

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR

João Vitor Paes Rettore

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA.**

Juiz de Fora – MG

2019

JOÃO VITOR PAES RETTORE

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA.**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Coorientador: Prof. Dr. Fernando de Sá Silva

Juiz de Fora – MG

2019

DEDICATÓRIA

À Marina Ferrara, minha esposa, companheira, amiga e professora, por ser
minha base e meu conforto nessa vida;

À minha mãe e meus irmãos Lucciano e Fernando, por me ensinarem o que é
companheirismo e amizade;

Aos meus cães e gatos, por me ensinarem qual é a natureza da felicidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Maranduba e Prof. Dr. Fernando de Sá Silva, por toda a amizade, disposição, ensinamentos, conhecimento e confiança;

Aos “co-orientadores” Prof. Dr. Gilson Macedo e Profa. Dra. Wanessa Araújo Carvalho, por terem me dado todo suporte técnico e laboratorial nas horas que mais precisei;

Aos Professores Valquiria Pereira de Medeiros e Mateus Rodrigues Pereira, pela disponibilidade, boa vontade e por aceitarem o convite de participar dessa etapa tão importante;

Ao amigo e “ex-e-sempre-orientador” Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos, por toda amizade, conhecimento, risadas e cervejas;

Aos amigos do coração Prof. Dr. José Marcello Salabert, Bia e Pedro, por todos os ótimos momentos juntos ao longo desses anos;

Aos amigos Ju, Elyabe e Silvioney, por todas as vezes que me salvaram;

Aos amigos do GENETEC e da UFJF, por estarem sempre disponíveis a ajudar;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos concedida (processo# 442142/2014-5);

Ao Departamento de Biologia da UFJF, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho;

À minha mãe e meus irmãos, por serem mais do que família e amizade multiplicados;

À minha Tia Lu, Tio Rogério e à minha prima Vivi, por alguns dos melhores momentos desses últimos 5 anos;

À minha família, pelo amor, segurança, suporte e apoio de todos;

À Marina, minha esposa e companheira de vida, por ser muito mais do que
minha esposa, por todo o companheirismo, paciência, felicidade e
ensinamentos, que me tornam uma pessoa melhor a cada dia.

♪ Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte
Porque apesar de muito moço me sinto são e salvo e forte
E tenho comigo pensado Deus é brasileiro e anda do meu lado
E assim já não posso sofrer no ano passado
Tenho sangrado demais, tenho chorado pra cachorro
Ano passado eu morri mas esse ano eu não morro ♪

Sujeito de Sorte, Belchior

RESUMO

O sistema de sinalização de canabinóides endógeno (eCBS) é composto por moléculas endocanabinóides que interagem com os receptores CB1 e CB2 acoplados à proteína G, estando presente em diversos tecidos e tipos celulares, entre eles em células do sistema nervoso central (SNC), sistema imune e células-tronco mesenquimais (MSC). A presença desses receptores, em específico, tanto em células do sistema imune como em células-tronco pode ser indício do caminho de sinalização celular pelo qual os dois sistemas se comunicam. Ultimamente houve crescimento de tratamentos de diversas doenças relacionadas ao SNC utilizando derivados de canábis, como o canabidiol, demonstrando resultados positivos. No entanto, não sabemos os reflexos dos tratamentos que envolvem o eCBS em outros tipos celulares. Existe assim a necessidade do entendimento dessa comunicação, bem como dos efeitos sistêmicos e prováveis efeitos colaterais relacionados à estimulação desses receptores, uma vez que o estímulo dos mesmos pode influenciar a ativação e resposta de células-tronco de polpa dentária humana (DPSC). Tais conhecimentos formam ainda a base para uma melhor compreensão do efeito medicinal da canábis, contribuindo no esclarecimento de sua ação por exemplo em doenças neurodegenerativas e no desenvolvimento de novos medicamentos. O presente trabalho objetivou então avaliar os efeitos de agentes estimulatórios e inibitórios dos receptores canabinóides sobre a resposta imunológica e proliferativa das DPSC. Para tal, DPSC humanas foram isoladas da polpa dentária e caracterizadas para confirmação de sua identidade como células-tronco (CT). As DPSC foram então cultivadas na presença ou ausência de um agonista (anandamida) e de antagonistas (AM251 e SR144528) dos receptores CB1 e CB2 do eCBS, sob estímulo ou não de TNF- α . Para análise da imunomodulação, moléculas de superfície ligadas à imunossupressão (HLA-DR, PD-L1, PD-L2) foram mensuradas por citometria de fluxo. Paralelamente, a expressão de mRNA relacionado às moléculas do eCBS foi verificada por *Real time* RT-PCR, bem como a expressão para as citocinas TGF- β e IL-6. Ainda, a taxa de proliferação das DPSCs em estudo também foi avaliada. A caracterização das células isoladas confirmou sua identidade como CT. A citometria para os marcadores HLA-DR, PD-L1 e PD-L2 indicou que as DPSCs expressam esses marcadores em sua superfície celular e que sua expressão responde diferencialmente ao estímulo do eCBS, bem como à presença de TNF- α , o que comprova o papel desse sistema na influência do perfil imunomodulador atribuído às DPSCs. A análise da expressão gênica para os componentes do eCBS forneceu uma compreensão detalhada do funcionamento do sistema em DPSCs em termos de sua autorregulação, e em termos de sua resposta à presença de TNF- α . Isso permitiu confirmar que o eCBS é um sistema presente e funcionalmente ativo em DPSCs, envolvido diretamente com a imunomodulação. A análise da expressão gênica para as citocinas TGF- β e IL-6 mostrou que as DPSCs expressam os genes para estas citocinas mesmo quando cultivadas sem estímulo específico. Mostrou também que essa expressão é profundamente alterada como resposta aos estímulos do eCBS e ao estímulo por TNF- α , indicando mais uma vez o papel desse sistema na coordenação da resposta

celular de DPSCs, em especial relativa à imunomodulação. A análise da taxa de proliferação das DPSCs frente aos estímulos do eCBS e ao estímulo por TNF- α mostrou que o eCBS não é capaz de afetar significativamente a proliferação das DPSCs, mas o TNF- α sim. A análise conjunta desses dados indica que o eCBS presente nas DPSCs não só responde ao estímulo imunológico, como também altera moléculas chave da resposta imune, fornecendo os estímulos necessários para que as DPSCs atuem na coordenação do ambiente inflamatório.

Palavras-chave: Células-tronco. Polpa de dente. Imunomodulação. Canabinóide.

ABSTRACT

The endogenous cannabinoid signaling system (eCBS) is composed of endocannabinoid molecules that interact with G-protein coupled receptors CB1 and CB2, and it is present in many tissues and cell types, including central nervous system (CNS) cells, the immune system cells and mesenchymal stem cells (MSC). The presence of such receptors in both immune and stem cells may be indicative of the cellular signaling pathway through which the two systems communicate. Lately there has been shown a growth in treatments of various CNS-related diseases using cannabis derivatives such as cannabidiol, showing positive results. However, we still do not know the consequences of treatments involving eCBS in other cell types. Thus, there is a need to understand such communication, as well as the systemic and related side effects upon receptors stimulation, since it may influence the activation and response of human dental pulp stem cells (DPSC). Such knowledge also form the basis for a better understanding of cannabis medicinal effects, contributing to clarify its action for example in neurodegenerative diseases and also in the development of new medicines. Thus, the present study aims at evaluating the effects of cannabinoid receptor stimulatory and inhibitory agents upon DPSC immune and proliferative responses. So, human DPSC were isolated from dental pulp and characterized to confirm their identity as stem cells. DPSC were then cultured in the presence or absence of an agonist (anandamide) and antagonists (AM251 and SR144528) for eCBS receptors, whether or not stimulated by TNF- α . For immunomodulation analysis, immunosuppression-related surface molecules (HLA-DR, PD-L1, PD-L2) were measured by flow cytometry. eCBS components mRNA expression was verified by Real time RT-PCR as well as the expression for TGF- β and IL-6 cytokines. The proliferation rate of DPSCs under study was also evaluated. The characterization of the isolated cells confirmed their identity as stem cells. Cytometry for HLA-DR, PD-L1 and PD-L2 markers indicated that DPSCs express these markers on their cell surface and that their expression responds differentially to eCBS stimulus as well as to the presence of TNF- α , which proves the role of such system in influencing the DPSCs immunomodulatory profile. Gene expression analysis for eCBS-related enzymes and receptors provided a deep and detailed understanding of the system's functioning in DPSCs, both in terms of its self-regulation and its response to the presence of TNF- α . Such results confirmed that eCBS is a present and functionally active system in DPSCs, directly involved with immunomodulation. Gene expression analysis for TGF- β and IL-6 cytokines showed that DPSCs express genes for these cytokines even when cultured without specific stimulation. It also showed that this expression is profoundly altered as a response to eCBS stimuli and TNF- α stimulation, again indicating the role of this system in coordinating the cellular response of DPSCs, especially concerning immunomodulation. Analysis of DPSC proliferation rate under eCBS and TNF- α stimulation showed that eCBS is not able to significantly affect DPSC proliferation, but TNF- α does. The combined analysis of these data indicates that eCBS present in DPSCs not only responds to immune stimulation, but also alters key immune response molecules, providing the necessary stimuli for DPSCs to act in the coordination of such environment.

Keywords: Stem cells. Tooth pulp. Immunomodulation. Cannabinoid.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
2-AGE	2-araquidonil-glicerol-éter, ou noladina
AEA	anandamida
Ago	anandamida, agonista inespecífico de CB1 e CB2
Ant 1	AM251, antagonista específico de CB1
Ant 2	SR144528, antagonista específico de CB2
APC	célula apresentadora de antígenos
ASCs	células-tronco adultas, do inglês <i>Adult Stem Cells</i>
BMSCs	células-tronco mesenquimais da medula óssea, do inglês <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</i>
CB	canabinoides
CB1	receptor canabinoide tipo 1
CB2	receptor canabinoide tipo 2
CBD	canabidiol
CBDV	cannabidivarin
COX-2	ciclo-oxigenase 2
CT	células-tronco
D9THC	delta-9-tetrahydrocannabinol
DAGL α	<i>diacylglycerol lipase alpha</i>
DAGL β	<i>diacylglycerol lipase beta</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DPSCs	célula tronco da polpa dentária, do inglês <i>Dental Pulp Stem Cells</i>
eCBS	sistema canabinoide endógeno
EM	esclerose múltipla
ESCs	células-tronco embrionárias, do inglês <i>Embryonic Stem Cells</i>

FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMSCs	células-tronco do tecido gengival, do inglês <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i>
GPR55	receptor 55 acoplado à proteína G
GPR116	receptor 116 acoplado à proteína G
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLA	antígeno leucocitário humano
HLA-DR	antígeno leucocitário humano DR
HLAG	antígeno leucocitário humano G
HSCs	células-tronco hematopoiéticas, do inglês <i>Hematopoietic Stem Cells</i>
IDO	indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
iDPSC	DPSCs isoladas de polpa dentária inflamada, derivadas de dentes com cárie e pulpite irreversível
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
iPSC	células-tronco pluripotentes induzidas, do inglês <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
LPS	lipopolissacarídeo
MAGL	<i>monoacylglycerol lipase</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MSCs	células-tronco mesenquimais, do inglês <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NADA	N-araquidonil-dopamina
NAPE-PLD	<i>N-acyl-phosphatidylethanolamine-selective phospholipase D</i>
NK	células Natural Killer
NO	óxido nítrico

NSCs	células-tronco neuronais
OA	oleamida
OAE	O-araquidonil-etanolamina, ou virodamina
OD-DPSC	DPSC após sofrerem diferenciação osteogênica
PBMC	célula mononuclear do sangue periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PGE2	prostaglandina E2
PPARs	receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma
SHED	células-tronco de dentes decíduos esfoliados
SNC	sistema nervoso central
TGF-Beta	fator de transformação do crescimento beta, do inglês <i>transforming growth factor beta</i>
Th	linfócitos T auxiliares
THC	delta-9-tetrahidrocanabinol
Thelper	linfócitos T auxiliares
THP-1	linhagem de linfócitos humana
Tnaive	linfócitos T virgens
Treg	linfócitos T reguladores
TRPV1	receptores vanilóides de potencial transitório 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Utilização de Células-Tronco.....	16
1.1.1 Células-Tronco.....	16
1.1.2 células-tronco mesenquimais.....	19
1.1.3 Perfil imunomodulador de células-tronco mesenquimais e sua utilização.....	21
1.1.4 Moléculas de destaque no perfil imunomodulador de células-tronco mesenquimais.....	25
1.1.5 células-tronco da polpa de dente.....	28
1.2 Utilização medicinal de canabinoides.....	33
1.2.1 <i>Cannabis sativa</i> L.....	33
1.2.2 Sistema canabinoide endógeno e suas aplicações.....	39
1.3 Sistema canabinoide e células-tronco.....	44
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Isolamento das DPSCs.....	49
3.2 Caracterização molecular das DPSCs.....	49
3.3 Diferenciação osteogênica das DPSCs.....	51
3.4 Cultura celular e estímulo do sistema canabinoide.....	52
3.5 Avaliação de marcadores celulares por citometria de fluxo.....	53
3.6 PCR em tempo real.....	54
3.7 Análise de Proliferação.....	55
3.8 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das DPSCs.....	57
4.2 Avaliação de marcadores celulares por citometria de fluxo.....	59
4.2.1 HLA-DR.....	60
4.2.2 PD-L1 e PD-L2.....	67
4.3 PCR em tempo real.....	77
4.3.1 Componentes do eCBS.....	77

4.3.2 Citocinas TGF- β e IL-6.....	109
4.4 Análise de proliferação.....	120
5 CONCLUSÃO.....	126
6 REFERÊNCIAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de Células-Tronco

1.1.1 Células-Tronco

No campo da biotecnologia, uma das áreas mais promissoras é a de aplicação das células-tronco (CT) e suas tecnologias associadas. O estudo do potencial das células-tronco estimulou o desenvolvimento de diversas novas áreas, como a bioengenharia e a medicina regenerativa, entre outras, tornando a terapia celular uma realidade e trazendo novas esperanças para o tratamento de diversas doenças humanas. (SILVA *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2014; CHALISSERRY *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018).

Por definição, CT são células indiferenciadas, capazes de auto-renovarem, mantendo seu estado indiferenciado após vários ciclos de replicação, e com habilidade para gerar mais de uma linhagem celular *in vitro* como também *in vivo*. São ainda definidas quanto à sua potencialidade, dividindo-se em três grandes grupos: células totipotentes, como as células originadas das primeiras divisões de um óvulo fertilizado, e que são capazes de gerar todo e qualquer tipo celular, embrionário ou extra-embrionário, necessários à formação de um organismo viável; células pluripotentes, como as conhecidas células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês *Embryonic Stem Cells*) isoladas a partir da massa celular interna do blastocisto (EVANS & KAUFMAN, 1981), e que podem originar células de qualquer um dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma ou endoderma, e conseqüentemente qualquer tecido do organismo adulto; o terceiro grupo trata das células multipotentes, que teoricamente têm um potencial de diferenciação mais limitado, originando apenas células de linhagens relacionadas e restritas, como células especializadas presentes no tecido de origem dessas células-tronco (SELL, 2004; HIPP & ATALA, 2008; GALVE-ROPERH *et al.*, 2013).

Neste terceiro grupo, enquadram-se as chamadas células-tronco adultas (ASCs, do inglês *Adult Stem Cells*), que são células derivadas de órgãos

específicos como fígado, pulmão, intestino, cérebro, tecido adiposo e medula óssea, sendo normalmente nomeadas de acordo com o tecido do qual são extraídas. Por um período, houve um consenso de que nem todos os tecidos eram capazes de autorrenovação, porém, hoje é sabido que diversos tecidos adultos mantêm seu estoque de células indiferenciadas. É comumente aceito que essas células são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e manutenção do tecido em que residem, e que representam uma população rara localizada em pequenos nichos no tecido adulto, funcionando como um “sistema de reparo” para o organismo (JONES & WATT, 1993; COSENTINO *et al.*, 1996; FLIEDNER, 1998; WEI *et al.*, 2000; WOODBURY *et al.*, 2002; GAVE-ROPERH *et al.*, 2013; SARTIPY, 2013; LUO *et al.*, 2018). Entre as ASCs, podemos ressaltar dois grupos, as células-tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês *Hematopoietic Stem Cells*) e as células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) como as ASCs mais bem estudadas e relatadas na literatura científica (SILVA *et al.*, 2012; GAVE-ROPERH *et al.*, 2013; SARTIPY, 2013).

Existe ainda outro grupo, de células-tronco produzidas artificialmente, conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*), que apresentam potencial, características e comportamento semelhantes às ESCs (SILVA *et al.*, 2012; GAVE-ROPERH *et al.*, 2013). Tais células têm recebido bastante atenção desde que foram desenvolvidos protocolos para sua produção à partir de células somáticas de camundongos (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006) e de fibroblastos de humanos (TAKAHASHI *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2007). Depois desses avanços, pesquisas têm tentado eliminar a etapa de transfecção viral para a produção dessas células, uma vez que essa etapa pode levar à mutagênese (ZHOU *et al.*, 2009; DESPONTS & DING, 2010; JIA *et al.*, 2010). Uma grande importância relacionada a essas pesquisas é que elas têm fornecido muitas informações acerca de genes que são críticos para a manutenção da célula em um estado indiferenciado, bem como informações epigenéticas que estariam associadas a vários estados de diferenciação celular.

Pensando-se na aplicação de CT em pesquisa ou no desenvolvimento de produtos ou tecnologias, deve-se lembrar que cada um dos tipos celulares apresentados possui suas características próprias e peculiaridades, levando-se em conta essas informações na hora de selecionar qual deles usar. ESCs apresentam inegável potencial de diferenciação e utilização, porém, seu isolamento e estabelecimento de linhagens esbarra em complicadas questões éticas, alvo de muitas discussões, uma vez que envolve a destruição de embriões. Além disso, existem diversos relatos de utilização *in vivo* de ESCs (majoritariamente em animais) que culminaram na formação de teratomas no organismo receptor, bem como o desenvolvimento de rejeição em transplantes alogênicos, tornando seu uso ainda arriscado (SILVA *et al.*, 2012, MA *et al.*, 2014). iPSC além de compartilharem a potencialidade das ESCs, também compartilham seu potencial teratogênico, conforme diversos estudos mostrados na literatura (SILVA *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2014). Entre as ASCs, quando falamos em HSCs precisamos saber que seu processo de extração, à partir da medula óssea, apesar de seguro e sem implicações éticas, é altamente invasivo e doloroso para o paciente (o mesmo sendo válido para MSCs derivadas da medula óssea, conhecidas como BMSCs, do inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Além disso, HSCs ainda apresentam um potencial mais restrito, sendo capazes de se diferenciarem apenas em células de linhagem mieloide e linfoide, e seu transplante deve ser feito com cuidado, pois pode ocasionar a “doença do enxerto vs hospedeiro” que é uma síndrome sistêmica desencadeada pelo transplante de linfócitos imunocompetentes. Como último limitante, elas ainda possuem baixa capacidade de expansão *in vitro*, o que diminui sua aplicabilidade pela baixa disponibilidade de células após extração (SILVA *et al.*, 2012). Por outro lado, as MSCs parecem contornar a maioria dos problemas citados até agora, tendo sido isoladas de diferentes tecidos adultos nos últimos anos. Embora apresentem potencial mais restrito que ESCs e iPSC, vários estudos têm demonstrado que as células-tronco adultas são capazes de gerar células de mais de uma origem (folheto) embrionária, apresentando assim um potencial de diferenciação já largamente comprovado além da linhagem mesodermal, com comprometimento menor do

que o geralmente esperado (TERSKIKH *et al.*, 2001; KOTTON & FINE, 2003; LUO *et al.*, 2018). Ainda comparando-se com ESCs e iPSCs, as MSCs parecem não apresentar significante potencial de formação de teratomas nem problemas de histocompatibilidade, além de apresentarem, de uma maneira geral, processos bem mais simples e baratos de extração, dependendo da fonte de origem. Quando comparadas às HSCs, apresentam maior potencial de diferenciação e alta capacidade de expansão *in vitro*, à partir até mesmo de baixas passagens, além de apresentarem fontes de fácil acesso, com processos menos invasivos de obtenção (como a polpa de dente, por exemplo), ou de grande disponibilidade (como o tecido adiposo) (SILVA *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2018).

Partindo desse ponto de vista, a utilização de ASCs, em especial MSCs, mostra-se de grande potencial, devido à relativa facilidade de extração e obtenção dessas células, e ao baixo custo do processo como um todo se comparado à extração e manipulação dos outros tipos celulares.

1.1.2 células-tronco mesenquimais

MSCs são células-tronco adultas multipotentes e que podem ser obtidas à partir de vários tecidos (adultos e fetais), como ossos, medula óssea, músculo esquelético, polpa de dente, cordão umbilical, tecido adiposo, pulmão, fígado, entre outros, parecendo, muitas vezes, residir próximo a vasos sanguíneos (GRONTHOS *et al.*, 2000; ZUK *et al.*, 2001; DE MIGUEL *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; SARTIPY, 2013; MA *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2018).

Não existem marcadores fenotípicos específicos descritos para as MSCs, porém, em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular sugeriu critérios mínimos para a definição de MSCs, a saber: aderência ao plástico sob condições padrão de cultura; marcação positiva para a expressão de CD105, CD73 e CD90 e negativa para expressão de marcadores de superfície CD34, CD45, CD11a, CD19 ou CD79a, CD14 ou CD11b; sob estímulo específico, diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (LE BLANC *et al.*, 2012, SILVA *et al.*, 2012; LIBRO *et al.*, 2017).

Como característica, MSCs têm grande capacidade de autorrenovação, podendo ser replicadas várias vezes sem prejuízos significativos de suas principais características, o que também permite que sejam expandidas e criopreservadas para futuras utilizações terapêuticas, após sua extração (GALVE-ROPERH *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014). Entre tais usos, podemos perceber sua utilização em medicina regenerativa principalmente baseada em sua capacidade de diferenciação, mas também sua utilização como “biorreatores” para produção de fatores capazes de levar à regeneração tecidual (DE MIGUEL *et al.*, 2012). Somando-se a esse cenário, existem diversos estudos demonstrando a ativação e recrutamento de MSCs para locais onde houve danos teciduais, tendo um papel de reparação e regeneração nesses locais, além de estarem envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, como envelhecimento, manutenção da homeostase celular, danos teciduais e doenças inflamatórias (MA *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2018). Corroborando esses fatos, temos a migração e integração, após transplante, de MSCs exógenas a locais de dano tecidual, onde passam a fazer parte do microambiente, bem como a observação da rápida recuperação pós-operatória e correção da condição inflamatória em tais situações (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

O somatório dos dados expostos acima levou os cientistas a um aprofundamento no estudo das características das MSCs, culminando com a demonstração não só de características regenerativas, mas também imunomoduladoras de tais células. Foram demonstradas então suas propriedades moduladoras de destaque na resposta imune inata e adaptativa, sendo sua comunicação com o microambiente inflamatório uma parte essencial desse processo (LE BLANC *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014, WANG *et al.*, 2014; BIANCO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2018). Assim, as características citadas, em adição à sua relativamente fácil extração, alta estabilidade após extração e potencial de expansão *in vitro*, bem como baixo risco de formação de teratomas ou desenvolvimento de rejeição após transplante, entre outros, fazem das MSCs uma boa aposta na terapia celular em aloimunidade, autoimunidade e condições inflamatórias (LE BLANC *et al.*, 2012).

1.1.3 Perfil imunomodulador de células-tronco mesenquimais e sua utilização

Muitos estudos vêm mostrando que as MSCs apresentam, além de suas propriedades regenerativas, não só uma baixa imunogenicidade, como também uma pronunciada capacidade antiinflamatória e imunomodulatória *in vitro* em diversas situações. Em uma via de mão-dupla, tanto as propriedades de regeneração tecidual e imunomodulação das MSCs são induzidas por citocinas inflamatórias, geradas no dano tecidual e no processo de inflamação, quanto as MSCs expressam moléculas antiinflamatórias e diversos fatores de crescimento que auxiliam no reparo tecidual e na manutenção da homeostase imunológica (SILVA *et al.*, 2012; DE MIGUEL *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2014; BIANCO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2018; PALADINO *et al.*, 2019).

Nesse contexto, as MSC possuem característica imunossupressora e podem exercer esse potencial pelo contato célula-célula e pela secreção de moléculas reguladoras do sistema imune, tais como IDO, TGF- β e PGE2, bem como através da modificação de padrões da expressão de diferentes genes relacionados ao processo inflamatório e à manutenção da homeostase (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002; KRAMPERA *et al.*, 2003; LE BLANC *et al.*, 2003a; ZHANG *et al.*, 2004; AGGARWAL *et al.*, 2005; BASSI *et al.*, 2012; BIANCO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2018; FÉLIX *et al.*, 2019; MAO *et al.*, 2019; HOOGDUIJN & LOMBARDO, 2019; PALADINO *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2019).

MSC podem suprimir a proliferação de células T, células B, células natural killer (NK) e células dendríticas (DC); inibir a secreção de citocinas e a lise celular promovida pelas células T CD8+ e NK; inibir a maturação de células B e secreção de anticorpos; inibir a maturação e ativação de DC, afetando a apresentação de antígenos; aumentar a proporção de células Treg; além de possuir a capacidade de reduzir a produção de fatores pró-inflamatórios e aumentar a produção de fatores anti-inflamatórios, bem como a já citada alteração da expressão de genes relacionados à imunomodulação (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002; LE BLANC *et al.*, 2003a; 2003b; RASMUSSEN

et al., 2005; AGGARWAL *et al.*, 2005; YAGI *et al.*, 2010; BASSI *et al.*, 2012; DE MIGUEL *et al.*, 2012; FÉLIX *et al.*, 2019; MAO *et al.*, 2019, PALADINO *et al.*, 2019). É importante ressaltar que estudos têm demonstrado que MSCs derivadas de diferentes tecidos possuem tais funções imunomodulatórias, parecendo então que tal característica é própria de MSCs de uma maneira geral.

A maior parte dos estudos trata as MSCs como potentes inibidoras do sistema imunológico de uma maneira geral, porém parece mais certo entender que as funções das MSCs não são fixas ou constitutivas, mas sim influenciadas pelo ambiente da inflamação, em especial por citocinas inflamatórias. Assim, o sistema imune (tanto inato quanto adaptativo) deve agir como mediador dessas funções, regulando não só as propriedades imunomodulatórias das MSCs, mas também sua proliferação e diferenciação, influenciando ativamente o processo de recuperação dos danos. Mais especificamente, um ambiente de inflamação parece ser necessário para que as MSCs promovam seus efeitos imunomodulatórios, e algumas moléculas inflamatórias como TNF- α e interferon- γ parecem estar envolvidas (LE BLANC *et al.*, 2012, WANG *et al.*, 2014, DE MIGUEL *et al.*, 2012, MA *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2019; HOOGDUIJN & LOMBARDO, 2019).

Nesse sentido, SILVA *et al.*, 2012 ressaltam que as MSCs, aparentemente, possuem tanto um papel imunorregulatório como um papel de célula apresentadora de antígenos (APC), sendo que no estabelecimento do processo inflamatório as MSCs aumentam seu potencial de apresentação de antígenos a fim de combater uma possível infecção. Porém, com o decorrer da inflamação, parece que o ambiente modula as MSCs para que adquiram seu potencial imunossupressor, levando o meio à homeostase. Assim, dependendo do tipo, da intensidade e do momento do estímulo inflamatório, pode conferir às MSCs, ora um papel de supressão da resposta imune, ora de auxílio à essa resposta (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

MA *et al.*, 2014 ainda observaram que, embora muitas vezes na terapia celular com MSCs a presença dessas células já não seja mais notada após pouco tempo de administração, seus efeitos imunomodulatórios possuem maior

durabilidade. Além disso, em alguns casos a administração do sobrenadante de culturas de MSCs parece ser capaz, por si só, de ter um efeito terapêutico. Assim, fica a dúvida se as MSCs, em si, são necessárias ao efeito terapêutico, ou se as moléculas secretadas por elas seriam capazes, isoladamente, de levar à modulação do ambiente inflamatório.

Dessa maneira é perceptível que, ao utilizar-se MSCs na terapia celular, elas servem não só como uma fonte de células indiferenciadas para reparação dos danos, mas, mais do que isso, estabelecem uma “conversa” com o sistema imunológico e com o processo inflamatório em si. Dessa forma, as propriedades imunomodulatórias das MSCs parecem ser dependentes do ambiente em que estão inseridas, e, ao serem “moduladas” por mediadores inflamatórios, as MSCs liberam diversos fatores, como fatores imunorregulatórios, de crescimento e de mobilização celular, propiciando a formação de um microambiente favorável à reparação dos danos, culminando no efeito terapêutico esperado (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014; FÉLIX *et al.* 2019; HOOGDUIJN & LOMBARDO, 2019; TAN *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a utilização de células que possuem potencial imunomodulatório e anti-inflamatório se torna extremamente interessante, uma vez que elas seriam capazes de superar o problema de compatibilidade entre doador e receptor, aumentando muito a chance de sucesso da terapia celular. De fato, as descobertas acerca do potencial imunomodulatório e da capacidade de controle da inflamação de diferentes tipos de MSCs revolucionaram o campo das terapias celulares com CT, em especial, mas não restrito, às doenças inflamatórias e autoimunes (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014).

As MSCs têm sido usadas no estudo para tratamento de diversas doenças, tanto em modelos animais como em pacientes humanos, incluindo doença do enxerto contra o hospedeiro, artrite reumatoide, encefalomielite autoimune, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes tipo 1 (BASSI *et al.*, 2012), esclerose múltipla (PERON *et al.*, 2012), esclerose lateral amiotrófica (KARUSSIS *et al.*, 2010), insuficiência hepática fulminante (ZHANG *et al.*, 2014), entre outras. Além disso, por possuir funcionamento semelhante aos

componentes do sistema inato de resposta imunológica, MSCs podem ainda desencadear respostas ao ataque microbiano, tanto local quanto sistematicamente, diminuindo a carga de infecção e aumentando a sobrevivência em modelos de estudo de sepse (LE BLANC *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; BASSI *et al.*, 2012).

Diferentes tipos de MSCs compartilham efeitos imunomoduladores e com grande potencial terapêutico, e nesse sentido a capacidade imunomoduladora das células-tronco da polpa de dente (DPSCs - do inglês *Dental Pulp Stem Cells*) não são exceção, mostrando por vezes capacidade superior às tradicionais BMSCs. PIERDOMENICO *et al.*, 2005 compararam a capacidade imunomoduladora entre BMSCs e DPSCs, sendo que DPSCs se mostraram mais imunomoduladoras que as BMSCs. Ainda, em outro estudo, as DPSCs isoladas de dentes decíduos esfoliados inibiram a proliferação de células Th17 também com mais eficiência em comparação às BMSCs (YAMAZA *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo, as DPSC foram capazes de atenuar os sintomas no modelo experimental murino de lúpus eritematoso sistêmico (YAMAZA *et al.*, 2010). É interessante ressaltar que DPSCs são células de fácil obtenção, com grande disponibilidade de material biológico para sua extração, uma vez que podem ser isoladas de dentes que normalmente são descartados, sem causar dano ao paciente ou necessitar de processos invasivos (XIAO *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2018).

Considerando-se o potencial imunomodulador relatado, e somando-se a ele a facilidade de obtenção de DPSCs, tanto tecnicamente quanto em termos de disponibilidade de material biológico, percebemos que DPSCs são alternativas promissoras entre as MSCs. Dentro desse contexto, algumas moléculas relacionadas à comunicação e sinalização celular de importância para o perfil imunomodulador merecem destaque.

