análise da micro-sequência molecular relevou uma seqüência única N-amino-terminal da proteína. Com base na aparente seletividade das células-alvo, os autores propuseram para a proteína caracterizada o nome de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Tisher et al.⁸¹ (1991) examinaram e caracterizaram diferentes isoformas do VEGF. A secreção de VEGF por células da musculatura lisa vascular em cultura foi observada por meio de análises protéicas e do Northern blot. Análises de bibliotecas de cDNA destas células pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e da clonagem de cDNA revelaram três formas diferentes da região codificadora do VEGF, contendo 189, 165 e 121 aminoácidos no comprimento da cadeia protéica. A comparação da seqüência de nucleotídeos do cDNA com seqüências

derivadas de clone genômico do VEGF humano indicou que o gene VEGF é dividido em oito éxons (unidade codificadora do DNA) e que as diversas formas da região codificadora do VEGF são provenientes deste gene submetido a *splicing* alternativos (ausência de um ou mais éxons). Os resultados indicaram que os diferentes isoformes do VEGF podem determinar diferentes propriedades e funções.

Peters et al.⁶³ (1993) investigaram a expressão do fms-receptor tirosina kinase (*flt-VEGFR1*), receptor para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), em órgãos de camundongos adultos, em embriões e em feridas de pele de camundongos. A análise de hibridização *in situ* demonstrou a expressão do VEGF no endotélio de tecidos de camundongos adultos, sugerindo que o receptor *flt* possa mediar às respostas endoteliais ao VEGF *in vivo*. A expressão do receptor *flt* em estruturas embrionárias de onde as células endoteliais são diferenciadas e no endotélio de vasos embrionários em desenvolvimento indicaram que o VEGF apresenta efeitos na diferenciação endotelial e no crescimento vascular embrionário. Adicionalmente, a expressão do receptor *flt* no endotélio de tecidos adultos sugeriu papel do VEGF na regulação da permeabilidade vascular e no reparo e manutenção vascular.

Gerber et al.²⁸ (1998) examinaram o papel do VEGF em prevenir a apoptose em células primárias endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). As células HUVEC foram tratadas ou não com VEGF e submetidas ou não a ausência de soro fetal bovino (FBS). A análise do RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada para determinar a expressão de genes envolvidos em atividades anti-apoptóticas como Bcl-2, A1, Bcl-XL ou genes indutores da apoptose como o Bax, pela células HUVEC. O VEGF foi capaz de prevenir apoptose induzida pela ausência de FBS nas concentrações de 10 a 100 ng/mL. A adição de VEGF (100 ng/mL) na cultura das células HUVEC sem FBS levou a indução de 5,2 vezes e de 2,4 vezes da expressão de Bcl-2 após 36 horas de incubação e de A1 após 7 horas de incubação, respectivamente. Os autores encontraram correlação direta entre os níveis de mRNA e de proteína dos genes Bcl-2 e A1 nas células HUVEC em resposta a estimulação do VEGF. Estes resultados indicaram que o VEGF exerce sua atividade de estimulação dos genes anti-apoptóticos, Bcl-2 e A1 primariamente a nível transcricional. Adicionalmente, a sobre-expressão de Bcl-2 através de experimentos de transfecção das células endoteliais foi suficiente para prevenir a morte celular por apoptose na ausência de VEGF, indicando a importância do gene Bcl-2 em mediar a atividade de sobrevivência das células endoteliais pelo VEGF.

FGF

Schweigerer et al.⁷⁰ (1987) examinaram a expressão do gene do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), mRNA e proteína, em células endoteliais de capilares do cérebro ou do córtex adrenal de bovinos. Os resultados demonstraram que o fator bFGF foi expresso pelas células endoteliais e secretado para o meio extracelular e o gene foi capaz de estimular a proliferação das células endoteliais capilares. Os autores concluíram que o bFGF poderia agir como fator de crescimento auto-estimulador para células endoteliais capilares e possivelmente a formação de novos capilares seria induzida pelas próprias células endoteliais dos capilares pré-existentes.

Moscatelli et al.⁵³ (1988) isolaram um fator angiogênico da placenta humana e células de hepatoma humano. Este fator foi capaz de estimular a produção de protease em cultura de células endoteliais capilares e quando purificado também estimulou a síntese de DNA, a migração das células e induziu a angiogênese in vivo. Dados da seqüência de aminoácidos revelaram que o fator analisado correspondia ao fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Os bFGFs que foram isolados de diferentes tecidos e seqüenciados, mostraram variabilidade no N-terminal. Os autores sugeriram que estas diferenças estruturais poderiam ocorrer em função de processos naturais ou geradas pela liberação de proteases durante o processo

de isolamento do fator angiogênico. Um isoforme do bFGF , Mr 25.000 (25KDa), foi isolado e apresentou as mesmas atividades biológicas e a mesma afinidade pelo receptor do bFGF que a forma típica, Mr 18.000 (18KDa). A conversão do bFGF de 25KDa em bFGF de 18KDa ocorreu pelo tratamento com baixas concentrações de tripsina, sugerindo que esta forma poderia ser precursora do bFGF Mr 18.000.

Gualandris et al.³⁵ (1996) investigaram as conseqüências biológicas da ativação de células endoteliais pelo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) endógeno em linhagem de células endoteliais da aorta de camundongos que foram transfectadas com vetor de expressão retroviral infectado com cDNA de bFGF (pZipbFGF). Os resultados mostraram que os transfectantes expressando alta concentração de bFGF in vitro apresentaram comportamento invasivo e formação de tubos capilares (*sprouts*) sobre géis de fibrina tri-dimensionais e formaram rede complexa de estruturas semelhantes a cordas em conexão com células infiltradas quando cultivados sobre matriz de matrigel. O comportamento morfogênético e invasivo das células transfectadas foi prevenido pelo uso de anticorpo anti-bFGF, revelando padrão autócrino do processo. As conseqüências biológicas desta ativação autócrina foram examinadas in vivo. As células endoteliais sobre-expressando o fator bFGF estimularam a formação de lesões altamente vascularizadas semelhantes ao sarcoma de

Kaposi quando injetadas em camundongos e induziram angiogênese em córneas avascularizadas de coelhos. Quando injetadas no saco alantóide de embrião de galinhas, as células transfectadas causaram aumento na densidade vascular e formação de hemangiomas nas membranas cório-alantóideas. De acordo com os resultados, os autores concluíram que as células endoteliais codificadoras de bFGF ao ativarem um programa autócrino in vitro, afetam a proliferação celular, o comportamento invasivo e o potencial morfogênico, além de adquirir fenótipo angiogênico e recrutar o endotélio quiescente, originando lesões auto-proliferativas in vivo.

Shi et al.⁷⁴ (2007) examinaram o efeito do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) na indução hipóxica da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por células de câncer de mama humano e investigaram os possíveis mecanismos envolvidos. A hipóxia (1% O₂) induziu a expressão de HIF-1alfa (fator de transcrição induzido pela hipóxia), a transatividade de HIF-1 e a secreção de VEGF, enquanto que o fator bFGF (10ng/mL) potencializou estas induções hipóxicas. O mecanismo do PI3K/Akt foi requerido para estes processos como demonstrado pela aplicação de um inibidor de PI3Kinase. Por outro lado, embora o fator bFGF tenha ativado o mecanismo MEK1/ERK em condições de hipóxia, apenas a transativação de HIF-1 foi regulada por este mecanismo, sendo que a expressão do HIF-1alfa e a secreção do fator VEGF

não foram afetadas. Os autores concluíram que o fator angiogênico bFGF cooperou com a indução da secreção do VEGF em condições hipóxicas, principalmente pelo mecanismo PI3K e parcialmente pela atividade do HIF-1

E. ANGIOGÊNESE

Nicosia et al.⁵⁵ (1994) avaliaram a resposta angiogênica in vitro de diversos fatores de crescimento, utilizando o modelo de anéis de aortas de ratos com 2 a 3 meses de idade. Estes anéis foram embebidos em géis de colágeno com ausência de soro fetal bovino, na presença ou ausência dos fatores de crescimento (concentrações de 0,1 a 50 ng/mL), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivados das plaquetas natural (PDGF) e recombinantes (PDGF-AA, PDGF-BB), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento de transformação- α (TGF- α), fator de crescimento de transformação- β 1 (TGF- β 1), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina-1 α (IL-1 α) ou fator de crescimento de hepatocitos (HGF). A resposta angiogênica da aorta de ratos foi estimulada pelo VEGF, PDGF, PDGF-AA, PDGF-BB e IGF-1, sendo os efeitos indutores máximos obtidos pelo VEGF e PDGF-BB. Contrariamente, TGF- β 1 e IL-1 α apresentaram atividade inibitória. Os fatores de crescimento TGF- α , EGF e HGF não apresentaram efeitos significantes. O crescimento vascular das culturas estimuladas pelo VEGF

foi primariamente composto por microvasos, enquanto que nas culturas estimuladas pelo PDGF- e IGF-1, houve aumento do número de células semelhantes aos fibroblastos. A incapacidade dos fatores TGF- α , EGF, HGF TGF- β 1 e IL-1 α de estimularem angiogênese em aorta de ratos parece ter ocorrido pelo fato destes fatores requererem atividade mediada por células acessórias que não estão presentes no modelo de aorta de ratos ou pela heterogeneidade de vasos sanguíneos na capacidade de respostas a diferentes fatores de crescimento.

Para estudar a diferenciação de células endoteliais em estruturas vasculares, Kanda et al.⁴⁴ (1996) isolaram uma linhagem de células endoteliais capilares de cérebro de camundongos transgênicos. Estas células mostraram caracteres específicos das células endoteliais, como a expressão do fator de von Willebrand (Fator VIII), a presença de sites de ligação para lectina BS-1 e receptores para Ac-LDL. Os efeitos de vários fatores de crescimento nas respostas celulares foram avaliados. Alguns fatores falharam na indução de respostas biológicas como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA). Por outro lado, os fatores PDGF-BB, fator de crescimento epidérmico (EGF) e os fatores de crescimento fibroblásticos ácidos (aFGF) e básicos (bFGF) estimularam a proliferação celular. A diferenciação das células endoteliais

em estruturas semelhantes a tubos capilares, em géis de colágeno tridimensionais, ocorreu apenas na presença dos fatores aFGF e bFGF. Os fatores de crescimento também foram analisados quanto à indução do ativador de plasminogênio (PA-atividade de proteases) e migração celular. Receptores funcionais para os diferentes fatores de crescimento foram testados nas células endoteliais, as quais expressaram apenas os receptores EGFR, PDGFR- β , FGFR-1 e c-met/HGFR. Para identificar os receptores capazes de transduzir as respostas biológicas induzidas pelo bFGF, um receptor quimérico, composto pelo domínio extracelular e transmembrana do receptor do PDGF- α e o domínio intracelular do FGFR-1, foi construído e transfectado nas células endoteliais. As células transfectadas responderam ao tratamento com PDGF-AA, indução da atividade de proteases, migração, proliferação e formação de estruturas vasculares em colágeno. Estes resultados indicaram que o FGFR-1 respondeu ao mecanismo de transdução de sinal, levando a diferenciação das células endoteliais.

Durante uma revisão da literatura, Risau ⁶⁸ (1997) discutiu os mecanismos do processo da angiogênese. O plexo vascular inicial é derivado da mesoderme pela diferenciação de angioblastos, células endoteliais que ainda não se diferenciaram formando um lúmen, células pelas quais geram vasos sanguíneos primitivos. Fatores indutores da mesoderme da família dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGF)

são fundamentais para a formação dos angioblastos e das células hematopoiéticas. O VEGF parece ser necessário para manter a diferenciação dos angioblastos por meio de mecanismo parácrino. Após o embrião ter formado este plexo vascular primário, processo conhecido como vasculogênese, vasos sanguíneos são gerados por dois processos diferentes de angiogênese, formação de tubos capilares de longa extensão (*sprouting*) e pelo processo de divisão de vasos pré-existentes por pilares trans-capilares ou matriz extracelular (*no-sprouting*). Assim, os vasos sanguíneos passam a ser progressivamente remodelados em um sistema circulatório adulto funcional. Em ambos os processos de vascularização, vasculogênese e angiogênese, mais estudos são necessários para elucidar os diferentes mecanismos moleculares envolvidos, além do papel de fatores de crescimento angiogênicos.

Benjamin et al.⁹ (1998) examinaram a remodelação do plexo endotelial inicial em uma rede vascular madura e funcional, observando a remodelação da vasculatura da retina pós-natal de ratos. Os autores mostraram a importância do recrutamento de pericitos, células de arteríolas positivas para a proteína actina de músculo liso- α e, do recobrimento do plexo primário de células endoteliais pré-organizadas. O período anterior a migração dos pericitos definido como estágio de transição da imaturidade vascular, mostrou-se essencial para a

plasticidade da rede vascular, determinando o desenvolvimento da vasculatura de acordo com a necessidade nutricional da retina. A remodelação da vasculatura demonstrou representar uma resposta de feedback a alterações do nível de oxigênio disponível no tecido, indicando que o processo vascular representaria um ajuste ao suprimento de oxigênio. Desta forma, os resultados indicaram que os pericitos influenciaram a maturação e a remodelação dos vasos da retina, não apresentando papel na formação inicial dos vasos sanguíneos. Para fundamentar que a associação da rede vascular com os pericitos estabilizaria a vasculatura, estas associações foram rompidas pela injeção de PDGF-BB que separou os receptores do PDGF- β dos vasos recém-recobertos pelos pericitos, resultando em regressão excessiva da rede vascular e remodelação anormal. Em contraposição, a injeção intraocular de VEGF acelerou a cobertura do plexo endothelial recém-formado pelos pericitos, revelando nova função deste fator de crescimento, além da proliferação e migração de células endoteliais e, manutenção da viabilidade de vasos sanguíneos imaturos.

Para definir os mecanismos pelos quais o VEGF promove a angiogênese e a significância do aumento da sobrevivência das células endoteliais neste processo, Nör et al.⁵⁸ (1999) examinaram os efeitos do VEGF na expressão de diversos membros da família Bcl-2 durante o

desenvolvimento de respostas angiogênicas *in vitro* e *in vivo*. Quando o VEGF foi adicionado à cultura de células endoteliais microvasculares dérmica humanas (HDMECs), implantadas em géis de colágeno tipo I, houve redução de 75% na proporção de células apoptóticas, dados observados pelas análises de fluxo e de fragmentação do DNA e, pelo teste de coloração de TUNEL. O aumento da sobrevivência das HDMECs foi associado ao aumento da expressão do Bcl-2 de forma dose-dependente e com a redução da expressão da enzima, cisteína protease caspase-3. Culturas de HDMECs transduzidas com Bcl-2 e com ausência de fatores de crescimento mostraram proteção contra a apoptose e aumentaram duas vezes o número de *sprouts*. Células HDMEC sobre-expressando Bcl-2 foram incorporadas às matrizes de ácido poli-L-lático (PLLA) e em seguida, implantadas em camundongos imunodeprimidos. Um aumento de cinco vezes no número de microvasos e a redução de quatro vezes do número de células apoptóticas foram observados nos dias 7 e 14 após os implantes. Estes resultados indicaram que a atividade mitogênica do VEGF deve ser atribuída em parte pela habilidade de aumentar a sobrevivência de células endoteliais pela indução da expressão de Bcl-2.

Nör et al. ⁵⁹ (2001) caracterizaram o desenvolvimento de um modelo novo para angiogênese humana fisiológica e patológica em

camundongos imunodeficientes (SCID). Matrizes altamente porosas de ácido poli-L-lático (PLLA) utilizadas como arcabouços para células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) foram implantadas bilateralmente no tecido subcutâneo do dorso de camundongos SCID. As células HDMEC se diferenciaram em microvasos humanos funcionais, que sofreram anastomoses com a vasculatura dos animais. Para confirmar a origem humana dos microvasos, as células HDMECs foram transduzidas com epítopos Flag ou com fosfatase alcalina. No dia seguinte ao transplante, as células endoteliais apareceram dispersas nas esponjas, enquanto que por volta do quinto dia, tornaram-se organizadas em estruturas tubulares vazias e se diferenciaram em microvasos funcionais após 7 a 10 dias. Os microvasos humanos nos camundongos SCID expressaram marcadores fisiológicos da angiogênese, CD31, CD34, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão inter-celular 1 (ICAM1). As células HDMEC foram revestidas por células de camundongos expressando moléculas de α -actina de músculo liso perivascular após 21 dias do transplante. O modelo de angiogênese humana utilizando camundongos imunodeprimidos foi proposto para o estudo do desenvolvimento de vasculatura fisiológica e de respostas de neovascularização patológica como em angiogênese tumoral e para o desenvolvimento e investigação

de estratégias delineadas para potencializar a neovascularização na engenharia de tecidos e órgãos humanos.