1.1.4 Moléculas de destaque no perfil imunomodulador de células-tronco mesenquimais

1.1.4.1 HLA-DR

No sistema imunológico, 3 tipos principais de células T são funcionalmente distintos. As células T do tipo citotóxica induzem diretamente o processo de apoptose em células infectadas, enquanto as células T do tipo auxiliar (Thelper ou Th) agem “auxiliando” o sistema através de diversos pontos, como: ativação das próprias T citotóxicas para eliminação de células alvo; ativação de células B para produção da resposta via anticorpos; ativação de células dendríticas para que elas estimulem a resposta de células T; ativação de macrófagos para destruição de microorganismos internalizados ou que os tenham invadido. Além dos dois tipos de células T citados, as células T reguladoras (Treg) têm como funcionalidade impedir a atividade das células T efetoras supracitadas bem como impedir a atividade de células dendríticas, tendo assim um papel de “supressão” da resposta imunológica. Quando a célula T ainda não foi ativada, e portanto não está comprometida com algum dos fenótipos citados, ela é chamada de T virgem, ou Tnaive (ALBERTS, 2010; WIECZOREK et al., 2017; VAUGHAN et al., 2017).

As células T expressam em sua superfície receptores semelhantes a anticorpos (TCRs), responsáveis por interagir com fragmentos de proteínas estranhas associadas a proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Esse complexo peptídeo-MHC é expresso na superfície de células apresentadoras de antígeno - juntamente com proteínas coestimuladoras e moléculas de adesão célula-célula - que então, em sua interação com os TCRs de células T virgens em órgãos linfóides periféricos, são responsáveis pela sua ativação. Existem diferentes tipos de células apresentadoras de antígenos, sendo as células dendríticas uma das mais potentes, e tidas como necessária à ativação das células T virgens (ALBERTS, 2010; WIECZOREK et al., 2017; VAUGHAN et al., 2017).

Assim, as proteínas do MHC desempenham um papel crucial na apresentação de antígenos proteicos estranhos, e podem ser divididas entre

MHC classe I e MHC classe II, com funções semelhantes (apresentação de antígenos para ativação de células T virgens) porém alvos e padrões de expressão distintos. De uma maneira geral, as proteínas do MHC de classe I apresentam antígenos estranhos para as células T citotóxicas, sendo expressas por quase todas as células de vertebrados. Já as proteínas de classe II apresentam antígenos para as células Th e Treg, sendo expressas normalmente apenas por células que interagem com as células Th e Treg, como as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. Vale ressaltar que em seres humanos, o complexo MHC é conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês human leukocyte antigen), sendo o HLA-DR uma de suas proteínas relativas ao MHC classe II (ALBERTS, 2010; WIECZOREK et al., 2017; VAUGHAN et al., 2017).

Assim, torna-se interessante analisar a presença de HLA-DR nas DPSCs, sob os diferentes estímulos do eCBS em ambiente não inflamatório (sem TNF- α) e inflamatório (com TNF- α) para avaliar a possibilidade de as DPSCs estarem aptas a responder imunologicamente através da apresentação de antígenos, bem como avaliar qual o papel do eCBS nessa situação.

1.1.4.2 PD-L1 e PD-L2

Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) e *Programmed Death Ligand 2* (PD-L2) são ligantes presentes na superfície de algumas células, que interagem com o *Programmed death receptor 1* (PD-1). Eles são moléculas que fazem parte da família B7-CD28, que é uma família de moléculas que têm um papel crucial na interação com células T, especialmente na sua ativação e regulação. Isso deve-se ao fato de que essa família não só gera sinais co-estimulatórios, mantendo a atividade de células T, como também gera sinais inibitórios, regulando a magnitude da resposta imune (NURIEVA et al., 2009; ROZALI et al., 2012).

É aí que reside a importância de PD-L1 e PD-L2, que em sua ligação com PD-1 constituem uma via inibitória muito relevante, levando à regulação e supressão da resposta imunológica em diferentes situações. Embora ambas as moléculas (PD-L1 e PD-L2) possuam via de ação em comum, seu padrão de

expressão é bem distinto. PD-L1 é constitutivamente expresso em diferentes tipos celulares, entre células imunológicas e não-imunológicas, e seu nível de expressão pode ser aumentado na maior parte dos tecidos, desde que haja um forte estímulo inflamatório. Já PD-L2 tem expressão bem mais restrita, e por muito tempo pensou-se que sua expressão era restrita a células imunológicas, em especial células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Hoje, no entanto, tem sido relatado que sua expressão pode ser induzida em outros tipos celulares (imunológicos e não-imunológicos), dependendo do padrão de estímulos presentes (NURIEVA et al., 2009; ROZALI et al., 2012).

Assim, ainda pensando no fato de que DPSCs atuam modulando o ambiente inflamatório, conforme discutido, pela diminuição de proliferação das Th ou pelo aumento das Treg (PIERDOMENICO et al., 2005; YAMAZA et al., 2010; ALIPOUR et al., 2013; SILVA et al., 2014), torna-se também interessante a análise da presença desses ligantes na superfície das DPSCs, que poderia indicar mais uma via de imunomodulação compartilhada entre DPSCs e células do sistema imune. Além disso, a análise dessa resposta dentro dos grupos propostos neste trabalho também levanta interesse, a fim de entender o papel do ambiente inflamatório e do eCBS na expressão de tais ligantes.

1.1.4.3 TGF- β e IL-6

TGF- β e IL-6 são citocinas amplamente estudadas e discutidas em seu papel no sistema imunológico. Enquanto IL-6 é tida majoritariamente como uma citocina pró-inflamatória, TGF- β pode atuar tanto na via pró-inflamatória quanto anti-inflamatória.

As citocinas do tipo IL-6 estão associadas a diversas vias de atuação, que acabam por levar diretamente à ativação de células do sistema imune, guiando assim para um perfil pró-inflamatório. Elas podem ser secretadas por diferentes tipos celulares, mas especialmente macrófagos e linfócitos T são tidos como os principais secretores nas vias de ativação do sistema imune (MORISHIMA et al., 2009; ALBERTS et al., 2010; YOSHIMURA & MUTO., 2011; ROSE-JOHN., 2017; MOCAN et al., 2019).

O TGF- β , por sua vez, foi classificado por muito tempo como uma citocina anti-inflamatória devido à sua capacidade de inibir a ativação desregulada de células T e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, conseqüentemente tendo importante papel no estabelecimento da imunotolerância. Porém, hoje já é sabido que ele também é capaz de levar à diferenciação e afetar a proliferação de células T efetoras, em especial Th17, que auxiliam na defesa contra patógenos extracelulares, mas também desempenham um papel importante em muitas doenças autoimunes (MORISHIMA et al., 2009; ALBERTS et al., 2010; YOSHIMURA e MUTO., 2011; ROSE-JOHN., 2017; MOCAN et al., 2019).

É interessante notar que as células Th17 desenvolvem-se quando células Th são ativadas por antígenos na presença de ambos TGF- β e IL-6 (além de possíveis outros fatores) (MORISHIMA et al., 2009; ALBERTS et al., 2010; YOSHIMURA e MUTO., 2011; ROSE-JOHN., 2017; MOCAN et al., 2019). Assim, tomando essas informações em conjunto com estudos onde foi avaliada a capacidade imunomoduladora de DPSCs frente ativação e/ou proliferação de células T (YAMAZA et al., 2010 SILVA et al., 2014), fica evidente a relevância da avaliação da expressão dos genes codificantes de domínios dessas duas interleucinas dentro da situação abordada nesse trabalho.

1.1.5 células-tronco da polpa de dente

A primeira população de células-tronco de origem pulpar dentária foi isolada do terceiro molar por Gronthos *et al.* nos anos 2000, e a partir daí diferentes trabalhos mostraram ser possível isolá-las da polpa de outros tipos de dentes, como dentes decíduos esfoliados (MIURA *et al.*, 2003), dentes permanentes e primários (KARAOZ *et al.*, 2010) e dentes supranumerários (HUANG *et al.*, 2008). Além da polpa dentária, outros tecidos orais podem servir como fonte de células-tronco, como o tecido ósseo craniofacial, folículo dentário, germe dentário, mucosa oral e gengival, entre outros (CHALISSERRY *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2018; SHETTY *et al.*, 2018). À partir de então, começou-se a dar nomes específicos para cada uma dessas populações, de

acordo com o tecido de origem das células. Em se tratando de células originárias da polpa dentária, certos autores ainda as dividem entre células isoladas da polpa de dentes adultos (DPSC), células isoladas da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) e células isoladas da polpa de outros tipos de dentes (NPSC, PTSC, etc). Neste trabalho, iremos tratar de forma generalizada todas as células isoladas da polpa dentária como DPSCs, já que este é um tópico onde não há consenso na literatura.

De uma maneira geral, MSCs de tecidos dentários, como as já citadas DPSCs, mas também células-tronco do ligamento periodontal, células-tronco da papila apical, e MSCs derivadas de gengiva, demonstraram possuir efeitos imunomoduladores já que inibiram a proliferação e função de linfócitos T. Nesse contexto, a polpa dentária representa uma fonte interessante e acessível de MSCs, conforme citado anteriormente (XIAO *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2018). A polpa dentária é um tecido conectivo macio, contendo vasos sanguíneos, nervos e tecido mesenquimal. Ela é responsável pelo desenvolvimento primário e secundário do dente, bem como pela manutenção permanente do dente – por exemplo, na defesa e restauração após infecção por cárie. À partir dela são extraídas as DPSCs, que possuem característica de MSCs, como indiferenciação, auto-renovação e multipotência (GRONTHOS *et al.*, 2000, 2002; XIAO *et al.* 2017; LUO *et al.*, 2018).

De fato, DPSCs apresentam o mesmo fenótipo que BMSCs, incluindo a expressão de marcadores moleculares de MSCs, seu potencial de imunorregulação, e capacidade de se diferenciar em células osteogênicas, odontogênicas, adipócitos e células neurais, entre outras. Vale ressaltar mais uma vez que a polpa dentária é um recurso muito acessível e capaz de fornecer células suficientes para uma potencial aplicação clínica, o que é devido à sua alta taxa de proliferação e expressão de telomerase, o que mantém sua estabilidade genética até mesmo em passagens relativamente altas. Porém, ainda não foram descobertos biomarcadores específicos para DPSC, e assim sua identificação é feita com base em um conjunto de informações (KERKIS *et al.*, 2006; YAMAZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012;

XIAO *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2018; ALMEIDA-JÚNIOR *et al.*, 2019).

As principais características que uma célula tronco precisa ter para ser considerada como uma DPSC são: (I) seu isolamento à partir da polpa dentária; (II) sua capacidade de aderência e sua morfologia (fusiforme quando aderida); (III) sua potencialidade de diferenciação em outros tipos celulares; (IV) sua capacidade de auto-renovação; (V) seu painel de marcadores, a saber:

- expressão positiva para marcadores de MSCs, como CD27, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD271, e STRO-1;
- expressão positiva para marcadores relacionados ao citoesqueleto, como Nestin e Vimentin;
- expressão negativa para os marcadores CD34, CD45, CD14, ou CD19;
- possível expressão (mas não obrigatória) de marcadores de células embrionárias, como Oct-4, Nanog e Sox-2.

As DPSCs têm demonstrado grande potencial terapêutico, o que está muito bem descrito e resumido em CHALISSERRY *et al.*, 2017. Dentre os trabalhos envolvendo a utilização de DPSCs com foco em seu papel imunomodulador, podemos citar com destaque PIERDOMENICO *et al.*, 2005, que compararam a capacidade imunomodulatória de BMSCs e DPSCs, co-cultivando tais células com células T CD2+. Seu resultado mostra que DPSCs são capazes de reduzir a proliferação de células T mais intensamente que BMSCs. Além disso, YAMAZA *et al.*, 2010, usando DPSCs isoladas de dentes decíduos esfoliados, demonstraram que essas células inibiram a proliferação de células Th17 de forma mais eficiente do que as BMSCs, enquanto ALIPOUR *et al.*, 2013 mostraram que BMSCs possuem uma habilidade maior em inibir proliferação de células T quando comparadas às DPSCs. Esses resultados conflitantes demonstram a necessidade de mais estudos acerca do potencial imunomodulatório de DPSCs, mas também reforçam que tais células de fato possuem esse potencial.

Ainda nesse campo, YAMAZA *et al.*, 2010 demonstraram as propriedades de imunossupressão das DPSCs *in vivo* em um modelo

experimental de lúpus eritematoso sistêmico. Esse estudo mostrou que as DPSCs foram capazes de atenuar os sintomas da doença ao diminuir os níveis de autoanticorpos, o índice de creatinina sérica e a proteinúria. A explicação para o fato do transplante de DPSCs ter mostrado efeito terapêutico tão relevante pode estar associada ao fato de que elas mostraram efeitos imunorregulatórios superiores aos de BMSCs em termos de aumento da taxa Treg/Th17 e redução dos níveis de células Th17 no sangue periférico (YAMAZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014).

Outro trabalho que merece destaque é o de SILVA *et al.*, 2014, ao demonstrar que DPSCs afetam a diferenciação de monócitos em DCs, levando a um perfil "regulatório" nessas células, o que é evidenciado pela diminuição de marcadores de superfície relacionados à diferenciação das DCs (BDCA1 e CD11c) e pela manutenção do marcador CD14 em células imaturas. Essas alterações fenotípicas persistiram mesmo depois que a maturação das DCs foi induzida por LPS, sendo que as DCs mostraram redução do marcador de ativação CD40, quando diferenciadas na presença de DPSCs. Além disso, DCs tratadas com DPSCs exibiram uma redução na capacidade de expandir as células T, bem como um viés para a estimulação de células Treg, o que foi acompanhado por uma modulação do padrão de secreção de citocinas, com aumento de fatores solúveis antiinflamatórios e diminuição de fatores pró-inflamatórios na co-cultura de DCs e DPSCs.

LEE *et al.*, 2016 trabalharam com DPSCs isoladas de polpa de dente inflamada, derivadas de dentes com cárie e pulpíte irreversível (i-DPSCs). Eles avaliaram o efeito imunomodulatório dessas células em comparação à imunomodulação por DPSCs originárias de polpa saudável. Para isso, os autores avaliaram a secreção de TNF- α e Interleucina 1 β (IL-1 β) no meio de co-cultivo com DPSCs e macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 (linhagem de monócitos) versus i-DPSCs e macrófagos diferenciados a partir de células THP-1. Ambas as co-culturas suprimiram de maneira semelhante a secreção de TNF- α , mas não de IL-1 β . Posteriormente, eles avaliaram a inibição da supressão de TNF- α pela adição de um inibidor seletivo deIDO vs um inibidor seletivo de COX-2, mostrando que a secreção de TNF- α ocorre via

IDO. De uma maneira geral, eles demonstraram que ambas DPSCs e i-DPSCs possuem características semelhantes relativas à imunossupressão da função de macrófagos através do eixo TNF- α /IDO.

OMI *et al.*, 2016, por sua vez, isolaram DPSCs de ratos, expandiram-nas *in vitro* e as transplantaram em ratos após a indução de diabetes via estreptozotocina, para avaliar seu papel de supressão da inflamação gerada pelo quadro no nervo ciático. Para avaliar a resposta, foram analisadas: (I) medidas neurofisiológicas; (II) expressão de genes relacionados ao processo inflamatório; (III) número de células CD68⁺. Posteriormente, para confirmação dos dados, o meio condicionado pela cultura das DPSCs foi utilizado em macrófagos estimulados com LPS. De uma maneira geral, o transplante de DPSCs diminuiu significativamente a diferenciação de monócitos em macrófagos, bem como a expressão gênica de TNF- α . Já o meio condicionado levou a um aumento na expressão de IL-10 e CD206 nos macrófagos estimulados com LPS. Assim, foi mostrado mais uma vez o potencial imunomodulador das DPSCs via polarização dos macrófagos para perfil anti-inflamatório.

Ainda no contexto de imunomodulação, HOSSEIN-KHANNAZER *et al.*, 2019 examinaram o efeito imunomodulatório em DPSC após sua diferenciação osteogênica (OD-DPSC), para verificar se as células mantinham essa capacidade após estarem comprometidas com a diferenciação. Para isso, tanto OD-DPSC como DPSCs foram co-cultivadas com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*). Então a concentração de IL-10, TGF- β , PGE2, IL-6, e NO foram estudadas, bem com a expressão gênica de IDO, HLAG, e HGF, mostrando que, embora haja uma diferença no nível de expressão de citocinas e de NO entre os grupos, ambos apresentaram poder imunomodulatório, mostrando que as DPSCs mantêm esse poder mesmo depois de diferenciadas em OD-DPSCs.

No cenário demonstrado, percebemos que DPSCs podem desempenhar um importante papel na homeostase, ajudando a restaurar o equilíbrio em um ambiente afetado por uma resposta imune exacerbada, bem como na

resolução de infecções ou lesões, servindo como potenciais ferramentas para a terapia imunológica em doenças auto-imunes e inflamatórias (YAMAZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; CHALISSERRY *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018).

Estes dados, em conjunto, são capazes de reafirmar o potencial imunomodulatório de MSCs, mostrando que também são compartilhados por DPSCs. Considerando o potencial dessas células, bem como sua facilidade de obtenção e a falta de mais estudos relacionados ao tema, podemos perceber que, em se tratando de eleger um tipo celular para estudo do sistema de imunomodulação, as DPSCs são escolhas muito promissoras.

1.2 Utilização medicinal de canabinoides

1.2.1 *Cannabis sativa* L.

Por toda a história da civilização e em todos os tempos, as plantas sempre serviram como a principal fonte de alimentos e medicamentos, bem como para outros usos. Nesse contexto, as plantas do gênero *Cannabis* são muitas vezes consideradas como algumas das primeiras plantas cultivadas pelo homem. O uso de suas fibras para confecção de cordas, tecidos e até mesmo papel datam de 4.000 a.C. na região da China. Além disso, seu uso medicinal também é ampla e historicamente relatado em diferentes civilizações, sendo inclusive citado na farmacopeia asiática antiga. Dentre diferentes relatos de uso, o tratamento de dor reumática, constipação, náuseas e até mesmo da infertilidade feminina aparecem relacionados a preparações à base dessas plantas (ZUARDI, 2006; HIRSCH & TAM, 2019; KOLB *et al.*, 2019).

Dentro do gênero *Cannabis* encontram-se três espécies principais - *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis* - que apresentam uma longa história de domesticação, podendo ser diferenciadas principalmente por análises morfológicas e fitoquímicas. Dentre elas, a *Cannabis sativa* L. (Figura 1), popularmente conhecida como maconha, desperta grande interesse científico na área da saúde devido à sua constituição química única. A *Cannabis sativa* L. é uma erva anual, dioica, pertencente à família

Cannabaceae e originária da Ásia Oriental e Central. Embora muito utilizada e discutida há milênios na cultura oriental, foi o Irlandês Sir William B. O'Shaugnessey que conduziu a primeira série de experiências formais sobre o potencial uso medicinal de *Cannabis sativa*, e a publicação de seus achados em 1842 levou ao uso de canábis para o tratamento da dor, espasticidade e reumatismo por clínicos em toda a Europa (GOWRAN *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2016; HIRSCH & TAM, 2019).



Figura 1: *Cannabis sativa* L.

Na década de 1960, o interesse pela utilização de derivados canabinoides (CB) cresceu após a identificação do componente ativo psicotrópico da maconha, o fitocanabinóide delta-9-tetrahidrocanabinol (d9THC, ou simplesmente THC - Figura 2), sendo este associado aos principais efeitos colaterais do uso da droga, bem como ao potencial de abuso e vício devido às elevações nos níveis de dopamina. Posteriormente, além dele, outros fitocanabinoides (canabinoides de origem vegetal) também foram isolados da canábis, como o canabidiol (CBD - Figura 3), que é o canabinoide mais abundante em *Cannabis sativa*, sendo desprovido de propriedades psicoativas

e capaz de exercer efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores. Embora THC e CBD sejam os fitocannabinoides mais discutidos, estudos têm sido feitos acerca de outras moléculas como canabigerol, canabivarin e outros (PORTER *et al.*, 2013; HODGES & ASHPOLE, 2019; MALLICK-SEARLE, 2019).

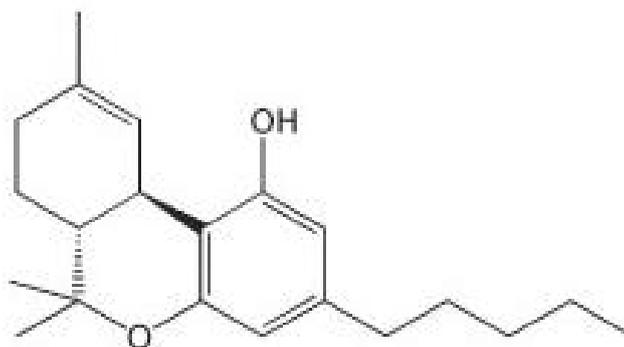


Figura 2: Estrutura química do d9-THC

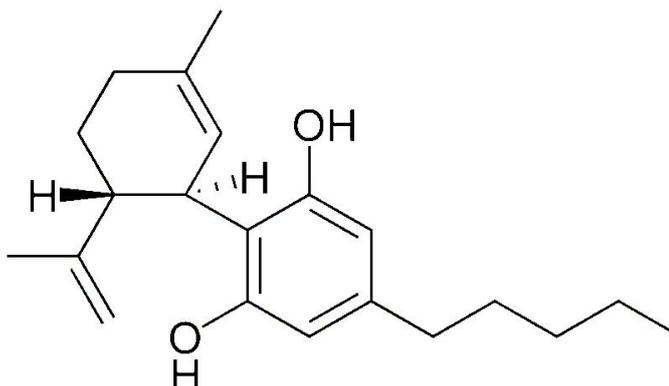


Figura 3: Estrutura química do CBD

Juntamente com o aumento do consumo da maconha, o campo da pesquisa começa a se voltar para o entendimento de sua ação e de seus alvos no organismo, o que levou ao descobrimento do sistema de cannabinoides endógeno, ou eCBS, um sistema de regulação homeostático que controla muitos processos fisiológicos. O eCBS é hoje reconhecido como uma complexa rede de sinalização que atua como importante modulador fisiológico de vários processos do sistema nervoso central (SNC) incluindo função motora, cognição, comportamento, função endócrina, nocicepção, balanço energético, apetite, digestão, pressão arterial, inflamação, plasticidade sináptica, e o destino de

células neurais, entre outros; bem como em condições patológicas, como doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e esclerose múltipla (EM). Como observa-se, o eCBS não está restrito ao SNC, e tem atraído considerável atenção como potencial alvo terapêutico em inúmeras condições fisiológicas. (GOWRAN *et al.*, 2011; MECHA *et al.*, 2012; HIRSCH & TAM, 2019; HODGES & ASHPOLE, 2019; MALLICK-SEARLE, 2019; WU, 2019).

Atualmente, cerca de 550 compostos já foram identificados em extratos de canábis, sendo pelo menos 144 isolados e identificados como fitocannabinóides. Além deles, outros compostos químicos presentes na canábis, como monoterpenóides e sesquiterpenóides também podem ter um papel na atividade biológica e efeitos farmacológicos da planta. Ainda, duas outras classes de cannabinóides têm despertado interesse com finalidade científica e farmacológica: os endocannabinóides, produzidos por nosso organismo; e os cannabinóides sintéticos (RUSSO, 2011; HODGES & ASHPOLE, 2019; HIRSCH & TAM, 2019; MALLICK-SEARLE, 2019).

Entre os exemplos das possíveis terapias utilizando canabinoide, a maior parte das pesquisas está voltada para o SNC. Hoje existem medicamentos de grau farmacêutico, à base de canábis, comercializados em alguns países. O Sativex®, um *spray* de mucosa oral, que contém uma relação de 1:1 THC e CBD (ambos extratos de fitocannabinóides), tem propriedades analgésicas e anti-espasmódicas, com eficácia em pacientes com EM, tendo sido aprovado para utilização no Canadá, mas não nos EUA. Ele tem sido usado para o alívio dos sintomas da EM e para o tratamento da dor neuropática grave relacionada ao câncer. A combinação de THC e CBD parece fornecer uma melhor utilidade para o controle da dor (ROG *et al.*, 2007; ASHTON *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2015; MALLICK-SEARLE, 2019). Dronabinol®, uma preparação do análogo de THC, de uso oral, é um medicamento voltado para tratar a dor neuropática associada à EM. Dronabinol® e Nabilona® (outro análogo do THC) são usados para prevenir a náusea e o vômito após o tratamento quimioterápico, bem como para o tratamento de anorexia e êmese, sendo ambos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA

(ZAJICEK *et al.*, 2003; WADE *et al.*, 2004; GOWRAN *et al.*, 2011; WANG & HENNINGFIELD, 2017; MALLICK-SEARLE, 2019).

Ainda, THC teve demonstrado seu potencial antitumoral em estudos clínicos, bem como parece diminuir a resposta inflamatória à infecção por influenza (GOWRAN *et al.*, 2011, DOTSEY *et al.*, 2017), e CBD mostrou efeitos positivos no tratamento da doença de Alzheimer, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LIBRO *et al.*, 2016). Substâncias medicinais botânicas derivadas de canábis, ricas em cannabidivarin (CBDV) e CBD mostraram grande potencial de supressão de convulsões em três diferentes modelos de convulsão aguda *in vivo*, dando suporte à sua utilização no tratamento da epilepsia (HILL *et al.*, 2013). Uma meta-análise revelou ainda que medicamentos à base de canabinoides são superiores ao placebo no tratamento da dor neuropática associada à EM (ISKEDJIAN *et al.*, 2007).

Assim, percebe-se que os canabinoides exógenos, como os lipídios bioativos isolados da *Cannabis sativa*, ou seus análogos sintéticos são atualmente utilizados no tratamento de uma série de doenças. Suas propriedades analgésicas e protetoras representam um recurso adicional de medicamentos que oferecem benefício para doenças que incluem, mas não se restringem a doenças neurodegenerativas, como a EM, bem como a um número crescente de quadros patológicos, em especial relacionados à neuroinflamação (GOWRAN *et al.*, 2011; GOWRAN *et al.*, 2013; MALLICK-SEARLE, 2019).

Ainda no horizonte de utilização medicinal da canábis, com sua legalização em um número cada vez maior de estados americanos, bem como em outros países, pais de crianças que sofriam com ataques de convulsão incontroláveis optaram por tratar seus filhos com derivados de canábis, em especial aqueles enriquecidos em CBD, muitas vezes sendo feitos extratos de maneira caseira à partir da planta. Esta tendência levou a uma constante presença *on-line* de pais descrevendo a utilização desses extratos em crianças com epilepsia.

Dentro desse cenário, PORTER *et al.*, 2013 pediram aos pais de um grupo do Facebook que anonimamente preenchessem uma pesquisa sobre a

experiência de utilizar tais extratos no tratamento de seus filhos, a fim de obter informações sobre o uso atual de canábis enriquecida com CBD como um tratamento alternativo para a epilepsia infantil. Os resultados mostraram que o número médio de fármacos antiepilépticos experimentado antes da utilização da canábis foi de 12, sendo que 16 (84%) dos 19 pais relataram uma redução na freqüência de convulsão de seus filhos ao utilizar canábis enriquecida com CBD. Destes, 2 (11%) relataram a ausência completa de convulsões, 8 (42%) relataram uma redução maior que 80% na freqüência das convulsões e 6 (32%) relataram uma redução de convulsões entre 25 e 60%. Outros efeitos benéficos incluíram aumento do estado de alerta, melhoras no humor e no padrão de sono. Os efeitos colaterais incluíram sonolência e fadiga (PORTER *et al.*, 2013).

Mais recentemente, abriu-se discussão para diminuir a restrição do uso do CBD no Brasil para o tratamento de convulsões e epilepsia. Atualmente a Anvisa permite que laboratórios registrem no Brasil produtos com CBD e THC como princípio ativo, um passo necessário para a venda de remédios à base dessas substâncias. Os medicamentos derivados de CBD ficam incluídos na lista de substâncias psicotrópicas vendidas no Brasil com receita do tipo A, específica para entorpecentes (ANVISA). A reclassificação aconteceu, entre outros motivos, pois existem evidências científicas suficientes que comprovam a eficácia da droga e sua segurança para uso terapêutico (HILL *et al.*, 2013; PORTER & JACOBSON, 2013; MAA E FIGI, 2014; ANVISA, 2019).

Com isso, em 2017 tivemos o registro do primeiro medicamento à base de *Cannabis sativa* no Brasil. O medicamento é o Mevatyl® (THC, 27 mg/mL + CBD, 25 mg/mL), na forma farmacêutica de solução oral (spray). O medicamento é registrado em outros países com o nome comercial Sativex®, sendo indicado para o tratamento sintomático da espasticidade moderada a grave relacionada à esclerose múltipla, conforme discutido anteriormente. Além disso, desde 2017 a *Cannabis sativa* está incluída na lista de plantas medicinais da ANVISA, na Farmacopeia Brasileira. Assim, a ANVISA reconhece que a planta, e não apenas seus componentes, tem potencial terapêutico. Atualmente, existem diversos projetos de lei em tramitação, relativos à regulamentação da maconha, bem como um aviso de audiência

pública sobre canábis medicinal. A audiência pretende tratar dos requisitos para o cultivo da planta por empresas farmacêuticas, única e exclusivamente para fins medicinais e científicos, bem como dos procedimentos para o registro e monitoramento de medicamentos produzidos à base da canábis medicinal (ANVISA, 2019).

No entanto, estudos relativos a fitocanabinóides tornam-se complicados em termos de interpretação de resultados, devido à complexidade, diversidade e heterogeneidade de compostos inerentes a qualquer matéria vegetal, bem como seus extratos brutos e preparações mais simples. Assim, estudos que buscam elucidar o perfil farmacológico desses fitocanabinóides, bem como dos outros tipos de canabinóides e do eCBS como um todo, tornam-se essenciais para a aplicação terapêutica dessas substâncias (SOETHOUDT *et al.*, 2017; HODGES & ASHPOLE, 2019).

1.2.2 Sistema canabinoide endógeno e suas aplicações

Preparações de *Cannabis sativa L.* têm sido utilizadas para fins medicinais e recreativos há milhares de anos, conforme relatado, e seus constituintes são conhecidos por modularem um conjunto diversificado de respostas fisiológicas através da interação dos fitocanabinoides com o sistema canabinoide endógeno (eCBS). O eCBS consiste em uma família de receptores, ligantes endógenos e a maquinaria molecular para sua síntese, transporte e metabolismo, sendo mais bem descrito no SNC (Figura 4). Uma vez que a utilização medicinal de canábis tem se tornado uma realidade por todo o mundo, a compreensão acerca do eCBS é imprescindível para a melhor utilização terapêutica dos canabinóides (GRILL *et al.*, 2019).

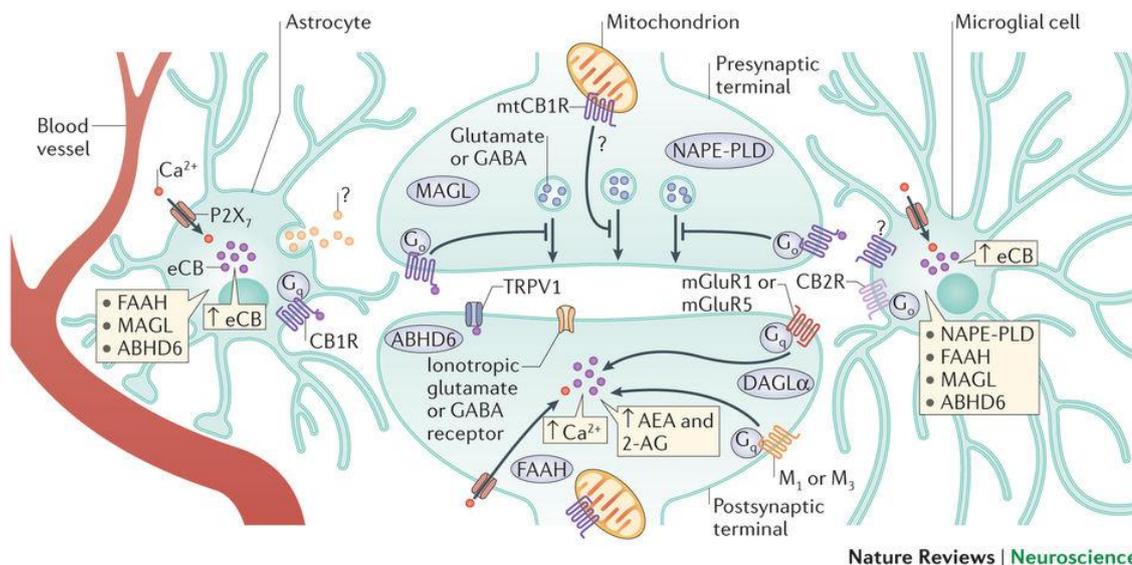


Figura 4: Principais componentes do sistema endocanabinoide (eCBS) no sistema nervoso central: os dois ligantes endocanabinóides (eCB) "clássicos": N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG); os receptores canabinóides CB1 (CB1R) e CB2 (CB2R); as enzimas responsáveis pela síntese dos endocanabinóides: sintetizadoras de AEA (ABDH6 e NAPE-PLD), sintetizadoras de 2-AG (DAGL α); as enzimas responsáveis pela degradação dos endocanabinóides (FAAH - capaz de metabolizar tanto AEA quanto 2-AG; MAGL - degradação preferencial de 2-AG).

Encontrado em todos os vertebrados, o sistema endocanabinoide é um sistema de sinalização ubíquo, cuja maioria dos efeitos biológicos está associada à ação de endocanabinóides, fitocanabinóides e vários compostos sintéticos através das suas interações com os receptores clássicos CB1 e CB2, embora com diferentes graus de seletividade. Devido à sua ubiquidade, foi sugerido que seus papéis homeostáticos estão relacionados a "relaxar, comer, beber, descansar, dormir, economizar, guardar, esquecer e proteger" (DI MARZO, 1998). A importância desse sistema é ressaltada quando percebemos que tais vias de sinalização existem mesmo em organismos mais primitivos, onde regulam uma série de processos vitais, bem como quando percebemos que, em organismos mais complexos, ele exerce um papel regulador de respostas celulares adaptativas a vários estímulos endógenos e exógenos que poderiam colocar em perigo a homeostase interna do indivíduo (DE PETROCELLIS et al., 1999; DOTSEY et al., 2017; MARINO et al., 2017; MORENO et al., 2019; HIRSCH e TAM, 2019).

Os componentes do eCBS começaram a ser descritos no final dos anos 1980 e início dos anos 1990, durante as buscas pelos alvos farmacológicos do

THC (DEVANE *et al.*, 1988; MATSUDA *et al.*, 1990). Seus principais componentes são: os dois ligantes endocanabinóides “clássicos”, N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA), caracterizada em 1992, e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), descoberta mais tarde; e os também “clássicos” receptores canabinóides CB1 e CB2. Nos últimos anos, a descoberta de outros ligantes e receptores levou à expansão do eCBS original. Entre os “novos” ligantes podemos ressaltar: 2-araquidonil-glicerol-éter (noladina, 2-AGE), O-araquidonil-etanolamina (virodamina, OAE), N-araquidonil-dopamina (NADA), e a amida do ácido oleico (oleamida, OA), bem como outros receptores alvo, em especial os receptores acoplados à proteína G 55 e 119 (GPR55 e GPR119), receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs), e receptores vanilóides de potencial transitório 1 (TRPV1).

Ainda pertencendo ao eCBS, temos as enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinóides, desempenhando um papel crucial na sinalização celular. Diferentes enzimas foram identificadas como sintetizadoras de AEA, como ABDH6, GDE1, PTPN22, porém a principal e mais relevante delas é a *N-acyl-phosphatidylethanolamine-selective phospholipase D* (NAPE-PLD). Já as principais enzimas sintetizadoras de 2-AG são as *diacylglycerol lipase alpha* e *beta* (DAGL α e DAGL β), com maior relevância de DAGL α . Em relação às enzimas responsáveis pela degradação dos endocanabinóides, a *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) é capaz de metabolizar tanto AEA quanto 2-AG, porém a degradação preferencial de 2-AG é via *monoacylglycerol lipase* (MAGL). Uma via secundária de degradação desses ligantes pode envolver ainda sua oxidação via COX-2 (IANOTTI *et al.*, 2016; MARINO *et al.*, 2017; BAZWINSKY-WUTSCHKE *et al.*, 2019; GRILL *et al.*, 2019; MORENO *et al.*, 2019; RAMER *et al.*, 2019).

O termo “endocanabinoidoma” foi então cunhado para abranger todos esses componentes, bem como possíveis novas moléculas componentes do eCBS, englobando todos os receptores canabinóides e não-canabinóides do sistema, todos os ligantes do sistema e as enzimas envolvidas em sua síntese, transporte e degradação (GRILL *et al.*, 2019).

Os processos fisiológicos associados à ativação do eCBS incluem neurotransmissão, percepção da dor, memória e aprendizagem, formação das emoções, apetite, funções motoras e endócrinas, homeostasia cardiovascular e resposta imune, entre outras (MARINO *et al.*, 2017; ROSSI *et al.*, 2019).

Em relação ao sistema energético, a sinalização endocannabinoide parece exercer um papel regulador no balanço energético através de uma ação coordenada nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central (RIVERA *et al.*, 2013; ROSSI *et al.*, 2019).

Quanto ao desenvolvimento de tumores, há evidências crescentes de que a maioria dos membros do sistema endocannabinoide de ligantes, receptores e enzimas exerce efeitos significativos sobre o crescimento, motilidade, invasão, disseminação e colonização de células tumorais em órgãos distantes (MARINO *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2019).

Nesse sentido, tal miríade de ações é devida ao fato de o eCBS estar presente em diferentes tecidos e tipos celulares, regulando vários processos celulares e fisiológicos. Recentemente, ambos os receptores foram encontrados tanto dentro quanto fora do sistema nervoso central (SNC). Dentro do SNC, os receptores CB1 já foram identificados em diversas regiões, como tronco cerebral, córtex, núcleo accumbens, hipotálamo, cerebelo, hipocampo, amígdala, medula espinhal, entre outros. Sua proeminente expressão no SNC tem chamado atenção e levado a crer que ele tem papel fundamental na modulações de diferentes funções cerebrais, incluindo processamento executivo, emocional, as vias de recompensa e de memória. Esses efeitos parecem ser devidos diretamente à modulação do eCBS e também devidos a efeitos indiretos sobre os sistemas glutamatérgico, gabaérgico e dopaminérgico. Fora do SNC, CB1 foi identificado, entre outros, no fígado, medula óssea, pâncreas, pulmões, sistema vascular, músculos, trato gastrointestinal, órgãos reprodutivos e no sistema imunológico (LOPRINZI *et al.*, 2019; MONTANARI *et al.*, 2019; WU, 2019).

CB2, por sua vez, no SNC parece ter uma distribuição mais restrita, estando presente principalmente no tronco cerebral e em células gliais. Já

periféricamente ele foi descrito no sistema imunológico, fígado, medula óssea, pâncreas, baço, ossos e pele, entre outros. O CB2 é um receptor dinâmico e indutível, e por isso tem sido defendido que, no SNC, sob algumas condições patológicas, como vício, inflamação do tecido, ansiedade e epilepsia, entre outros, sua expressão pode ser alterada, sugerindo envolvimento com várias doenças neurológicas. Ainda, os receptores CB2 localizados nas células do sistema imune parecem ter um papel ativo na modulação da migração e liberação de citocinas por parte das células imunológicas (LOPRINZI *et al.*, 2019; MONTANARI *et al.*, 2019; WU, 2019).

Vale ressaltar que, conforme dito, as células do sistema imune expressam ambos CB1 e CB2 e, entre elas, linfócitos B, células NK e monócitos expressam os níveis mais altos de CB2, o que sugeriu inicialmente que esses receptores devem desempenhar papel importante na função do sistema imune como um todo (DOTSEY *et al.*, 2017).

Quanto ao sistema imune então, as moléculas envolvidas no eCBS parecem ser produzidas "sob demanda" a partir de precursores de fosfolípidos de membrana, induzindo suas ações moduladoras imunológicas através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e células TH17, modulação da reposta de células TH1/TH2 CD4+, aumento de células Treg, indução de células imunossupressoras mieloides, inibição da proliferação de leucócitos e indução da apoptose de células efectoras. Em contraste com o CB1, que é principalmente expresso no SNC, conforme comentado acima, CB2 é predominantemente expresso em células imunes e parece não ter papel nos efeitos psicotrópicos do THC, embora o mesmo se ligue tanto em CB1 quanto em CB2 (KEMTER *et al.*, 2015; DOTSEY *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2019; BAZWINSKY-WUTSCHKE *et al.*, 2019).

Ainda dentro do sistema imune, vários estudos indicam que o eCBS fornece um alvo atraente para o tratamento de neuroinflamação de origem microglial, podendo regular muitos aspectos da resposta inflamatória no cérebro através de ambos os receptores CB1 e CB2, atuando como moduladores imunológicos no SNC (MALEK *et al.*, 2015).

DOTSEY *et al.*, 2017 postulam ainda que a ativação “sob demanda” da sinalização do eCBS durante a imunização serve como um “sistema de frenagem” inerente para prevenir o desenvolvimento de uma inflamação excessiva durante a ativação imune, mas que também acaba suprimindo a resposta natural à vacinação e pode diminuir a resposta imune de uma maneira geral. Isso pode ser particularmente importante em idosos, onde o declínio imune associado à idade afeta tanto o sistema inato quanto o adaptativo e diminui a capacidade de resposta específica a antígenos (DOTSEY *et al.*, 2017).

Assim, o eCBS desempenha um papel importante na resposta imune, em especial na imunomodulação, sendo que após a estimulação de CB2 por seus ligantes, ele apresenta um potente papel imunomodulador e propriedades anti-inflamatórias. Somando-se isso aos dados expostos no item 1.1.3 - Perfil Imunomodulador de células-tronco mesenquimais e sua utilização, percebemos que o eCBS deve ser capaz também de modular várias vias, como a auto-renovação e sobrevivência de células-tronco, sua proliferação e difusão dando margem a novos estudos nesse sentido. Embora muito esteja sendo estudado e elucidado acerca do eCBS, ainda existe uma grande lacuna na compreensão mais estrita acerca do seu funcionamento, em especial quando trata-se do sistema como um todo, o que se mostra um obstáculo entre a pesquisa científica e a prática clínica da utilização de canabinoides (GALVE-ROPERH *et al.*, 2013; AMENTA *et al.*, 2014; LIBRO *et al.*, 2017; MONTANARI *et al.*, 2019).

1.3 Sistema canabinoide e células-tronco

As propriedades imunomoduladoras das MSC humanas têm atraído muita atenção dos imunologistas e médicos. Trabalhos com MSC em relação ao eCBS e imunomodulação são relativamente escassos, sendo que a maior parte dos estudos são relacionados a células-tronco progenitoras neuronais.

De uma maneira geral, as MSCs expressam todos os componentes do eCBS, e estudos sugerem o CB2 como mediador das principais propriedades imunomodulatórias, bem como de suas vias de sobrevivência e capacidade de

migrar em direção à concentração de endocanabinóides. Foi observado ainda que essas células são produtoras de endocanabinóides, como AEA, 2-AG e OEA (ROSSI *et al.*, 2013, GOWRAN *et al.*, 2013).

Mais especificamente, o tratamento das MSCs com LPS leva à diminuição da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 e aumento de citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , IL-8 e IL-17, sendo que a ativação de CB2 por agonista específico reverteu esses efeitos induzidos por LPS. A análise por *western blot* mostra ainda que há um aumento na produção de IL-10 após a estimulação de CB2 (ROSSI *et al.*, 2013).

Em estudo com células progenitoras endoteliais, foi constatada a liberação dos endocanabinóides AEA e 2-AG por essas células, sendo que na presença de TNF- α houve aumento de 2-AG. Ainda, após o tratamento de células desse mesmo tipo com endocanabinoide, porém maduras, percebeu-se a redução da indução (por TNF- α) da molécula de adesão pró-inflamatória CD106 (VCAM-1) (OPITZ *et al.*, 2007).

Outros trabalhos, relacionado com células-tronco neuronais (NSCs) ou progenitoras do sistema nervoso, mostraram que o bloqueio farmacológico dos receptores canabinóides CB1 e/ou CB2 diminuiu a proliferação de NSCs, e indicaram que a via de sinalização de IL-1 está envolvida. Assim, os autores sugerem que o eCBS, que tem ações neuroprotetoras e imunomoduladoras mediadas pela cascata de sinalização de IL-1 no cérebro, pode participar no processo de proliferação e diferenciação de NSC (GARCÍA-OVEJERO *et al.*, 2013).

Mecha *et al.* (2012) verificaram ainda que o CBD protegeu células progenitoras de oligodendrócitos da apoptose induzida por inflamação estimulada por LPS ou INF- γ . O tratamento com canabidiol reverteu a indução de caspase 3, porém, de forma independente dos receptores CB1 e CB2, diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio e a apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático, seguida pela diminuição dos efetores moleculares Bax e caspase 12 (Mecha *et al.*, 2012).

GOWRAN *et al.*, 2013 demonstraram que o receptor CB1 tem sua expressão aumentada durante a diferenciação osteogênica de MSCs e é

essencial para a sobrevivência dessas células diferenciadas. Assim, os autores postulam que os resultados demonstram a potencial aplicação de canabinóides em pré-culturas de MSCs, a fim de influenciar suas funções fisiológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, abrindo espaço para novas pesquisas (GOWRAN *et al.*, 2013).

XIE *et al.*, 2016, estudando o papel modulador de MSCs na inflamação e sensibilidade à dor crônica, mostraram que BMSCs expressam ambos os receptores canabinóides (CB1 e CB2). Mostraram ainda que THC foi capaz de ativar o receptor CB2, conseqüentemente exacerbando a modulação de MSCs sobre a liberação de citocinas associadas à inflamação. Corroborando dados *in vitro*, o pré-tratamento com THC melhorou os efeitos imunomoduladores do BMSCs, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (XIE *et al.*, 2016).

WANG *et al.*, 2017 tiveram como objetivo avaliar o impacto de canabinóides na migração de BMSCs em lesões hepáticas e investigar os mecanismos envolvidos. Em seu estudo, eles descobriram que BMSCs expressavam tanto CB1 quanto CB2, mas que, *in vitro*, CB1, e não CB2, mediou a migração de BMSCs, sendo essa migração associada à remodelação do citoesqueleto. Mais do que isso, o bloqueio farmacológico de CB1 *in vivo* reduziu consideravelmente o recrutamento de BMSC para o fígado lesado e atenuou a fibrose hepática (WANG *et al.*, 2017).

Em se tratando de trabalhos com células-tronco de origem em tecidos dentários, alguns estudos merecem destaque. LIBRO *et al.*, 2017 realizaram um amplo estudo de expressão gênica, a fim de avaliar o efeito do tratamento com CBD sobre o fenótipo molecular de células-tronco gengivais (GMSCs, do inglês *Gingival Mesenchymal Stem Cells*). Em especial, foi analisado se o pré-tratamento *in vitro* de GMSCs com CBD poderia influenciar seu perfil de expressão, melhorando o potencial terapêutico desta cultura celular. Após o tratamento com CBD durante 24 h, a análise da expressão gênica revelou vários genes diferencialmente expressos, que estavam ligados à inflamação e apoptose. Em particular, demonstraram que o tratamento com CBD impediu a ativação da via NALP3-inflamassomo, suprimindo os níveis de NALP3, CASP1 e IL-18, e em paralelo inibiu a apoptose, como demonstrado pela supressão de

Bax. O tratamento com CBD também foi capaz de modular a expressão de conhecidos marcadores de MSCs (CD13, CD29, CD73, CD44, CD90 e CD166) e outros antígenos de superfície. Especificamente, o CBD levou à diminuição da expressão de genes que codificam para os antígenos envolvidos na ativação do sistema imunológico (CD109, CD151, CD40, CD46, CD59, CD68, CD81, CD82, CD99), enquanto levou à elevação da expressão dos genes envolvidos na inibição das respostas imunes (CD47, CD55, CD276) (LIBRO *et al.*, 2017).

LIBRO *et al.*, 2017, em outro estudo, demonstraram que o pré-tratamento de GMSCs com CBD também modulou o perfil de expressão gênica dessas células, atenuando a expressão de genes implicados na etiopatogenia da doença de Alzheimer. Este estudo *in vitro* demonstrou que as GMSCs pré-condicionados com CBD possuem melhores potenciais terapêuticos se comparadas com as células controle, o que levou os autores a concluírem que o seu transplante no estágio inicial da doença de Alzheimer pode desempenhar um papel importante na prevenção ou atenuação do início da doença (LIBRO *et al.*, 2016, 2017).

Dessa forma, verifica-se ainda relativa escassez de trabalhos sobre o sistema canabinoide e MSCs em relação à imunomodulação, principalmente em relação a células-tronco originárias de tecidos dentários. Assim, há a necessidade de ampliar a investigação da interação das DPSCs e eCBS em relação a imunomodulação, na tentativa de elucidar melhor essas vias de atuação, uma vez que essa é uma via de comunicação comum em MSCs. O estímulo do eCBS pode influenciar a ativação e resposta das DPSC, modulando sua influência sobre o quadro inflamatório e seu comportamento frente a inflamação.

Este estudo é de grande importância ainda para contribuir no entendimento dos efeitos benéficos ou colaterais no sistema corpóreo como um todo, formando a base para uma melhor compreensão do efeito medicinal da canábis no esclarecimento de sua ação em doenças neurodegenerativas e no desenvolvimento de novos medicamentos, entre outros, frente à atual demanda da utilização de substâncias como o CBD no tratamento de doenças variadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a participação do sistema endocanabinóide na proliferação e modulação da função imunológica de células-tronco da polpa dentária humana, na presença ou ausência de TNF- α .

2.2 Objetivos específicos

- Isolar células-tronco a partir da polpa de dentes decíduos humanos, cultiva-las, expandi-las e congela-las;
- Caracterizar as linhagens obtidas quanto à expressão dos marcadores CD34 e CD45 (hematopoiéticos); Nestin e CD105 (mesenquimais); OCT4 e NANOG (embrionários);
- Avaliar o potencial de diferenciação osteogênica das células obtidas;
- Estimular as DPSC na presença do agonista (anandamida) e dos antagonistas (AM251 e SR144528) de receptores canabinóides, sob co-estímulo ou não de TNF- α ;
- Avaliar o imunofenótipo das DPSC em relação às moléculas de superfície HLA-DR, PD-L1 e PD-L2.
- Quantificar a expressão de mRNA dos receptores CB1 e CB2, e das enzimas DAGL α , MAGL, NAPE-PLD e FAAH, relacionados ao sistema endocanabinóide.
- Quantificar a expressão de mRNA das citocinas IL-6 e TGF-Beta.
- Avaliar o efeito do estímulo na taxa de proliferação das DPSC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento das DPSCs

As DPSCs foram obtidas de dentes decíduos esfoliados humanos, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo responsável do doador (a identidade do doador foi mantida em sigilo). O processamento da polpa dentária foi realizado por dilaceramento mecânico com auxílio de bisturi. A polpa foi lavada e cultivada em meio basal constituído de meio DMEM/F12 (Invitrogen, CA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; LGC Biotecnologia, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, EUA), até a liberação e aderência das células à placa de cultura (GRONTHOS *et al.*, 2000; modificado). As DPSC isoladas foram expandidas e congeladas em meio de congelamento constituído de DMEM/F12 suplementado com 20% (v/v) de SFB (LGC Biotecnologia, Brasil) e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, EUA). As DPSC, em passagem de P4 a P8 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada com concentração de 5% CO₂, até atingir confluência máxima de 70%. O acompanhamento do crescimento celular e sua morfologia foram feitos por microscopia de luz transmitida (Nikon TS100F, Japão).

3.2 Caracterização molecular das DPSCs

Para traçar o perfil molecular das células isoladas foi analisada a expressão de genes que agem como marcadores de células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais e embrionárias. Os marcadores para células-tronco hematopoiéticas utilizados foram *CD34* e *CD45*; para células-tronco mesenquimais foram *Nestin* e *CD105*; e para células-tronco embrionárias foram *Nanog* e *OCT4*. Foi ainda utilizada como controle interno a expressão dos genes *GAPDH* e *Beta-actina*.

Inicialmente, o RNA total de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células foi extraído utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop™1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) e seu grau de pureza estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm. Logo após, cerca de 2 µg de RNA total foram utilizados para a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA, então, foi utilizado como *template* para as reações de PCR.

As reações de PCR para amplificação da região alvo dos marcadores citados foram feitas utilizando-se 0,6 µM de cada um dos *primers* F e R para os respectivos marcadores (conforme Tabela 1), 2 µL da reação de síntese de cDNA usada diretamente como *template*, 1x *Go Taq® Flexi Buffer*, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1 U *Go Taq®* polimerase (*GoTaq® Flexi DNA Polymerase*, Promega Corporation, EUA), e água Mili-Q suficiente para um volume final de reação de 25 µL. A solução foi inicialmente desnaturada a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos compostos por: desnaturação (95°C por 30s), anelamento dos *primers* (60°C por 30s) e alongamento da fita (72°C por 30s), além da extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi visualizado em géis de agarose 2% (p/v) corados com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). A condição da corrida do gel foi de 80 v por 1h30min, analisando-se as bandas esperadas nas alturas indicadas.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* para a caracterização das células

Marcador	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	T _m (°C)
Embrionário				
OCT4	ACTTCACTGCAC TGTACTCCTCAG	AGGTTCTCTTTCC CTAGCTCCTC	158	60
NANOG	CTACCCAGCCT TTACTCTTCCTAC	CTCTCCACAGTTA TAGAAGGGACTG	217	60
Controles				

B actina	ATTAAGGAGAAG CTGTGCTACGTC	GATGGAGTTGAA GGTAGTTTCGTG	213	60
GAPDH	GAAGGTGAAGGT CGGAGTC	GAAGATGGTGAT GGGATTTTC	226	58
Hematopoiético				
CD34	AACACCTAGTAC CCTTGGAAGTAC C	AACACTGTGCTG ATTACAGAGGTC	177	60
CD45	GGACACAGAAGT ATTTGTGACAGG	GAGAAGTTGTGG TCTCTGAGAAGT C	176	60
Mesenquimal				
Nestin	GGACCCTCCTAG AGGCTGAG	GTGAGGAGAGGG GAGTAGGG	168	60
CD105	TGCCACTGGACA CAGGATAA	CCTTCGAGACCT GGCTAGTG	205	60

3.3 Diferenciação osteogênica das DPSCs

Para avaliar o potencial de diferenciação osteogênica das DPSC, inicialmente 1×10^4 células foram plaqueadas (D0) em placas de 6 poços e cultivadas por 24 horas com meio de manutenção para aderirem ao fundo da placa. No dia seguinte (D1) o meio de manutenção foi substituído pelo meio de indução osteogênica composto por DMEM-LG, SFB (10% v/v), dexametasona (1×10^{-8} M), 2-fosfato ácido ascórbico (0,2 mM), β -glicerolfosfato (10 mM). A cultura foi mantida por 14 dias, trocando-se o meio a cada 2 dias. As células utilizadas nesse ensaio estavam inicialmente em P6, e o experimento foi realizado em triplicata. A evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através do microscópio invertido (Nikon TS100F, Japão). Ao final dos 14 dias, a deposição de cálcio típica de osteoblastos foi avaliada através da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, EUA).

Para a coloração, o meio indutor osteogênico foi removido e as culturas de células foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) por 24 horas. A solução de vermelho de alizarina foi preparada de acordo com as recomendações do

fabricante: vermelho de alizarina e hidróxido de amônio na proporção de 10:1, respectivamente, seguido de agitação a temperatura ambiente por 15 minutos (Forma Orbital Shaker, Thermo, EUA). Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada, o sobrenadante foi removido e foram aplicados 2 mL/poço da solução de vermelho de alizarina, deixando em contato, em temperatura ambiente, por 5 minutos. O excesso da solução foi descartado e a placa foi mantida aberta até a secagem. As imagens foram obtidas através de microscópio invertido (Nikon TS100F, Japão).

3.4 Cultura celular e estímulo do sistema canabinoide

DPSCs foram cultivadas (1×10^5 células em placas de 6 poços) na presença do agonista (anandamida - Ago, Cayman Chemical, EUA) e dos antagonistas dos receptores CB1 (AM251 - Ant1, Cayman Chemical, EUA) e CB2 (SR144528 - Ant2, Cayman Chemical, EUA), todos diluídos em DMSO, durante 48h, sob estímulo ou não de TNF- α (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, EUA), conforme mostra a Tabela 2. A concentração utilizada do agonista anandamida (Ago) foi de 5 μ M (adaptado de Chiurchiu *et al.*, 2013) e dos antagonistas de 2 μ M para AM251 (Ant 1, adaptado de Jiang *et al.*, 2007) e 2 μ M para SR144528 (Ant 2, adaptado de Cabral *et al.*, 2005).

Tabela 2 - Descrição dos grupos utilizados para imunomodulação das DPSCs

	Sem TNF- α	Com TNF- α
Grupos	Meio	Meio
	Meio + DMSO	Meio + DMSO
	Anandamida (Ago)	Anandamida (Ago)
	AM251 (Ant 1)	AM251 (Ant 1)
	SR144528 (Ant 2)	SR144528 (Ant 2)

Ant 1 + Ant 2	Ant 1 + Ant 2
Ago + Ant 1	Ago + Ant 1
Ago + Ant 2	Ago + Ant 2
Ago + Ant 1 + Ant 2	Ago + Ant 1 + Ant 2

3.5 Avaliação de marcadores celulares por citometria de fluxo

Para a análise de citometria de fluxo, as DPSC foram lavadas três vezes em PBS, desagregadas enzimaticamente utilizando Tripsina (TrypLE Express, Invitrogen, EUA) por cinco minutos a 37 °C, e inativadas com o próprio meio de cultivo. As células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, contadas utilizando hemocitômetro e destinadas à marcação para moléculas de superfície. As DPSC foram marcadas com os anticorpos monoclonais para as moléculas de superfície relacionadas à imunomodulação HLA-DR, PDL-1 e PDL-2. Para o procedimento, 1×10^5 células de cada um dos grupos (Tabela 2) em suspensão foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em “U” e lavadas duas vezes através de centrifugação a 300 g a 4 °C com tampão FACS gelado (PBS 1x com 1% (v/v) de SFB). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas no volume residual, sendo adicionados 20 µL de FACS de cada anticorpo na concentração de 1/100 (v/v), seguidos de breve homogeneização. As células foram incubadas, protegidas da luz, por 30 minutos a 4 °C. Em seguida as células foram lavadas três vezes com tampão de FACS gelado (centrifugação a 300 g, a 4 °C) e ressuspendidas em 150 µL de tampão de FACS gelado, sendo conservadas em geladeira até a leitura no citômetro. 50.000 eventos foram lidos para cada grupo e foi utilizado como controle negativo células não marcadas com os anticorpos. O experimento foi feito em triplicata.

3.6 PCR em tempo real

Após o cultivo celular experimental (Tabela 2), o RNA total de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células foi extraído utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop™1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) e seu grau de pureza estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm. Logo após, cerca de 2 µg de RNA total foram utilizados para a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop™1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) e seu grau de pureza estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm, sendo então utilizado como *template* para as reações de PCR.

Os *primers* específicos para os componentes do eCBS: *CB1*, *CB2*, *DAGLα*, *MAGL*, *NAPE-PLD*, *FAAH*; e para as citocinas: *IL-6* e *TGF-β* foram desenhados utilizando o software Primer3 e sintetizados pela Qiagen (Tabela 3). As reações de qRT-PCR foram feitas usando o kit *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as especificações do fabricante, após realização do teste de eficiência para *primers* e concentração de cDNA. A análise da expressão do mRNA foi normalizada com os genes endógenos GAPDH e Beta-Actin, e a expressão relativa foi calculada com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O experimento foi realizado em triplicatas.

Tabela 3 – Sequência dos *primers* para determinação dos efeitos da imunomodulação

Marcador	Primer F	Primer R	Amplicon (pb)	T _m (°C)
CB1	GGAGTAAGGACC	TCTTGACCGTGC	168	60
	TGCGACAC	TCTTGATG		
CB2	TAGACACGGACC	TTCTCCCAAGTC	241	60
	CCTTTTTG	CCTCATTG		

DAGL α	TACCGAGGTGGA CCTGACTC	CCTCCAGGCTCA TCTCAGAC	155	60
MAGL	ACTTCCACGTTTT CGTCAGG	AGGCGAAATGAG TACCATGC	167	60
NAPE-PLD	TCACGGATCCCA TCTTTAGC	CACAGCCACATT TTTGCATC	240	60
FAAH	CTGGAGACCAAA CAGAGCCTTG	ACTGAAGAGCCC ACCTGTTGA	108	62
IL-6	ATGCAATAACCA CCCCTGAC	ATCTGAGGTGCC CATGCTAC	171	60
TGF-Beta	AAGTGGACATCA ACGGGTTC	TGCGGAAGTCAA TGTACAGC	213	60

3.7 Análise de Proliferação

Para análise de proliferação, 500 células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo chato e cultivadas conforme descrito no item “3.4 Cultura celular e estímulo do sistema canabinoide”: DPSCs foram cultivadas na presença do agonista (anandamida - Ago, Cayman Chemical, EUA) e dos antagonistas dos receptores CB1 (AM251 - Ant1, Cayman Chemical, EUA) e CB2 (SR144528 - Ant2, Cayman Chemical, EUA), todos diluídos em DMSO, durante 48h, sob estímulo ou não de TNF- α (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, EUA), conforme mostra a Tabela 2. A concentração utilizada do agonista anandamida (Ago) foi de 5 μ M e dos antagonistas de 2 μ M para AM251 (Ant 1) e 2 μ M para SR144528 (Ant 2).

Após 48h, foi adicionada solução 0,15 mg/mL de sal de resazurina (Alamar Blue®, Thermo Fisher Scientific, EUA) à cultura, na proporção de 10% (v/v) conforme indicações do fabricante. As células foram então incubadas por 4h a 37 °C e a leitura da absorbância foi feita em 570 nm e 600 nm. Para determinação da porcentagem de proliferação em relação ao controle (células cultivadas apenas com meio de cultivo basal - grupo “Meio” da Tabela 2, na ausência de TNF- α), a fórmula utilizada foi:

$$\% \text{ Proliferação} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Onde:

- O1= Absorbância molar do sal oxidado a 570 nm = 80586
- O2= Absorbância molar do sal oxidado a 600 nm = 117216
- A1= Absorbância da amostra a 570 nm
- A2= Absorbância da amostra a 600 nm
- P1= Absorbância do controle a 570 nm
- P2= Absorbância do controle a 600 nm

3.8 Análise estatística

Os dados coletados *in vitro* foram analisados por ferramentas estatísticas adequadas levando em consideração o número da amostra e sua distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk). As diferenças foram consideradas significantes quanto ao valor $p \leq 0,05$ para análise bicaudal. Os gráficos e análises estatística foram gerados utilizando-se o software GraphPad Prisma (versão 7; GraphPad Software, Inc., EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das DPSCs

As linhagens foram isoladas a partir da polpa de um dente decíduo recebido por doação, e mostraram morfologia semelhante a fibroblastos, com células alongadas e em formas de “espículas”, características de células-tronco mesenquimais (Figura 5).