Haspel et al.³⁷ (2002) examinaram o papel da atividade de receptores tirosina-kinase associados ao VEGF (VEGF RTK) na angiogênese *in vitro*. Células endoteliais microvasculares cardíacas derivadas de camundongos foram embebidas em matriz de colágeno tipo I e avaliadas quanto a agregação e organização em núcleos esferóides e formação de estruturas tubulares (*sprouting*), utilizando o inibidor tirosina-kinase, SU5416, que demonstrou previamente inibir a atividade do sistema VEGF RTK e a angiogênese *in vivo*. A formação de esferóides e *sprouts* foi observada pelas células endoteliais entretanto, o SU5416 inibiu cerca de 50% da síntese de DNA basal e de DNA estimulado pelo VEGF nas culturas de células em monocamadas. O inibidor não interferiu na agregação, nem na organização esferóide das células, mas eliminou completamente a formação espontânea de tubos capilares e a formação estimulada pelo VEGF. Estes resultados indicaram que a organização e a diferenciação das células endoteliais são independentes da sinalização pelos receptores tirosina-kinase associados ao VEGF. Contrariamente, a atividade do sistema VEGF RTK mostrou ser essencial para a formação de estruturas capilares pelas células endoteliais cardíacas de camundongos.

Yamamoto et al.⁹³ (2003) analisaram os efeitos do stress de deformação na atividade mitogênica de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea (EPCs). Quando as EPCs foram submetidas ao stress gerado pelo fluxo sanguíneo ou pelo fluxo de fluido tissular (aparato de rotação que induz movimento do meio de cultura em círculos concêntricos) exibiram alterações morfológicas, as células se alongaram e se orientaram em direção ao fluxo. A densidade das EPCs expostas ao stress foi maior e as análises da citometria de fluxo mostraram que grande parte das células estavam na fase G2-M do ciclo celular, quando comparadas com as células cultivadas em condições normais, indicando a estimulação da proliferação celular. O stress aumentou intensamente a expressão pelas células EPCs de dois receptores do fator de crescimento endotelial vascular, KDR (*VEGFR2-kinase insert domain-containing receptor*) e Flt-1 (*VEGFR1-fms-like tyrosine kinase-1*) e moléculas de adesão intercelular, VE-cadherin (caderina vascular endotelial), em ambos os níveis, proteína e mRNA. Análises para formação de tubos foram realizadas, cultivando as EPCs submetidas ao stress de deformação sobre gel de colágeno tipo I. As EPCs pós-stress formaram estruturas semelhantes a tubos capilares e desenvolveram extensa rede tubular mais rápida do que as células em condições normais. Os autores sugeriram de acordo com os resultados que as células progenitoras endoteliais

derivadas da medula óssea são sensíveis ao stress de deformação, o qual é capaz de modular as atividades vasculogênicas das mesmas.

Oishi et al.⁶¹ (2004) investigaram o potencial de desenvolvimento de células-tronco neurais (NSCs) como células progenitoras vasculares. As células NSCs foram isoladas do córtex de camundongos no período embrionário e cultivadas em meio de cultura livre de soro fetal bovino (FBS), na presença de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), para formação de neuroesferas. Estas foram dissociadas mecanicamente em suspensões de células-únicas que se diferenciaram em células neurais após cultivo em meio sem bFGF. As células diferenciadas foram inoculadas em géis de colágeno com 10% de FBS e bFGF e então, incubadas por 10 dias. Houve formação de estruturas tubulares semelhantes a vasos sanguíneos compostas por células imuno-reativas aos marcadores fenotípicos endoteliais, PECAM-1 e VE-caderina, processo de angiogênese idêntico ao desenvolvimento vascular cerebral in vivo. A análise do RT-PCR mostrou que as células NSCs foram capazes de expressar marcadores endoteliais como o PECAM-1, VE-caderina e Flk-1 (VEGFR2), além de desenvolverem morfologia das células endoteliais, comprovando a diferenciação celular. A formação de estruturas tubulares também foi observada quando as células endoteliais diferenciadas foram implantadas em gel de colágeno e

incubadas por 5 dias. Estes resultados sugeriram que as NSCs podem se diferenciar *in vitro* em dois tipos de células vasculares, células endoteliais e murais, as quais são capazes de formar tubos vasculares.

McCloskey et al.⁵² (2005) testaram a capacidade de uma população proliferativa de células endoteliais purificadas e isoladas de células-tronco embrionárias de camundongos, em formar estruturas vasculares tri-dimensionais *in vitro*. As células endoteliais derivadas das células-tronco foram embebidas em gel de colágeno tipo I (10^6 células/mL de gel). Os géis foram observados diariamente por meio de microscópio de contraste de fase para avaliar o tempo para a organização das células endoteliais. Os primeiros vasos foram observados entre os dias 3 e 5 após a construção do gel e após este período, foi observado aumento do número e da complexidade das estruturas, atingindo um número máximo, antes de começarem a regredir. Por volta da segunda semana, todas as estruturas vasculares tinham regredido a células unitárias. Imagens da histologia e do teste de fluorescência das estruturas vasculares mostraram que as estruturas tubulares eram multi-celulares e foram capazes de desenvolver lúmens intra e inter-celulares. Os autores mostraram que as células endoteliais derivadas das células embrionárias, purificadas e expandidas *in vitro*, apresentaram habilidade de suportar a vasculogênese em gel de colágeno, indicando que estas células poderiam ser úteis em aplicações médicas de regeneração.

Goldstein et al.³⁰ (2005) examinaram o efeito de culturas primárias de fibroblastos dérmicos humanos no processo de angiogênese em células de melanoma. Os autores testaram a capacidade de 12 linhagens de melanoma para induzir a invasão e migração de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HMVECs) em gel de colágeno tipo I e de formar rede capilar. Geis de colágeno tri-dimensionais sobre monocamadas de células HMVEC foram embebidos com células de melanoma, fibroblastos ou uma combinação de ambas as linhagens. Após 5 dias, os géis foram removidos, fixados e submetidos a análise de imunofluorescência para o Fator von Willebrand. A influência de fatores solúveis na invasão/migração de células HMVEC no colágeno foi avaliada através do tratamento do colágeno sobre as monocamadas de HMVECs com os meios de acondicionamento derivados de culturas de células de melanoma, de fibroblastos ou da combinação das duas linhagens celulares. A expressão de vinte fatores de crescimento angiogênicos diferentes também foi analisada. A associação das células de melanoma com os fibroblastos aumentou significativamente as respostas angiogênicas das células HMVEC. Os meios de acondicionamento das células de melanoma ou das células de melanoma associadas a fibroblastos reduziram a invasão/migração das HMVECs no colágeno quando comparados ao meio de acondicionamento apenas dos fibroblastos. Nas culturas onde as células de melanoma foram associadas aos fibroblastos, interleucina 8 (IL8),

proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2) foram identificados nos meios de cultura em concentrações significativamente superiores quando comparadas com as culturas de tipos celulares separados. Os autores demonstraram pela primeira vez que a angiogênese em melanomas em colágeno foi mais fortemente influenciada por fibroblastos derivados de pele normal do que pelos diferentes tipos de melanoma.

Koch et al.⁴⁷ (2006) investigaram a possibilidade de aumentar as propriedades angiogênicas de matrizes de colágeno pela incorporação covalente do VEGF. O VEGF foi incorporado ao colágeno através do *cross-linker* SS-PEG-SS, formando um conjugado. A atividade biológica do conjugado foi investigada pela exposição de células endoteliais umbilicais (HUVECs) ao VEGF misturado ou ao VEGF conjugado ao *cross-linker*. O conjugado apresentou efeito limitado na atividade mitogênica do VEGF. A reação *cross-linking* foi aplicada aos sistemas de matrizes associadas ao VEGF. Avaliações *in vitro* foram realizadas nas células HUVECs expostas às matrizes não modificadas, às matrizes com VEGF apenas misturado ou às matrizes com o VEGF incorporado covalentemente. As propriedades angiogênicas foram avaliadas *in vivo*, utilizando o modelo de matriz cório-alantóide, membrana de embrião de galinha, exposto aos mesmos sistemas de matrizes e implantadas em ovos fertilizados de galinha. A incorporação

covalente do VEGF mostrou um efeito pequeno, mas significativo de formação microvascular nas membranas cório-alantóides e crescimento tecidual no interior do implante. Os resultados indicaram que a incorporação covalente de fatores de crescimento angiogênicos deve ser considerada um método promissor para o aumento da capacidade angiogênica de matrizes de colágeno.

Angiogênese regulada pela hipóxia

Como aplicações de forças ortodônticas podem gerar alterações no nível de oxigênio pulpar e conseqüentemente iniciar neovascularização, Derringer, Linden ¹⁸ (1998) analisaram a liberação de fatores de crescimento angiogênicos por polpas dentárias humanas durante movimentação dentária ortodôntica. Para tal finalidade, bandas ortodônticas com fios retos foram aplicadas em dentes pré-molares humanos para movimentação por duas semanas. Após extração dentária, secções horizontais de 1mm dos tecidos pulparem foram embebidas em gel de colágeno juntamente com secções de 1 mm da aorta de ratos e em seguida, foram co-cultivadas por 4 semanas. Polpas de dentes não tracionados e secções de aorta cultivadas sozinhas foram usados como controle. O crescimento microvascular foi observado pela microscopia de luz e, a identificação de microvasos foi confirmada pela microscopia

eletrônica e pela imunohistoquímica para o fator VIII, antígeno marcador de células endoteliais. Quando comparados nos dias 5, 10 e 14 de co-cultura, o número de microvasos foi significativamente maior nas polpas de dentes movimentados ortodonticamente do que dos dentes controle. O desenvolvimento de microvasos nas aortas de ratos também foi estimulado quando foram co-cultivadas com polpas de dentes movimentados. Não houve diferença na vascularização de aortas co-cultivadas com polpas de dentes controle ou quando cultivadas sozinhas. Estes resultados indicaram que houve secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos em tecidos pulpare de dentes movimentados ortodonticamente e que a vascularização das aortas de ratos quando co-cultivadas com estas polpas indica a capacidade de difusão dos fatores angiogênicos.

Elson et al.¹⁹ (2001) para analisarem o efeito do aumento da expressão do HIF-1alfa na vascularização tecidual, criaram camundongos transgênicos que expressavam HIF-1 α em queratinócitos basais da pele e epitélio escamosos, utilizando cDNA codificadores de HIF-1alfa *wild-type* (*wt* HIF-1 α) ou a forma mutante ativa constitutiva do HIF-1alfa (HIF-1 α Δ ODD). A neovascularização e a expressão de fatores pró-angiogênicos (VEGF, Angiopoietinas 1 e 2) foram avaliadas. Camundongos tratados com HIF-1 α Δ ODD na epiderme mostraram

aumento de 66% de capilares na derme, aumento de 13 vezes da expressão do VEGF total e indução de 6-9 vezes da expressão de cada isoforme do VEGF (VEGF 188, 144, 164, 120), quando comparados com os animais submetidos à outra terapia (*wt* HIF-1 α). Apesar da indução de hipervascularização, o HIF-1 α não induziu edema, inflamação ou infiltração vascular nos tecidos. Surpreendentemente, a resistência a infiltração de vasos sanguíneos pelo aumento na expressão de HIF-1 α não foi estimulada pela angiopoietina 1 ou pela angiopoietina 2. Os autores sugeriram que a hipervascularização induzida pela forma constitutiva do HIF-1 α poderia aprimorar a terapia para tecidos isquêmicos

Jones et al.⁴³ (2001) analisaram o efeito e o mecanismo de regulação da resposta hipóxica do VEGF em diferentes linhagens de células de carcinoma de bexiga (linhagens celulares superficiais ou invasivas), variando as condições de confluência celular e do gradiente de O₂ (normóxia-21% O₂; hipóxia-0.1% de O₂). A expressão do VEGF foi examinada por meio das análises do mRNA e proteína. A hipóxia aumentou significativamente a expressão dos níveis de proteína do VEGF em todas as linhagens celulares, embora o efeito tenha variado de acordo com o grau de confluência das células. As linhagens celulares superficiais quando em confluência mostraram redução da expressão do VEGF por

perda de indução hipóxica, o que não ocorreu com as células de linhagens invasivas. Este padrão de expressão do VEGF correlacionou-se com a expressão dos fatores de transcrição, HIF-1alfa e HIF-2alpha. Em função destes resultados, os autores sugeriram que a regulação hipóxica do VEGF é dependente da confluência celular e resulta do equilíbrio entre o aumento da expressão do HIF-1alfa e sua interação com outros fatores regulados quando as células estão confluentes, as quais entram em estado de quiescência, sofrendo alterações na expressão de vários receptores, fatores de transcrição e fatores de crescimento. Ao utilizarem o inibidor do mecanismo sinalizador PI 3-kinase, responsável por mediar a sinalização de vários fatores de crescimento e citocinas, em condição de hipóxia, houve redução da expressão do VEGF total, mantendo a capacidade de indução da hipóxia. Entretanto, a indução da expressão do HIF-1alfa não foi afetada pelo inibidor, sugerindo que a indução do VEGF pela hipóxia ocorre via HIF-1alfa, adicionada ao mecanismo de expressão basal do fator de crescimento regulado pelo sistema PI 3-Kinase. Embora, HIF-1alfa e HIF-2alpha sejam componentes chaves da regulação hipóxica do VEGF, os autores mostraram claramente que outros fatores de transcrição também são importantes no controle da angiogênese.

Shyu et al.⁷⁵ (2002) avaliaram um sistema regulatório transcricional como estratégia terapêutica para aumentar a formação de vasos sanguíneos colaterais em tecidos miocárdicos isquêmicos em casos de perfusão inadequada. Para tal finalidade, utilizaram um modelo para induzir infarto agudo no miocárdio de ratos. Após a ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda proximal, 50µg de plasmídeos de DNA, pCMVβ (plasmídeo codificador de β-galactosidase, controle), HIF-1α/VP16 (plasmídeo codificador de HIF-1α) ou phVEGF (plasmídeo codificador de VEGF) foram injetados na área infartada em três locais diferentes. A análise do RT-PCR mostrou a presença do mRNA do HIF-1α e do VEGF no miocárdio, mas não em outros órgãos após 3 e 7 dias. O tamanho da área infartada foi significativamente reduzida pelos tratamentos com o HIF-1α/VP16 e phVEGF, quando comparados ao grupo controle (pCMVβ). A densidade capilar nos grupos experimentais HIF-1α/VP16 e phVEGF (850; 850 mm²) foi semelhante, mas também aumentou em relação ao grupo controle (550 mm²). Ao combinar as terapias, HIF-1α/VP16 e phVEGF, houve aumento da densidade capilar em relação a cada tratamento, enquanto que o tamanho das áreas afetadas não sofreu modificação. O fluxo sanguíneo e os níveis plasmáticos de VEGF do miocárdio foram significativamente maiores nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Os autores por meio

dos resultados concluíram que o fator de transcrição híbrido, HIF-1 α /VP16, é capaz de reduzir o tamanho de infartamentos e de potencializar a neovascularização de isquemia aguda do miocárdio, tornando-se uma alternativa eficaz para tratamento de isquemias associadas com injúrias vasculares.

Bos et al.¹⁰ (2005) investigaram a regulação da angiogênese (densidade microvascular) e de alguns fatores de crescimento (PDGF-BB, bFGF, TGF- α , VEGF) e receptores (EGFR, TGF- β -RII) pelo fator transcricional HIF-1 α , em câncer de mama invasivo. Fatias de tecido com cerca de 5 mm de espessura foram obtidas de 45 pacientes com câncer de mama invasivo e submetidas a imunohistoquímica. Alto nível de expressão de HIF-1 α foi observado e correlacionado positivamente com o aumento da densidade microvascular (CD31+), da expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB), do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Os autores sugeriram que o HIF-1 α tem papel importante em câncer de mama invasivo, e a utilização de agentes direcionados a este fator de transcrição podem combinar diferentes mecanismos de inibição do crescimento do câncer, incluindo angiogênese e fatores de crescimento.

Pan et al.⁶² (2005) avaliaram a eficácia anti-angiogênica do YC1 in vitro e in vivo. A substância YC1 inibiu a habilidade do VEGF e do bFGF de maneira dose-dependente em induzir proliferação, migração e formação de estruturas tubulares em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs), por meio dos testes de incorporação da timidina [³H], da migração trans-well e de implantes de células endoteliais com matrigel, respectivamente. A ativação do mecanismo dos componentes ERK1/2, Akt e PKC α é requerida para os efeitos de proliferação e migração dos fatores angiogênicos VEGF e bFGF nas células endoteliais. O YC1 inibiu a expressão dos fatores angiogênicos, induzida pelas atividades de ERK1/2 e Akt, bem como pela translocação de PKC α , através da análise do western blot. A angiogênese in vivo utilizando o YC1 foi analisada por meio do modelo de implate de matrigel em camundongos. O YC1 administrado oralmente em doses de 1 a 100mg/kg/dia inibiu a neovascularização induzida pelo VEGF e bFGF de forma dose-dependente por mais de 7 dias. De acordo com os resultados, os autores concluíram que o YC1 apresentou atividade anti-angiogênica em pequenas doses e quando administrado oralmente mostrou alta atividade anti-tumoral com ausência de citotoxicidade.

Nicosia et al.⁵⁶ (2005) investigaram um novo método para estudar a angiogênese. Explantes de veias cavas inferiores e/ou aortas

removidas de ratos, embebidas em gel de colágeno tipo I e cultivadas com ausência de soro fetal bovino, formaram crescimentos microvasculares compostos por células endoteliais e pericitos. Os explantes das veias cavas exibiram maior capacidade de formar vasos, estes mais longos e com menor número de pericitos do que os anéis de aortas. A co-cultura dos anéis das veias cavas com anéis das aortas produziram extensas redes de anastomoses de microvasos, os quais foram primariamente formados pelos explantes venosos. Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fibroblástico básico (bFGF) estimularam angiogênese de forma dose-dependente e induziram formação de rede complexa de microvasos altamente ramificada. O fator VEGF e sua associação ao bFGF estimularam o recrutamento de pericitos. Quando anticorpos anti-VEGF foram adicionados a culturas de veias cavas não tratadas com a proteína recombinante, contendo apenas VEGF endógeno, a resposta angiogênica espontânea foi significativamente reduzida. Os resultados indicaram que o modelo da veia cava inferior de ratos representa um avanço nos mecanismos existentes já que reproduziu *ex vivo* a resposta angiogênica de um endotélio venoso nativo não modificado por consecutivas passagens em cultura. Adicionalmente, como a angiogênese foi primariamente iniciada pelo lado venoso da cama vascular, este modelo provavelmente reproduz melhor o contexto vascular do que o modelo dos anéis arteriais. Entretanto, a combinação de ambos os modelos poderia promover novas inferências aos mecanismos moleculares que

regulam a formação de conexões anastomóticas entre a circulação arterial e venosa.

Nillesen et al.⁵⁷ (2007) testaram a aplicação combinada das proteínas recombinantes, VEGF-164 (rrVEGF) e FGF-2 (rrFGF2) em *scaffolds* (arcabouços) acelulares de colágeno-heparina no processo de angiogênese para a engenharia tecidual. Para este propósito, *scaffolds* de combinações de colágeno tipo I, heparina, rrVEGF, rrFGF2 foram construídos, caracterizados por meio de microscopia eletrônica de varredura e implantados em subcutâneo de ratos para avaliação das respostas teciduais *in vivo* nos dias 3, 7 e 21. Os implantes foram examinados por imunocoloração, através de anticorpos específicos, colágeno tipo IV para determinar a área total de vasos sanguíneos, actina de músculo liso (SMA) para estudar o nível de maturação dos mesmos e HIF-1alfa para determinar o número de células hipóxicas nos *scaffolds*. Dos *scaffolds* construídos, aqueles com a combinação do VEGF e FGF-2 mostraram a maior densidade de vasos sanguíneos, os quais apresentaram maior maturação. Adicionalmente, não foram identificadas células hipóxicas nos dias 7 e 21, após os implantes. Estes resultados indicaram que a adição de ambos os fatores de crescimento, VEGF e FGF-2, em arcabouços acelulares foi capaz de potencializar a formação de uma rede precoce e bem desenvolvida de vasos sanguíneos.

Ke et al.⁴⁵ (2007) examinaram a expressão de VEGF em fibroblastos sinoviais da articulação temporo-mandibular (ATM) e investigaram a regulação transcricional do HIF-1alfa envolvida na expressão de VEGF nestas células em hipóxia. Para isto, fibroblastos sinoviais foram obtidos da ATM e incubados em normóxia ou anóxia (0% de O₂) por diferentes períodos. Os níveis de expressão do VEGF foram determinados pelo teste de imunoensaio, ELISA, enquanto que os mRNAs e a estabilidade dos isoformes do VEGF foram identificados pelas análise do RT-PCR e Northern Blot, respectivamente. O VEGF foi significativamente induzido pela hipóxia nos fibroblastos sinoviais, sendo os mRNAs do VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅, as formas mais comuns. Não houve alteração na estabilidade dos mRNAs de ambos os isoformes. O acúmulo de HIF-1alfa foi avaliado pelo western blot e imunofluorescência, sendo observados, o acúmulo e a translocação nuclear do HIF-1alfa, em condições de hipóxia. Os resultados indicaram que a hipóxia deve induzir principalmente a expressão de VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ em fibroblastos sinoviais para promover angiogênese inflamatória da ATM. Além disso, HIF-1alfa controla a expressão do VEGF nos fibroblastos sinoviais em hipóxia.

Angiogênese em tecidos pupares

Matsushita et al.⁵¹ (2000) investigaram o papel do VEGF em células pulpares humanas por meio de análises de quimiotaxia, proliferação

e diferenciação celular. O fator de crescimento VEGF induziu forte resposta quimiotática nas células pulpares humanas de forma dose-dependente, além de aumentar a proliferação celular e induzir a expressão de fosfatase alcalina. Entretanto, estes efeitos não foram observados em fibroblastos da pele humana. Análises do RT-PCR e da citometria de fluxo mostraram que o mRNA de dois receptores para o fator angiogênico VEGF, fms-tirosina kinase (VEGFR1) e KDR (VEGFR2), foram expressos pelas células pulpares humanas, mas apenas o mRNA do VEGFR1 foi expresso pelos fibroblastos humanos. Para elucidar o mecanismo da sinalização do VEGF nas células pulpares humanas, foi investigada a ativação das proteínas ativadoras 1 (AP-1) e fatores de transcrição compostos por duas proteínas das famílias *fos* e *jun* pelo VEGF. O VEGF induziu a ativação da proteína AP-1 e do mRNA de *c-fos* nas células pulpares humanas. Ao utilizar um inibidor da proteína AP-1, houve inibição da produção mediada pelo VEGF da fosfatase alcalina. Estes resultados indicaram que o fator de crescimento VEGF secretado pelas células pulpares humanas age diretamente nas células de maneira autócrina, promovendo quimiotaxia, proliferação e/ou diferenciação das células pulpares humanas via receptores do VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e em parte através da proteína AP-1 que aumenta a expressão de *c-fos*.

Artese et al.⁷ (2002) avaliaram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a densidade microvascular (MVD) em tecidos pulpare normais e inflamados através da imunohistoquímica para o fator VIII (Von Willebrand). Os vasos sanguíneos foram sempre positivos para o VEGF nos tecidos pulpare em ambas as condições, sendo fortemente marcados no infiltrado inflamatório das pulpites irreversíveis. A expressão do VEGF em células do estroma apresentou média significativamente maior nos tecidos saudáveis do que nos tecidos com pulpites irreversíveis, nos quais a densidade microvascular foi significativamente menor. Estes resultados poderiam ser associados com a presença de substâncias inflamatórias nos tecidos inflamados responsáveis pela redução drástica da reatividade vascular.

Trubiani et al.⁸⁵ (2003) examinaram a expressão de células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34⁺ para caracterizar a topografia e os processos celulares envolvidos na vascularização do tecido pulpar humano. Polpas dentárias obtidas de dentes decíduos e permanentes foram avaliadas morfologicamente em microscopia de luz e eletrônica e através do teste de imunohistoquímica para verificar a expressão do antígeno CD34, marcador de células-tronco e progenitoras. Os resultados indicaram que a vasculogênese da polpa dentária é um processo complexo iniciado por células CD34⁺ que se agregam formando

cordas vasculares sólidas, dentro de tecido conjuntivo em desenvolvimento, que se tornam ocas com o tempo. Pericitos parecem envolver o endotélio, cobrindo parcialmente a circunferência do vaso em várias camadas. A avaliação morfométrica revelou a presença de mais de 18% de células CD34+ na polpa de dentes decíduos, 16% nos tecidos de dentes permanentes com idade equivalente aos decíduos, 3% em polpas dentárias de pacientes com 26 anos de idade e, desaparecendo em tecidos pulpares de pacientes com 60 anos de idade. O reconhecimento de células CD34+ comprova que embora a vasculogênese começa nos períodos iniciais da formação dentária, este processo continua por muito tempo, persistindo na vida adulta.

Tran-Hung et al.⁸⁴ (2006) investigaram a interação de fibroblastos polpas dentárias com o sistema vascular e o possível papel das células pulpares na angiogênese após injúria. Para tal finalidade, fibroblastos extraídos de polpas de dentes permanentes humanos (HDPF) foram co-cultivados com células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs) (proporção de 8:2), induzindo organização das células endoteliais e a formação de estruturas capilares. O contato indireto das células HDPF com as células HUVECs foi realizado através da coleta do meio de acondicionamento dos fibroblastos submetidos ou não a injúria mecânica e posterior, tratamento das células endoteliais. O contato direto

não foi necessário para indução da angiogênese e os efeitos observados foram relacionados com a presença de fatores solúveis no meio de acondicionamento. Esta relação foi comprovada pela neutralização dos fatores de crescimento, VEGF e bFGF, que demonstrou redução dos efeitos angiogênicos destes fatores solúveis. A expressão de VEGF e bFGF pelas células HDPF foi comprovada pela imunocitoquímica que aumentou com a injúria celular. Os autores concluíram baseados nos resultados que os fibroblastos pulpare humanos secretam fatores angiogênicos, os quais são necessários para a reparação pulpar, especialmente no local de injúria do tecido.

Ueno et al.⁸⁶ (2006) avaliaram os efeitos da hipóxia na proliferação de células pulpare in vitro e examinaram a resposta destas células a reoxigenação pós-hipóxia. Quando as células pulpare de polpas dentárias de ratos (RPC-C2A-K4) foram expostas a 24h e 48h de hipóxia, o crescimento celular foi interrompido e morte celular foi detectada por meio da coloração Hoechst. A análise do western blot revelou a inibição da fosforilação da proteína do retinoblastoma, responsável pelo controle da progressão do ciclo celular durante a transição das fases G1/S, através da modulação proteica combinada, ou seja, supressão da ciclina D2 e ativação da p21, inibindo a proliferação celular durante os longos períodos de hipóxia. A re-oxigenação das células após períodos de

hipóxia contribuiu para o aumento da viabilidade celular, progressão do ciclo celular e a expressão da ciclina D2. Estes resultados indicaram que a interrupção do ciclo celular pelas condições hipóxicas é reversível e que a ciclina D2 pode apresentar papel fundamental na proliferação celular com a re-oxigenação.

Gandia et al ²⁷ (2008) examinaram o potencial terapêutico das células-tronco derivadas de polpas de dentes permanentes (DPSC) no reparo de infartamento do miocárdio em ratos e o compararam as células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MS). Células DPSC ou BM-MS foram infectadas com retrovirus codificador de proteína verde fluorescente (GFP) e expandidas ex vivo. O infartamento miocárdico foi induzido nos animais e após sete dias, $1,5 \times 10^6$ GFP-DPSC ou GFP-BM-MS foram injetadas no interior do miocárdio. Com quatro semanas, os animais demonstraram uma melhora na função cardíaca, observada pelo aumento na espessura da parede anterior ventricular esquerda, pela redução do tamanho da área infartada e pela alta densidade microvascular, resultados estatisticamente iguais para ambas as linhagens celulares (DPSC e BM-MS). As DPSC não se diferenciaram em células da musculatura lisa, cardíaca ou em células endoteliais. Entretanto, houve aumento da formação de vasos sanguíneos, pela injeção das DPSC nos animais, quando comparados ao grupo controle (injeção de solução salina). Através dos

resultados, pôde-se concluir que as células DPSC foram capazes de reparar miocárdio infartado, em função do aumento do processo de angiogênese e da redução da área infartada. Os autores ainda sugeriram que o efeito das DPSCs em ambientes isquêmicos se deve a habilidade de secretar fatores pró-angiogênicos e fatores anti-apoptóticos, indicando as DPSCs como novas alternativas de células-tronco para o tratamento de injúrias isquêmicas.

PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial das células-tronco (DPSC) e de fibroblastos (HDPF) de polpas de dentes permanentes humanos em hipóxia.

Objetivos Específicos

1. Determinar e comparar a expressão dos fatores pró-angiogênicos, VEGF e bFGF nas células DPSC e HDPF em normóxia e hipóxia.
2. Determinar e comparar a expressão do fator transcricional regulado pela hipóxia, HIF-1alfa, pelas células DPSC e HDPF em diferentes períodos de hipóxia e avaliar o papel do HIF-1alfa na expressão de VEGF nas células DPSC e HDPF.
3. Avaliar o papel das células DPSC e HDP, em normóxia e hipóxia na proliferação e formação de estruturas vasculares pelas células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC).

MATERIAL E MÉTODO

Cultura das células

Fibroblastos derivados de tecido pulpar humano (HDPF, cultura primária desenvolvida no Laboratório de Angiogênese da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, Ann Arbor, MI, USA, passagens 4-8) foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com alta concentração de glicose. Células-tronco derivadas de polpa de dentes permanentes humanos (DPSC, linhagem gentilmente fornecida pelo Dr. Songtao Shi, USC, USA, passagens 4-8), foram cultivadas em DMEM, porém com baixa concentração de glicose. Para ambas as células, o DMEM utilizado foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM/L de glutamina.

Células Endoteliais Microvasculares da Derme Humana (HDMEC, Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA, passagens 7-10) foram cultivadas em meio de cultura EGM-2MV (500 mL) (Cambrex, San Diego, CA, USA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5%, hidrocortisona 0,04%, ácido ascórbico 0,1%, proteína recombinante do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (R3-IGF-1) 0,1%, sulfato de gentamicina e anfotericina B (GA-1000) 0,1%, proteína recombinante do

fator de crescimento fibroblástico (rhFGF-B) 0,4%, proteína recombinante do fator de crescimento vascular endotelial (rhVEGF) 0,1% e proteína recombinante do fator de crescimento epidérmico humano (rhEGF) 0,1%.

Condições de normóxia e hipóxia

Em normóxia, as células pulpares humanas foram cultivadas em estufa a 37°C com 100% de umidade, 5% de CO₂, 21% O₂ e 74% N₂. Para a condição de hipóxia, as células pulpares foram cultivadas a 37°C em uma câmara de hipóxia (Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg, Califórnia, USA), regulada a 5% de CO₂, 1% de O₂ e 94% N₂⁸⁹ (Figura 1).



FIGURA 1- Câmara de hipóxia regulada a 5% de CO₂, 1% de O₂ e 94% N₂.

Western blot e Imunocitoquímica

Para a identificação da ativação do fator de transcrição induzido pela hipóxia - HIF-1 α acumulado no núcleo celular, foi realizado o teste de western blot e a imunocitoquímica. DPSC ou HDPF (60×10^4 células) foram cultivadas e incubadas overnight em placas de acrílico esterilizadas de 60 mm de diâmetro (Corning Costar Corp., Cambridge, MA). As células foram cultivadas em normóxia ou em diferentes períodos de hipóxia (2h, 4h, 8h, e 24h). Para a obtenção da proteína, as células foram lavadas com solução salina fosfatada tamponada gelada (PBS) e coletadas por raspagem do fundo da placa. *Pellets* das células foram homogeneizados por extração com tergentol tipo NP-40 (nonyl phenoxypolyethoxylethanol, Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA), utilizando centrifuga refrigerada a 4°C, 13000 RPM, durante 10 minutos. A concentração da proteína total foi quantificada por espectrofotometria num comprimento de onda de 585 nm (Microplate Reader, Tecan, Genios, Áustria).