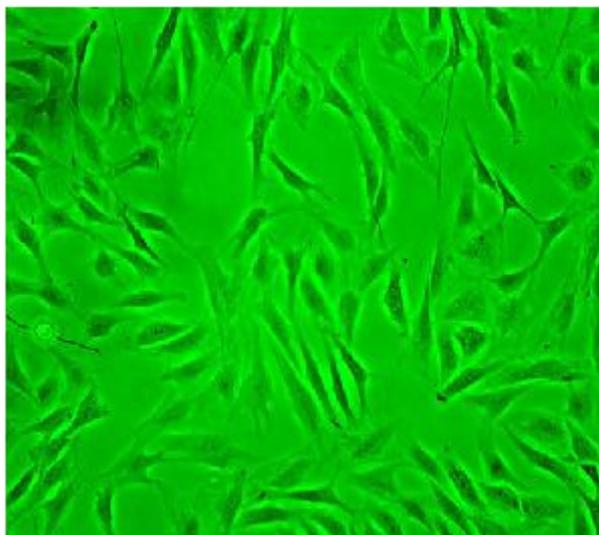


Figura 5: Morfologia fusiforme das DPSC isoladas. Aumento de 10X.

A caracterização molecular (Figura 6) confirmou a marcação esperada, com expressão dos marcadores típicos de MSCs (Nestin e CD105), bem como os dois marcadores embrionários (NANOG e OCT-4), conforme já descrito na literatura (KIRKS et al., 2006; LUO et al., 2018). Além disso, as células não expressaram os marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45 - dados não mostrados).

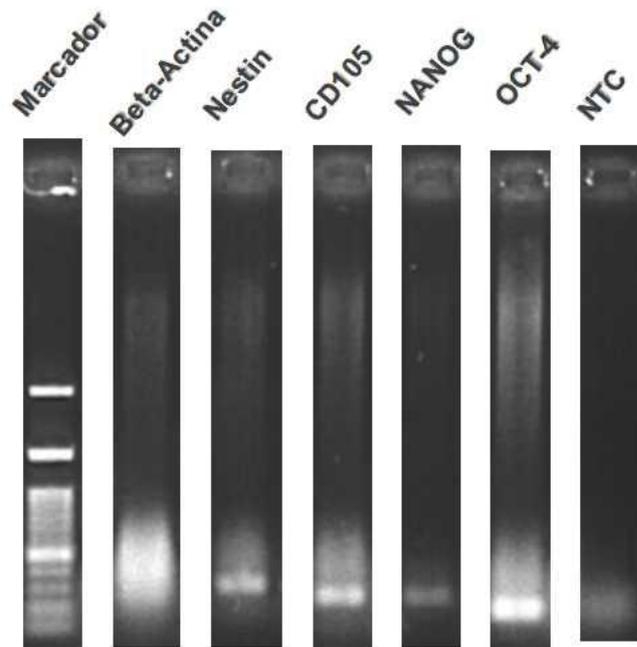


Figura 6: Gel de agarose 2% (p/v) corado com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). Corrida do gel em 80 v por 1h30min. Os marcadores testados estão indicados. NTC = controle negativo (*non-template control*).

As DPSCs mostraram potencial de diferenciação osteogênica, sendo notadas diferenças morfológicas nas células tratadas com meio indutor, com as células apresentando claramente morfologia semelhante a osteoblastos. As fotos foram tiradas no D14, e a diferenciação foi confirmada pela coloração com vermelho de alizarina, que evidencia o depósito de cálcio extracelular no tecido ósseo (Figura 7).



Figura 7: Coloração com vermelho de alizarina para evidenciar a diferenciação osteogênica das DPSCs. O citoplasma é corado fracamente em vermelho. Os depósitos extra celulares de cálcio são corados fortemente de preto. Aumento de 4x.

A identificação morfológica é uma das características necessárias para definição de uma DPSC bem como a expressão de marcadores típicos de MSCs, a ausência de expressão de marcadores típicos de HSCs e a possibilidade de expressão de marcadores embrionários. Ainda, o não comprometimento com linhagens diferenciadas (indiferenciação) e a multipotencialidade são também características preconizadas para definição de uma DPSC. Uma vez que as células isoladas apresentaram a capacidade de se diferenciar em outro tipo celular sob estímulo específico, além da morfologia e marcações moleculares esperadas, tais resultados asseguram a homogeneidade da cultura e a identidade das DPSCs em cultivo segundo o preconizado por diversos autores. (GRONTHOS et al., 2000, 2002; KERKS et al., 2006; YAMAZA et al., 2010; SILVA et al., 2012; XIAO et al., 2017; HASWEH et al., 2018; LUO et al., 2018; ALMEIDA-JÚNIOR et al., 2019).

4.2 Avaliação de marcadores celulares por citometria de fluxo

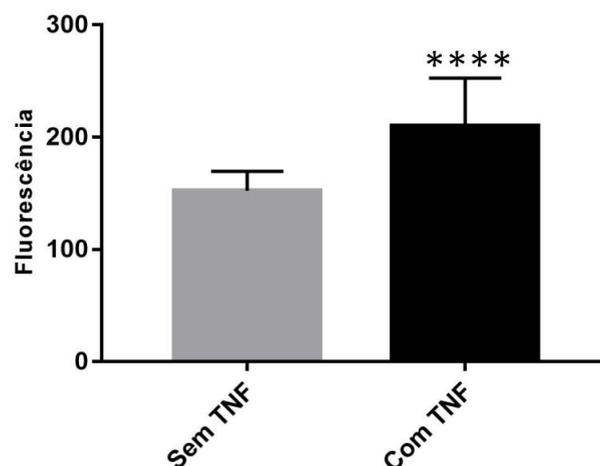
Os grupos Meio + DMSO, e Meio + DMSO + TNF não apresentaram diferença em relação aos grupos Meio e Meio + TNF, respectivamente,

mostrando que o DMSO (diluente do agonista e dos antagonista, conforme descrito na metodologia) não afetou o comportamento das células. Assim, esses dois grupos (Meio + DMSO, e Meio + DMSO + TNF) foram excluídos das representações gráficas. Ainda, dentro da comparação de alguns grupos, muitas diferenças estatisticamente relevantes foram encontradas, e para facilitar a visualização e análise dos resultados, esses gráficos foram divididos em Avaliação 1, Avaliação 2, etc.

4.2.1 HLA-DR

Quando analisa-se conjuntamente todos grupos em ambiente não inflamatório (grupos Meio, Ant1, Ant2, Ant1+2, Ago, Ago+Ant1, Ago+Ant2 e Ago+Ant1+2, todos na ausência de TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) (Gráfico 1), percebe-se que o ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de aumentar a expressão de HLA-DR nas DPSCs, mostrando que elas podem estar aptas a responder imunologicamente, e provavelmente atuarem como apresentadoras de antígenos às células T auxiliares e regulatórias.

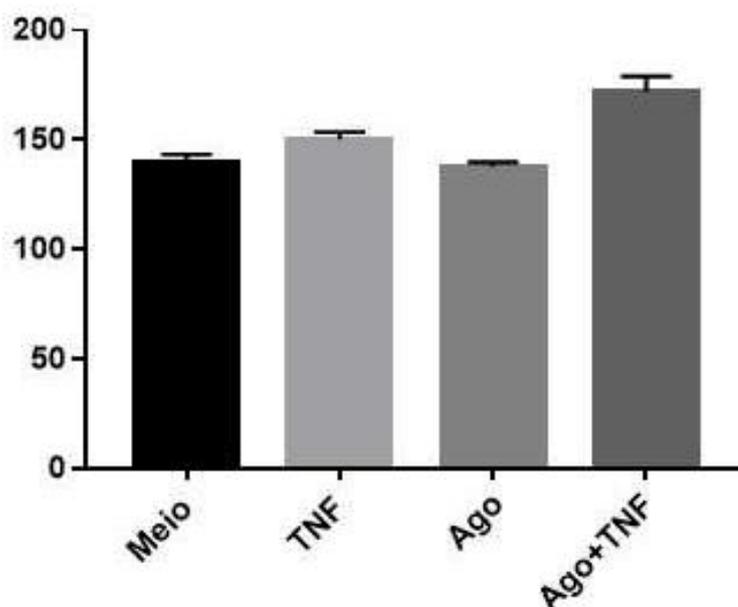
Gráfico 1: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando analisa-se os grupos isoladamente, retirando-se da análise os grupos com a presença dos antagonistas (Gráfico 2), não são detectadas diferenças significativas. Isso primariamente indica que a anandamida não é capaz, isoladamente (Grupo Ago), de aumentar HLA-DR nas DPSCs, mostrando que a ativação dos receptores CB1 e CB2 em ambiente não inflamatório (sem TNF) não é capaz de alterar seu perfil imunológico em relação à apresentação de antígenos. Além disso, também indica que o TNF isoladamente (Grupo TNF) não é o responsável pelo aumento do HLA-DR detectado no ambiente inflamatório. Por último, a presença concomitante de Ago e TNF (que pode ser traduzida como a ativação de CB1 e CB2 em ambiente inflamatório) também não altera esse perfil. Assim, juntamente com o Gráfico 1, tem-se a indicação que a presença aumentada de HLA-DR nas DPSCs em ambiente inflamatório pode ser devida à inibição dos receptores CB1 e/ou CB2 (presença de antagonistas, excluídos do Gráfico 2) ou a outra via de sinalização.

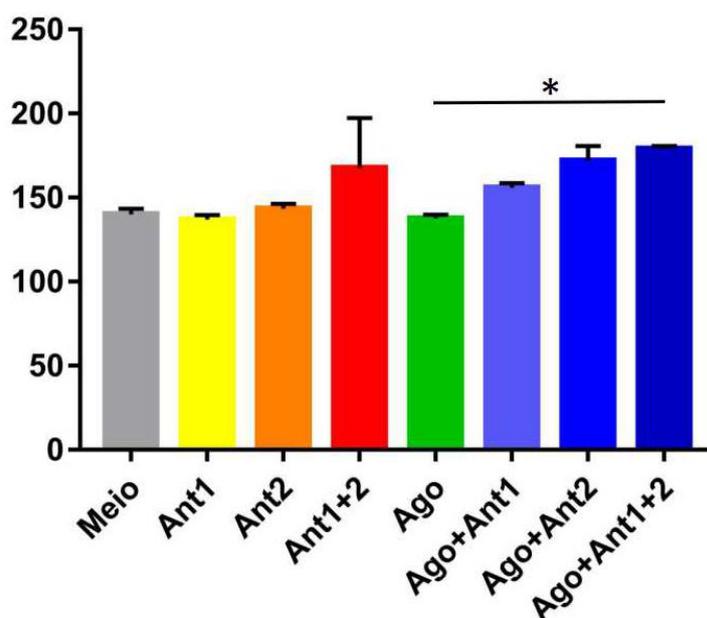
Gráfico 2: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Em ambiente não inflamatório (ausência de TNF) (Gráfico 3), o único grupo que apresentou aumento representativo (embora discreto) de HLA-DR foi o grupo Ago+Ant1+2, reforçando a hipótese de que a presença dos antagonistas deve ser responsável por alterações no HLA-DR. Porém, é notável que, em ambiente sem inflamação, a diferença só acontece na presença do agonista, concomitantemente com a presença de Ant1 e Ant2. Uma vez que a atuação dos receptores CB1 e CB2 pode ser tida como uma atuação retrógrada, sob um complexo sistema de feedback, deve ser considerada a hipótese de que a presença do agonista no meio seja relevante para o efeito relatado dos antagonistas.

Gráfico 3: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.

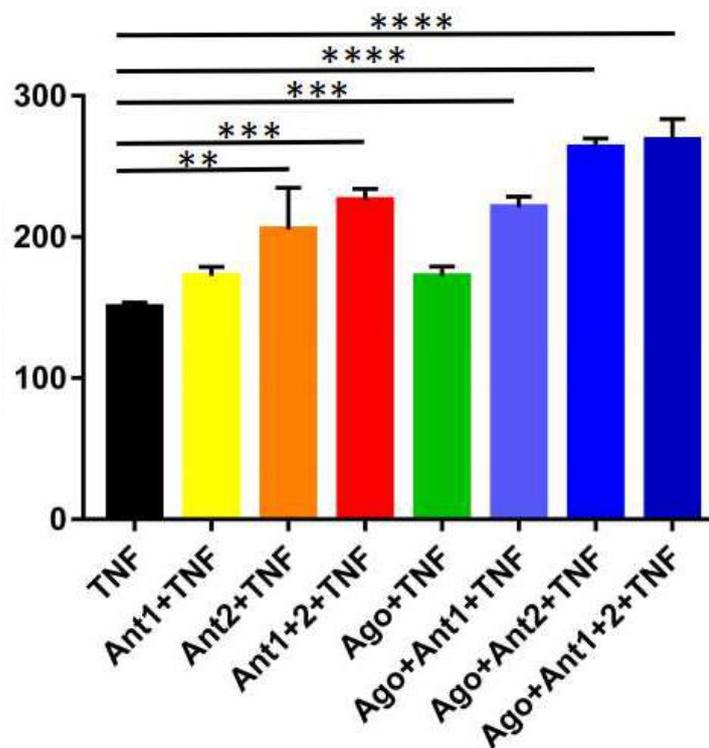


O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Já em ambiente de inflamação (Gráficos 4, 5 e 6), a hipótese de que os antagonistas sejam os responsáveis pelo aumento de HLA-DR mostra-se relevante, uma vez que, comparativamente ao grupo TNF, a presença do agonista não é capaz de levar a esse aumento. Porém, sem a presença de

agonista, a presença do Ant2 isoladamente ou a presença de Ant1+2 aumentam HLA-DR (Gráfico 4). Essa observação levanta a questão de que talvez o bloqueio de CB2 seja o maior responsável pelo aumento de HLA-DR. Já quando existe a presença de agonista no meio, juntamente com qualquer um dos antagonistas, nota-se aumento de HLA-DR. Esse achado também suporta a teoria levantada anteriormente que a presença de agonista no meio possa afetar a resposta celular, exacerbando-a.

Gráfico 4: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 1.

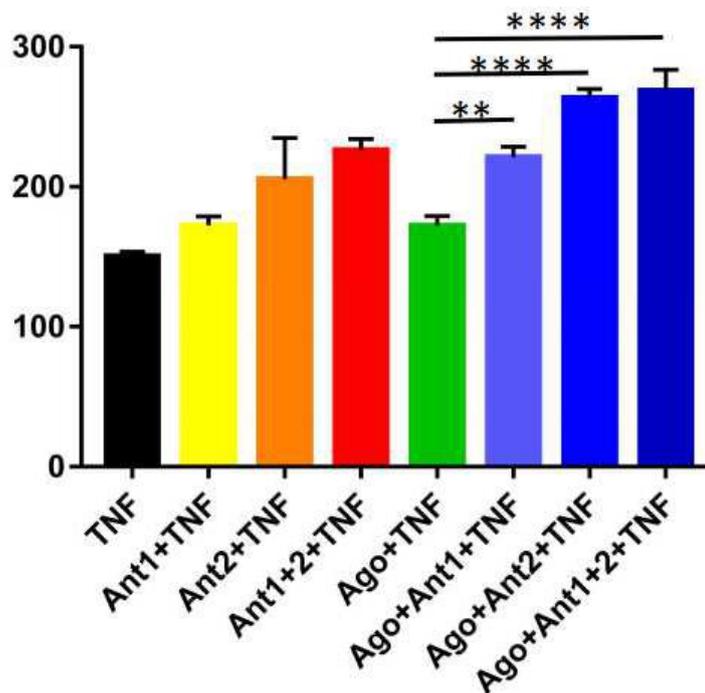


O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando compara-se com o grupo Ago+TNF, mais uma vez é notado que, com a presença de agonista no meio inflamatório, a presença de qualquer um dos antagonistas é capaz de aumentar a expressão de HLA-DR (Gráfico 5), sustentando ambas as hipóteses: os antagonistas são os grandes

responsáveis pelo aumento de HLA-DR, porém a presença de agonista no meio parece capaz de exacerbar essa ação dos antagonistas.

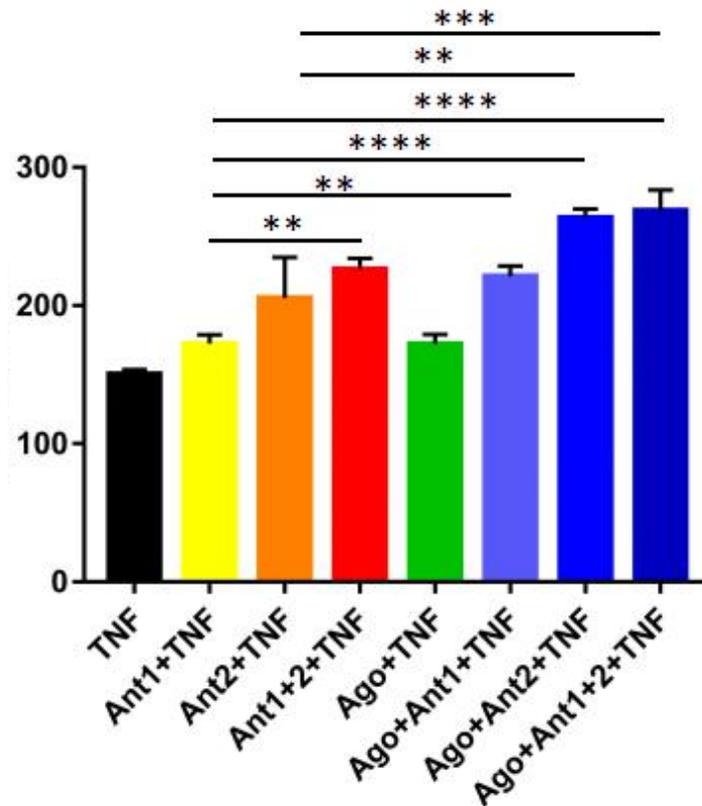
Gráfico 5: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 2.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na comparação entre os antagonistas no meio inflamatório, nota-se novamente uma contribuição maior de Ant2, mostrando que talvez o bloqueio de CB2 seja o responsável pelo aumento de HLA-DR, tornando a DPSC apta a responder imunologicamente, através da apresentação de antígenos. Além disso, nota-se novamente uma exacerbação desse resultado quando há presença do agonista no meio, reforçando a hipótese que sua presença pode amplificar o efeito do bloqueio de CB2 (Gráfico 6).

Gráfico 6: Avaliação da presença de HLA-DR nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 3.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

4.2.1.1 Considerações gerais sobre a presença de HLA-DR

De uma maneira geral, pode-se perceber que existem diferenças de expressão de HLA-DR entre os grupos e condições testados. Vale ressaltar que dois “conjuntos” de alterações estão sendo majoritariamente analisados nesse estudo, a saber: o papel do ambiente inflamatório (presença de TNF- α ou não) nas possíveis alterações fenotípicas, e o papel do eCBS nessas alterações (presença ou ausência do agonista e dos antagonistas).

Marcadamente, a análise do gráfico 1 permite inferir que o ambiente inflamatório é capaz de aumentar a expressão de HLA-DR pelas DPSCs, o que

leva a crer que a inflamação parece ser capaz de induzir um fenótipo de apresentação de antígenos às DPSCs, tornando-as aptas a responder imunologicamente. Isso corrobora e explicaria o fato de essas células, sob condições inflamatórias, serem capazes de interagir com linfócitos T, conforme já relatado, uma vez que HLA-DR é responsável especialmente pela interação de células periféricas com tais linfócitos.

Na análise do gráfico 2, é possível inferir que tal modificação fenotípica não é devida à presença do TNF por si só, uma vez que não houve diferença entre os grupos relatados nessa análise. Assim, pode-se pensar que a interação entre o eCBS e o ambiente inflamatório é que gera tais alterações. Porém, esse gráfico também permite analisar que tampouco é a ativação dos receptores pelo agonista que gera tais modificações, o que leva a crer que os antagonistas é que seriam os grandes responsáveis pelo quadro observado.

Pela análise em conjunto dos gráficos 3 a 6, pode-se perceber de fato o aumento na expressão de HLA-DR pelo bloqueio dos receptores, bem como um proposto papel de amplificação dessas respostas pela presença de agonista no meio que contém antagonistas. Mais que isso, nota-se que o bloqueio de CB2, especialmente em ambiente inflamatório, parece ser o maior responsável pelas alterações.

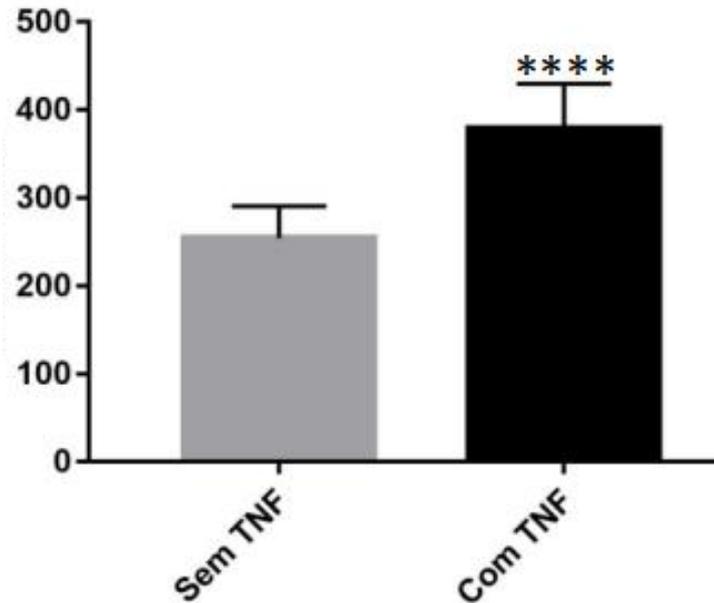
As DPSCs têm demonstrado grande potencial terapêutico, com alguns escassos mas representativos trabalhos focando no papel de interação dessas células com o sistema imunológico (PIERDOMENICO et al., 2005; YAMAZA et al., 2010; ALIPOUR et al., 2013; SILVA et al., 2014; LEE et al., 2016; OMI et al., 2016; HOSSEIN-KHANNAZER et al., 2019). De uma maneira geral, todos estes trabalhos demonstram um papel imunomodulador atribuído às DPSCs, focando primariamente em dois tópicos: liberação de citocinas anti-inflamatórias e supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias; e interação com células T. Assim, os resultados mostrados corroboram a possibilidade de as DPSCs estarem funcionando como células apresentadoras de antígenos às células T, já que possuem a maquinaria molecular para tal. Podem, ainda, corroborar e somar-se aos trabalhos onde a presença de

DPSCs em ambiente de inflamação foi capaz de levar a uma imunomodulação pela diminuição de proliferação das Th ou pelo aumento das Treg (PIERDOMENICO et al., 2005; YAMAZA et al., 2010; ALIPOUR et al., 2013; SILVA et al., 2014), explicando o direcionamento/manutenção de um perfil imunorregulador.

4.2.2 PD-L1 e PD-L2

Quando analisa-se conjuntamente todos grupos em ambiente não inflamatório (sem TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) para a presença de PD-L1 (Gráfico 7), de maneira similar ao relatado para HLA-DR, percebe-se que o ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de aumentar a expressão de PD-L1 nas DPSCs, indicando que elas podem induzir uma via de imunomodulação através da interação com células T.

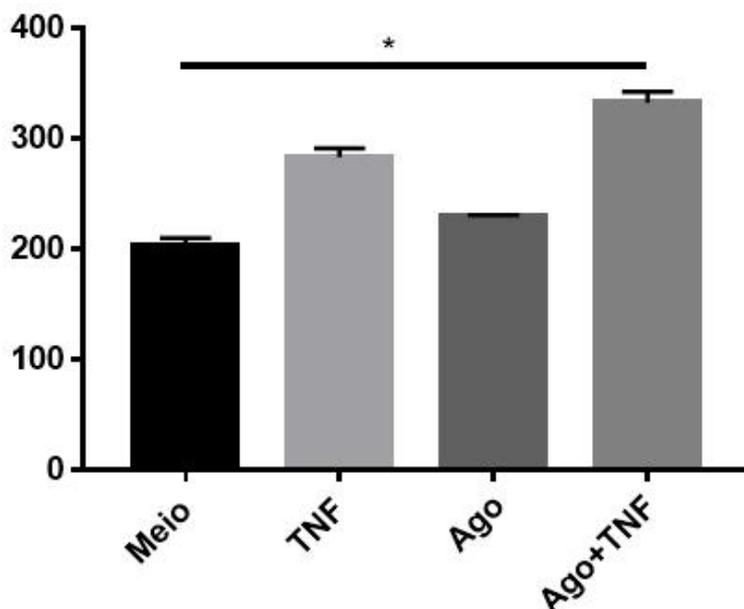
Gráfico 7: Avaliação da presença de PD-L1 nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Ao analisar os grupos sem a presença de antagonistas (Gráfico 8), percebe-se que o TNF isoladamente não é capaz de levar ao aumento de PD-L1 nas DPSCs, bem como a presença de agonista (Grupo Ago) em ambiente sem inflamação também não. Já a presença do agonista no ambiente inflamatório (Ago+TNF) é capaz de levar a um fenótipo imunorregulador das DPSCs. Porém, como será mostrado a seguir, a presença dos antagonistas leva a um aumento ainda maior de PD-L1 nas DPSCs.

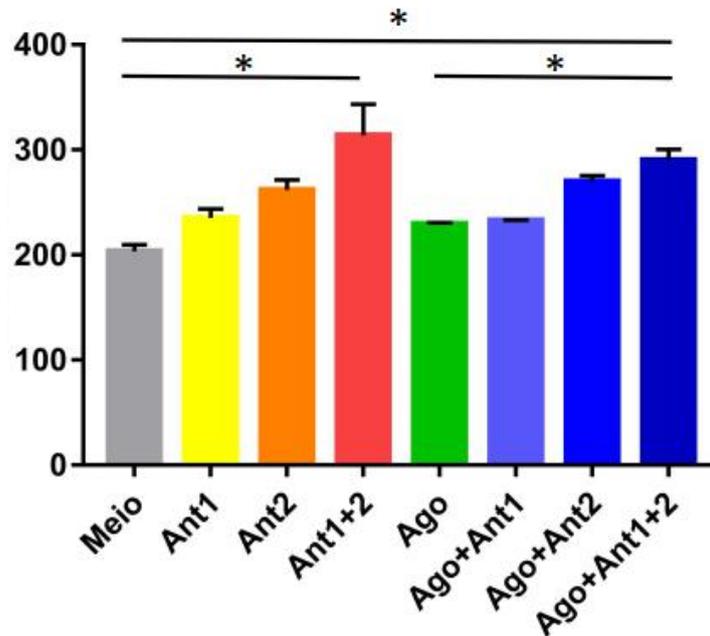
Gráfico 8: Avaliação da presença de PD-L1 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Ao analisar todos os grupos em ambiente sem inflamação (Gráfico 9), percebe-se, de maneira semelhante a HLA-DR, que sem TNF as respostas são muito discretas, mostrando que de fato a instalação da inflamação parece ter influência no desenvolvimento do perfil imunomodulador de DPSC, conforme relatado adiante. Porém, o bloqueio de ambos os receptores dispara o perfil imunomodulador, mesmo sem inflamação. Além disso, a presença do agonista isoladamente não é capaz de disparar esse perfil, mostrando mais uma vez que o bloqueio dos receptores mostra-se mais importante para o desenvolvimento de um perfil imunomodulador do que sua ativação.

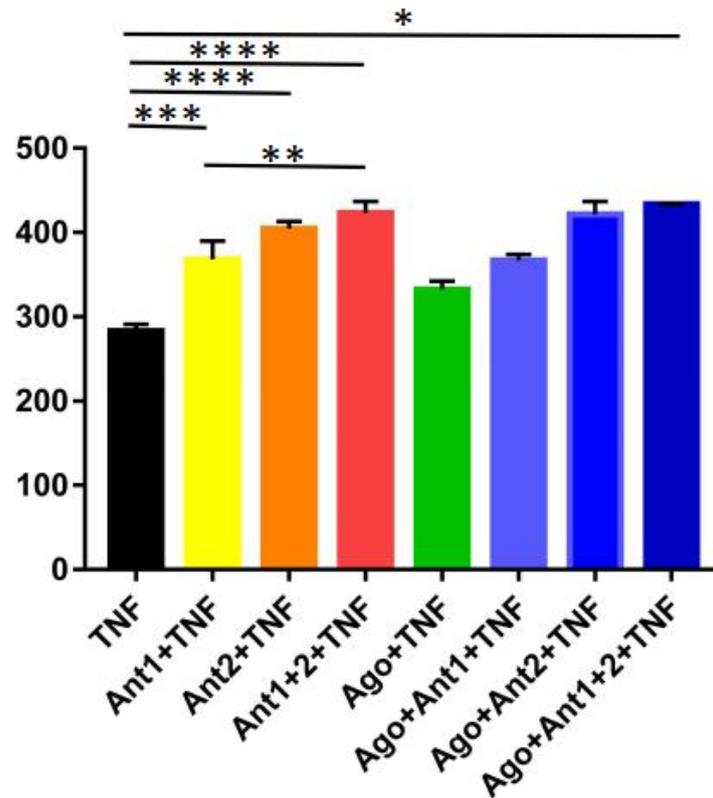
Gráfico 9: Avaliação da presença de PD-L1 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Já no ambiente inflamatório (com TNF) (Gráfico 10) nota-se uma situação muito interessante. Primeiramente, é reforçada a hipótese de que o bloqueio dos receptores é que dispara o perfil imunomodulador das DPSCs, e não sua ativação, uma vez que a presença somente do agonista não dispara o perfil imunomodulador. Mais do que isso, quando compara-se os grupos sem a presença do agonista e os grupos com a presença do agonista, neste ambiente inflamatório, nos primeiros a presença de qualquer um ou dos dois antagonistas é capaz de levar a um perfil imunomodulatório pela presença de PD-L1 aumentada, com especial contribuição da presença simultânea de ambos os antagonistas. Já nos últimos, a presença de ambos os antagonistas é obrigatória para desenvolvimento do perfil imunomodulador.