Para a análise do western blot, a proteína total celular (20 μ g) foi separada por eletroforese (SDS- Eletroforese em gel de poliacrilamida com adição do sulfato dodecil-sódico - detergente aniônico que se liga à maioria das proteínas) em gel 8% de poliacrilamida e, transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Nitrocellulose Transfer Mebrane, Whatman-Protran, Dassel, Germany). Para o bloqueio de bandas inespecíficas, as membranas foram incubadas em leite desnatado 5%, dissolvido em solução salina

tamponada Tris (TBS), contendo 0.1% de Tween-20 (TBST), em temperatura ambiente por 1 hora. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-HIF-1alfa humano (mouse IgG; diluição de 1:1000 em TBST; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) e posteriormente, com o anticorpo secundário peroxidase-conjugado (anti-mouse IgG; diluição de 1:10,000 em TBST; Jackson Immuno Research Laboratories Inc. West Grove, PA, USA) por 2 horas em temperatura ambiente. Os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados por quimioluminescência (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE) e exposição ao filme de raio X (Fujifilm, 100NIF – Fujifilm Holdings América Co., Hanover park, IL, USA). Células cultivadas em normóxia foram utilizadas como controle negativo e células pré-tratadas com cloreto de cobalto 0.5 mM (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como controle positivo^{20, 90}. O controle do carregamento da proteína foi realizado pela marcação das membranas de nitrocelulose com a proteína GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Para análise da imunocitoquímica, foi utilizado o sistema de detecção de imunoperoxidase (4 Plus Universal HRP-DAB Sample Kit, Biocare Medical, Concord, CA, USA). DPSC ou HDPF ($2,5 \times 10^4$ células) foram cultivadas em câmaras acopladas a lâminas microscópicas (Figura 2 - Lab-Tek II Chamber Slides with cover, LAB-TEK, Brand

Products, Nalge Nunc. International), e mantidas a 37°C overnight. As células foram mantidas em normóxia ou hipóxia por 4 horas. Após 30 minutos de fixação com solução de formalina fosfatada tamponada 10% (Paraformaldeído 4%, Fisher Scientific, Pittsburg, PA), as células foram lavadas com PBS 1X. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada durante 20 minutos com solução de peróxido de hidrogênio 3% (Peroxidazed 1, Ref PX968H) e em seguida, 20 minutos adicionais para o bloqueio de colorações não-específicas (Background Sniper, Ref. BS966H). As células foram incubadas com o anticorpo primário anti-HIF-1alfa (mouse antiserum; 1:100, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) durante 90 minutos, novamente submetidas à lavagem com PBS 1X, e então incubadas com o anticorpo secundário conjugado anti-*rabbit* por 20 minutos (mouse polymer - HRP). Para revelação da reação imonocitoquímica, foi utilizado o cromógeno 3,3' tetracloro de diaminobenzidina (DAB Chromogen, Ref. DB851C, Biocare Medical, Concord, CA, USA). A reação foi imediatamente observada por microscopia de luz em aumento de 200X, sendo então cessada com lavagem em água. Todos as lâminas imunocoradas foram levemente contra-coradas com hematoxilina (Meyers; Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA). Após lavagem em água-corrente para remoção do excesso de corante, as lâminas foram montadas utilizando meio aquoso de montagem (Vecta Mount AQ, Vector Laboratories, Peterborough, UK.).



FIGURA 2- Câmaras de cultura acopladas a lâminas microscópicas.

Análise da expressão do VEGF e bFGF

A análise quantitativa da concentração dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fibroblástico básico (bFGF) em sobrenadante de culturas de células pulpares foi realizada através do uso de kits ELISA comercialmente disponíveis, VEGF Humano e FGF básico Humano (Quantikine, Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 3). Células DPSC e HDPF foram cultivadas (3×10^4 células/compartimento) em seis compartimentos individuais de placas de acrílico esterilizadas de 12 compartimentos e, mantidas a 37°C em normóxia ou hipóxia por 24 horas. O sobrenadante foi coletado, centrifugado e o teste de imunoensaio ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) foi realizado. O meio de cultura

DMEM não-suplementado foi utilizado como controle negativo. O valor médio da concentração de VEGF ou bFGF no meio de cultura foi subtraído do valor de cada amostra. A densidade óptica obtida das amostras foi mensurada por espectrofotometria (Microplate Reader, Tecan, Genios, Austria) num comprimento de onda de 450nm.

Efeito do HIF-1alfa na expressão do VEGF

Para determinar o efeito do HIF-1alfa na expressão do VEGF, foi realizada a inibição do fator transcricional e posterior análise da expressão do fator de crescimento. A inibição do HIF-1alfa nas células pulpares estudadas foi realizada pela substância química, YC-1 ([3-(5'-hydroxy methyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole]; AG Scientific Inc., San Diego, CA) ^{13, 62}, diluída em dimetil-sulfóxido (DMSO) e armazenada a - 20°C.

DPSC e HDPF (60×10^4 células/placas de 60 mm de diâmetro) foram pré-tratadas com YC-1 (5µM, 10µM, 20µM, 40µM, ou 80µM) por 60 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com cloreto de cobalto 0.5 mM para indução da expressão do HIF-1alfa ^{20, 90} e então, mantidas a 37°C por 4 horas (Figura 3). Após a extração das proteínas, o western blot foi realizado para análise da expressão do HIF-1alfa.

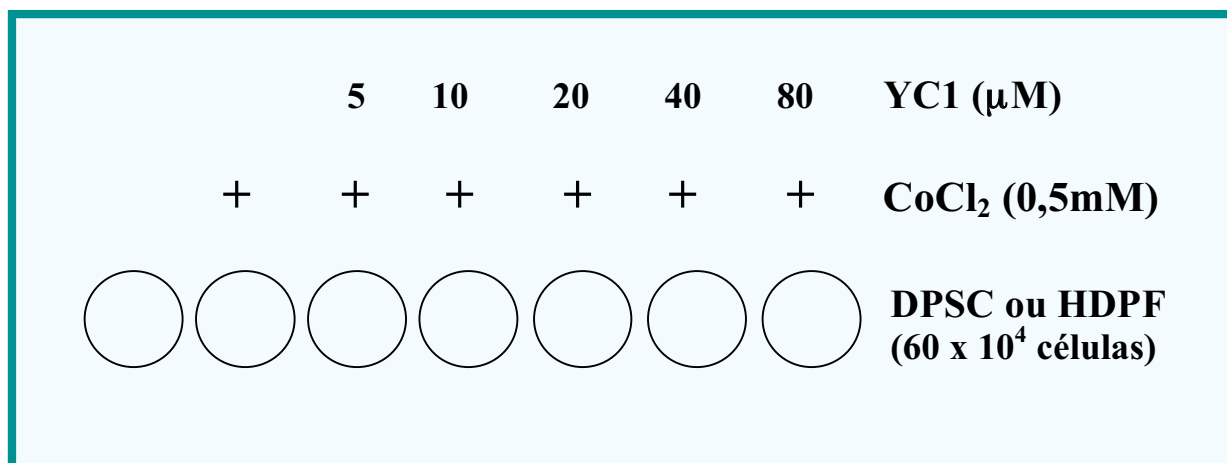


FIGURA 3 - Esquema do tratamento das DPSC e HDPF para análise da expressão do HIF-1alfa pelo western blot.

Para certificar que a concentração de YC-1 capaz de inibir a expressão do HIF-1alfa preservasse a viabilidade celular, o metabolismo celular foi avaliado pela taxa de respiração celular mitocondrial através do teste WST-1 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany), como previamente descrito na literatura^{26, 40}. Para isto, células DPSC ou HDPF ($1,5 \times 10^4$ células) foram cultivadas em triplicata por condição, em placas de 24 compartimentos, tratadas com as diferentes concentrações de YC-1 e mantidas por 24 horas a 37°C. A concentração de 40μM do inibidor YC-1 foi capaz de inibir a ativação do HIF-1alfa e manter a viabilidade de ambas as linhagens celulares (Tabela 4, Figuras 8 e 9). Desta forma, células DPSC ou HDPF (3×10^4 células) foram cultivadas em placas de 12 compartimentos, e pré-tratadas ou não com 40μM YC-1 durante 1 hora (4 compartimentos por condição e linhagem celular). As células foram mantidas a 37°C em normóxia ou hipóxia por 23 horas adicionais. O sobrenadante foi coletado e

a expressão do fator pró-angiogênico VEGF foi analisada pelos testes ELISA .

Testes de proliferação e formação de tubos capilares *in vitro*

O efeito *in vitro* das células pulpares DPSC e HDPF sobre a proliferação e a formação de estruturas semelhantes a capilares (*sprouts*), pelas células endoteliais (HDMEC), foi examinado. Para isto, células DPSC e HDPF foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB e mantidas a 37°C por 24 horas em normóxia (NX) ou hipóxia (HX) após atingirem, no frasco de cultura (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), cerca de 80-90% de confluência. O meio de acondicionamento (CM) de cada tipo celular foi coletado, concentrado 10X por centrifugação (3000 RPM, 30 minutos; Amicon Ultra - 3,000 NMWL – 3K-Centrifugal Filter Devices, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e congelado a -80°C.

Para a avaliação da angiogênese *in vitro* (*sprouting assay* – Anexo 5) ^{30, 47, 58, 60}, colágeno tipo I (Vitrogen 100; Cohesion Technologies, Palo Alto, CA, USA) a 4°C foi tamponado com PBS 10X gelado e 0.1M NaOH (concentração de 8:1:1), mantido em gelo. Quando necessário, o pH da solução de colágeno foi ajustado para 7.4, adicionando 0.1M de NaOH ou HCl. Em placas de 6 compartimentos, 1.5 mL do colágeno preparado foi colocado em cada compartimento e

incubado a 37°C overnight para geleificação. HDMEC (5×10^4 células) foram implantadas sobre o gel de colágeno em meio de cultura EGM-2MV overnight. No dia seguinte, o meio foi substituído por EGM-2MV suplementado com o meio de acondicionamento das DPSC (CM DPSC NX/CM DPSC HX) ou dos HDPF (CM HDPF NX/CM HDPF HX), em concentração de 9:1. O número de tubos capilares foi contado diariamente em aumento de 100X (Microscópio de contraste de fase, Modelo IMT-2, Olympus Optical Company Co. LTD, Tokyo, Japan), acoplado a uma câmera (Evolution MP Color, Media Cybernetics, US) como descrito previamente⁵⁸ durante 5 dias. Para a contagem, seis campos de cada compartimento foram selecionados aleatoriamente e os dados foram obtidos de dois compartimentos por tratamento ($n = 12$). O meio de cultura EGM-2MV foi utilizado como controle negativo, sendo que este mesmo meio de cultura suplementado com 50ng da proteína recombinante do VEGF₁₆₅ (rhVEGF₁₆₅, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), como controle positivo^{9, 47, 57}.

Para a avaliação da proliferação e viabilidade das células endoteliais, foi realizada a análise colorimétrica do WST-1^{26, 40} (Anexo 4 - Roche Applied Science, Penzberg, Germany). HDMEC (1×10^3 células) foram implantadas em 6 compartimentos por condição em placas de 96 compartimentos e cultivadas a 37°C overnight para adesão das células no fundo dos compartimentos. Em seguida, o meio de cultura foi substituído

por EGM-2MV suplementado com o meio de acondicionamento das células DPSC ou HDPF, concentrado 10X (concentração de 9:1), sendo que as células foram mantidas em normóxia ou hipóxia. Os dados foram obtidos de seis amostra por condição e período de tempo (Tabela 1). A taxa de proliferação celular foi avaliada em três períodos (24h, 48h e 72h). Após os

determinados períodos de tempo, o corante WST-1 (1:10) foi adicionado no meio de cultura sobre as células e mantido 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram analisadas por espectrofotometria com comprimento de onda de 450nm (Microplate Reader, Tecan, Genios, Austria).

Tabela 1 - Apresentação do número de amostras por condição e período de tempo e identificação dos meios de acondicionamento das HDMEC para o teste de proliferação celular, WST-1.

Meio de acondicionamento das HDMEC	Período de tempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
EGM -2MV	6	6	6
EGM-2MV + 50ng VEGF	6	6	6
EGM-2MV + CM DPSC NX ^a	6	6	6
EGM-2MV + CM DPSC HX ^b	6	6	6
EGM-2MV + CM HDPF NX ^c	6	6	6
EGM-2MV + CM HDPF HX ^d	6	6	6

^a meio de acondicionamento das DPSC em normóxia;

^b meio de acondicionamento das DPSC em hipóxia;

^c meio de acondicionamento das HDPF em normóxia;

^d meio de acondicionamento das HDPF em hipóxia

Tratamento estatístico dos resultados

As análises da expressão dos fatores de crescimento pró-angiogênicos e da proliferação e formação de tubos capilares pelas células endoteliais forneceram dados em distribuição não-normal, portanto testes não paramétrico foram utilizados. O teste estatístico Kruskal-Wallis foi aplicado para a comparação dos grupos e quando foi rejeitada a hipótese nula, os testes de Mann-Whitney (dados não-pareados) ou de Wilcoxon (dados pareados) foram realizados para localização das diferenças.. Os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5%.

A análise da expressão do fator transcricional HIF-1 α foi realizada de forma descritiva.

RESULTADO

A distribuição dos dados das análises de expressão dos fatores pró-angiogênicos, proliferação e formação de tubos capilares pelas HDMEC foi analisada pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$) ou Shapiro-Wilk ($n < 50$). Estes testes revelaram distribuição não normal dos dados em todas as análises, portanto testes não-paramétricos foram utilizados.

Western Blot e imunocitoquímica para expressão do HIF-1alfa

Em ambos os testes, western blot (Figura 4) e imunocitoquímica (Figura 5), foi observada ausência da ativação do fator transcricional HIF-1alfa nas células DPSC e HDPF em condição de normóxia. Por outro lado, houve aumento da expressão do HIF-1alfa em ambas as linhagens celulares, quando as células foram colocadas em condição de hipóxia.

O western blot revelou que a ativação do HIF-1alfa em ambas as células DPSC e HDPF em condição de hipóxia foi tempo-dependente, com expressão máxima observada após 4 horas de incubação, observada pela maior intensidade das bandas. A atividade do fator de transcrição após este período de tempo reduziu gradativamente. Na análise da imunocitoquímica, observou-se a presença do HIF-1alfa nos núcleos celulares (Figura 5 - setas).

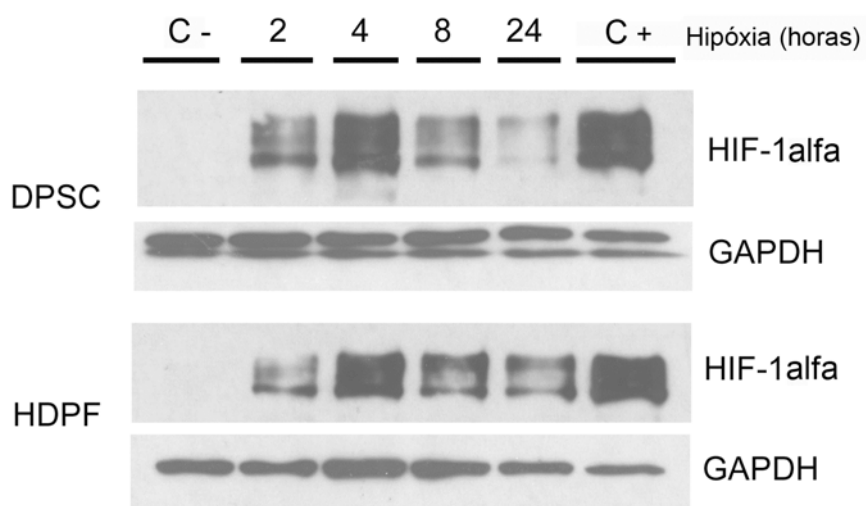
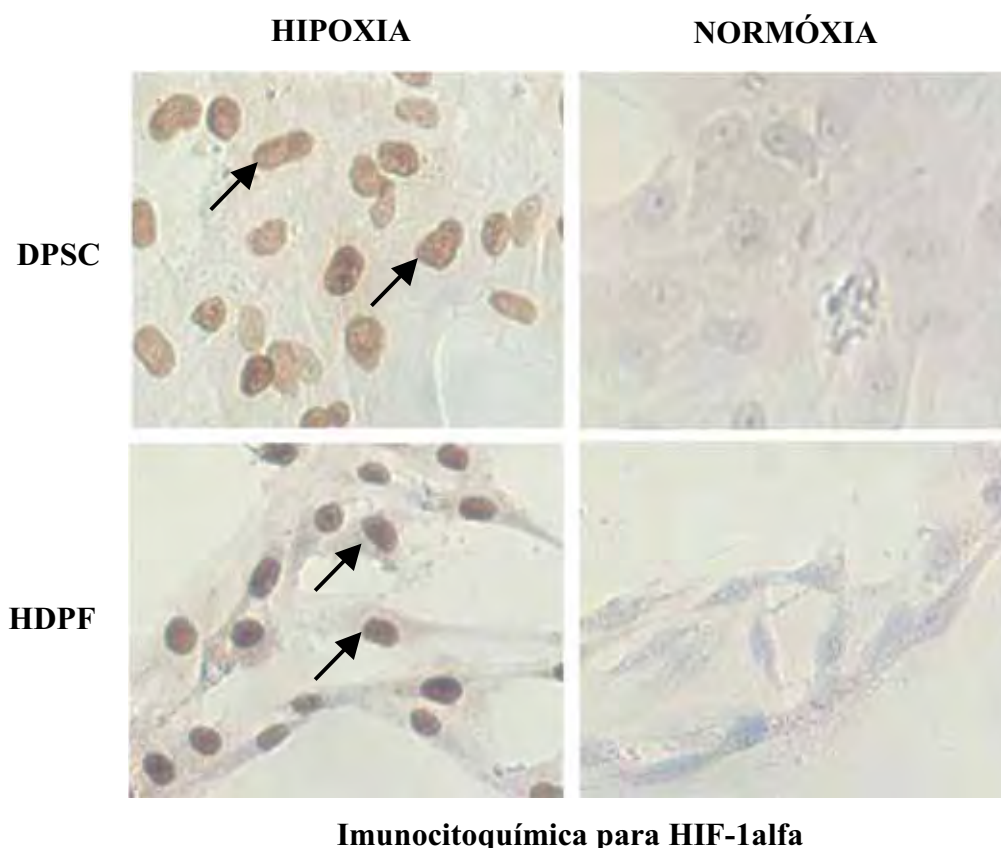


FIGURA 4 - Western blot para análise da expressão de HIF-1alfa por DPSC e HDPF em normóxia ou hipóxia. As células tratadas com 1mM de cloreto de cobalto foram utilizadas como controle positivo e as células em normóxia como controle negativo para a expressão do HIF-1alfa .



Imunocitoquímica para HIF-1alfa

FIGURA 5 - Imunocitoquímica para análise da expressão de HIF-1alfa por DPSC e HDPF em normóxia ou hipóxia. Após 4 horas de hipóxia, a expressão do fator transcricional foi observada no núcleo das células estudadas (setas), mas não nas células em normóxia.

Análise da expressão do VEGF e bFGF

Para a análise dos dados da expressão dos fatores pró-angiogênicos, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Os resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 6 revelam aumento significativo da expressão do VEGF para ambas as linhagens celulares quando em condição de hipóxia. Este aumento foi oito vezes maior nas células DPSC e três vezes maior nos HDPF, quando comparado com a situação onde estas mesmas células foram cultivadas em normóxia.

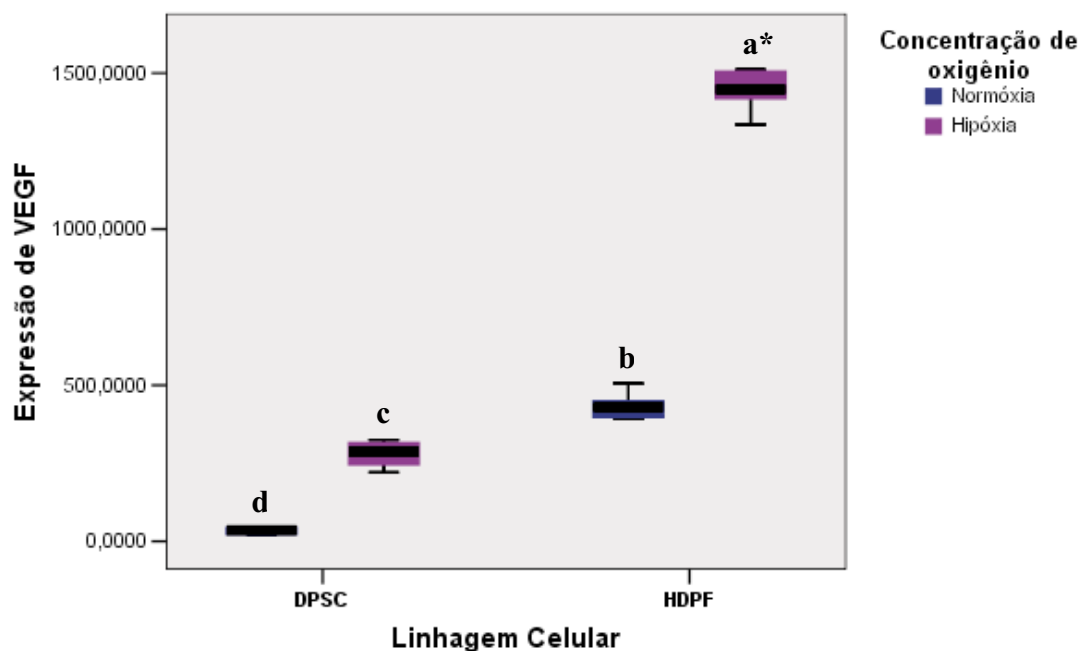
Em contraposição, não houve diferença estatística na expressão do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) pelas células DPSC e HDPF em normóxia ou hipóxia (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 2 - Expressão do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (pg/mL), em células pulpare humanas por meio do teste ELISA.

*valores são medianas (intervalo interquartilico, P25/P75) (n = 6)

Linhagem celular	Expressão de VEGF (pg/mL)	
	Normóxia	Hipóxia
DPSC	35.52 (22.47-44.26)* B b**	288.00 (239.67-317.45) A b
HDPF	429.39 (396.69-463.13) B a	1447.83 (1398.22-1506.43) A a

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)



* Letras iguais não diferem estatisticamente

FIGURA 6 - Representação gráfica (Box Plot - intervalo interquartílico, P25/P75) da expressão de VEGF (pg/mL) em DPSC e HDPF em normóxia ou hipóxia por 24 horas.

Tabela 3 - Expressão do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), em pg/mL, em células pulpares humanas por meio do teste ELISA.

Linhagem Celular	Linhagem Celular	
	Normóxia	Hipóxia
DPSC	40.57 (7.48)* A a**	38.53 (10.44) A a
HDPF	45.07 (14.73) A a	45.22 (13.71) A a

*valores são medianas (intervalo interquartílico, P25/P75) (n = 6)

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

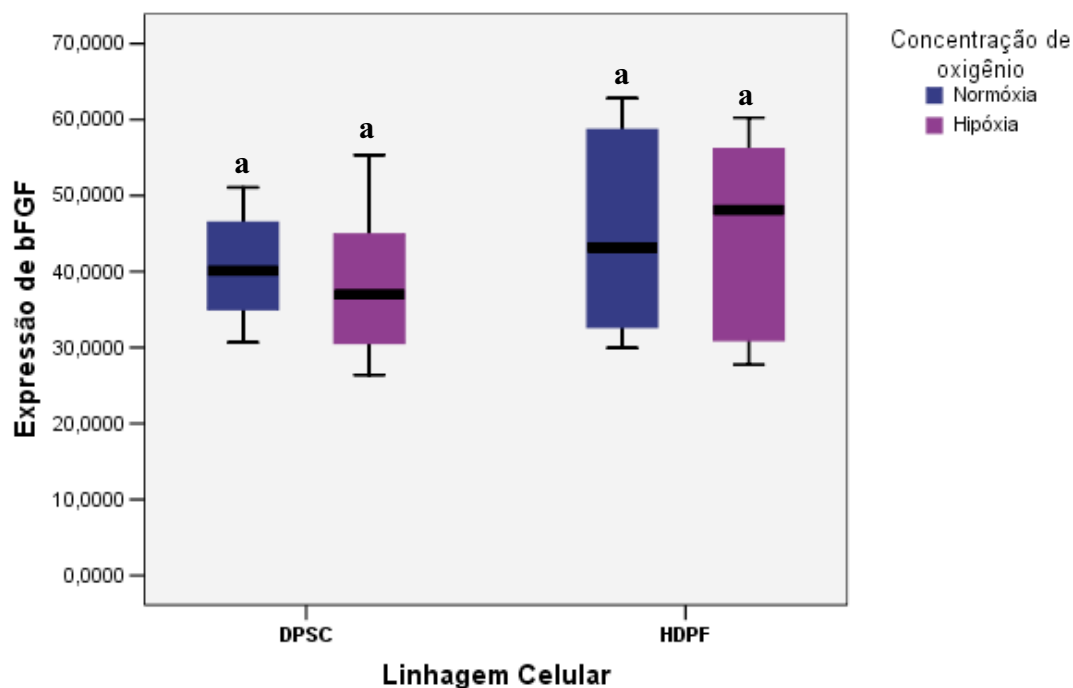


FIGURA 7 - Representação gráfica (Box Plot - intervalo interquartílico, P25/P75) da expressão de bFGF (pg/mL) em DPSC e HDPF em normóxia ou hipóxia por 24 horas.

Efeito do HIF-1alfa na expressão de VEGF

Para determinar a concentração ótima do YC1 para inibição da atividade do HIF-1alfa e ao mesmo tempo, manutenção da viabilidade das células em contato com a substância, a análise de western blot e o teste de proliferação celular WST-1, foram realizados respectivamente. O teste estatístico de Mann Whitney foi empregado para análise dos dados do teste WST-1. Os resultados apresentados na Tabela 4 e Figura 8 mostram que o YC1, inibidor de HIF-1alfa, não foi tóxico para às células HDPF nas concentrações testadas, entretanto, para a células DPSC, o YC1 nas

concentrações de 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M reduziu o metabolismo celular em 9%, 17% e 24%, respectivamente.

Tabela 4 - Teste de proliferação celular (WST1) para avaliação da toxicidade de diferentes concentrações de YC1 em células DPSC e HDPF.

Concentração de YC1 (μ M)	Linhagem Celular	
	DPSC	HDPF
0	1,78 (1,76-1,86)* A a **	0,87 (0,80-0,88) B b
5	1,59 (1,54-1,61) A b	0,85 (0,78-0,87) B b
10	1,50 (1,47-1,58) A b	0,91 (0,88-0,96) B a
20	1,61 (1,55-1,63) A b	0,93 (0,92-0,95) B a
40	1,48 (1,45-1,59) A b	0,92 (0,89-0,94) B a
80	1,35 (1,32-1,37) A c	0,80 (0,74-0,87) B b

*valores são medianas (intervalo interquartilico, P25/P75) (n = 4)

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

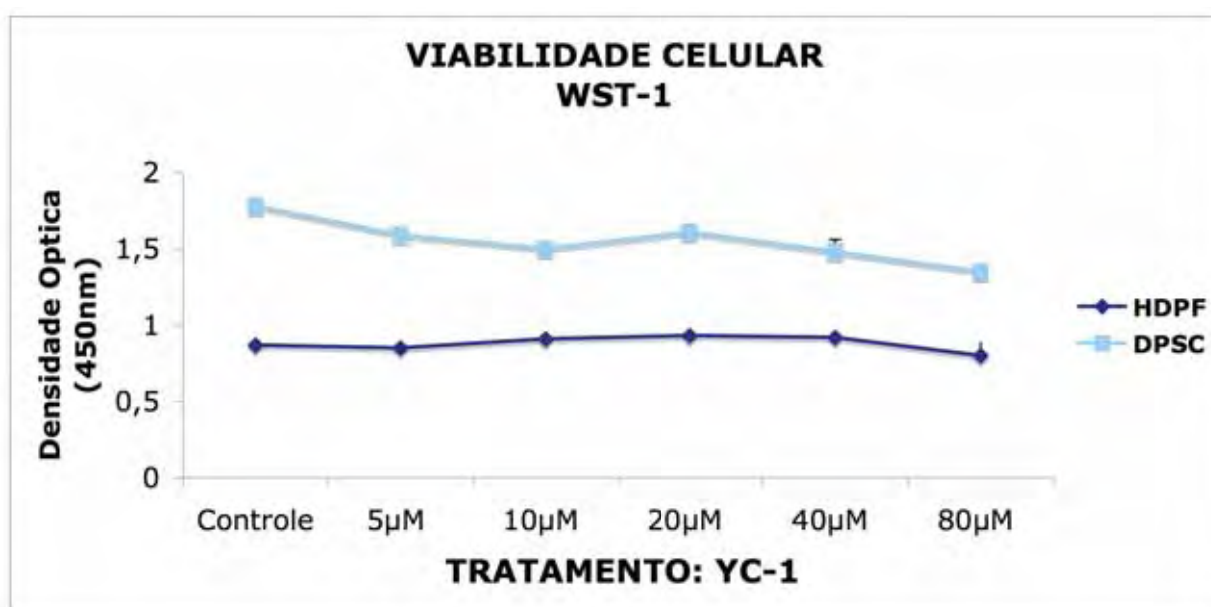


FIGURA 8 - Representação gráfica da viabilidade das células, DPSC e HDPF, pré-tratadas com diferentes concentrações de YC1.

Na análise do western blot, na ausência do cloreto de cobalto 0,5 mM, não houve expressão do HIF-1alfa pelas células DPSC e HDPF. O cloreto de cobalto 0,5 mM foi utilizado para induzir a expressão, uma vez que sua capacidade de mimetizar a ação da hipóxia foi demonstrada ^{20, 88, 89}. Entretanto, alta atividade do fator de transcrição foi observada na presença do cloreto de cobalto em ambas as linhagens celulares (Figura 9). A expressão do HIF-1alfa foi dependente da concentração do YC1, portanto quanto maior a concentração do YC1, menor foi a atividade do HIF-1alfa. Para as células HDPF, esta atividade foi inibida a partir da concentração de 20µM, enquanto que nas células-tronco, a atividade de HIF-1alfa foi praticamente bloqueada pelo YC1 nas concentrações de 40µM e 80µM.

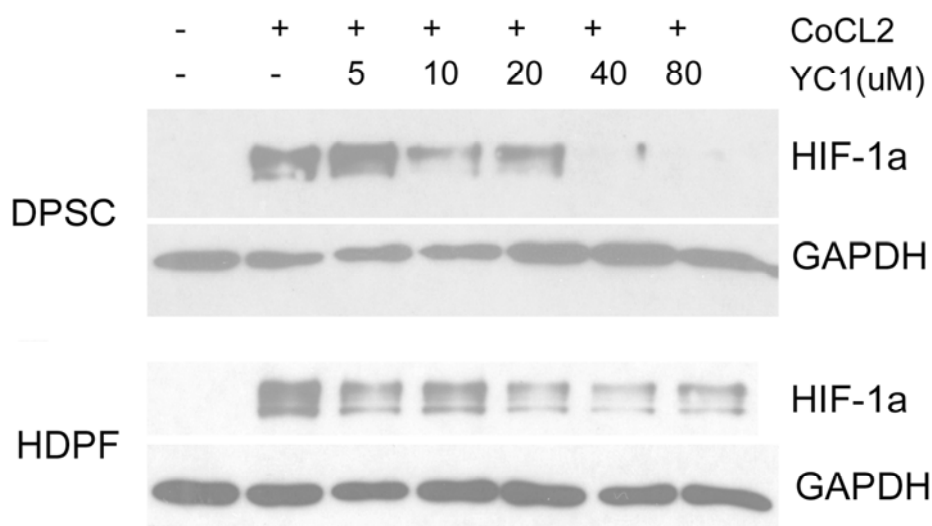


FIGURA 9 - Western Blot para identificação da expressão de HIF-1alfa em DPSCs e HDPFs pré-tratadas com diferentes concentrações de YC1. Após 60 minutos, a solução de 0,5 mM de cloreto de cobalto foi adicionada para induzir a expressão do HIF-1alfa e as células foram incubadas por 4 horas.

Baseando-se nos resultados do western blot e do teste WST-1, a concentração de 40µM do YC1 foi selecionada para o tratamento das células em cultura e posterior avaliação do efeito do HIF-1alfa da expressão de VEGF.

O teste de Mann-Whitey foi utilizado para análise da expressão do fator de crescimento pró-angiogênico de acordo com os diferentes tratamentos das células pulpares avaliadas (Tabela 5 e Figura 10). Foi observado aumento da expressão do VEGF quando ambas as linhagens celulares foram cultivadas em hipóxia. Além disso, houve redução estatisticamente significativa da expressão do VEGF quando as DPSCs em hipóxia foram pré-tratadas com inibidor do HIF-1alfa (YC1).

Tabela 5 - Expressão do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (pg/mL), em células DPSC e HDPF, após inibição da atividade do fator de transcrição, HIF-1alfa, pelo YC1.