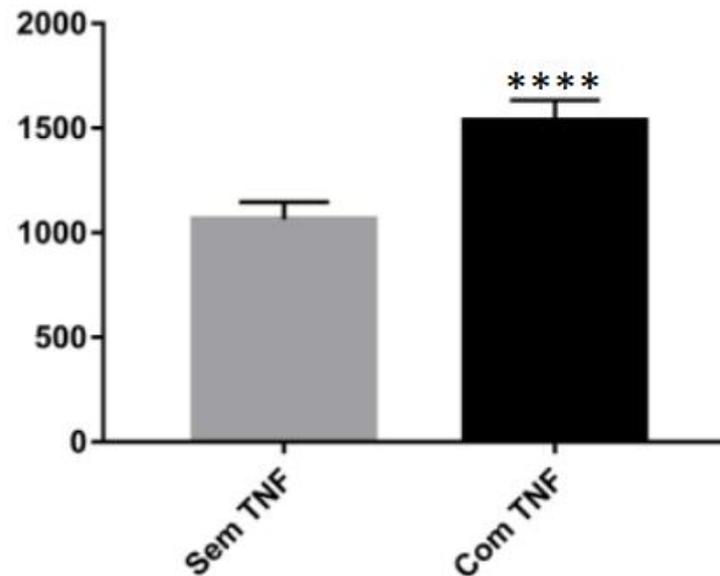
Gráfico 10: Avaliação da presença de PD-L1 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando analisa-se conjuntamente todos grupos em ambiente não inflamatório (sem TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) para a presença de PD-L2 (Gráfico 11), de maneira similar ao relatado para HLA-DR e PD-L1, percebe-se que o ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de aumentar a expressão de PD-L2 nas DPSCs, indicando que elas podem induzir uma via de imunomodulação através da interação com células T.

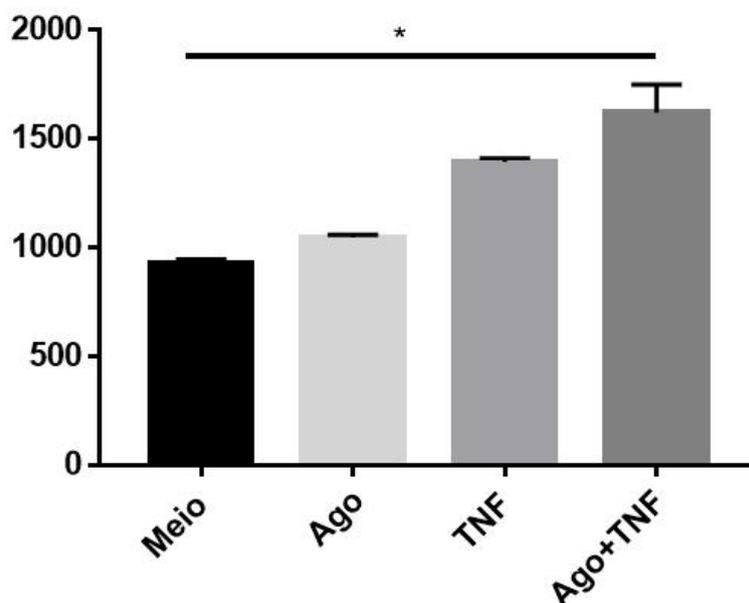
Gráfico 11: Avaliação da presença de PD-L2 nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

A análise dos grupos sem a presença de antagonistas para PD-L2 (Gráfico 12) mostra-se semelhante à que foi feita para PD-L1: percebe-se que o TNF isoladamente não é capaz de levar ao aumento do ligante nas DPSCs, bem como a ativação dos receptores (Grupo Ago) em ambiente sem inflamação também não. Já a ativação dos receptores no ambiente inflamatório (Grupo Ago+TNF) é capaz de levar ao fenótipo imunomodulador das DPSCs. Da mesma maneira que para PD-L1, a presença dos antagonistas leva a um aumento ainda maior de PD-L2 nas DPSCs.

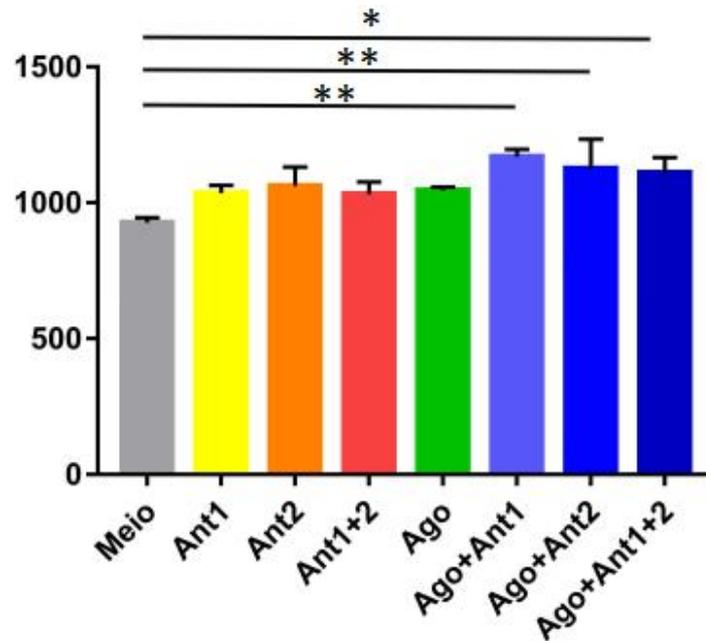
Gráfico 12: Avaliação da presença de PD-L2 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Ao analisar todos os grupos em ambiente sem inflamação (Gráfico 13), também nota-se que o bloqueio dos receptores, na presença do agonista, é capaz de levar a um aumento de PD-L2, enquanto a presença do agonista isoladamente não. Isso reforça a hipótese de que o bloqueio dos receptores é responsável pela definição do perfil imunomodulador, e não sua ativação. Porém, diferentemente de PD-L1, para PD-L2 a presença de qualquer um, ou de ambos os antagonistas é capaz de aumentar PD-L2. Interessante notar que, no ambiente sem inflamação, a presença do agonista conjuntamente com os antagonistas parece ser necessária para a definição desse perfil.

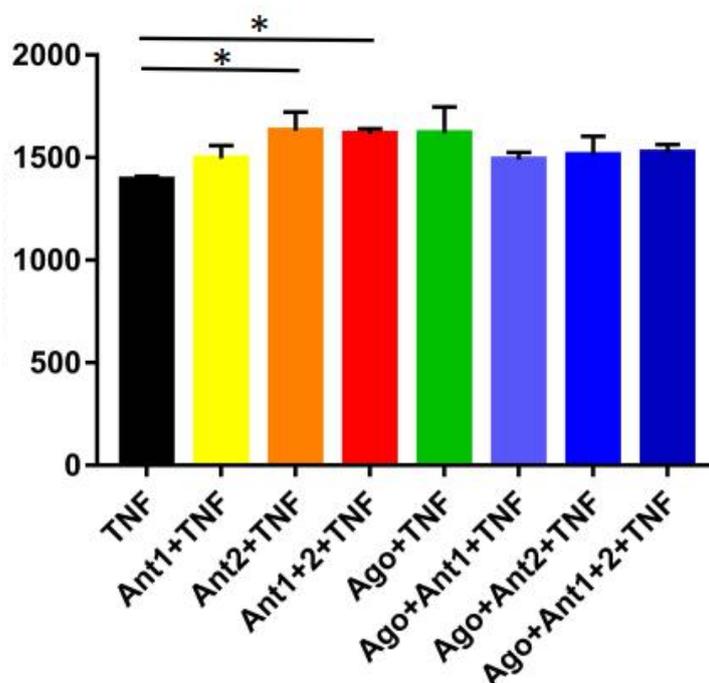
Gráfico 13: Avaliação da presença de PD-L2 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos em ambiente inflamatório (Gráfico 14), percebe-se mais uma vez que o bloqueio dos receptores dispara o perfil imunomodulador, em especial nesse caso o bloqueio de pelo menos CB2, e não sua ativação, marcadamente em ambiente sem a presença do agonista.

Gráfico 14: Avaliação da presença de PD-L2 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores da mediana da fluorescência. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

4.2.2.1 Considerações gerais sobre a presença de PD-L1 e PD-L2

De uma maneira geral, percebe-se que o ambiente inflamatório é capaz de guiar as DPSCs para um perfil imunomodulador tanto via PD-L1 quanto via PD-L2. De maneira semelhante para ambos os ligantes, a análise dos gráficos 8 e 12 mostra que não são nem AEA (agonista), nem tampouco o TNF, isoladamente os responsáveis pelo disparo do perfil imunomodulador. Porém, para ambos os ligantes, a presença de agonista em um meio inflamatório é capaz de levar a esse perfil.

Apesar do discutido acima, é notado que a maior expressão dos ligantes se dá em meio inflamatório com presença dos antagonistas, e justamente nessa situação a presença do agonista parece modular negativamente o perfil

imunomodulador, diminuindo o efeito dos antagonistas quando comparado à presença dos antagonistas sem agonista.

O aumento de PD-L1 e PD-L2 de uma maneira geral no ambiente inflamatório corrobora os resultados de estudos onde a presença de DPSCs em ambiente de inflamação foi capaz de levar a uma imunorregulação pela diminuição de proliferação das Th ou pelo aumento das Treg (PIERDOMENICO *et al.*, 2005; YAMAZA *et al.*, 2010; ALIPOUR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014). Uma vez que a expressão de PD-L2 parece ser mais restrita que PD-L1 e controlada pelo microambiente onde a célula se encontra, este achado dá força à hipótese de que as DPSCs tenham um papel imunomodulador em ambiente inflamatório, podendo atuar diretamente em contato com as células do sistema imune na coordenação do processo inflamatório.

Ainda, como relatado para HLA-DR, parece inicialmente que a inibição dos receptores CB1 e/ou CB2 seja a responsável pelo perfil imunomodulador, e não diretamente sua ativação. Em relação a esse ponto a literatura se mostra contraditória e confusa, sendo consenso apenas a participação do eCBS na imunomodulação, mas não o papel da ativação e bloqueio de cada um dos receptores. (KEMTER *et al.*, 2015; DOTSEY *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2019; BAZWINSKY-WUTSCHKE *et al.*, 2019)

GALVE-ROPERH *et al.*, 2013, descrevem que a ativação de CB2 está associada à inflamação crônica do sistema nervoso, bem como a diferentes desordens imunológicas. MONTANARI *et al.*, 2019, por sua vez, descrevem uma série de novos compostos baseados no benzofurano com propriedades neuroprotetoras e imunomodulatórias para o tratamento do Mal de Alzheimer, entre eles o “composto 8”, relatado como “ligante potente e seletivo de CB2 com efeito imunomodulador”, e o “composto 10”, relatado como “potente agonista inverso de CB2”, porém também com “promissoras propriedades imunomodulatórias”. ROSSI, 2019, relata que CB1 é conhecido por promover a inflamação enquanto CB2 regula sua magnitude. MORENO *et al.*, 2019, de maneira semelhante relatam que os ligantes de CB2 são os responsáveis pelos efeitos imunomodulatórios observados.

Assim, para PD-L1 e PD-L2, a indução a um perfil imunomodulador parece ser controlada de maneira complexa entre a presença de agonista e antagonistas dos receptores CB1 e CB2. Esse controle parece dar-se de maneira diferencial em distintos tipos celulares, provavelmente sendo sensível à concentração relativa dessas moléculas e envolvendo outras vias de controle que não somente o eCBS ou a presença de TNF, o que poderia explicar tal discrepância na literatura.

4.3 PCR em tempo real

Os grupos Meio + DMSO, e Meio + DMSO + TNF não apresentaram diferença em relação aos grupos Meio e Meio + TNF, respectivamente, mostrando que o DMSO não afetou o comportamento das células. Assim, esses dois grupos (Meio + DMSO, e Meio + DMSO + TNF) foram excluídos das representações gráficas. Ainda, dentro da comparação de alguns grupos, muitas diferenças estatisticamente relevantes foram encontradas, e para facilitar a visualização e análise dos resultados, esses gráficos foram divididos em Avaliação 1, Avaliação 2, etc.

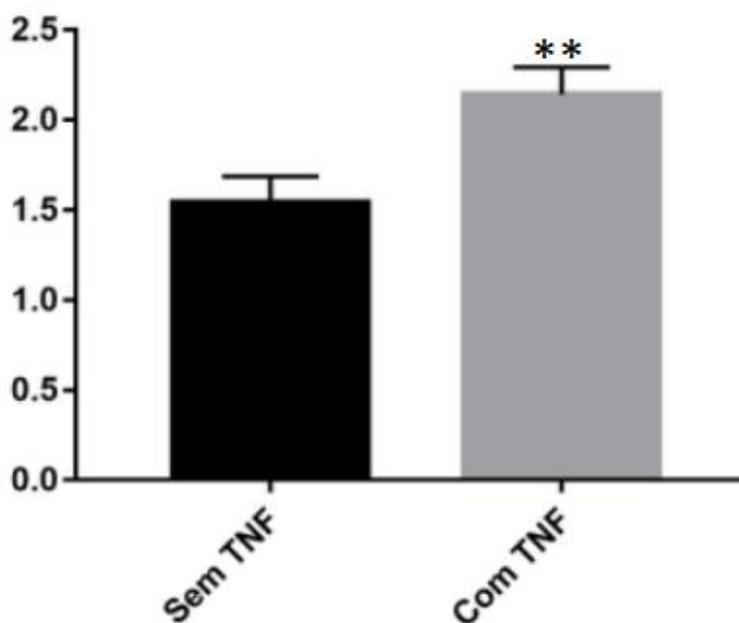
4.3.1 Componentes do eCBS

Foi avaliada a expressão dos genes codificantes para: os receptores CB1 e CB2; a enzima NAPE-PLD, responsável pela síntese de AEA; a enzima FAAH, capaz de degradar ambos AEA e 2-AG, porém com papel preponderante sobre AEA; a enzima DAGL- α , responsável pela síntese de 2-AG; e a enzima MAGL, principal responsável pela degradação de 2-AG.

Quando analisa-se conjuntamente todos os grupos em ambiente não inflamatório (sem TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) para a expressão gênica do receptor CB1 (Gráfico 15), de maneira similar ao relatado para HLA-DR, PD-L1 e PD-L2, percebe-se que o

ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de levar ao aumento da expressão gênica de CB1 nas DPSCs. Levando-se em conta os resultados anteriores, parece que ter CB1 é importante para o desenvolvimento do perfil imunomodulador relatado, o que é um indício de que sua sinalização tem papel na imunomodulação.

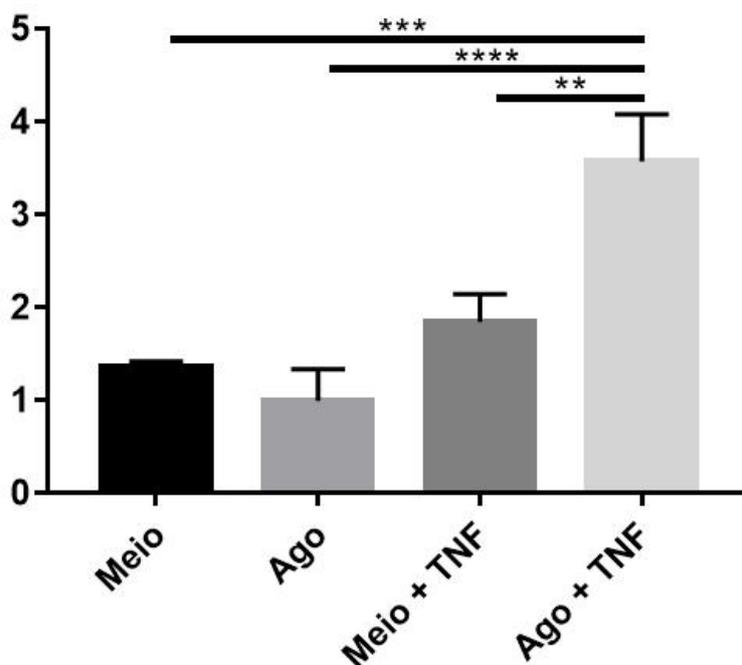
Gráfico 15: Avaliação da expressão gênica para CB1 nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isoladamente, sem efeito dos antagonistas, para a expressão gênica de CB1 (Gráfico 16) podemos perceber que a presença de agonista no meio inflamatório (Grupo Ago+TNF) é capaz de aumentar a expressão de CB1 de maneira relevante. Nota-se assim que o TNF, por si só, não é capaz de levar a um aumento da expressão gênica de CB1, tampouco a presença do agonista isoladamente. Assim, pode-se perceber que a presença do agonista em ambiente não inflamatório não é relevante para a expressão de CB1, mas em ambiente inflamatório sim, como será confirmado nos próximos gráficos.

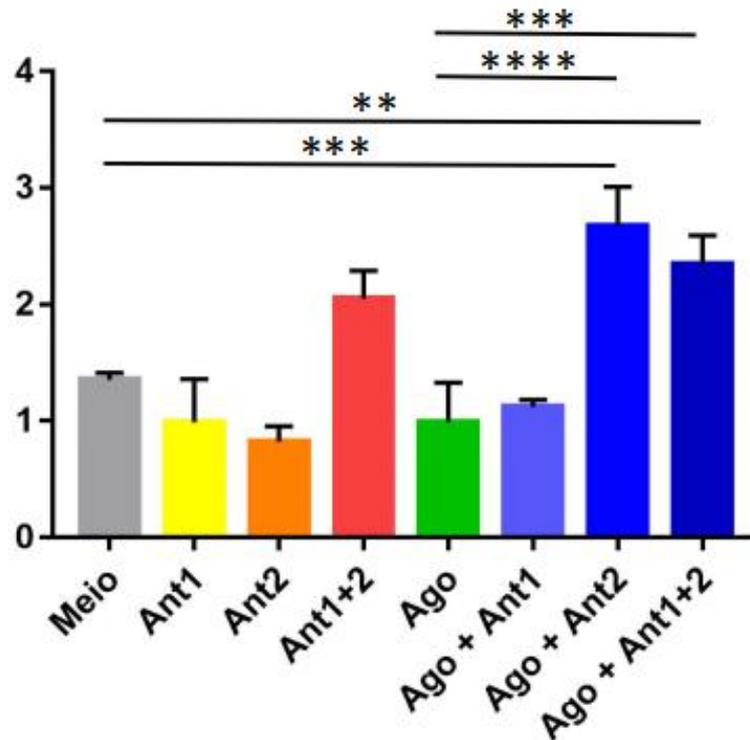
Gráfico 16: Avaliação da expressão gênica para CB1 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2-\Delta\Delta C_t$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise de todos os grupos em ambiente não inflamatório (Gráfico 17), pode-se perceber que a presença do agonista isoladamente não parece influenciar a expressão de CB1, porém a presença de Ant2 (isoladamente ou com Ant1) na presença do agonista sim, indicando um possível papel de regulação de CB1 via Ant2 na presença de agonista. Como CB1 e CB2 são receptores muito similares, que ativam a mesma via de inibição de cAMP, é esperada uma comunicação cruzada entre a expressão dos mesmos. Aqui, parece que, uma vez que exista Ant2 no meio, com agonista, a expressão de CB1 é aumentada como uma possível compensação, como se fosse necessário ter algum dos receptores disponível para a via de sinalização.

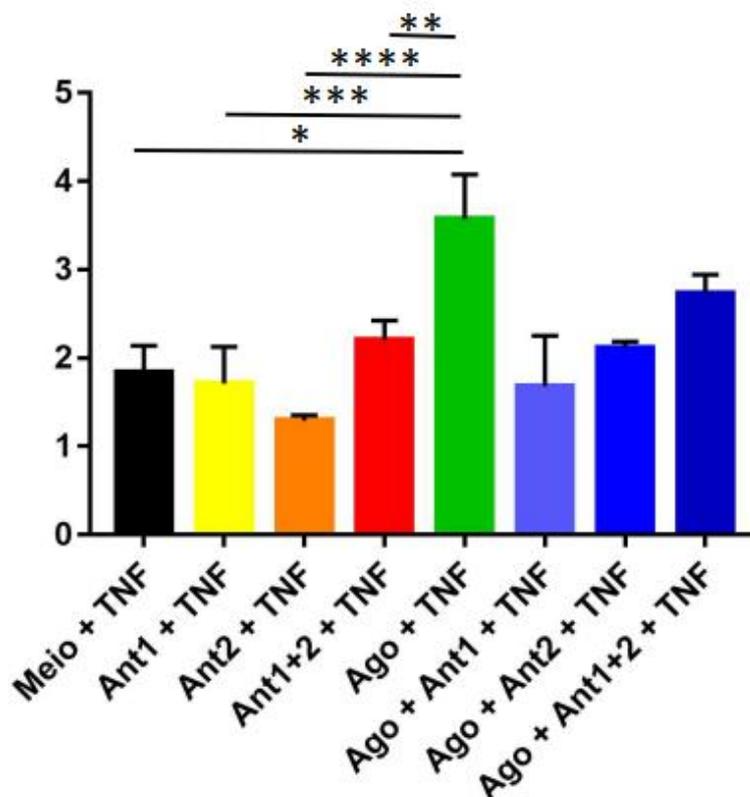
Gráfico 17: Avaliação da expressão gênica para CB1 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2-\Delta\Delta C_t$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise de todos os grupos em ambiente de inflamação (Gráficos 18 e 19), por sua vez, nota-se que a presença do agonista leva a um aumento considerável da expressão de CB1, quando comparado a todos os grupos sem a presença de agonista (Gráfico 18). Isso sugere que, uma vez que os receptores estejam livres para a interação com o agonista, sua ligação dispara um sinal para a expressão de mais CB1. Uma vez que AEA é capaz de se ligar e ativar tanto CB1 quando CB2, não é possível definir se a ativação é devida a um ou ao outro, especificamente.

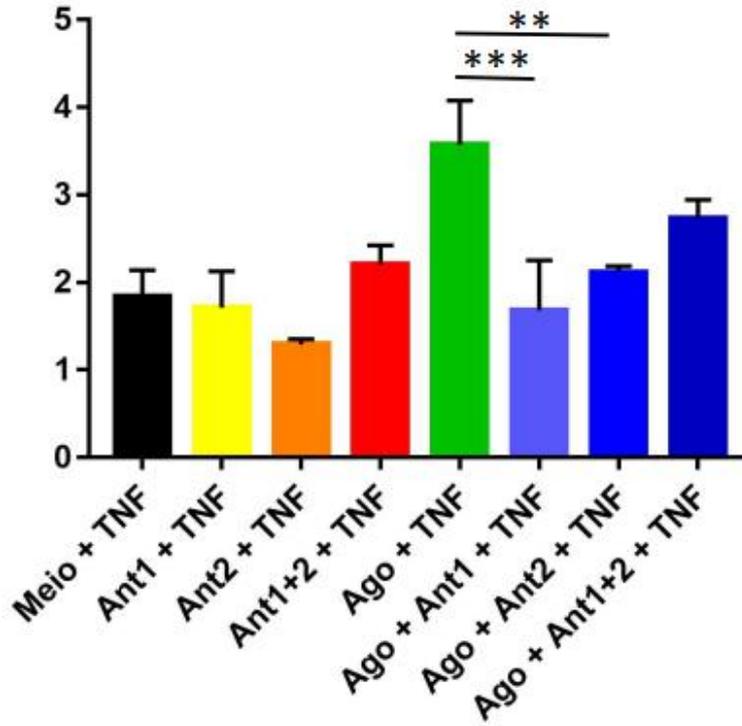
Gráfico 18: Avaliação da expressão gênica para CB1 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 1.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

De maneira similar ao relatado no gráfico anterior, a presença do agonista leva a um aumento considerável da expressão de CB1 também em relação à presença de antagonistas no meio com agonista (Gráfico 19), o que pode sugerir que talvez a ativação de ambos os receptores simultaneamente seja importante para o aumento de CB1. Interessante notar que, uma vez que existam ambos Ant1 e Ant2 na presença do agonista, a expressão de CB1 se mantém aumentada (semelhante ao grupo Ago + TNF), reforçando a hipótese de que, de alguma maneira, é necessário ter receptores disponíveis para a via de sinalização, e então seu possível bloqueio simultâneo leva a um aumento de expressão. Como será discutido nos próximos gráficos, essa situação se repete na expressão de CB2.

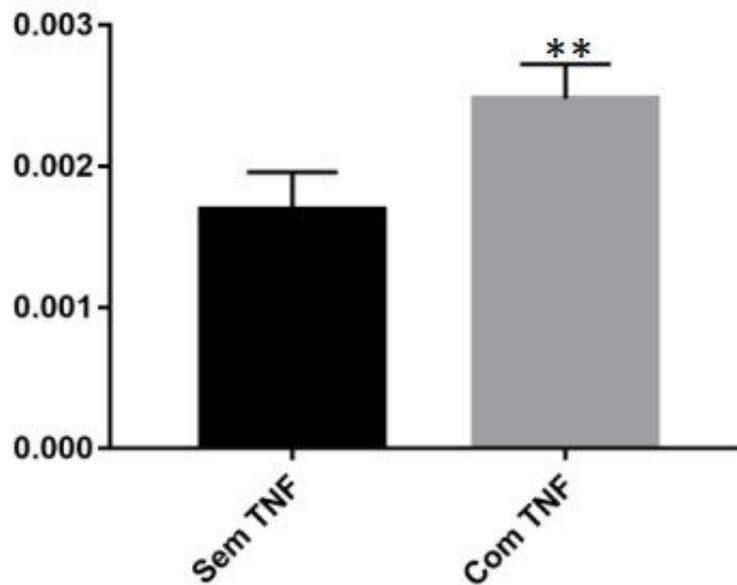
Gráfico 19: Avaliação da expressão gênica para CB1 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 2.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando analisa-se conjuntamente todos os grupos em ambiente não inflamatório (sem TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) para a expressão de CB2 (Gráfico 20), de maneira similar ao relatado para HLA-DR, PD-L1, PD-L2 e CB1, percebe-se que o ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de levar ao aumento da expressão gênica também de CB2 nas DPSCs. Isso indica que sua presença, tal qual a presença de CB1, é importante nessa situação. Ou seja, levando-se em conta os resultados anteriores, parece que ter CB2 também é importante para o desenvolvimento do perfil imunomodulador relatado, o que é um indício de que sua sinalização tem papel na imunomodulação.

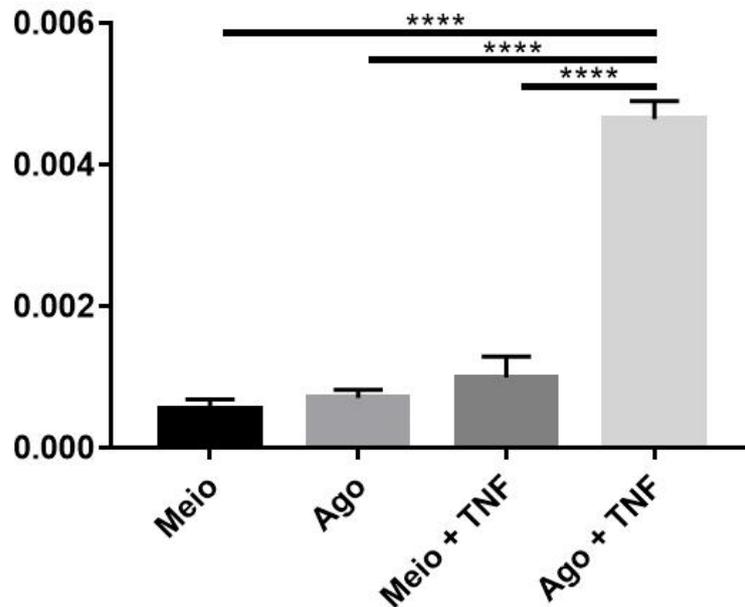
Gráfico 20: Avaliação da expressão gênica para CB2 nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isoladamente sem a presença de antagonistas, para a expressão de CB2 (Gráfico 21), de maneira semelhante ao encontrado para CB1 percebemos que o TNF isoladamente não é capaz de levar ao aumento do receptor CB2 nas DPSCs, bem como a presença do agonista em ambiente sem inflamação também não. Já a presença de agonista no ambiente inflamatório (Grupo Ago+TNF) parece levar a esse aumento, mais uma vez reforçando a importância desse receptor em um ambiente de inflamação.

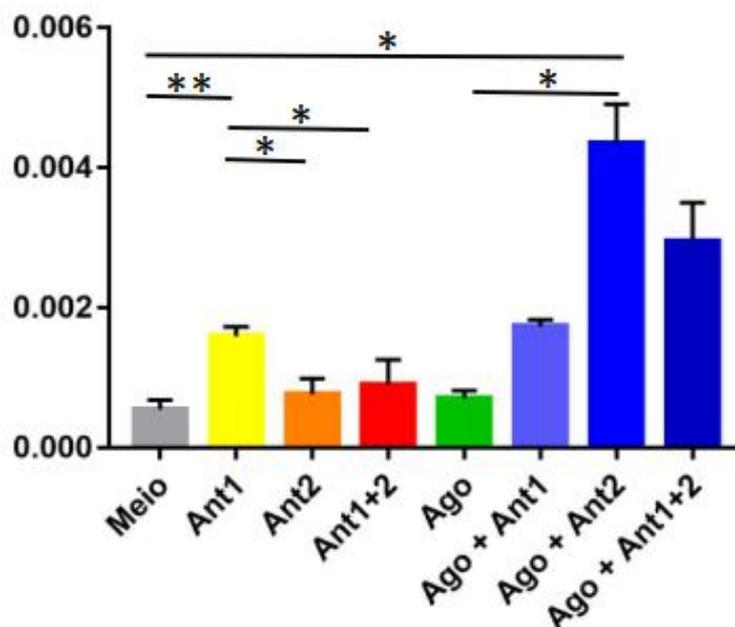
Gráfico 21: Avaliação da da expressão gênica para CB2 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na comparação de todos os grupos, percebe-se mais uma vez que, no ambiente não inflamatório (Gráfico 22), a presença de agonista isoladamente (ativação dos receptores) não parece influenciar a expressão de CB2, de maneira similar ao relatado para CB1. Ainda de maneira similar ao relatado para CB1, a presença de Ant2 com agonista, por sua vez, aumenta essa expressão, indicando um possível papel regulador de CB2 via Ant2 na presença de agonista. Conjuntamente com a análise do gráfico 17, essa situação demonstra que, em ambiente não inflamatório, com a presença de agonista, Ant2 dispara a expressão de ambos os receptores, indicando um papel regulador da expressão dos mesmos via possível bloqueio de CB2.

Gráfico 22: Avaliação da expressão gênica para CB2 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



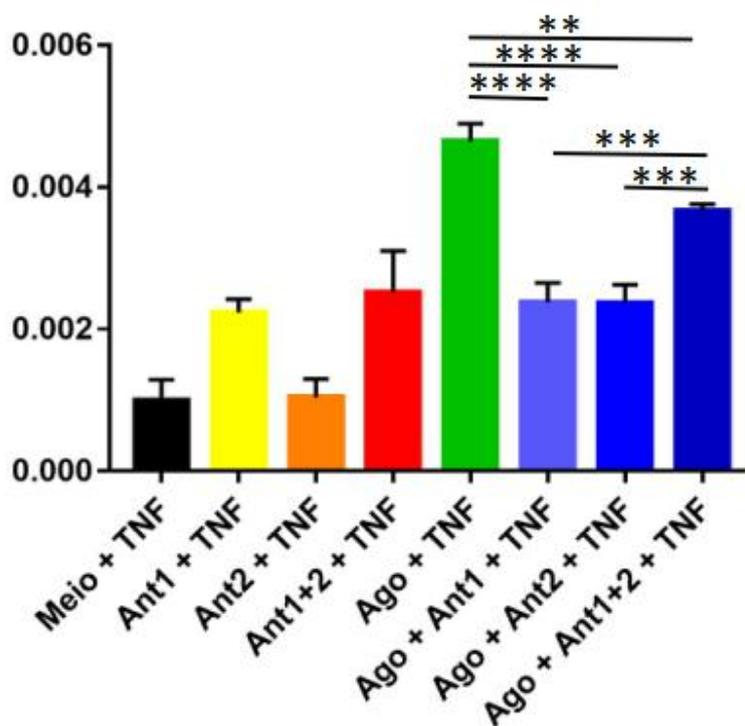
O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Ainda em meio não inflamatório (Gráfico 22), considerando-se apenas os grupos sem agonista no ambiente não inflamatório, pode-se perceber uma sutil, mas relevante, influência de Ant1 na expressão de CB2 na ausência de agonista, evidenciando mais uma vez uma possível comunicação cruzada entre as vias de regulação dos receptores em ambiente não inflamatório.