Tratamento	Expressão de VEGF (pg/mL)	
	DPSC	HDPF
Normóxia	405,82 (395,48-423,93)* B c **	492,77 (469,98-540,66) A b
Normóxia + 40uM YC1	399,18 (367,75-436,20) B c	516,73(474,00-558,10) A b
Hipóxia	744,91 (732,54-768,32) B a	985,45 (897,39-1108,34) A a
Hipóxia + 40uM YC1	638,59 (612,27-690,32) B b	913,41 (856,41-947,23) A a

*valores são medianas (intervalo interquartilico, P25/P75) (n =6)

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

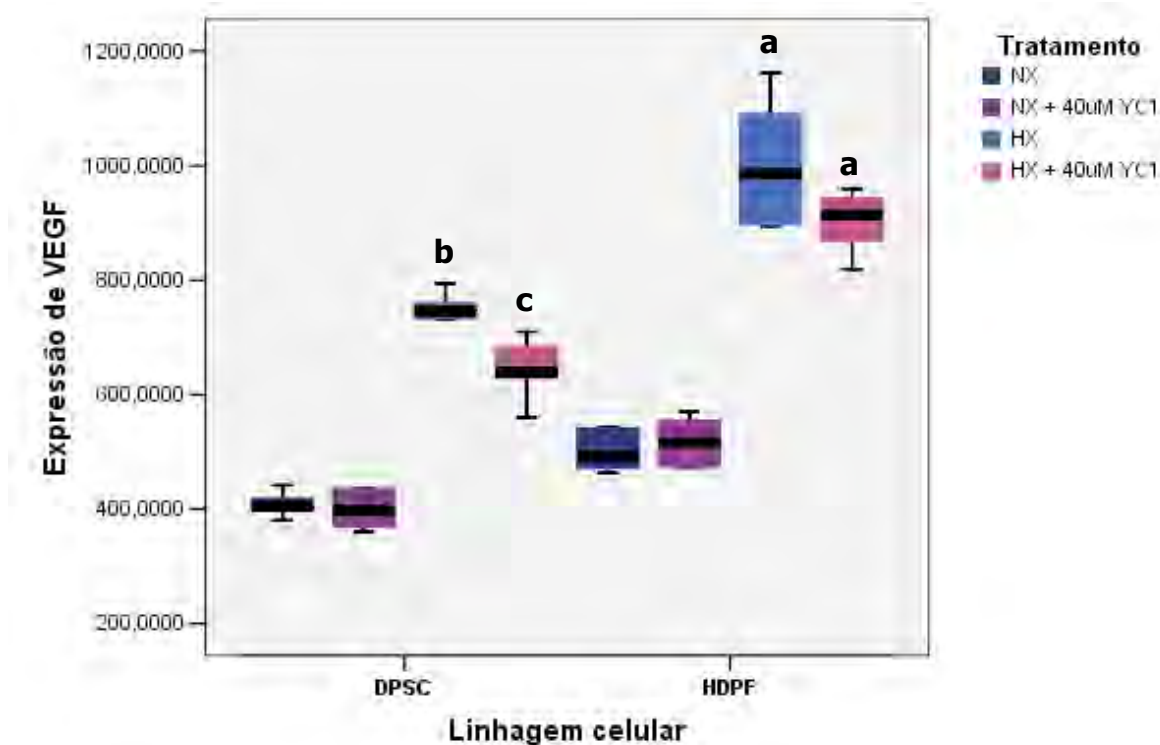


FIGURA 10 - Representação gráfica (Box Plot - intervalo interquartilico, P25/P75) da expressão de VEGF (pg/mL) em DPSC e HDPF cultivadas 24 horas em normóxia ou hipóxia, pré-tratadas ou não por 40μM de YC1.

Proliferação e formação de tubos capilares *in vitro* pelas HDMEC

As análises dos dados de proliferação das HDMECs foram realizadas pelo teste estatístico Mann-Whitney e a formação de capilares *in vitro*, pelo teste Wilcoxon (dados pareados) para localização das diferenças, considerando os grupos dois a dois.

Os resultados da proliferação celular estão apresentados na Tabela 6 e Figura 11 e mostram que o aumento da taxa de proliferação das HDMECs foi tempo-dependente. Não houve diferença no período de 24 horas nos

diferentes tratamentos. No período de 48 horas, observou-se que as HDMECs tratadas com CM DPSC HX tiveram proliferação 67% maior quando comparadas ao grupo controle negativo. Esta proliferação aumentou para 78% quando as mesmas células foram tratadas com CM DPSC NX. No período de 72 horas, a taxa de proliferação celular foi estimulada pelas células HDPF e DPSC cultivadas em normóxia e hipóxia, entretanto a taxa de proliferação celular foi 13% maior quando as HDMECs foram tratadas com o meio de condicionamento dos fibroblastos em hipóxia do que com os fibroblastos em normóxia.

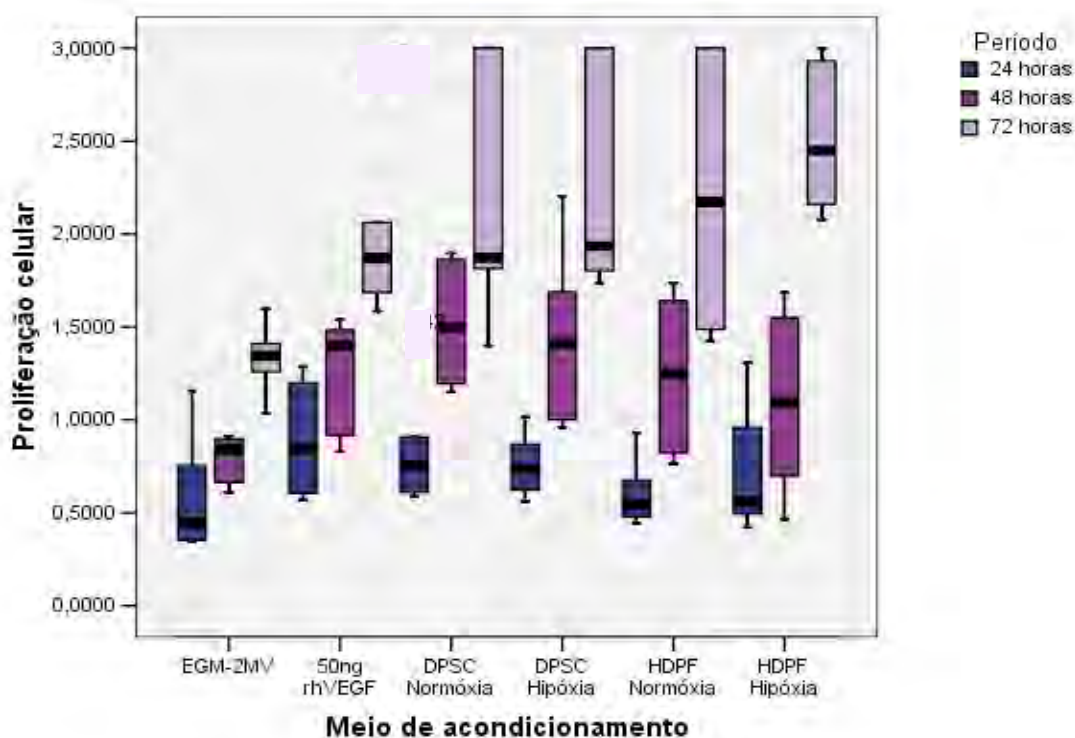


FIGURA 11 - Representação gráfica (Box Plot - intervalo interquartil, P25/P75) da taxa de proliferação das HDMEC de acordo com o tratamento e período de tempo por meio de teste WST-1

Tabela 6 - Proliferação das HDMEC de acordo com o tratamento e período de tempo por meio do teste WST1.

TRATAMENTO DAS HDMEC	PROLIFERAÇÃO CELULAR (WST-1)		
	24 horas	48 horas	72 horas
EGM -2MV	0.44 (0.35-0.85)* A a **	0.84 (0.65-0.90) A b	1.34 (1.20-1.46) B c
EGM-2MV + 50ng VEGF	0.85 (0.6-1.22) A a	1.40 (0.89-1.50) A a	1.87 (1.66-2.00) B b
EGM-2MV + CM DPSC NX	0.74 (0.60-0.87)) B a	1.50(1.18-1.87) A a	1.87 (1.71-3.00) A ab
EGM-2MV + CM DPSC HX	0.73 (0.61-0.90)) A a	1.41(0.99-1.81) B a	1.93 (1.78-3.00) C ab
EGM-2MV + CM HDPF NX	0.54 (0.47-0.74) B a	1.25 (0.81-1.66) A ab	2.17 (1.47-3.00) A b
EGM-2MV + CM HDPF HX	0.56 (0.47-1.05) A a	1.09 (0.64-1.58) A ab	2.45 (2.14-2.95) B a

*valores são medianas (intervalo interquartilico, P25/P75) (n = 6)

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

A taxa de formação dos sprouts pelas HDMECs foi significativamente maior no quinto dia de avaliação independente o tratamento realizado. Quando as células foram tratadas com o meio de condicionamento dos HDPFs em hipóxia houve aumento de 91% no número de *sprouts* em relação ao controle e 50% em relação ao meio de condicionamento dos fibroblastos em normóxia. Estes dados estão apresentados na Tabela 7 e Figura 12 e a formação de *sprouts* pelas HDMECs submetidas aos diferentes tratamentos, no quinto dia de observação, está apresentada na Figura 13.

Tabela 7 - Formação de tubos capilares, *in vitro*, por células microvasculares dérmicas humanas, HDMEC, após diferentes tratamentos, durante 5 dias.

TRATAMENTO DAS HDMEC	PERÍODO DE TEMPO	
	Dia 1	Dia 5
EGM -2MV	24 (19-27)* A ab **	22 (18-29) A c
EGM-2MV + 50ng VEGF	27 (23-33) A a	35 (28-48) B ab
EGM-2MV + CM HDPF NX	17 (12-26) A b	28 (17-43) B bc
EGM-2MV + CM HDPF HX	22 (14-31) A ab	42 (38-49) B a
EGM-2MV + CM DPSC NX	20 (16-33) A ab	30 (26-35) B b
EGM-2MV + CM DPSC HX	24 (20-28) A ab	33 (24-38) B b

*valores são medianas (intervalo interquartilico, P25/P75) (n = 12)

**valores representados por letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente (Wilcoxon, $p > 0,05$)

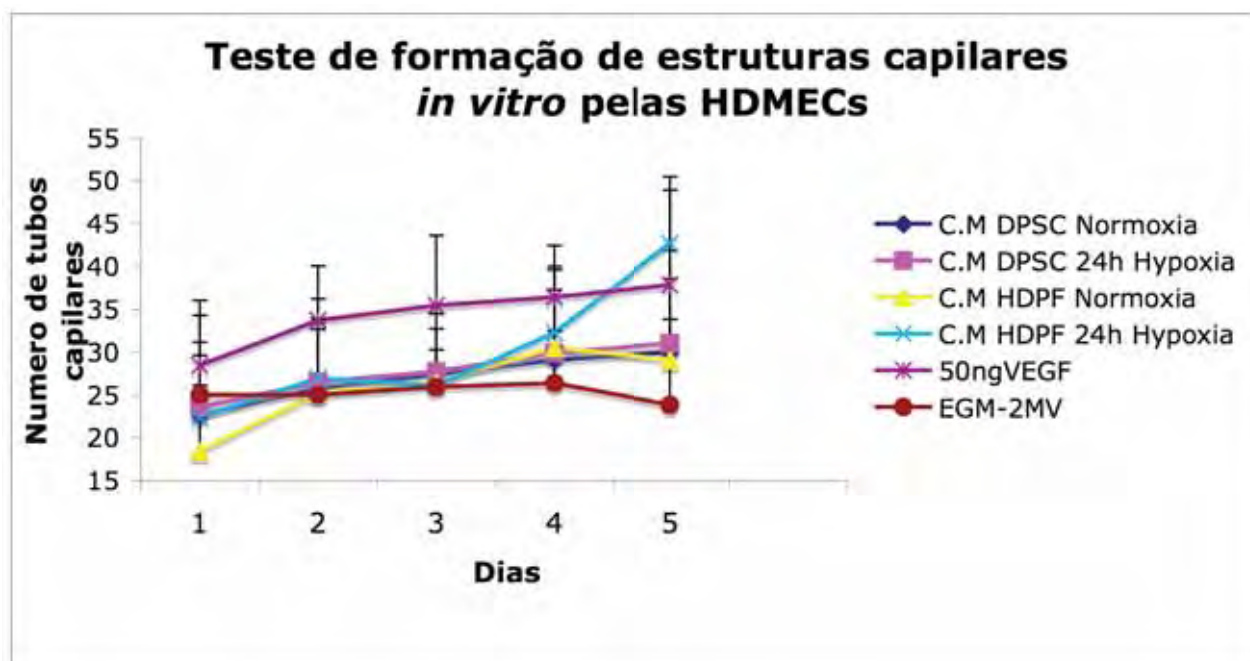


FIGURA 12 - Representação gráfica da formação de tubos capilares pelas HDMEC de acordo com o tratamento e período de tempo.

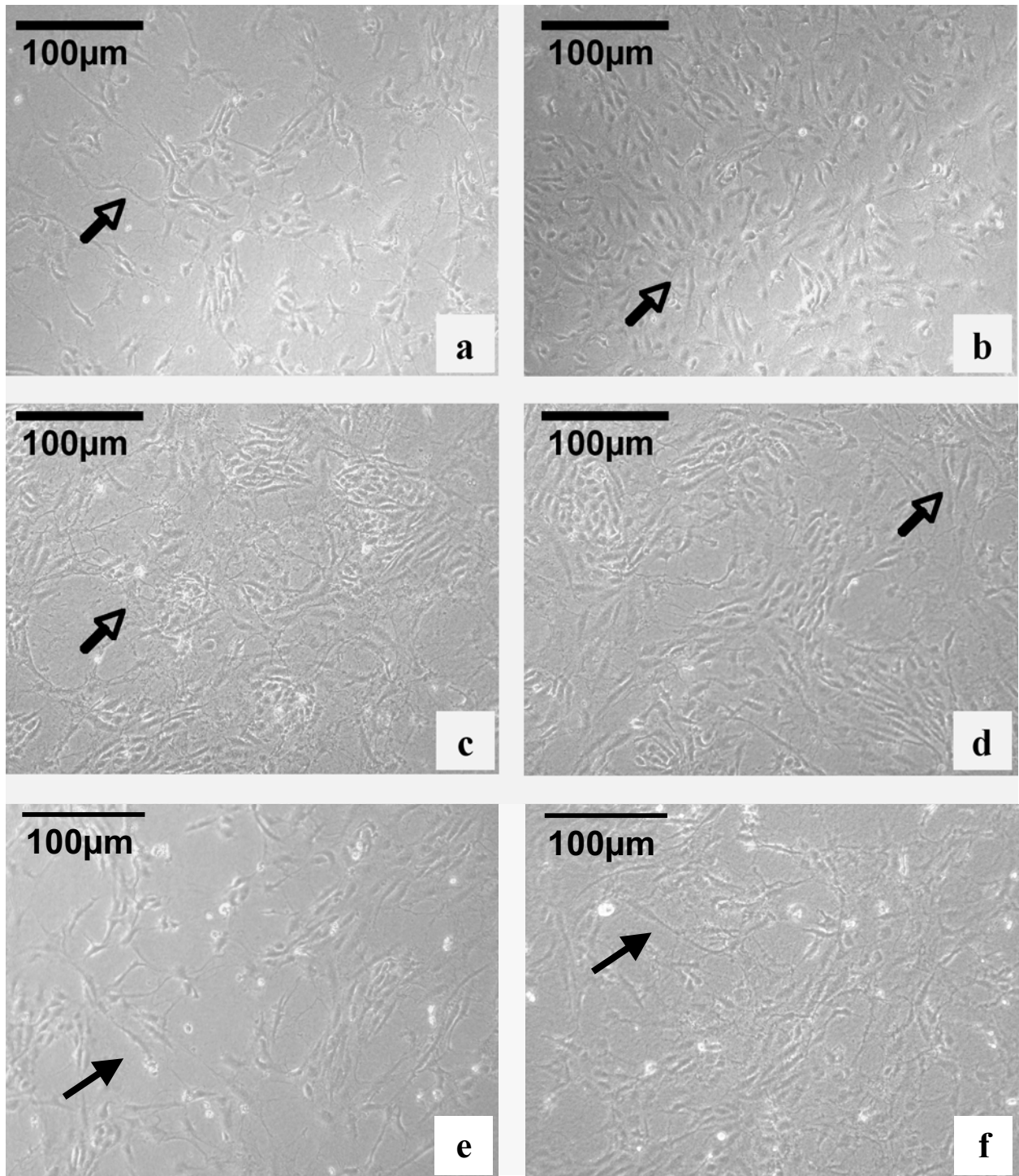


FIGURA 13 - Formação in vitro de tubos capilares – *sprouts* (setas) pelas HDMEC, 5 dias após diferentes tratamentos, 100X: (a) EGM-2MV; (b) EGM-2MV + 50 ng de VEGF; (c) CM HDPF NX; (d) CM HDPF HX; (e) CM DPSC NX; (f) CM DPSC HX.

DISCUSSÃO

Existem na literatura científica vários estudos epidemiológicos^{16, 48, 49}, de avaliação do tecido pulpar^{3, 13, 78, 79} e da revascularização tecidual^{15, 69} após injúrias traumáticas de origem dentária. Entretanto, poucas são as pesquisas que buscam avaliar os processos moleculares, pós-traumas dentários, que envolvem o rompimento do feixe vâsculo-nervoso e as respostas celulares que levam ao processo de revascularização do tecido pulpar.

O presente estudo foi desenvolvido para investigar as respostas de duas linhagens celulares pulpares quando submetidas à redução do nível de oxigênio, simulando as condições de hipóxia/anóxia desenvolvidas pelo rompimento do feixe vâsculo-nervoso em luxações intrusivas ou extrusivas e avulsões dentárias. Para isso, examinou-se a capacidade das células pulpares de estimular a proliferação e a formação de estruturas semelhantes a tubos vasculares, por células endoteliais *in vitro*.