Na avaliação da expressão de CB2 com todos os grupos em ambiente inflamatório (Gráfico 23), de maneira similar ao discutido no gráfico 19 (expressão de CB1 em ambiente inflamatório), a presença do agonista leva a um aumento considerável da expressão de CB2 em relação à presença de antagonistas no meio com agonista, o que pode sugerir que talvez a ativação de ambos os receptores simultaneamente seja necessária para o aumento de CB2 nesse ambiente. Interessante notar que, também semelhante ao que acontece com CB1, uma vez que ambos Ant1 e Ant2 estejam na presença do agonista, a expressão de CB2 tenta ser compensada, aumentando em relação

à presença individual dos antagonistas com o agonista. Porém para CB2, essa expressão não alcança a expressão induzida pelo agonista (Grupo Ago + TNF).

Gráfico 23: Avaliação da expressão gênica para CB2 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.

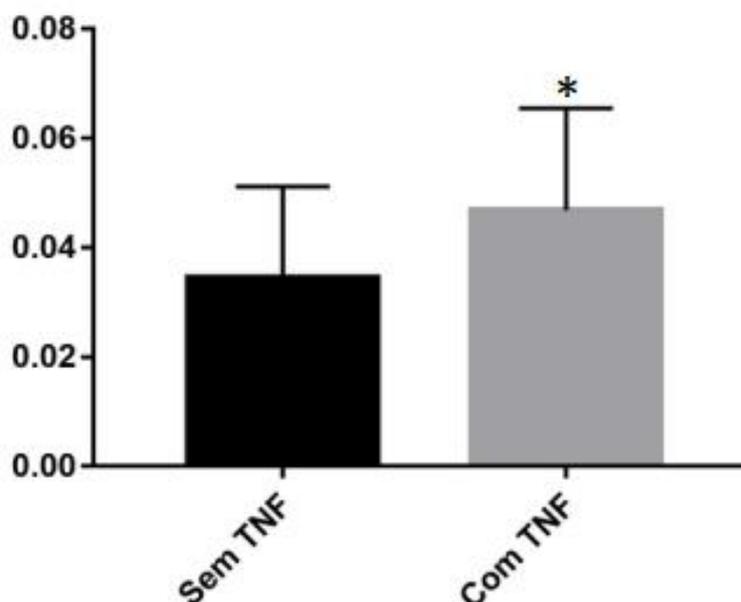


O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Tal situação também dá força à hipótese de que, de alguma maneira, é necessário ter receptores disponíveis para a via de sinalização, e então a presença simultânea de Ant1 e Ant2 leva a um aumento de expressão na tentativa de compensação do possível bloqueio desses receptores.

Quando são analisados conjuntamente todos os grupos em ambiente não inflamatório (sem TNF) versus todos os grupos conjuntamente em ambiente inflamatório (com TNF) para a expressão de NAPE-PLD (Gráfico 24), de maneira similar ao relatado para HLA-DR, PD-L1, PD-L2, CB1 e CB2, percebe-se que o ambiente inflamatório, de uma maneira generalizada, é capaz de levar ao aumento da expressão gênica de NAPE-PLD nas DPSCs.

Gráfico 24: Avaliação da expressão gênica para NAPE-PLD nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



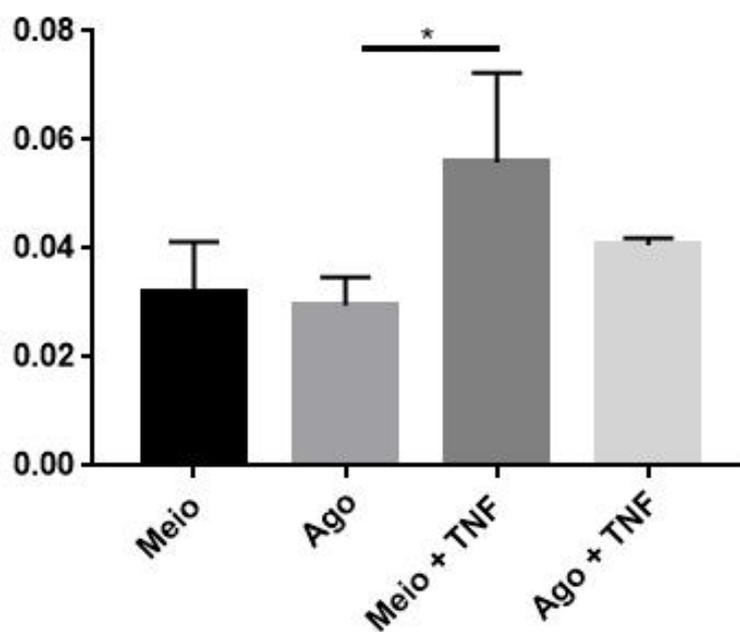
O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Uma vez que NAPE-PLD é a enzima responsável pela síntese de AEA (agonista), conforme já discutido, esse achado é relevante por indicar que o ambiente inflamatório é capaz de levar a um aumento da expressão gênica da enzima sintetizadora do agonista presente. Ou seja, a sinalização via AEA, juntamente com as expressões de CB1 e CB2 - levando-se em conta os resultados anteriores relativos a HLA-DR, PD-L1 e PD-L2 - demonstram que o eCBS de fato tem papel relevante no desenvolvimento do perfil imunomodulador relatado.

Ao analisar os grupos isoladamente, sem a presença dos antagonistas, para a expressão de NAPE-PLD (Gráfico 25), percebemos que há uma diferença entre a presença do agonista isoladamente, mostrando a menor taxa de expressão gênica (Grupo Ago), e o meio inflamatório sem a presença de agonista (Grupo Meio+TNF). Isso primariamente pode ser entendido como um mecanismo de regulação negativa da síntese de AEA: a presença de AEA no

meio sem TNF (Grupo Ago) está levando à menor taxa de expressão gênica de NAPE-PLD, a enzima responsável por sua síntese.

Gráfico 25: Avaliação da da expressão gênica para NAPE-PLD nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



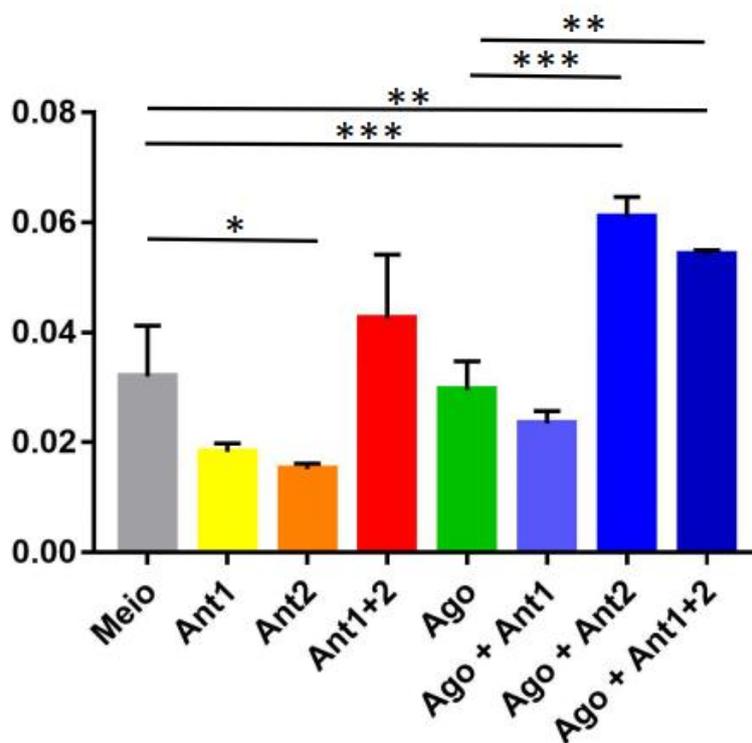
O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Por outro lado, a presença de TNF sem AEA (Grupo Meio+TNF), leva à maior taxa de expressão de NAPE-PLD (Gráfico 25), teoricamente possibilitando uma maior síntese de AEA. Isso pode indicar que a presença de agonista é necessária no meio inflamatório, o que ainda permite fazer a ligação com o fato de a expressão de CB1 e CB2 estarem aumentadas no meio inflamatório onde já existe agonista (Gráficos 16 e 21): uma vez que AEA é produzida e está disponível, sua presença no ambiente inflamatório demanda um aumento na produção dos receptores (Gráficos 16 e 21), provavelmente para aumentar a intensidade de resposta ou restaurar os receptores.

Ao analisar todos os grupos em ambiente não inflamatório (Gráfico 26), é percebida uma relação interessante. Quando não há AEA (agonista) no meio, Ant2 isoladamente diminui a expressão de NAPE-PLD, o que teoricamente

pode diminuir a síntese de AEA no ambiente. Já em ambiente com a presença de AEA, a presença de pelo menos Ant2 (Ago+Ant2 e Ago+Ant1+2) induz representativamente a produção de NAPE-PLD, que pode permitir o aumento dos níveis de AEA no ambiente.

Gráfico 26: Avaliação da expressão gênica para NAPE-PLD nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



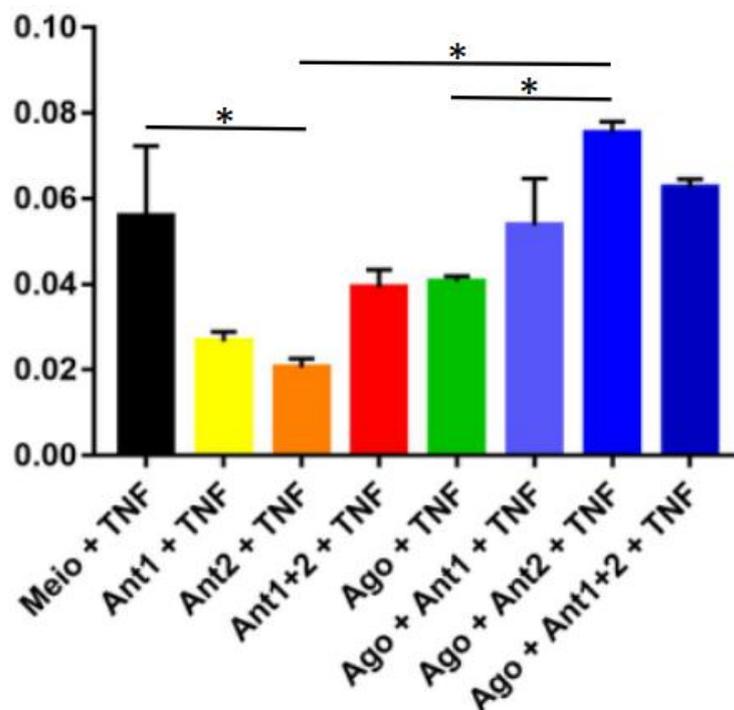
O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Em conjunto com a análise dos gráficos de expressão de CB1 e CB2 (alvos de AEA) sem TNF, percebemos também uma via interessante de comunicação: tanto para CB1 quanto para CB2, a presença do antagonista de CB2 (Ant2) no meio induz a expressão de ambos CB1 e CB2, porém a ativação deles por AEA não. Quando existe TNF, porém, AEA passa a induzir a síntese de CB1 e CB2, ressaltando mais uma vez a importância da presença de tais receptores no ambiente inflamatório.

De uma maneira geral, a análise conjunta dos gráficos de CB1, CB2 e NAPE-PLD mostram que parece existir um certo “programa” de interação entre esses componentes do eCBS para que seja possível a existência de receptores para ligação (aumento da expressão gênica de CB1 e CB2) bem como agonista (aumento da expressão de NAPE-PLD quando já existe AEA no meio e os receptores estão bloqueados), sendo que a ativação desses receptores em ambiente sem inflamação não exerce efeito significativo sobre o sistema.

Na avaliação da expressão gênica de NAPE-PLD em ambiente com TNF (Gráfico 27), de maneira semelhante à relatada para o meio sem TNF, a presença de Ant2 sem agonista diminui a expressão de NAPE-PLD, o que teoricamente diminui a síntese do agonista (AEA) no ambiente. Já em ambiente com a presença de agonista, Ant2 induz representativamente a produção de NAPE-PLD, que permite o aumento dos níveis de AEA no ambiente.

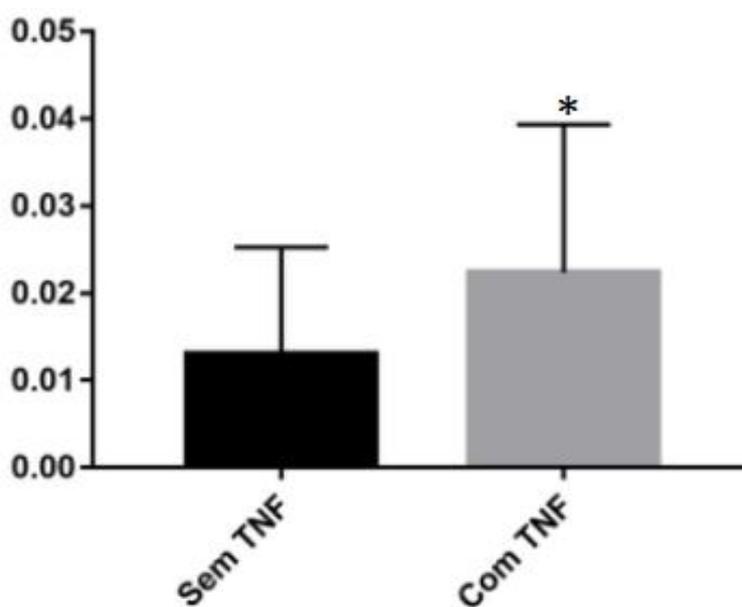
Gráfico 27: Avaliação da expressão gênica para NAPE-PLD nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na avaliação da expressão gênica para FAAH, com as amostras agrupadas sem TNF e com TNF (Gráfico 28), da mesma maneira que foi relatado para os outros marcadores analisados até aqui, o ambiente inflamatório como um todo mostra-se capaz de induzir a expressão gênica de FAAH. Considerando que FAAH é responsável, principalmente, pela degradação de AEA (agonista), pode-se inferir à partir dessa informação que o ambiente inflamatório não só induz a expressão de CB1, CB2 e NAPE-PLD (responsável pela síntese de AEA), mas também a expressão de FAAH, o que torna possível a degradação de AEA.

Gráfico 28: Avaliação da expressão gênica para FAAH nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.

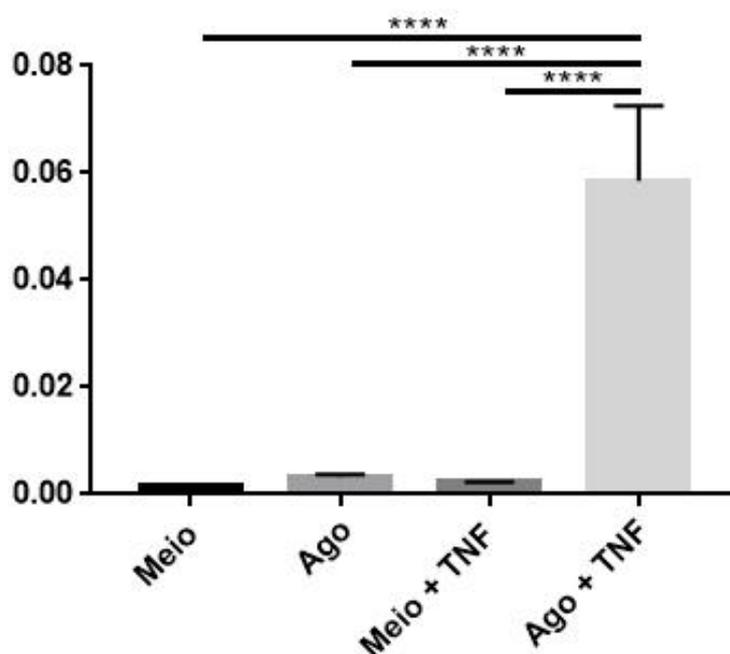


O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Assim, pode ser entendido que o eCBS é capaz de coordenar de uma maneira geral toda a via de sinalização, desde a síntese dos receptores, até a síntese e degradação do agonista (AEA), sendo que os antagonistas têm um papel preponderante nessas oscilações.

Na análise dos grupos isoladamente, sem a presença de antagonistas (Gráfico 29), percebe-se que o TNF isoladamente não é capaz de levar ao aumento de FAAH nas DPSCs, bem como a ativação dos receptores (Grupo Ago) em ambiente sem inflamação também não. Já a ativação dos receptores no ambiente inflamatório (Grupo Ago+TNF) parece levar a esse aumento, mais uma vez reforçando a ideia de que existe uma busca pela homeostase e pelo controle da presença de receptores e agonista em um ambiente de inflamação.

Gráfico 29: Avaliação da da expressão gênica para FAAH nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.

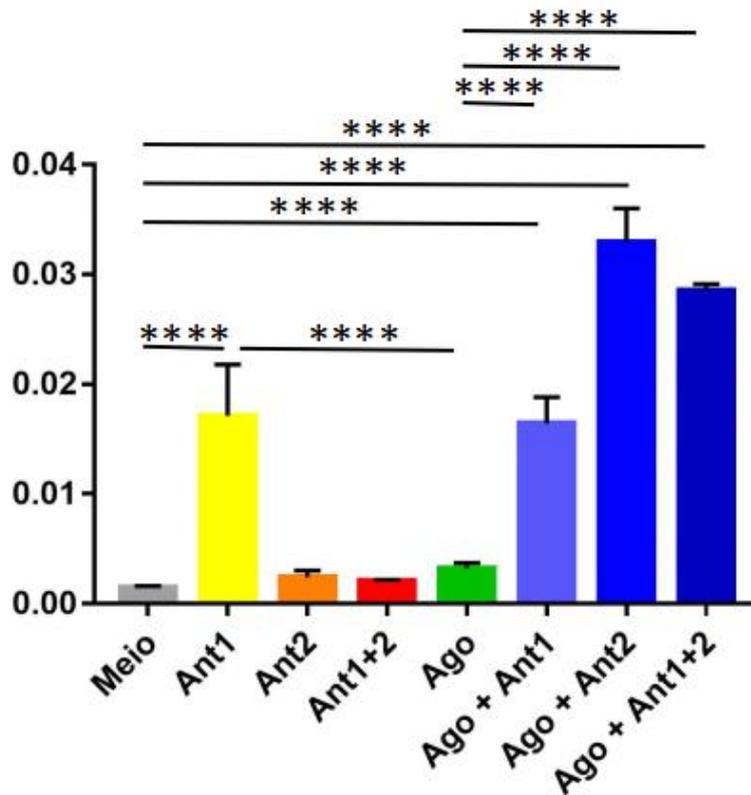


O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos em ambiente não inflamatório (Gráficos 30 e 31), percebe-se que a presença concomitante de qualquer um dos antagonistas (ou dos dois) e do agonista é capaz de levar a um aumento da expressão de FAAH (Gráfico 30), que poderia culminar com a diminuição de agonista no meio. Isso indica que, em um meio não inflamatório com agonista, os antagonistas podem levar à diminuição do agonista. Ainda, se forem considerados apenas os

grupos sem agonista no ambiente não inflamatório, pode-se perceber uma relevante influência de Ant1 na expressão de FAAH, de maneira semelhante ao relatado para a expressão de CB2 em ambiente não inflamatório.

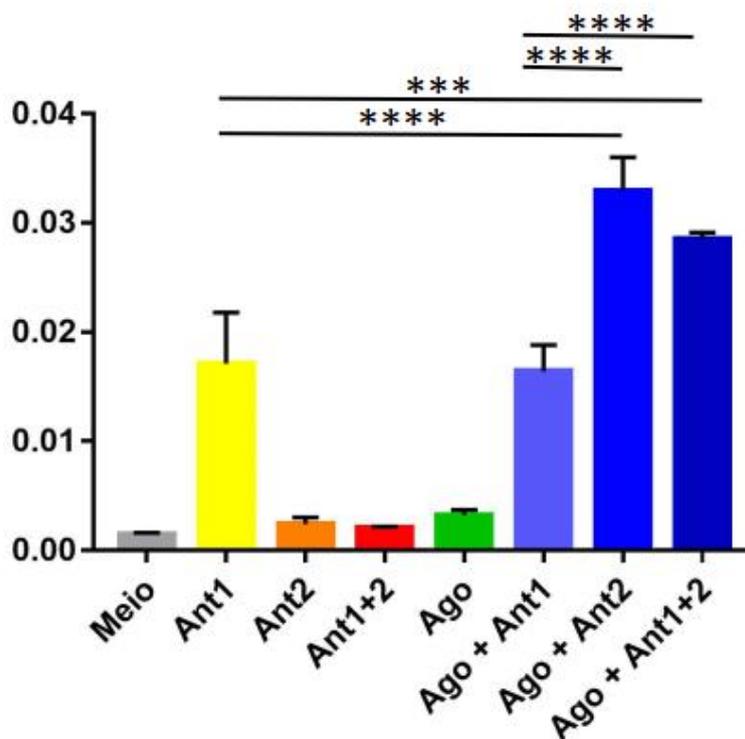
Gráfico 30: Avaliação da expressão gênica para FAAH nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 1.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Pode-se ainda ressaltar que, em ambiente não inflamatório, o aumento de FAAH pela presença de agonista juntamente com pelo menos Ant2 é mais relevante que o aumento originado pela presença de Ant1 com ou sem agonista (Gráfico 31). Isso mostra um papel relevante de Ant2 na regulação do eCBS em ambiente não inflamatório com agonista, nas DPSCs.

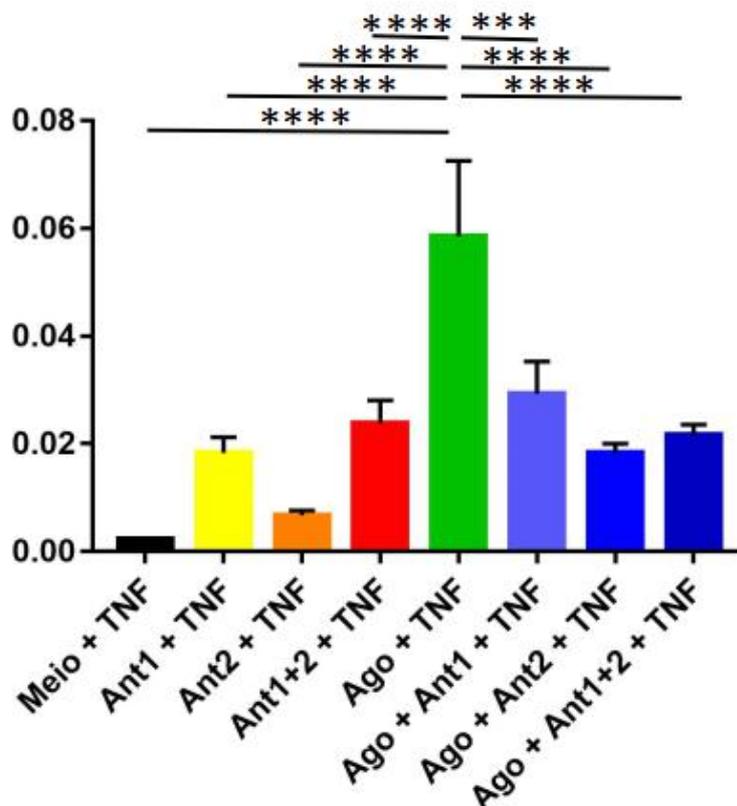
Gráfico 31: Avaliação da expressão gênica para FAAH nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 2.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise de todos os grupos em ambiente com TNF (Gráfico 32), percebemos que a presença de agonista na ausência dos antagonistas, em ambiente inflamatório, definitivamente aumenta a expressão de FAAH. Uma vez que os receptores estão todos livres para interação com agonista (sem presença de antagonista algum), e existe agonista no meio, o aumento na expressão de FAAH (e conseqüente possível redução de AEA) pode funcionar como um mecanismo de feedback negativo, controlando os níveis de agonista no ambiente inflamatório.

Gráfico 32: Avaliação da expressão gênica para FAAH nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



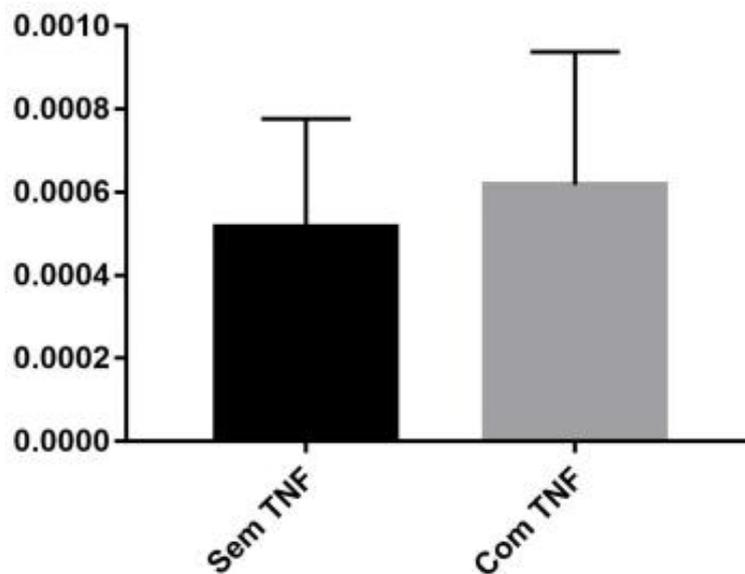
O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Pensando-se que o eCBS é um sistema relacionado à busca pela homeostase, e levando-se em conta a análise dos Gráficos 19 e 23, pode-se ainda entender que a presença de agonista em grande quantidade no meio sem antagonistas poderia levar a uma produção aumentada de CB1 e CB2 (Gráficos 19 e 23), e consequente possível respostas aumentadas desses receptores, o que iria contra a homeostase. Assim, o aumento na expressão de FAAH induzido também pela presença de agonista no meio sem antagonistas possibilita um sistema de controle dessas concentrações.

Na análise com os dados agrupados para a expressão gênica de DAGL- α (Gráfico 33), não podemos perceber a influência do ambiente inflamatório na expressão da enzima DAGL- α (responsável pela síntese do endocanabinóide

2-AG), o que indica a princípio que o ambiente inflamatório em si não deve ser responsável por alterações significativas na síntese de 2-AG.

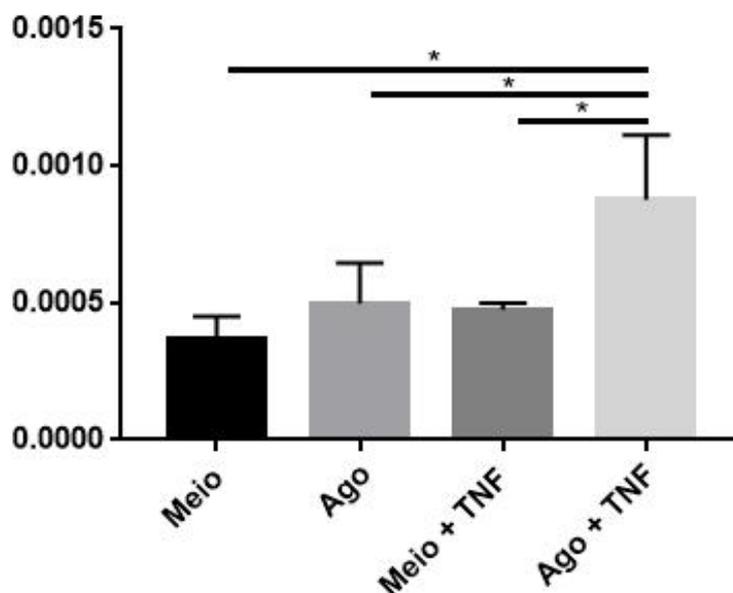
Gráfico 33: Avaliação da expressão gênica para DAGL- α nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Já na análise dos grupos isolados para a expressão gênica de DAGL- α , excluindo-se aqueles com a presença de antagonistas (Gráfico 34), podemos perceber que a presença de agonista em ambiente inflamatório leva a um aumento na expressão do gene para DAGL- α . Isso pode indicar que a presença do endocanabinoide AEA (agonista) no ambiente inflamatório pode alterar a presença do outro endocanabinóide, 2-AG, possibilitando sua síntese. Além disso, tal análise demonstra que nem o TNF por si só, nem a AEA isoladamente têm esse papel.

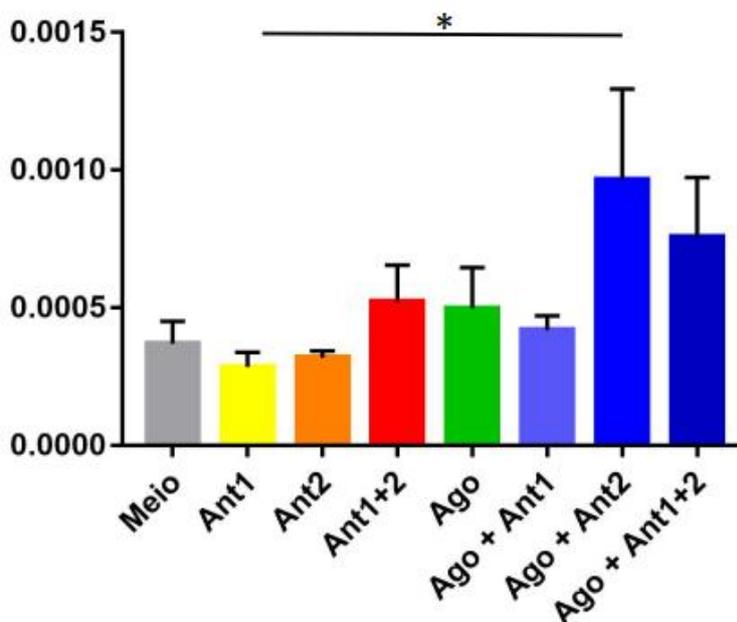
Gráfico 34: Avaliação da expressão gênica para DAGL- α nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, em ambiente não inflamatório (Gráfico 35), a única relação representativa observada é entre os grupos Ant1 e Ago+Ant2, mostrando que a presença concomitante de Ant2 e do agonista leva a um aumento da expressão de DAGL- α , em relação à presença de Ant1 na ausência do agonista. Em outras palavras, a possível ativação específica de CB1 por AEA (Ago+Ant2) leva a um aumento de DAGL- α em relação ao bloqueio específico do mesmo receptor. Isso pode indicar um papel de relevância de CB1 na síntese de 2-AG em ambiente sem inflamação.

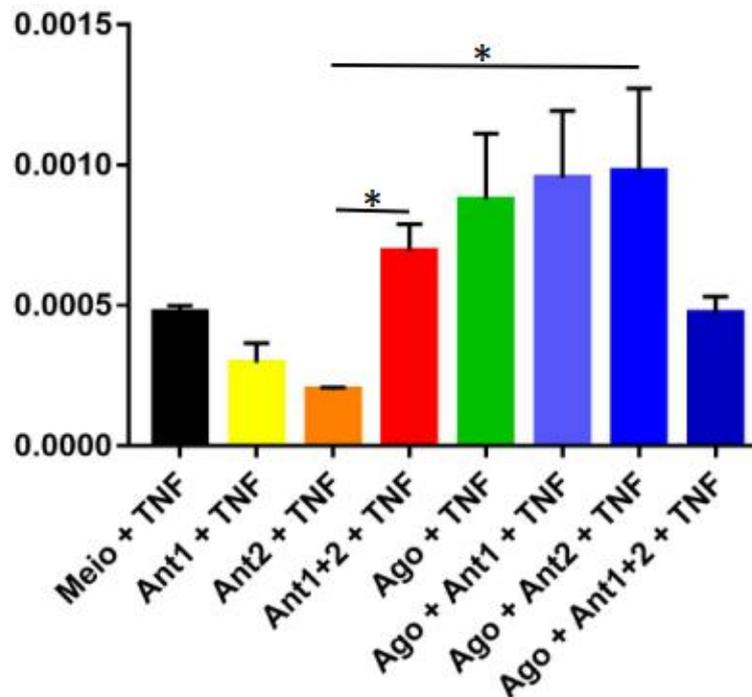
Gráfico 35: Avaliação da expressão gênica para DAGL- α nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Para expressão de DAGL- α no ambiente inflamatório (Gráfico 36), obrigatoriamente com a presença de Ant2, a presença também de Ant1 (Ant1+2+TNF) aumenta a expressão de DAGL- α , bem como a presença também de agonista (Ago+Ant2+TNF). Isso indica que, em ambiente inflamatório onde os receptores CB2 podem estar bloqueados, o bloqueio também de CB1 na ausência de agonista pode induzir a síntese de 2-AG. A possível ativação específica de CB1 também pode induzir essa síntese. Isso mostra também uma possível relevância de CB1 na indução da síntese de 2-AG no ambiente inflamatório. Porém, esse funcionamento pode indicar que outras vias também estejam funcionando nessa regulação.

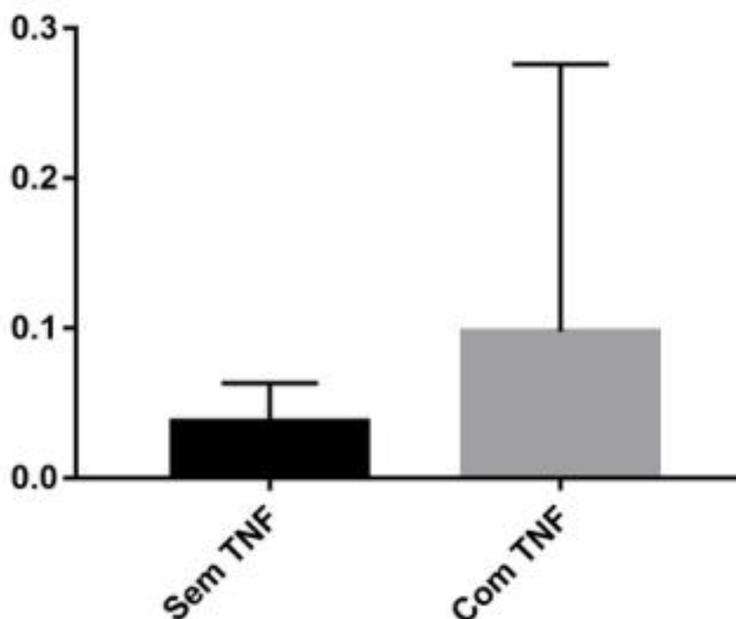
Gráfico 36: Avaliação da expressão gênica para DAGL- α nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise com os dados agrupados para a expressão de MAGL (Gráfico 37), não pode ser percebida a influência do ambiente inflamatório na expressão da enzima (principal responsável pela degradação do endocanabinóide 2-AG), o que indica a princípio que o ambiente inflamatório em si não deve ser responsável por alterações significativas na degradação de 2-AG. Ainda, conforme pode ser observado posteriormente no gráfico 41, a média do grupo com TNF é aumentada unicamente pela presença de um grupo de estudo: Ago+Ant2+TNF, o que leva também a um alto desvio padrão nos dados em análise.

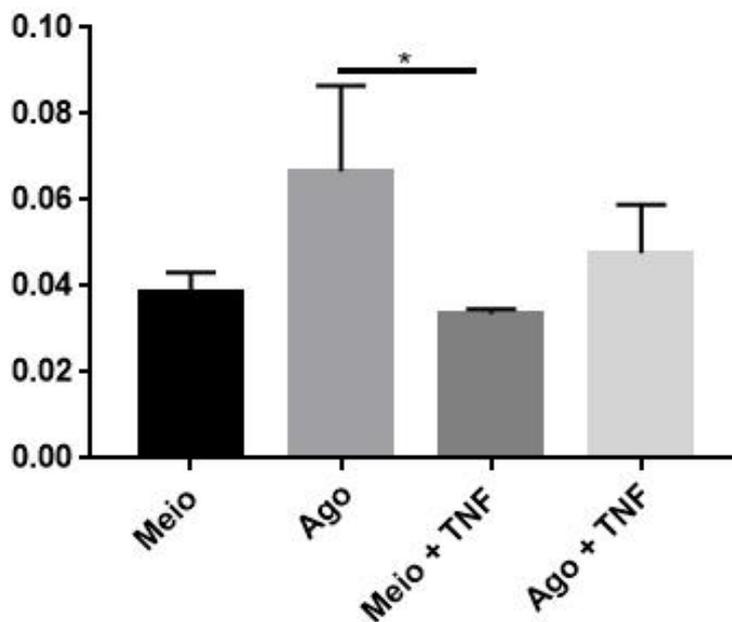
Gráfico 37: Avaliação da expressão gênica para MAGL nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados para expressão de MAGL, excluindo-se aqueles com a presença de antagonistas (Gráfico 38), pode-se perceber que existe diferença na expressão de MAGL entre a presença de agonista no meio não inflamatório, com a maior taxa de expressão, e o meio inflamatório sem agonista, com a menor taxa de expressão. Essa observação permite inferir que a ativação dos receptores no ambiente não inflamatório, via AEA (agonista), pode alterar a presença do outro endocanabinóide, 2-AG, levando à uma possível maior taxa de degradação. Além disso, tal análise demonstra também que, uma vez que não exista agonista no meio inflamatório, as células podem ser impelidas a diminuir a expressão de MAGL, o que pode culminar com uma menor taxa de degradação de 2-AG.

Gráfico 38: Avaliação da da expressão gênica para MAGL nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

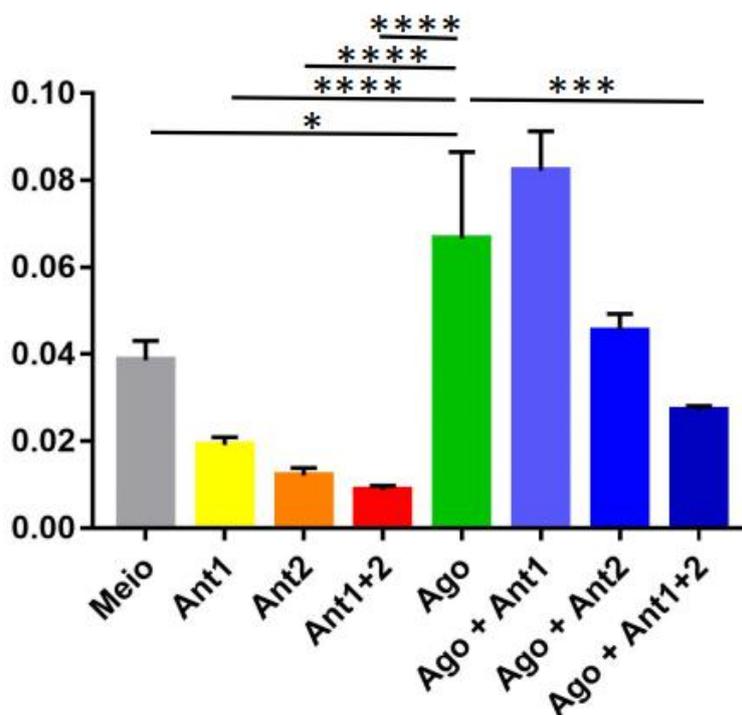
Mais uma vez, a análise desses dados pode indicar que a presença de um agonista parece ser necessária no meio inflamatório, levando a uma interpretação semelhante, mas paralela, à feita para NAPE-PLD (síntese de AEA): no meio inflamatório sem a presença de um agonista, a expressão de MAGL é diminuída, o que pode culminar com uma menor degradação de 2-AG e consequente possível manutenção desse endocanabinoide no meio inflamatório, indicando a necessidade de um agonista nesse tipo de ambiente.

Por outro lado, a presença de agonista no meio sem TNF (Grupo Ago) está levando à maior taxa de expressão de MAGL, o que pode culminar com uma maior degradação de 2-AG e ser entendido como um mecanismo de controle da concentração de agonistas no meio sem inflamação.

Na análise dos grupos em ambiente sem inflamação (Gráficos 39 e 40), pode-se perceber que a presença de agonista no meio livre de antagonistas (Grupo Ago), podendo se ligar a ambos os receptores, é capaz de aumentar a

expressão de MAGL e, teoricamente, levar à degradação de 2-AG. Além disso, a presença de Ant1 e Ant2 juntamente com o agonista (Grupo Ago+Ant1+2) faz o nível de expressão de MAGL diminuir consideravelmente em relação à presença de agonista no meio livre (Gráfico 39). Isso pode indicar que, ao possibilitar o bloqueio dos dois receptores na presença do agonista, a degradação de 2-AG pode ser reduzida, como uma tentativa de manutenção da concentração do endocanabinóide 2-AG.

Gráfico 39: Avaliação da expressão gênica para MAGL nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 1.

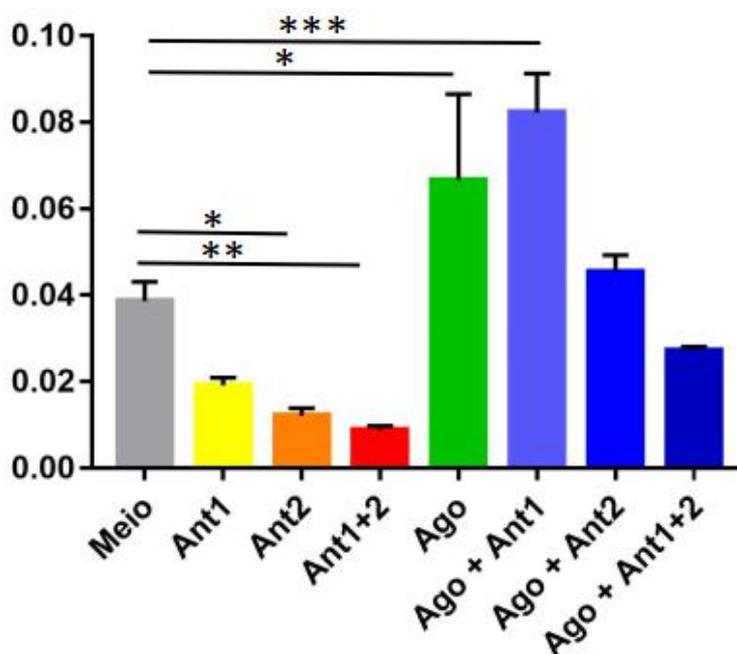


O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Outra relação importante relacionada à expressão de MAGL em ambiente não inflamatório, é que, na ausência de agonista no meio, a presença de pelo menos Ant2 (Grupos Ant2 e Ant1+2) diminui a expressão de MAGL (Gráfico 40). Da mesma maneira, no ambiente onde o agonista havia elevado a expressão da enzima, a presença de pelo menos Ant2 (Ago+Ant2 e

Ago+Ant1+2) faz o nível de expressão de MAGL voltar a ficar semelhante ao do meio sem agonistas nem antagonistas (Gráfico 40). Esses achados parecem indicar um papel importante de Ant2 sobre a expressão de MAGL, levando à sua diminuição e conseqüente possível menor degradação de 2-AG.

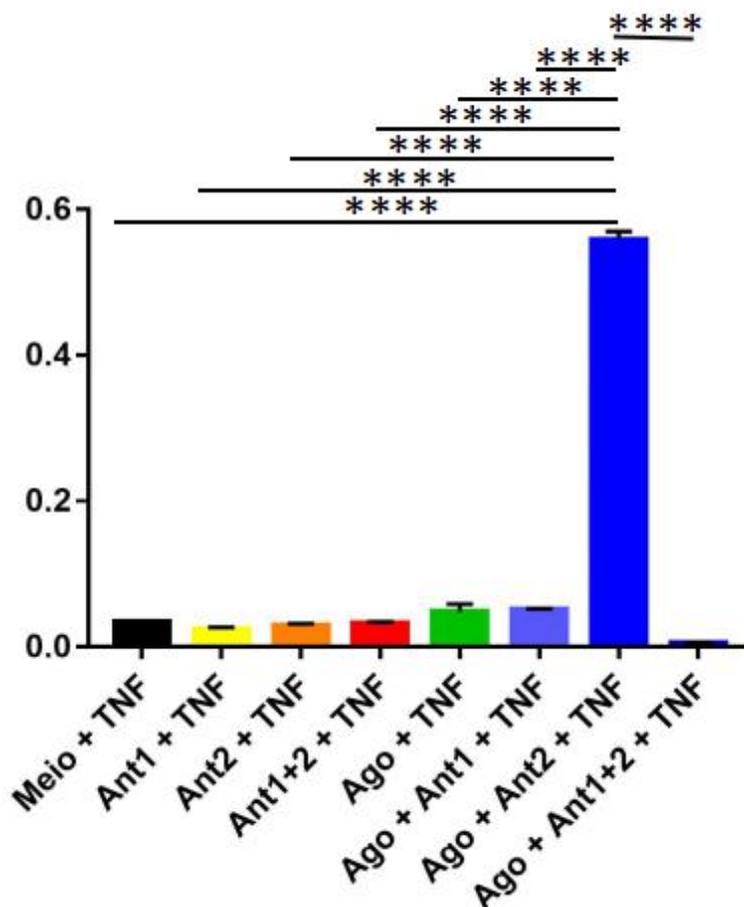
Gráfico 40: Avaliação da expressão gênica para MAGL nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 2.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, em ambiente inflamatório (Gráficos 41 e 42), pode-se notar nitidamente que a presença de agonista conjuntamente com Ant2 eleva consideravelmente a expressão de MAGL (Gráfico 41). Isso indica, em outras palavras, que a possível ativação específica de CB1 por agonista no ambiente inflamatório parece alterar de maneira drástica a expressão de MAGL, podendo conseqüentemente significar um aumento na degradação de 2-AG.

Gráfico 41: Avaliação da expressão gênica para MAGL nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF - Avaliação 1.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Ainda em ambiente inflamatório, a presença de Ant1, Ant2 e agonista diminui representativamente os níveis de expressão gênica de MAGL (Gráfico 42), o que pode ser traduzido como uma tentativa de manutenção da concentração do endocanabinóide 2-AG pela possibilidade de menor degradação, da mesma maneira que foi relatado para o ambiente sem inflamação (Gráfico 39).

dessa expressão frente a diferentes estímulos de ativação e bloqueio desses receptores.

Além disso, esses componentes também tiveram sua expressão gênica marcadamente alterada, de maneira específica, frente ao estímulo inflamatório de TNF- α , mostrando também que o eCBS de fato atua em resposta ao estímulo inflamatório em DPSCs, corroborando estudos que relatam atividade das DPSC frente a inflamação (YAMAZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; CHALISSERRY *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018) bem como estudos que relatam, de uma maneira geral, a regulação do eCBS como resposta à inflamação em outros tipos celulares (MONTANARI, *et al.*, 2019; WU, 2019).

Ainda, se analisarmos conjuntamente os gráficos 1 a 15 e os gráficos 15 a 42, e o fato de as DPSCs expressarem HLA-DR, PD-L1 e PD-L2 em sua superfície, podemos perceber que o eCBS presente nas DPSCs não só responde ao estímulo imunológico, como também é capaz de alterar moléculas chave da resposta imune, fornecendo os estímulos necessários para que as DPSCs atuem na coordenação do ambiente inflamatório, rumo à homeostase. Tal achado corrobora estudos que citam o papel de manutenção/busca da homeostase pelo eCBS, em diferentes tipos celulares (HIRSCH e TAM, 2019; MORENO *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2019) e especificamente em DPSC (CHALISSERRY *et al.*, 2017; HASWEH *et al.*, 2018).

Quanto ao funcionamento desse sistema em sua autorregulação em DPSCs, bem como em resposta ao estímulo inflamatório, as seguintes questões merecem destaque.

Pela análise dos gráficos 15 a 23, pode-se perceber que de fato o ambiente inflamatório é capaz de alterar a expressão tanto de CB1 quanto de CB2, levando ao aumento da expressão gênica de ambos. Isso indica, de uma maneira geral, que os receptores são importantes vias de comunicação na inflamação. Se forem levadas em consideração as alterações relatadas nos gráficos 1 a 15, e nos tópicos “4.2.1.1 Considerações gerais sobre a presença de HLA-DR” e “4.2.2.1 Considerações gerais sobre a presença de PD-L1 e PD-

L2”, pode-se inferir que tais receptores têm papel crucial na imunomodulação, uma vez que diferentes estímulos (agonistas e antagonistas) sobre eles levam a diferentes respostas quanto à expressão das molécula de superfície HLA-DR, PD-L1 e PD-L2. Isso reforça a teoria que as DPSCs, via eCBS, são capazes de coordenar o ambiente inflamatório. (YAMAZA et al., 2010; SILVA et al., 2014; CHALISSERRY et al., 2017; HASWEH et al., 2018)

Ainda pela análise dos gráficos 15 a 23, pode-se ressaltar que a presença isolada de agonista no ambiente livre de inflamação não é relevante para a expressão de nenhum dos dois receptores, mas sim o bloqueio dos mesmos. Nessa situação, a presença concomitante dos antagonistas com o agonista parece exacerbar esse aumento. No ambiente inflamatório, por outro lado, a presença de agonista aumenta a expressão gênica de ambos CB1 e CB2.

De uma maneira geral, percebe-se uma comunicação complexa entre ativação e bloqueio dos receptores para que, em qualquer situação, exista a possibilidade de expressão de receptores para a via de sinalização.

Pela análise dos gráficos 24 a 27, pode-se perceber que o ambiente inflamatório é capaz de levar ao aumento da expressão gênica também de NAPE-PLD, o que indica um caminho de síntese do agonista AEA. Levando em conjunto também os dados dos gráficos 1 a 15 e suas análises, pode-se demonstrar que o eCBS de fato tem papel relevante no desenvolvimento do perfil imunomodulador relatado, confirmado até aqui pelo aumento da expressão de seus receptores, e agora da enzima de síntese de AEA, um dos dois ligantes clássicos do eCBS.

Assim mostra-se que receptores e agonista são induzidos pelo ambiente inflamatório e, mais do que isso, a análise especificamente dos gráficos 26 e 27 mostra que existem mecanismos de controle da síntese de AEA (via expressão de NAPE-PLD) influenciadas pela própria AEA e pelos antagonistas, bem como pelo TNF- α , que buscam de maneira geral manter a possibilidade dessa síntese aumentada no ambiente inflamatório, e diminuída fora dele, indicando

que a presença de AEA parece necessária no ambiente inflamatório e indesejada fora dele.

Em relação à expressão de FAAH, a análise dos gráficos 28 a 32 permite perceber que, de maneira semelhante ao relatado para os outros componentes, o ambiente inflamatório é capaz de aumentar a expressão gênica de FAAH. Assim, tem-se então os receptores (CB1 e CB2), a síntese (NAPE-PLD) e a degradação (FAAH) do endocanabinoide AEA sendo afetadas pelo ambiente inflamatório, completando um sistema capaz de se autorregular. Vale ressaltar que os antagonistas também têm papel de relevância nessas alterações. No caso específico de FAAH, nota-se um papel relevante de CB2 em sua regulação (e conseqüente influência na concentração de AEA) em ambiente não inflamatório. Analisando-se mais profundamente os gráficos 30 a 32, percebe-se mais uma vez que, na relação agonista/antagonistas e TNF, parece haver uma busca pela homeostase também influenciada pela degradação de AEA via FAAH.

Em relação às enzimas responsáveis pela síntese (DAGL- α) e degradação (MAGL) do outro endocanabinóide, 2-AG, pela análise dos gráficos 33 a 36 (DAGL- α) e 37 a 42 (MAGL), pode-se perceber que o ambiente inflamatório não influencia diretamente a expressão gênica das mesmas. Porém a presença de AEA (agonista) influencia essas expressões, de maneira diferente. Enquanto a presença do agonista em ambiente inflamatório leva à maior expressão gênica de DAGL- α (e conseqüente possível aumento da concentração de 2-AG nesse meio), sua presença em ambiente não inflamatório leva ao aumento da expressão de MAGL, que pode culminar com uma diminuição da concentração de 2-AG.

Mais uma vez, a análise desses dados parece indicar que a presença de um agonista é desejada em ambiente inflamatório, e indesejada em ambiente não inflamatório. Além disso, ao analisar-se especificamente os gráficos 35, 36, e 39 a 42, também percebe-se uma busca pela homeostase através do controle da síntese e degradação de 2-AG. De maneira relevante, merece

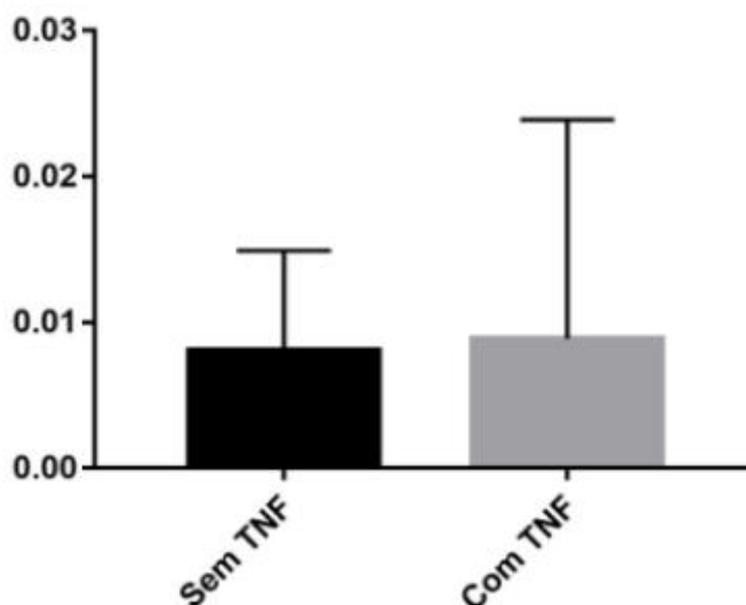
destaque o papel de CB1 na síntese de 2-AG tanto em ambiente inflamatório quanto não inflamatório.

De maneira geral, é perceptível o papel do eCBS na comunicação de DPSCs e o ambiente inflamatório, e esses achados mostram um sistema completo, funcional e autorregulável nas DPSCs, respondendo ativamente ao estímulo de TNF- α , dados estes nunca antes relatados em conjunto, de maneira detalhada.

4.3.2 Citocinas TGF- β e IL-6

Na análise com os dados agrupados para a expressão de TGF- β (Gráfico 43), não pode-se perceber a influência do ambiente inflamatório na expressão gênica dessa citocina, o que indica a princípio que o ambiente inflamatório não é responsável por alterar a produção dessa citocina. Ainda, conforme pode ser observado posteriormente no gráfico 47, a média do grupo “Com TNF” é aumentada unicamente pela presença de um grupo de estudo: Ago+Ant2+TNF, o que leva também a um alto desvio dentro do grupo “Com TNF”.

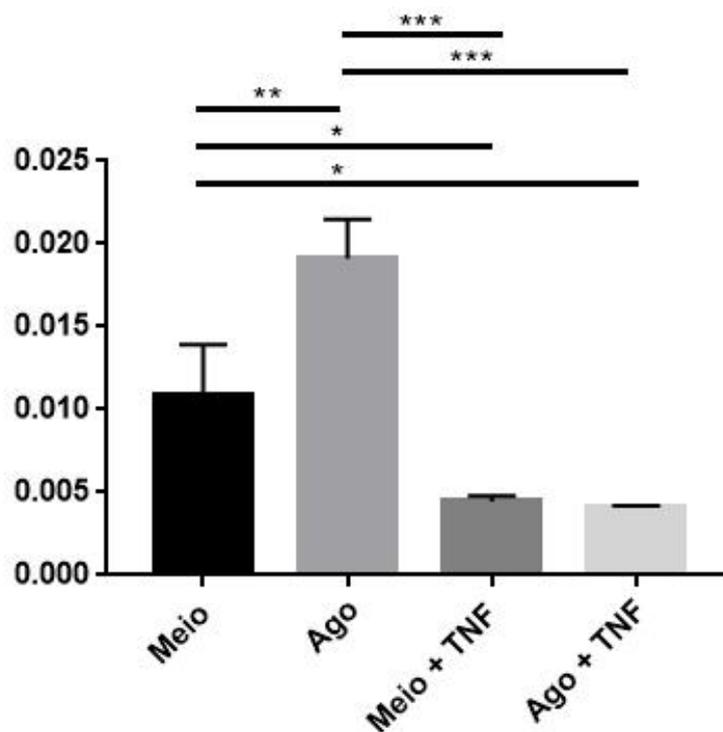
Gráfico 43: Avaliação da expressão gênica para TGF- β nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, excluindo-se aqueles com presença de antagonistas, para a expressão de TGF- β (Gráfico 44), pode-se perceber que a presença de agonista no meio, em ambiente não inflamatório, é um forte indutor da expressão gênica para TGF- β , o que é confirmado nos próximos gráficos. Além disso, a presença de TNF, independente da presença ou não de agonista, é capaz de diminuir a expressão de TGF- β . Analisando-se o discutido anteriormente a respeito da ativação de células Th17 via TGF- β , é interessante notar que o ambiente inflamatório sem antagonistas leva a uma diminuição na expressão do gene para TGF- β , o que pode indicar um papel imunossupressor das DPSCs em ambiente inflamatório, já que expressando menos TGF- β espera-se um menor direcionamento de células Th presentes em um processo inflamatório para o perfil efetor Th17.

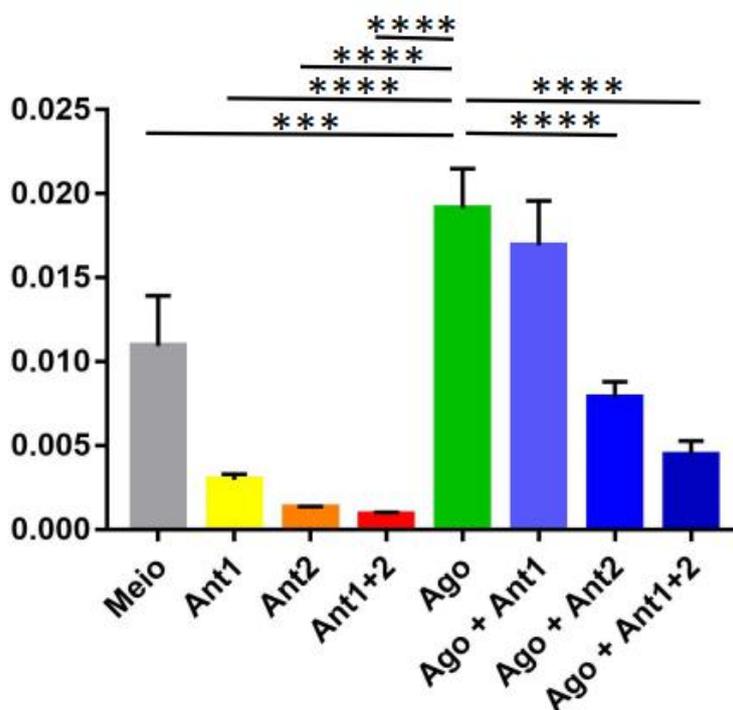
Gráfico 44: Avaliação da da expressão gênica para TGF- β nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isoladamente em ambiente não inflamatório (Gráficos 45 e 46), a presença de agonista isoladamente aumenta a expressão de TGF- β em relação a praticamente todos os grupos, mostrando um papel relevante do agonista no ambiente não inflamatório em termos de induzir a expressão de TGF- β (Gráfico 45). O único grupo que apresenta expressão similar a ele é o grupo Ago+Ant1, o que mostra que Ant1 na presença de agonista não afeta esse aumento de expressão. Já a presença de pelo menos Ant2, em ambiente com agonista (Ago+Ant2 e Ago+Ant1+2) diminui essa expressão.

Gráfico 45: Avaliação da expressão gênica para TGF- β nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 1.

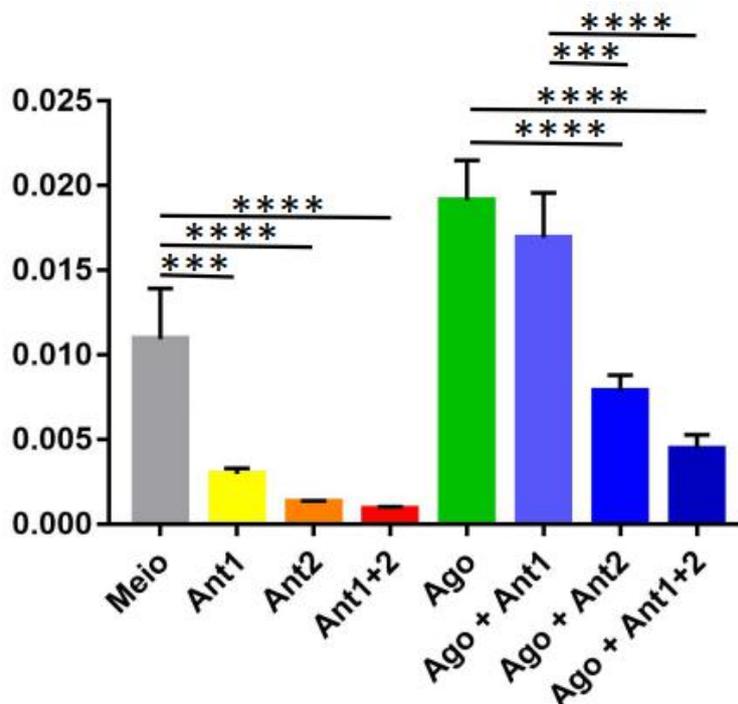


O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Considerando-se as características discutidas dessa citocina e os relatados papéis imunomoduladores das DPSCs frente a Th, bem como as discussões feitas até agora, pode-se postular que o receptor CB2 tem um papel preponderante na imunomodulação via TGF- β e interação com células Th mesmo fora de um ambiente de inflamação, uma vez que teoricamente ele pode afetar o balanço entre células Treg/Th17.

Ainda em relação ao ambiente não inflamatório, sem a presença de AEA a presença de qualquer um dos antagonistas é capaz de diminuir a expressão de TGF- β . Já nos grupos com presença de AEA, Ant2 (isoladamente ou com Ant1) é capaz de diminuir a expressão de TGF- β (Gráfico 46), confirmando sua relevância no controle da expressão dessa citocina.