O tecido pulpar é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, situado, exclusivamente, entre paredes rígidas de dentina mineralizada, o que lhe confere várias características especiais³⁶. A polpa dentária é composta por diferentes tipos celulares, como fibroblastos, odontoblastos, células endoteliais e células mesenquimais indiferenciadas³⁶. Para o presente estudo, foram selecionados dois tipos celulares: fibroblastos de

polpas dentárias humanas e células-tronco derivadas de polpas dentárias de dentes permanentes humanos. Os HDPF foram selecionados neste estudo por serem as células mais numerosas do tecido pulpar ³⁶ e apresentarem papel importante na angiogênese, expressando fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2), estimulando a formação de uma rede de estruturas tubulares por células endoteliais ^{66, 84, 85}. Da mesma forma, células-tronco derivadas de polpas de dentes permanentes humanos (DPSC), isoladas por Gronthos et al. ³³ (2000), foram utilizadas por serem uma fonte eficiente, e de fácil acesso, de células mesenquimais indiferenciadas, com potencial de diferenciação diferente ao das células mesenquimais da medula óssea ⁶⁴.

As DPSCs fazem parte de uma população de células clonogênicas, altamente proliferativas e com capacidade de formar complexo semelhante ao dentino-pulpar ³³. Estudos anteriores mostraram a habilidade das DPSCs de se diferenciarem em diferentes tipos celulares como adipócitos ^{34, 64}, células neurais ^{33, 34}, células hematopoiéticas ^{33, 34}, células osteogênicas ⁶⁴ e células odontoblastóides ^{33, 34}, sugerindo que as DPSCs poderiam ser utilizadas para estudos in vitro de diferenciação de células-tronco adultas e de regeneração tecidual in vivo ^{34, 92}. Yamada et al. ⁹¹ (2006) analisaram o padrão de expressão gênica das DPSC e identificaram vários genes que codificaram fatores de crescimentos (IGF-1 e II,

Interleucina 8 e 11, TNF- α , BMP-2 e 4) e reguladores transcricionais (Msx1, Jun-B), dentre outros. Fundamentando-se na capacidade proliferativa e de diferenciação celular e também no padrão de expressão gênica das células-tronco pulpares, optou-se, neste estudo, por avaliar o potencial mitogênico das células DPSC, comparando-o ao dos fibroblastos pulpares humanos.

Para avaliação da angiogênese in vitro, a proliferação das células endoteliais foi avaliada por meio do teste WST-1^{26, 40}, método mais preciso e rápido de ser aplicado quando comparado ao teste do MTT⁵⁴. A formação de estruturas semelhantes a tubos vasculares (*sprouts*) também foi examinada pelo teste de *sprouting* por já ter sido utilizado com sucesso em outros estudos^{30, 47, 52, 58}.

Regulação da expressão do fator transcricional HIF-1alfa e de fatores angiogênicos por células pulpares humanas em condições de hipóxia

Semenza, Wang (1992)⁷² mostraram que a transcrição do gene humano da eritropoietina (EPO), responsável pela regulação da produção de eritrócitos e desta forma, importante para o aumento do transporte de oxigênio tecidual, é regulada pela hipóxia e mediada pelo fator de transcrição HIF-1alfa. Seguindo este raciocínio, a regulação da angiogênese pela hipóxia ocorre principalmente através da ativação do fator HIF-1^{10, 19, 62, 75}. Em outras palavras, o fator HIF-1alfa coordena

respostas transcricionais homeostáticas em condições de hipóxia ²⁵, regulando a expressão de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF ^{10, 25, 43, 45, 50, 92}, bFGF ^{10, 21}, Angiopoietinas 1, 2 e 4 ^{70, 92}, IGF2 ⁷⁰, PDGF-B ^{10, 70}, PGF ⁷⁰, e receptores como o VEGFR2 ⁷⁰ e EGFR ¹⁰.

A regulação da expressão gênica pelo fator HIF-1alfa foi apontada como célula-dependente ⁴⁶. Por esta razão, o fator transcricional HIF-1alfa foi selecionado, no presente estudo, para análise da atividade angiogênica das células DPSC e HDPF, uma vez que existem poucos estudos que se concentraram na expressão do HIF-1alfa e na sua regulação de expressão gênica em células pulpares ¹ e nenhuma pesquisa envolvendo as células DPSC.

O VEGF é um potente fator de crescimento regulador da angiogênese, sendo responsável pela proliferação ⁹³, diferenciação ^{64, 93}, sobrevivência ^{28, 58} e formação de *sprouts* pelas células endoteliais ^{11, 37, 47, 55, 63, 74, 93}. Da mesma forma, também foi observado o papel do bFGF na proliferação ³⁵, diferenciação ^{35, 44}, migração e *sprouting* ³⁵ das células endoteliais.

Assim, a expressão de ambos os fatores de crescimento VEGF e bFGF pelas células DPSC e HDPF foi examinada no presente estudo em decorrência de suas atividades mitogênicas. Adicionalmente, embora existam alguns estudos mostrando a expressão do VEGF ^{6, 7, 83, 84} e bFGF

^{83, 84} por células pulpares, a presente pesquisa mostrou pela primeira vez a secreção dos fatores angiogênicos pelas DPSCs.

O aumento da expressão do HIF-1alfa nas células DPSC e HDPF submetidas a diferentes períodos de hipóxia, observado no presente estudo, corrobora com os resultados obtidos em outros estudos realizados com tipos celulares diferentes, como em células de hepatoma humano ^{42, 71, 87, 88, 90} e em fibroblastos de camundongos ³². A importância dos dados obtidos no presente estudo reside especialmente no fato de se ter mostrado também a ativação do HIF-1alfa nas DPSCs e HDPFs em condições de hipóxia, nas quais o fator transcricional obteve expressão máxima no tempo de 4 horas, conforme ocorrido em estudos anteriores ^{71, 87, 88}, e declínio após 8 horas ⁹⁰. No estudo de Wang et al. ⁹⁰ (1995), os autores mostraram expressão máxima do HIF-1alfa e HIF-1beta nas primeiras 2 horas de hipóxia e ao tratarem as células de hepatoma humano com cloreto de cobalto, substância esta utilizada para mimetizar a ação da hipóxia ^{87, 88, 89}. Os autores mostraram ainda que a expressão do HIF-1alfa também atingiu nível máximo após 4 horas de hipóxia. Outro fator a ser apontado, é a concentração de oxigênio utilizada para o cultivo das células para criar ambiente hipóxico. Jiang et al. ⁴² (1996) demonstraram que a atividade de ligação do HIF-1alfa ao DNA, fundamental para sua dimerização e posterior acúmulo no núcleo celular e as proteínas nucleares HIF-1alfa e HIF-1beta tiveram, respectivamente, sua atividade e expressões

aumentadas proporcionalmente à redução do oxigênio, tendo resposta média entre 1,5-2% de O₂ e resposta máxima a 0,5% de O₂. Sob condições de hipóxia severas, como concentração de oxigênio inferior a 0,01%, as células parecem não sobreviver, iniciando cascata de eventos que levam a morte celular por apoptose. Entretanto, as células submetidas a 0,01-2% de O₂ não ativaram o mecanismo da apoptose como observado por Greijer, van der Wall ³¹ (2004).

No presente estudo, as células DPSC e HDPF foram cultivadas a 1% de O₂ em uma câmara de hipóxia conforme realizado em outros trabalhos ^{14, 32, 41, 50, 71, 80, 90, 92}. Tem sido demonstrado que durante a redução dos níveis de oxigênio, mecanismos de sobrevivência celular são ativados na tentativa de se manter a homeostase celular e tecidual ²⁹. Inicialmente, após a percepção da queda do nível de oxigênio, uma série de processos moleculares de defesa ocorrem, como queda de cerca de 90% da biossíntese protéica e redução generalizada da permeabilidade da membrana citoplasmática, processos pelos quais há economia da energia, em forma de ATP, requerida para o metabolismo e sobrevivência celular. Adicionalmente, ocorre supressão coordenada do suprimento de ATP ^{29, 80}, mantendo equilíbrio entre suprimento-demanda e ativação de fatores transcricionais como os da família HIF-1 ^{29, 39}. O fator HIF-1alfa apresenta papel crítico na angiogênese ^{17, 25, 46, 50, 92}, processo fundamental para o re-equilíbrio homeostático tecidual, pois ocorre formação de novos vasos

sanguíneos a partir de vasos pré-existent, aumentando o transporte e suprimento de oxigênio local ²⁹. A regulação da angiogênese pelo HIF-1alfa ocorre por meio da ativação da expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos e de seus receptores por diferentes tipos celulares ^{14, 17, 25, 46, 50}. Portanto, em função da regulação gênica do fator transcricional, na presente pesquisa, a regulação da ativação dos fatores angiogênicos VEGF e bFGF pelo HIF-1alfa foi examinada nas células DPSC e HDPF. Assim, foi demonstrado que as células DPSC e HDPF quando cultivadas em condições de hipóxia (1% de O₂) aumentaram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), oito e três vezes, respectivamente, comparando-se às células cultivadas em normóxia, resultado em concordância com os obtidos por outros estudos envolvendo células pulpares ⁶ e outras linhagens celulares ^{17, 25, 42, 43, 46, 92}. Estudos demonstraram que fibroblastos de polpas dentárias humanas ⁸³ e células extraídas de polpas de terceiros molares humanos ⁸⁴ foram capazes de secretar VEGF e bFGF em normóxia, aumentando o nível de expressão após injúria mecânica ^{83, 84}, resultado consistente com o do presente estudo ao cultivar os fibroblastos humanos em hipóxia.

Quanto às células DPSC, não foram encontradas pesquisas anteriores, o que nos leva a supor que esta seja a primeira vez que tais células são avaliadas quanto à respostas à hipóxia e à expressão de fatores angiogênicos.

Para examinar o papel do fator transcricional HIF-1alfa na expressão do VEGF, sua atividade foi inibida através do tratamento das DPSCs e HDPFs com 40µM de YC-1. Os resultados apontaram inibição do HIF-1alfa nas células DPSC e HDPF e posterior redução estatisticamente significativa da expressão do VEGF pelas DPSCs em hipóxia, o que não ocorreu para os fibroblastos. Este fato poderia ser explicado pela existência e o envolvimento de outros mecanismos reguladores da expressão do VEGF nos fibroblatos em condições de hipóxia, além da regulação transcricional do HIF-1alfa. A regulação da expressão do VEGF pelo fator HIF-1alfa foi observada em estudo *in vitro* com fibroblastos sinoviais de ATM humana que induziram a expressão dos isoformes VEGF 121 e VEGF 165 ⁴⁵. Em estudo *in vivo*, foi demonstrado aumento de 13 vezes na secreção de VEGF total e de 6-9 vezes na secreção de isoformes específicos (VEGF 188, 144, 164 e 120), através da utilização de camundongos transgênicos expressando de forma constitutiva o HIF-1alfa ¹⁹.

Vale ressaltar a importância do HIF-1alfa na regulação da hipóxia e expressão do VEGF pelas células DPSC. Embora não existam outros estudos nesta direção com as células DPSC, pesquisa realizada por Dai et al. ¹⁷ (2007) demonstrou aumento significativo da secreção de VEGF associado ao aumento da expressão do HIF-1alfa por células-tronco da medula óssea (BMSC) em condições de anóxia e hipóxia de forma

tempo-dependente. Ao inibirem a atividade do HIF-1alfa através da substância química 2-ME2, a secreção do VEGF pelas BMSCs foi atenuada parcialmente, o que está de acordo com o presente estudo para as DPSCs.

A escolha da concentração do inibidor do fator de transcrição foi realizado após pré-tratamento das células examinadas com diferentes concentrações de YC-1 e associação dos resultados da viabilidade celular pelo teste WST-1 com os resultados da expressão do HIF-1alfa por meio da análise do western blot. Tanto para as células DPSC, quanto para as HDPF, a concentração de 40µM do YC-1 (Tabela 4, Figura 8 e 9) foi selecionada por inibir a expressão do HIF-1alfa, mantendo as células viáveis. Por outro lado, resultados diferentes foram observados em estudo realizado por Chun et al.¹³ (2001), onde a inibição do fator HIF-1alfa ocorreu quando concentrações superiores a 100µM de YC-1 foram utilizadas, sendo que em concentrações menores do que 25µM de YC-1, não houve alteração da expressão do fator transcricional. Provavelmente, a inconsistência dos resultados dos dois estudos ocorreu pela avaliação de diferentes tipos celulares, tendo Chun et al.¹³ (2001) examinado a inibição do HIF-1alfa pelo YC-1 em células de hepatoma humano, sugerindo que a concentração para inibição do HIF-1alfa pelo YC-1 é célula-dependente.

No presente estudo, a expressão do VEGF pelos fibroblastos foi 12

vezes maior do que pelas DPSCs em normóxia e 5 vezes maior do que as DPSCs durante hipóxia. Como não existem outros estudos de observação da expressão de VEGF pelas DPSCs, apenas sugere-se que a secreção de VEGF poderia ser maior em células mais especializadas do que nas células indiferenciadas, como é o caso das células-tronco de polpas dentárias humanas. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Na presente pesquisa, não foi observada diferença na expressão do bFGF em ambas as linhagens celulares em condições de normóxia e hipóxia, resultado este que contraria os dados científicos obtidos por Bos et al.¹⁰ (2005). Estes autores determinaram a associação entre o fator HIF-1alfa e a expressão de bFGF e PDGF-BB em células de câncer isquêmico invasivo de mama. Adicionalmente, Potier et al.⁶⁵ (2008) observaram que ao tratar células do estroma da medula óssea (BMSCs) em normóxia com DFX (desferroxamina), substância queladora de ferro que participa do processo de acúmulo do HIF-1alfa²⁰, a expressão protéica do bFGF foi aumentada, mas as células pré-tratadas com DFX e cultivadas em hipóxia aumentaram em 50% a expressão de VEGF e não do bFGF. Os resultados do presente estudo, entretanto, foram consistentes com a pesquisa desenvolvida por Fang et al.²¹ (2001) que demonstraram a regulação transcricional da expressão do VEGF, mas não do bFGF, pelo HIF-1alfa em células de condrosarcoma de ratos. Pode-se sugerir que a

diferença de resultados entre as pesquisas esteja relacionada com os variados tipos celulares envolvidos nos estudos, já que se sabe que a regulação da expressão gênica pelo HIF-1 α é célula- dependente⁴⁶.

Avaliação do efeito de células pulpares humanas em hipóxia na proliferação e *sprouting* de células endoteliais.

O efeito das células pulpares examinadas no presente estudo sobre a proliferação e *sprouting* das células endoteliais foi avaliado através do tratamento das HDMECs com os meios de acondicionamento das DPSCs e HDPFs, quando submetidas à normóxia ou à hipóxia. Como observado na Tabela 6 e Figura 11, o aumento da proliferação das células HDMEC foi tempo-dependente em todos os tratamentos realizados. Após 48 horas de normóxia ou hipóxia, as células-tronco estimularam a proliferação das HDMECs quando comparadas com o grupo controle em 78% e 67%, respectivamente. Enquanto que após 72 horas, os fibroblastos em hipóxia aumentaram em 13% a proliferação celular em relação a condição de normóxia e 83% quando comparados ao controle. Estes resultados sugerem que a secreção de fatores angiogênicos solúveis no meio de cultura pelos fibroblastos, especialmente em condições hipóxicas, contribuiu para a proliferação das células endoteliais após 72 horas. Quando a resposta de uma linhagem de células de mamíferos submetidas a 1% de O₂ foi avaliada, a supressão da proliferação celular e a perda

significante de viabilidade das células foi observada após 12 horas de hipóxia e morte celular após 48 horas⁸⁰. Os resultados deste estudo foram consistentes com o de Ueno et al.⁸⁶ (2006), os quais observaram que células pulpare de ratos colocadas em condições de hipóxia por 24 e 48 horas tiveram crescimento celular interrompido e posterior morte celular. Os resultados das duas pesquisas apresentadas reforçam a hipótese explicativa dos resultados do presente estudo quanto a presença de fatores de crescimento pró-angiogênicos nos meios de acondicionamento das células pulpare em normóxia e hipóxia e significativamente nos meios de acondicionamento de fibroblastos em hipóxia, os quais estimularam a proliferação das HDMECs. A proliferação das HDMECs foi maior quando estimuladas pelas células HDPF em hipóxia e não pelas DPSCs, provavelmente pela maior secreção de VEGF no meio de cultura pelos fibroblastos do que pelas células DPSC, o que significa maior concentração do fator de crescimento VEGF no meio de acondicionamento dos fibroblastos utilizado para o tratamento das HDMECs. Esta hipótese é consistente com o estudo de Koch et al.⁴⁷ (2005) que mostraram estimulação da proliferação de células endoteliais pelo fator angiogênico VEGF. Por outro lado, Haspel et al.³⁷ (2002) ao bloquearem receptores tirosina-kinase para VEGF (VEGFR2-KDR), observaram inibição da proliferação e migração de células endoteliais, demonstrando a importância do VEGF na proliferação de células endoteliais. Outra

hipótese explicativa para a estimulação da proliferação das HDMECs pelos fibroblastos seria a presença de outros fatores de crescimento além do VEGF secretados pelas células HDPF em hipóxia no meio de cultura, não observados neste estudo, mas que podem ter contribuído para o aumento da proliferação das células endoteliais como por exemplo, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AB), o qual foi secretado 1,5 vezes a mais por células pulpareis mecanicamente danificadas quando comparado ao VEGF⁸⁴. Estudos com inibidores específicos de sinalização do VEGF são necessários para determinar a participação deste fator de crescimento na indução de *sprouting*, observada quando DPSC e HDPF foram tratados com meio de condicionamento.

A formação de estruturas semelhantes a tubos capilares (*sprouts*) observada na presente pesquisa foi significativamente maior no quinto dia de observação, quando as células endoteliais foram tratadas pelo meio de condicionamento das células HDPF em hipóxia e pelo meio de cultura acrescido de 50 ng de VEGF (grupo controle positivo). Por outro lado, a partir do quinto dia, as células endoteliais e as estrutura formadas entraram em regressão, seguida de morte celular. O fato dos fibroblastos em hipóxia mostrarem maior secreção do VEGF (1447pg/mL) do que as células-tronco pulpareis (288ng/mL) e da expressão de bFGF ter sido equivalente em ambos os tipos celulares, poderia explicar a maior estimulação do *sprouting* das HDMECs pelos HDPFs em hipóxia. Entretanto, outros

determinantes da proliferação de estruturas vasculares no meio de cultura, ou seja, a expressão de outros fatores de crescimento, além do VEGF e bFGF, não examinados neste estudo, podem de alguma forma também estar relacionados à angiogênese. Estudo *in vivo* com embriões heterozigotos com ausência de um alelo do fator de crescimento VEGF mostrou que a ausência de VEGF não interrompeu a vascularização, entretanto o desenvolvimento de vasos sanguíneos anormais foi observado, indicando a importância do VEGF na angiogênese e reforçando a teoria da importância de outros fatores de crescimento no processo multi-eventos da angiogênese ¹¹. Os dados científicos obtidos na presente pesquisa corroboram com estudo prévio, o qual demonstrou que o contato indireto de fibroblastos pulpaes humanos (meio de acondicionamento dos HDPF) com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) em matrigel promoveu organização das HUVECs e aumento da formação de estruturas capilares ⁸³. Tran-Hung et al. ⁸³ (2006) demonstraram que o contato direto de ambas as linhagens celulares não se fez necessário, mas que os fatores solúveis secretados pelos HDPFs no meio de cultura é que promoveram a angiogênese, corroborando com o método do presente estudo de utilização de meios de acondicionamento celulares para a avaliação da angiogênese *in vitro*. Através de metodologia semelhante, Goldstein et al. ³⁰ (2005) mostraram que o cultivo de células endoteliais microvasculares humanas (HMVECs) em meio de acondicionamento de células de melanomas

associados a fibroblastos de pele humana, contribuiu para o aumento significativo das respostas vasculares das HMVECs. O meio de acondicionamento dos fibroblastos estimulou a migração e a invasão das HMVECs na matriz, reforçando o papel importante dos HDPFs durante a angiogênese. No mesmo ano, na tentativa de criarem extensas estruturas vasculares tri-dimensionais, McCloskey et al.⁵² (2005) suspenderam células endoteliais derivadas de células embrionárias em colágeno tipo 1, ao invés de apenas implantá-las sobre os géis, como realizado na presente pesquisa. Nesta técnica, McCloskey et al.⁵² (2005) identificaram os primeiros vasos entre os dias 3 e 5 de observação, os quais apresentaram lúmens intra- e inter-celulares. No presente estudo, os primeiros *sprouts* formados pelas HDMECs foram observados já nas primeiras 24 horas após os diferentes tratamentos das células endoteliais. Entretanto, a técnica empregada nesta pesquisa não permitiu melhor caracterização das estruturas tubulares como realizada por McCloskey et al.⁵² (2005) por meio de imagens histológicas e de fluorescência das estruturas vasculares formadas nos géis de colágeno tri-dimensionais. Assim como demonstrado na presente pesquisa, McCloskey et al.⁵² (2005) observaram regressão das estruturas vasculares, o que provavelmente tenha ocorrido devido à ausência de outras células fundamentais para maturação e remodelação dos vasos formados, como os periócitos, caracterizados em estudo in vivo de

vascularização em retina pós-natal de ratos ⁹, apontando uma limitação de estudos de angiogênese in vitro.

Adicionalmente, foi possível demonstrar na presente pesquisa, o aumento da formação de *sprouts* quando as HDMECs foram cultivadas nos meios de condicionamento das células DPSC, em hipóxia ou normóxia, quando comparado com o *sprouting* das HDMECs cultivadas apenas em meio de cultura EGM-2MV (grupo controle negativo). Com a finalidade de avaliar o papel das DPSCs na angiogênese, num estudo in vivo, DPSCs foram injetadas em miocárdios infartados de ratos e após 30 dias, houve redução da área infartada e aumento do número de vasos sanguíneos no local, indicando melhora na função cardíaca dos animais e sugerindo o uso das DPSCs para o tratamento de injúrias isquêmicas ²⁷. Todavia, a ausência de estudos sobre vascularização pulpar in vitro envolvendo células DPSC dificulta a discussão dos resultados obtidos neste estudo.

O processo da angiogênese é regulado por uma variedade de fatores de crescimento que estimulam degradação da matriz extracelular ao redor dos vasos sanguíneos, migração, proliferação e organização das células endoteliais ^{24, 68}. Por esta razão, embora os estudos in vitro sejam fundamentais para o maior entendimento dos processos moleculares envolvidos na angiogênese, eles apresentam limitações, enquanto que os estudos in vivo podem fornecer maior contribuição para caracterização deste processo. Nör et al. ⁵⁸ (1999) demonstraram o efeito do VEGF na

sobrevivência das células endoteliais envolvidas na angiogênese por meio da expressão de vários membros da família de fatores anti-apoptóticos Bcl-2. A partir deste resultado, um modelo para angiogênese humana fisiológica e patológica, *in vivo*, foi desenvolvido em camundongos imunodeprimidos ⁵⁹, utilizando matrizes porosas de ácido poli-L-lático para a implantação de células endoteliais. Os autores demonstraram organização das HDMECs por volta do quinto dia pós-implante nos camundongos e diferenciação em microvasos funcionais após 7 a 10 dias.

Apesar das limitações dos estudos *in vitro*, tais como os realizados na presente pesquisa, foi demonstrado, pela primeira vez, eventos de sinalização molecular em células-tronco pulpares, mostrando a diferença de comportamento dos diferentes tipos de células presentes nos tecidos pulpares durante a angiogênese. Por esta razão, mais estudos devem ser realizados para caracterizar a relação entre as células pulpares e a formação de estruturas vasculares e para identificar outros fatores angiogênicos ativados nas células pulpares quando submetidas à hipóxia. Desta forma, espera-se que os mecanismos examinados na presente pesquisa possam futuramente ser ativados terapeuticamente para potencializar a revascularização de tecidos pulpares danificados por trauma dentários, especialmente em avulsões dentárias, contribuindo clinicamente para o prognóstico no tratamento das injúrias traumáticas que

envolvem rompimento do feixe vâsculo-nervoso e redução do suprimento de oxigênio tecidual.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais da presente pesquisa, foi possível concluir que o fator transcricional HIF-1alfa é induzido em resposta à hipóxia nas células pulpare humanas examinadas, DPSCs e HDPFs. A transcrição do fator pró-angiogênico VEGF foi regulada pelo HIF-1alfa nos fibroblastos. As células pulpare humanas foram capazes de aumentar a proliferação e a formação de estruturas vasculares pelas células endoteliais. A hipóxia foi suficiente para induzir o potencial angiogênico de células pulpare humanas, sendo demonstrado pela primeira vez nas células-tronco DPSC.

REFERÊNCIAS *

1. Amemiya K, Kaneko Y, Muramatsu T, Shimono T, Inoue T. Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111:332-8.
2. Andreasen JO, Borum MK, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 3. Factors related to root growth. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11:69-75.
3. Andreasen JO, Andreasen FM, Bakland LK, Flores MT. Traumatic dental injuries 2nd ed. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; 2000.
4. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11:51-8.
5. Andreasen FM, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11:59-68.
6. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11:76-89.
7. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2002; 25:20-3.
8. Baumgardner KR, Walton RE, Osborne JW, Born JL. Induced hypoxia in rat pulp and perapex demonstrated by ³H-Misonidazole retention. *J Dent Res.* 1996; 75:1753-60.
9. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 1998; 125:1591-8.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor 1 α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology*. 2005; 46:31-6.
11. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kreckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380:435-9.
12. Chappuis V, von Arx T. Reimplantation of 45 avulsed permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Dent Traumatol*. 2005; 21:289-96.
13. Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CM, Bae JM, Kim MS, et al. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem Pharmacol*. 2001; 61:947-54.
14. Cipriano TJ, Walton RE. The ischemic infarct pulp of traumatized teeth: a light and electron microscopic study. *Endod Dent Traumatol*. 1986; 2:196-204.
15. Claus I, Laureys W, Cornelissen R, Dermaut LR. Histologic analysis of pulpal revascularization of autotransplanted immature teeth after removal of the original pulp tissue. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004; 125:93-9.
16. Cohenca N, Roger RA, Roger R. The incidence and severity of dental trauma in intercollegiate athletes. *J Am Dent Assoc*. 2007; 138:1121-6
17. Dai Y, Xu M, Wang Y, Pasha Z, Li T, Ashraf M. HIF-1 α induced-VEGF over-expression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42: 1036-44.
18. Derringer KA, Linden RWA. Enhanced angiogenesis induced by diffusible angiogenic growth factors released from human dental pulp explants of orthodontically moved teeth. *Eur J Orthod*. 1998; 20:357-67.

19. Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS et al. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev.* 2001; 15:2520-32.
20. Fandrey J, Frede S, Ehleben W, Porwol T, Acker H, Jelkmann W. Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species. *Kidney Int.* 1997;51:492-6.
21. Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. HIF-1 α -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001; 61:5731-5.
22. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25:581-611
23. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161:851-8.
24. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267:10931-4.
25. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996; 16:4604-13.
26. Fukuyama Y, Ohta K, Okoshi R, Kizaki H, Nakagawa K. Hydrogen peroxide induces expression and activation of AMP-activated protein kinase in a dental pulp cell line. *Int Endod J.* 2008; 41:197-203.
27. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 2008; 26:638-45.
28. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:13313-6.

29. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004; 18:2183-94.
30. Goldstein LJ, Chen H, Bauer RJ, Bauer SM, Velazquez OC. Normal human fibroblasts enable melanoma cells to induce angiogenesis in type I collagen. *Surgery.* 2005; 138:439-49.
31. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* 2004; 57:1009-14.
32. Greijer AE, Groep PV, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol.* 2005; 206: 291-304.
33. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS.* 2000; 97:13625-30.
34. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde, A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81:531-5.
35. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EM, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP et al. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ.* 1996; 7:146-60.
36. Hargreaves KM, Seltzer S, Goodis HE. Seltzer and Blender's dental pulp. Chicago: Quintessence; 2002. 512p.
37. Haspel, HC, Scicli GM, McMahon G, Scicli GM. Inhibition of vascular endothelial growth factor-associated tyrosine kinase activity with SU5416 blocks sprouting in the microvascular endothelial cell spheroid model of angiogenesis. *Microvasc Res.* 2002; 63:304-15.
38. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 59: 15-26.

- 39.Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:9493-8.
- 40.Höper J. Spectrophotometric in vivo determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiol Meas.* 1997; 18:61-6.
- 41.Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 1996; 271(Cell Physiol 40): C1172-C80.
- 42.Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271:17771-8.
- 43.Jones A, Fujiyama C, Blanche C, Moore JW, Fuggle S, Cranston D, et al. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:1263-72.
- 44.Kanda S, Landgren E, Ljungstrom M, Claesson-Welsh L. Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cells line established from tsA58 large T transgenic mice. *Cell Growth Differ.* 1996; 7:383-95.
- 45.Ke J, Liu Y, Long X, Li J, Fang W, Meng Q et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint by hypoxia. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36:290-6.
- 46.Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res.* 2003; 93:1074-81.

47. Koch S, Yao C, Grieb G, Prevel P, Noah EM, Steffens GCM. Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. *J. Mater Sci Mater Med.* 2006; 17:735-41.
48. Levin L, Samorodnitzky GR, Schwartz-Arad D, Geiger SB. Dental and oral trauma during childhood and adolescence in Israel: occurrence, causes and outcomes. *Dent Traumatol.* 2007; 23:356-9.
49. Lin S, Levin L, Goldman S, Peleg K. Dento-alveolar and maxillofacial injuries: a 5-year multi-center study. Part 1: general vs facial and dental trauma. *Dent Traumatol.* 2008; 24:53-5.
50. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan, L, Kelly BD, Ye SQ et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia. *Blood.* 2005; 105:659-69.
51. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, et al. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res.* 2000;79:1596-603.
52. McCloskey KE, Gilroy ME, Nerem RM. Use of embryonic stem cell-derived endothelial cells as a cell source to generate vessel structures in vitro. *Tissue Eng.* 2005;11:497-504.
53. Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Presta M, Rifkin DB. Multiple forms of an angiogenesis factor: basic fibroblast growth factor. *Biochimie.* 1988; 70:83-7.
54. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55-63
55. Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol.* 1994; 145:1023-9.
56. Nicosia RF, Zhu WH, Fogel E, Howson KM, Aplin AC. A new ex vivo model to study venous angiogenesis and arterial-venous anastomosis formation. *J Vasc Res.* 2005; 42:111-9.

57. Nillesen STM, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*. 2007; 28:1123-31.
58. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini 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;154:375-84.
59. Nör JE, 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; 81:453-63.
60. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2006; 10:588-612.
61. Oishi K, Kobayashi A, Fujii K, Kanehira D, Ito Y, Uchida MK. Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells. *J. Pharmacol Sci*. 2004; 96:208-18.
62. Pan SL, Guh JH, Peng CY, Wang SW, Chang YL, Cheng FC et al. YC-1 [3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole] inhibits endothelial cell functions induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 314:35-42.
63. Peters KG, de Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90:89159.
64. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005; 80:836-42.
65. Potier E, Ferreira E, Dennler S, Mauviel A, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Desferrioxamine-driven upregulation of angiogenic factor expression by human bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2:272-8

- 66.Presta M, Rusnati M, Gualandris A, Dell'Era P, Urbinati C, Coltrini D et al. Human basic fibroblast growth factor: structure-function relationship of an angiogenic molecule. *Angiogenesis: Molec Biol Clin Aspec.* 1994; 39-54.
- 67.Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003; 9: 677-84.
- 68.Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386:671-4.
- 69.Ritter ALS, Ritter AV, Sigurdsson V, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol.* 2004; 20:75-84.
- 70.Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature.*1987; 3225:257-9.
- 71.Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology.* 2004; 19:176-82.
- 72.Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12:5447-54.
- 73.Senger DR, Perruzzi Ca, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46:5629-32.
- 74.Shi YH, Bingle L, Gong LH, Wang YX, Corke KP, Fang WG. Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells. *Pathology.* 2007; 39:396-400.
- 75.Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P et al. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res.* 2002; 54:576-83.

- 76.Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.*2003; 67:678-89.
- 77.Stanley HR. Pulp capping: conserving the dental pulp – Can It be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;68:628-39
- 78.Stanley HR, Weisman MI, Michanowicz AE, Bellizzi R. Ischemic infarction of the pulp: sequential degenerative changes of the pulp after traumatic injury. *J Endod.* 1978; 4:325-35.
- 79.Strobl H, Moschen I, Emshoff ER , Emshoff R. Effect of luxation type on pulal blood flow measurements: a long-term follow-up of luxated permanent maxillary incisors. *J Oral Rehabil.* 2005; 32:260-5.
- 80.Swiderek H, Logan A, Al-Rubeai M. Cellular and transcriptomic analysis of NS0 cell response during exposure to hypoxia. *J Biotechnol.* 2008, 134:103-11.
- 81.Tisher E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991; 266:11947-54.
- 82.Tompach PC, Lew D, Stoll JL. Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26:82-6.
- 83.Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res.* 2006; 85:819-23.
- 84.Tran-Hung L, Laurent P, Camps, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol.* 2008; 53:9-13.
- 85.Trubiani O, Tripodi D, Delle Fratte T, Caputi S, Di Primio R. Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res.* 2003; 82: 742-7.

86. Ueno Y, Kitamura C, Terashita M, Nishihara T. Re-oxygenation improves hypoxia-induced pulp cell arrest. *J Dent Res.* 2006; 85:824-8.
87. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem.* 1993; 268:21513-8.
88. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:4304-8
89. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995; 270:1230-7.
90. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:5510-4.
91. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSC) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials.* 2006; 27:3766-81.
92. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res.* 2003; 93:664-73.
93. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamyia A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol.* 2003; 95:2081-8.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 22 de setembro de 2008.

ANDREZA MARIA FÁBIO ARANHA