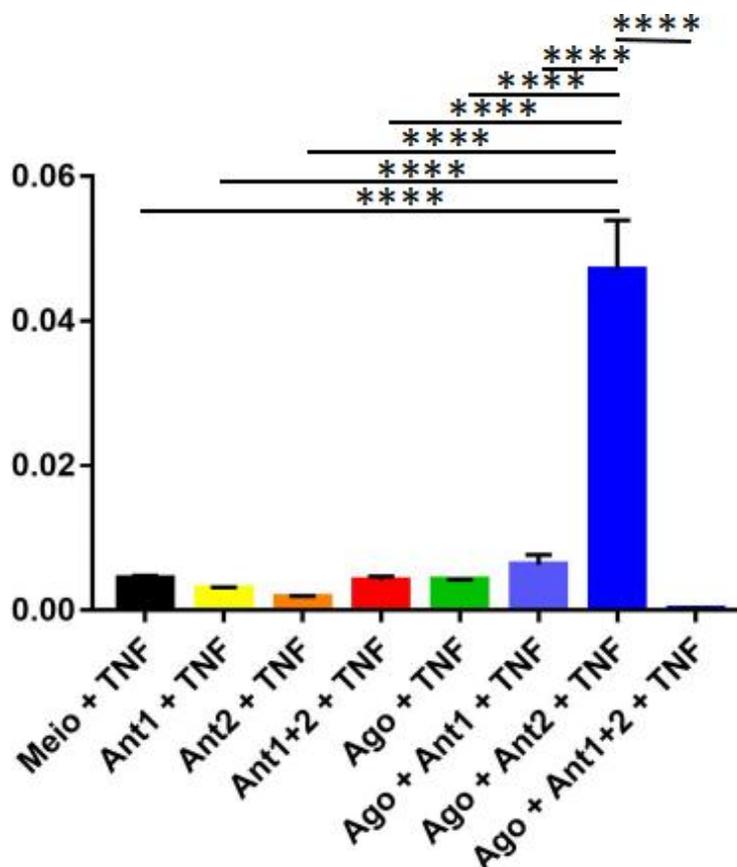
Gráfico 46: Avaliação da expressão gênica para TGF- β nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF - Avaliação 2.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, em ambiente inflamatório (Gráfico 47), pode-se notar nitidamente que a presença de agonista conjuntamente com Ant2 eleva consideravelmente a expressão de TGF- β .

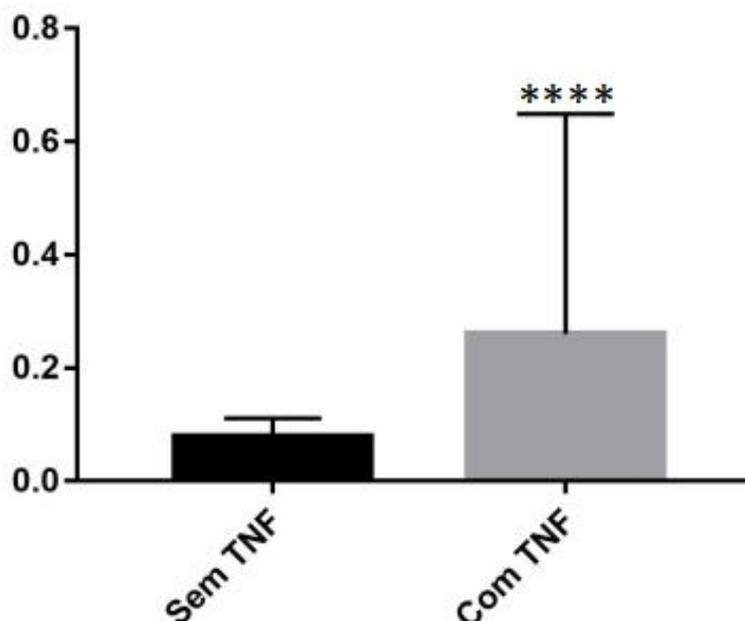
Gráfico 47: Avaliação da expressão gênica para TGF- β nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise agrupada da expressão gênica de IL-6 (Gráfico 48), da mesma maneira que foi relatado para outros marcadores analisados até aqui, o ambiente inflamatório como um todo mostra-se capaz de induzir a expressão gênica de IL-6. Considerando o perfil pró-inflamatório dessa citocina e os resultados anteriores relativos à presença de HLA-DR, PD-L1 e PD-L2 nas DPSCs, isso pode ser justificado pelo fato de as DPSCs expressarem tanto marcadores relacionados a um perfil anti-inflamatório quanto pró-inflamatório.

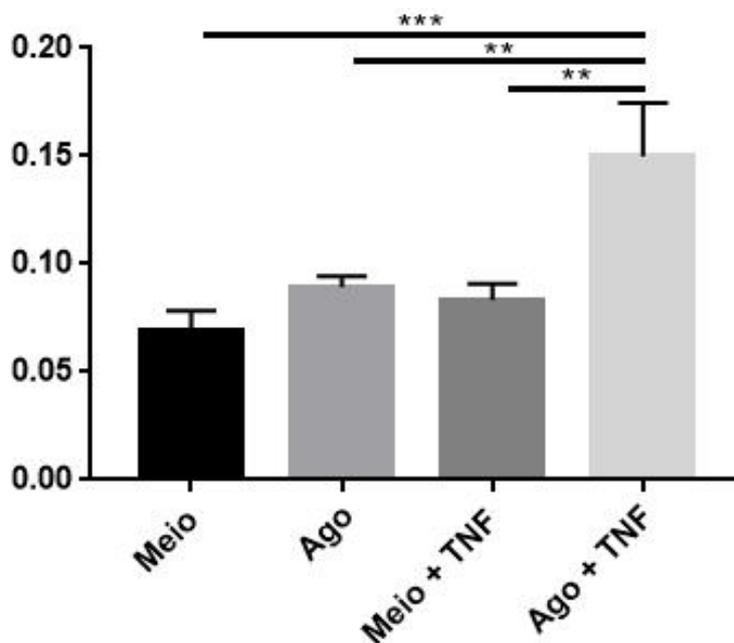
Gráfico 48: Avaliação da expressão gênica para IL-6 nas DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, excluindo-se aqueles com a presença de antagonistas, para a expressão de IL-6 (Gráfico 49), pode-se perceber que a presença de agonista em meio inflamatório leva a um aumento significativo na expressão do gene para IL-6. Além disso, tal análise demonstra que nem o TNF por si só, nem o agonista isoladamente têm esse papel. Esses dados corroboram a discussão feita acima, no gráfico 48, a respeito do direcionamento das DPSCs para um perfil de controle e coordenação do processo inflamatório, e não apenas um papel antiinflamatório ou pró-inflamatório polarizado.

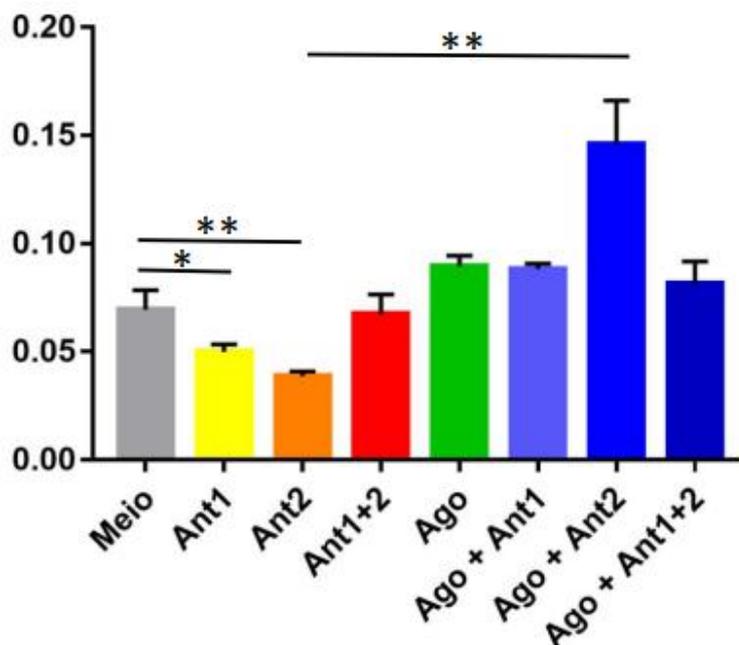
Gráfico 49: Avaliação da da expressão gênica para IL-6 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando analisa-se a expressão de IL-6 nos grupos isolados, em ambiente não inflamatório (Gráfico 50), pode-se perceber algumas situações: em relação ao meio sem a presença de agonista (Grupo Meio), a presença individual de Ant1 ou Ant2 diminui a expressão de IL-6, sendo o papel de Ant2 mais relevante. Já a presença de ambos os antagonistas simultaneamente restaura a expressão inicial similar ao grupo “Meio”. Além disso, em ambiente obrigatoriamente com presença de Ant2 e ausência de Ant1, a presença de agonista (Grupo Ago+Ant2) aumenta a expressão de IL-6, podendo levar a um perfil mais pró-inflamatório.

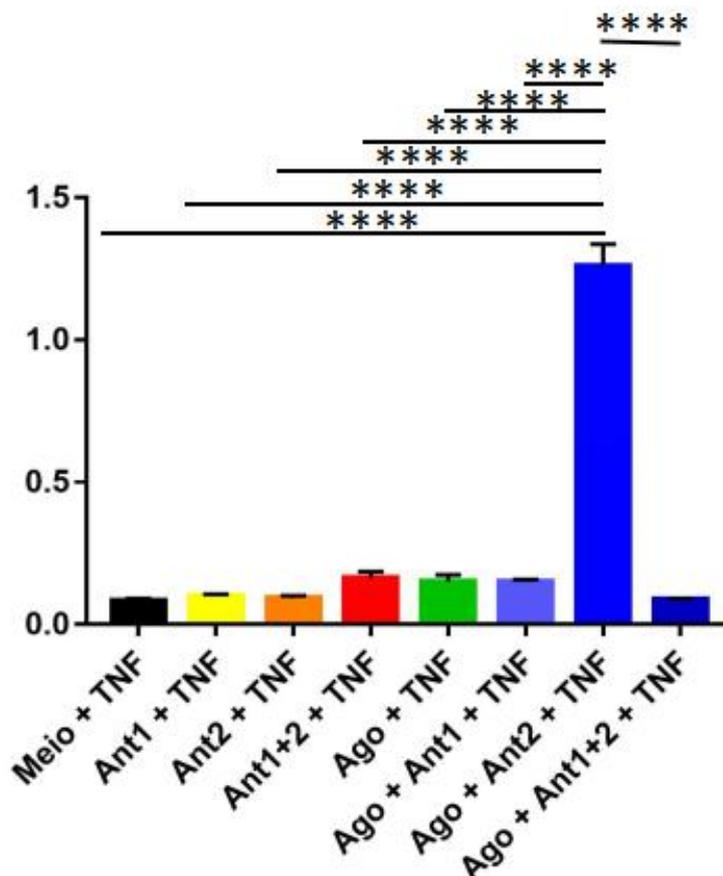
Gráfico 50: Avaliação da expressão gênica para IL-6 nas DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Quando analisam-se os grupos no ambiente inflamatório (Gráfico 51), é percebido de maneira semelhante à descrita no ambiente sem inflamação, porém bem mais representativa, que a presença de Ant2 juntamente com agonista (Grupo Ago+Ant2+TNF) é capaz de levar a um perfil mais pró-inflamatório pelo aumento na expressão de IL-6.

Gráfico 51: Avaliação da expressão gênica para IL-6 nas DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em relação à expressão dos controles endógenos. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

4.3.2.1 Considerações gerais sobre a expressão gênica das citocinas

TGF- β e IL-6

Pela análise dos gráficos 43 a 51, pode-se perceber que o eCBS, em sua comunicação com o ambiente inflamatório, também tem papel importante na mediação de uma resposta pró-inflamatória das DPSCs, mostrando que tais células não apresentam um perfil pró-inflamatório ou anti-inflamatório polarizados, mas sim um perfil de controle mais amplo sobre o ambiente de inflamação, sendo capaz de sustentá-lo ou inibi-lo. Isso pode acontecer via alteração do balanço Treg/Th uma vez que a indução de células Th17 acontece

via IL-6 e TGF- β , que são citocinas cujos genes são diferencialmente expressos pelas DPSCs, sendo regulados pelo eCBS e pelo ambiente inflamatório.

Esse achado é sustentado por ampla literatura que trata do balanço Treg/Th (MORISHIMA et al., 2009; ALBERTS et al., 2010; YOSHIMURA e MUTO., 2011; ROSE-JOHN., 2017; MOCAN et al., 2019), bem como corrobora e coopera na explicitação do mecanismo por trás da alteração desse balanço relatada em artigos especificamente acerca de DPSC (PIERDOMENICO et al., 2005; YAMAZA et al., 2010; ALIPOUR et al., 2013; SILVA et al., 2014; CHALISSERRY et al., 2017), elucidando o papel do ambiente inflamatório e do eCBS nesse controle.

Em relação à TGF- β , a presença de agonista em meio sem inflamação aumenta sua expressão, enquanto o TNF em si diminui sua expressão. Isso mais uma vez sustenta que o papel das DPSCs é de regular o ambiente inflamatório, já que elas podem aumentar ou diminuir a expressão de TGF- β nas diferentes condições analisadas.

De maneira relevante, vale ressaltar que o receptor CB2 parece ter papel preponderante na resposta em ambiente sem inflamação, com Ant2 sendo responsável pela diminuição da expressão de TGF- β . Já em ambiente inflamatório, agonista na presença de Ant2 aumenta drasticamente sua expressão.

Em relação a IL-6, o ambiente inflamatório como um todo parece aumentar sua expressão gênica, sendo que, na ausência de antagonistas, a presença de agonista é capaz de aumentar drasticamente esses níveis, levando as DPSCs a um perfil mais pró-inflamatório, o que poderia ser entendido como uma sustentação da inflamação.

Já em um ambiente complexo, com a presença de agonistas e antagonistas, esse perfil mais pró-inflamatório, direcionado por IL-6, é devido principalmente à presença de agonista com Ant2, que pode ser entendida como possível ativação de CB1. Essa situação é percebida tanto em ambiente

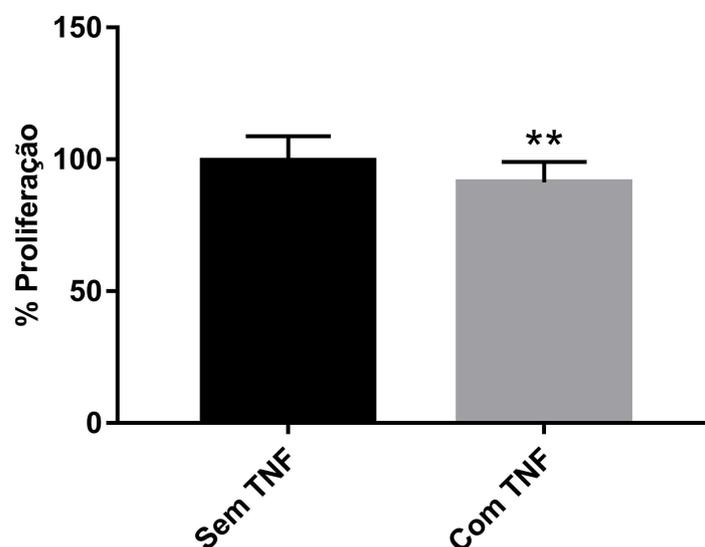
inflamatório quanto não inflamatório, e esse dado corrobora o estudo de JORGACEVIC *et al.*, 2019, que demonstraram que o fármaco rimonabanto, conhecido por bloquear o receptor CB1, levou à uma diminuição significativa de IL-6 em tecido adiposo e hepático de camundongos. (JORGACEVIC *et al.*, 2019)

Assim, pelos dados demonstrados até aqui, pode-se perceber que de fato o eCBS é capaz de modular o perfil de resposta das DPSCs em relação ao ambiente de inflamação, e que elas podem assumir tanto perfis mais pró-inflamatórios, quanto perfis mais anti-inflamatórios. Isso deve-se ao fato de que elas são capazes tanto de expressar HLA-DR, PD-L1 e PD-L2, quanto modular seu nível de expressão gênica de TGF- β e IL-6 em resposta ao estímulo inflamatório de TNF- α e aos estímulos do eCBS (agonista e antagonistas). MONTANARI *et al.*, 2019, de maneira similar, relataram que o eCBS está envolvido na modulação da liberação de citocinas inflamatórias, porém associam esse efeito especificamente ao receptor CB2 presente em células do sistema imune. (MONTANARI *et al.*, 2019)

4.4 Análise de proliferação

Na análise com os dados agrupados para a proliferação das DPSCs (Gráfico 52), de uma maneira geral, pode-se perceber que a presença de TNF (ambiente inflamatório) diminui a taxa de proliferação das células, porém em porcentagem pequena, embora significativa. Vale ressaltar que, nesse estudo, a expressão gênica de IL-6, bem como a presença dos ligantes PD-L1 e PD-L2, e de HLA-DR, mostraram-se alteradas nessa mesma comparação, com regulação positiva desses marcadores no grupo com TNF.

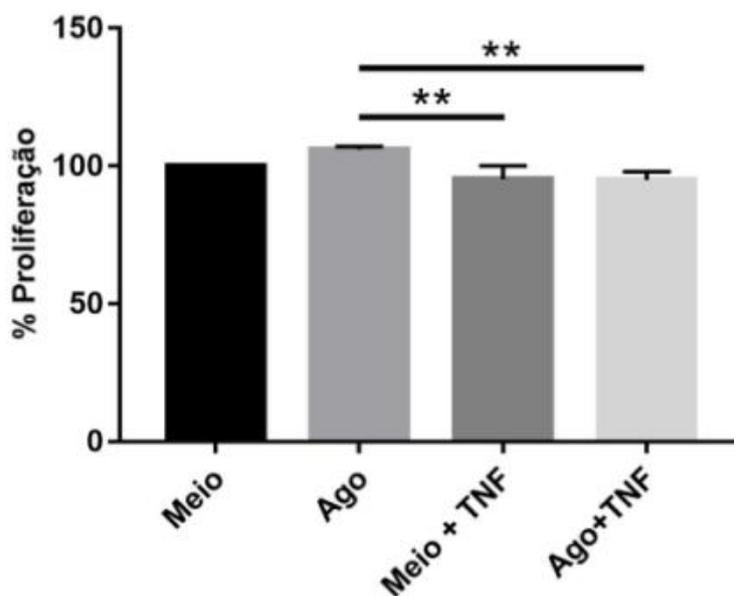
Gráfico 52: Análise de proliferação das DPSCs, amostras agrupadas sem TNF e com TNF.



O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação em comparação ao Grupo Meio. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Na análise dos grupos isolados, sem influência dos antagonistas (Gráfico 53), pode-se perceber que a presença de TNF diminui a taxa de proliferação quando presente, em relação à presença apenas de agonista, mas não em relação ao meio.

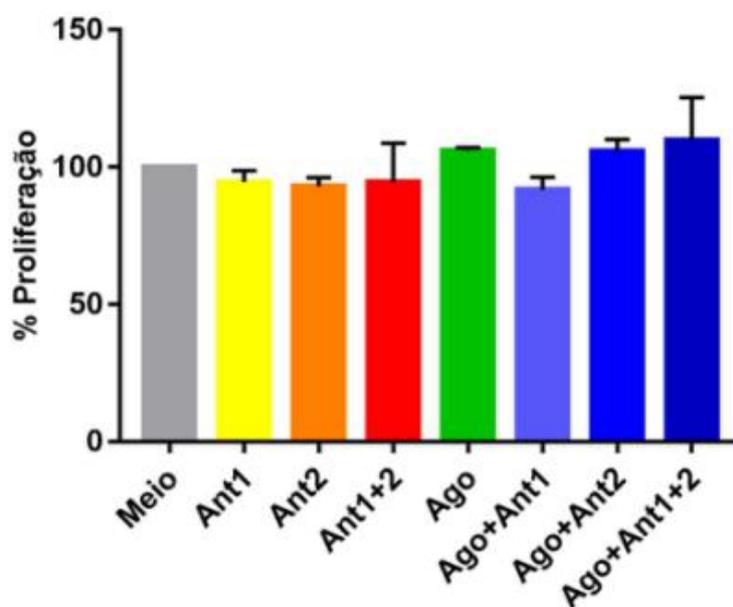
Gráfico 53: Análise de proliferação das DPSCs, grupos isolados, na ausência de antagonistas.



O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação em comparação ao Grupo Meio. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

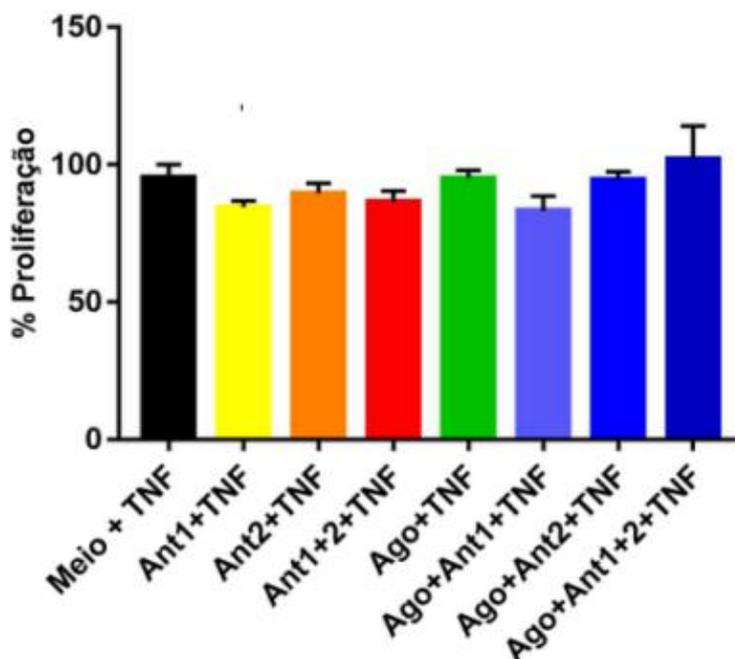
Não houve diferença significativa na proliferação pela presença de AEA ou dos antagonistas quando a análise foi feita com todos os grupos no meio sem inflamação (Gráfico 54). Da mesma maneira, também não houve diferença quando a análise foi feita com todos os grupos no meio inflamatório (Gráfico 55). Isso corrobora que a diferença notada nos gráficos 52 e 53 não são devidas a diferenças entre os grupos isoladamente, mas sim a diferenças entre todos os grupos sem TNF vs. todos os grupos com TNF.

Gráfico 54: Análise da proliferação das DPSCs, grupos isolados, na ausência de TNF.



O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação em comparação ao Grupo Meio. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Gráfico 55: Análise da proliferação das DPSCs, grupos isolados, na presença de TNF.



O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação em comparação ao Grupo Meio. Valores de $p < 0,05$ foram indicados por (*); valores de $p < 0,01$ foram indicados por (**); valores de $p < 0,001$ foram indicados por (***) e valores de $p < 0,0001$ foram indicados por (****).

Em outras palavras, o eCBS não parece ser o responsável por variações na proliferação, uma vez que a modificação na presença de AEA e dos antagonistas não gerou diferenças. Por outro lado, o TNF parece ser o responsável por essa variação, uma vez que ao comparar-se os grupos agrupados sem TNF e com TNF podemos perceber essa diferença.

Conforme discutido em mais detalhes nos itens “1.1.3 - Perfil Imunomodulador de células-tronco mesenquimais e sua utilização”, e “1.2.2 Sistema canabinoide endógeno e suas aplicações”, as funções de células-tronco são fortemente influenciadas pelo ambiente de inflamação, em especial pela ação de citocinas inflamatórias, que podem agir na regulação tanto das propriedades imunomodulatórias dessas células, como na sua proliferação e diferenciação. Assim, os resultados apresentados corroboram esses estudos que mostram alteração da proliferação de MSCs como consequência do

ambiente inflamatório, porém vão contra outros estudos que têm mostrado também que o eCBS interage em diversas vias das MSCs afetando sua diferenciação, sobrevivência e proliferação (DE MIGUEL et al., 2012; LE BLANC et al., 2012; GALVE-ROPERH et al., 2013; GARCÍA-OVEJERO et al., 2013; AMENTA et al., 2014; MA et al., 2014; WANG et al., 2014; LIBRO et al., 2017; HOOGDUIJN e LOMBARDO, 2019; MONTANARI et al., 2019; TAN et al., 2019).

5 CONCLUSÃO

A avaliação das respostas das DPSC aos estímulos dos receptores do sistema endocanabinóide e ao TNF- α , realizada neste trabalho, ampliou a investigação da interação das DPSCs e do eCBS em relação à imunomodulação, elucidando melhor essa via de atuação. Mais do que isso, este trabalho permitiu, pela primeira vez, o entendimento aprofundado e detalhado desse padrão e sua relação com o ambiente inflamatório e a capacidade imunomoduladora atribuída a essas células.

À partir do conhecimento gerado neste trabalho pode ser formada ainda a base para um entendimento mais detalhado dos efeitos medicinais gerais da canábis, através da melhor compreensão da comunicação MSC/sistema imune/eCBS, o que auxilia no esclarecimento de sua ação e suas consequências no tratamento de outras doenças, como doenças neurológicas, e também no desenvolvimento de novos medicamentos.

A linhagem de células utilizada foi isolada à partir da polpa de um dente decíduo recebido por doação e apresentou todas as características que definem uma DPSC: (I) foi isolada à partir da polpa dentária; (II) apresentou capacidade de aderência e morfologia fusiforme quando em cultivo; (III) apresentou potencialidade de diferenciação em outros tipos celulares, confirmada pelo sucesso da diferenciação osteogênica induzida nas células; (IV) apresentou capacidade de autorrenovação quando em cultivo, sendo utilizada em diversas passagens; (V) apresentou o painel de marcadores esperado em sua caracterização molecular: expressão positiva para os marcadores Nestin, CD105, NANOG e OCT-4, e negativa para CD34 e CD45.

A imunofenotipagem das moléculas de superfície HLA-DR, PD-L1 e PD-L2 permitiu uma melhor compreensão sobre as vias de imunomodulação expressas por DPSCs, bem como sobre sua resposta aos estímulos do eCBS e do TNF- α . A análise de HLA-DR mostrou que as DPSCs expressam esse marcador em sua superfície celular, o que possibilita que ela atue como

apresentadora de antígenos frente a células do sistema imunológico. Além disso, a análise mostrou que sua expressão responde diferencialmente ao estímulo do eCBS, bem como à presença de TNF- α , o que comprova o papel desse sistema na influência do perfil imunomodulador atribuído às DPSCs. A análise de PD-L1 e PD-L2 mostrou também que as DPSCs expressam esses ligantes em sua superfície, conferindo a elas a possibilidade de atuação imunomossupressora, conforme já relatado na literatura. Mais do que isso, a análise também mostrou que sua expressão responde diferencialmente aos estímulos do eCBS e ao TNF- α , o que comprova o papel do eCBS como via de comunicação entre as DPSCs e o sistema imune, em especial na imunomodulação.

A análise da expressão gênica para as enzimas e receptores relacionados ao sistema endocanabinóide forneceu uma compreensão profunda e detalhada do funcionamento do eCBS em DPSCs em termos de sua autorregulação, e em termos de sua resposta à presença de TNF- α . Isso permitiu confirmar indubitavelmente que o eCBS é um sistema presente e funcionalmente ativo em DPSCs. De maneira relevante, essas análises mostraram a expressão gênica dos principais componentes do eCBS em DPSCs - os “clássicos” receptores CB1 e CB2, as enzimas responsáveis pela síntese (NAPE-PLD) e degradação (FAAH) de AEA, e as enzimas responsáveis pela síntese (DAGL- α) e degradação (MAGL) de 2-AG, bem como a alteração dessa expressão frente a diferentes estímulos de ativação e bloqueio desses 2 receptores, e ao estímulo por TNF- α , mostrando também que o eCBS de fato atua em resposta ao estímulo inflamatório em DPSCs.

A análise da expressão gênica para as citocinas TGF- β e IL-6 forneceu bases para uma melhor compreensão sobre o direcionamento a um perfil pró-inflamatório das DPSCs. Os resultados mostraram que as DPSCs expressam os genes para TGF- β e IL-6 mesmo quando cultivadas sem estímulo específico (meio basal), mas que essa expressão é profundamente alterada como resposta aos estímulos do eCBS e ao estímulo por TNF- α , mostrando mais

uma vez o papel desse sistema na coordenação da resposta celular de DPSCs, em especial relativa à imunomodulação.

A análise da taxa de proliferação das DPSCs frente aos estímulos do eCBS e ao estímulo por TNF- α mostrou que a presença de TNF- α diminui, de uma maneira generalizada, a taxa de proliferação das células. Essa diminuição é numericamente pequena, porém significativa, o que corrobora estudos que mostram alteração da proliferação de MSCs em ambiente inflamatório. Na análise dos grupos individualizados, não percebe-se diferença entre a taxa de proliferação de nenhum grupo específico, o que demonstra não ser o eCBS o responsável por variações na proliferação, uma vez que a modificação na presença de agonista e antagonistas não gerou diferenças. Por outro lado, o TNF- α mostra-se como responsável por essa variação, uma vez que a comparação entre os grupos sem TNF e com TNF mostra essa diferença.

Assim, a análise conjunta dos dados indica que o eCBS presente nas DPSCs não só responde ao estímulo imunológico, como também é capaz de alterar moléculas chave da resposta imune, fornecendo os estímulos necessários para que as DPSCs atuem na coordenação do ambiente inflamatório ao assumir tanto perfis pró-inflamatórios, quanto perfis anti-inflamatórios. Isso é possível devido ao fato de que elas são capazes tanto de expressar HLA-DR, PD-L1 e PD-L2, quanto modular seu nível de expressão gênica de TGF- β e IL-6 em resposta ao estímulo inflamatório de TNF- α e aos estímulos do eCBS.

6 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- ALBERTS, Bruce. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª edição. Porto Alegre Artmed, 2010.
- ALIPOUR, R. *et al.* Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **The Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 12, p. 331-344, 2013.
- ALMEIDA-JÚNIOR, L. A. *et al.* Effect of single and multiple doses of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Lasers in Medicinal Science**, jul. 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31267320>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- AMENTA, P. S. *et al.* Cannabinoid receptor type-2 stimulation, blockade, and deletion alter the vascular inflammatory responses to traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 191, 2014.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/lista-de-substancias-sujeitas-a-controle-especial>>. Acesso em: 22 fev. 2019.
- ASHTON, J.C.; GLASS, M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. **Current Neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 73-80, 2007.
- BARTHOLOMEW, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.
- BASSI, E. J. *et al.* Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. **Diabetes**, v.61, p. 2534-2545, 2012.
- BAZWINSKY-WUTSCHKE, I.; ZIPPRICH, A.; DEHGHANI, F. Endocannabinoid system in hepatic glucose metabolism, fatty liver disease, and cirrhosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20. n. 10, may. 2019.

BIANCO, J. *et al.* Taking a bite out of spinal cord injury: do dental stem cells have the teeth for it? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 7, p. 1413-1437, 2016.

CABRAL, G. A.; MARCIANO-CABRAL, F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 6, p. 1192-1197, 2005.

CHALISSSERRY, E. P. *et al.* Therapeutic potential of dental stem cells. **Journal of Tissue Engineering**, v. 8, p. 1-17, 2017.

CHIURCHIU, V. *et al.* Distinct modulation of human myeloid and plasmacytoid dendritic cells by anandamide in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 73, n. 5, p. 626-636, 2013.

COSENTINO, L.; SHAVER-WALKER, P.; HEDDLE, J. A. The relationships among stem cells, crypts, and villi in the small intestine of mice as determined by mutation tagging. **Developmental Dynamics**, v. 207, p. 420-428, 1996.

DE MIGUEL, M. P. *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 574-591, 2012.

DE PETROCELLIS, L. *et al.* Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. **Neuroscience**, v. 92, p. 377-387, 1999.

DESPONTS, C.; DING, S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 636, p. 207-218. 2010.

DEVANE, W. A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 605-613, 1988.

DI MARZO, V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1392, p. 153-175, 1998.

DOTSEY, E. *et al.* Transient cannabinoid receptor 2 blockade during immunization heightens intensity and breadth of antigen-specific antibody responses in young and aged mice. **Nature: Scientific Reports**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209996>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154, 1981.

FÉLIX, R. G. *et al.* Adipose-derived stem cells and adipose-derived stem cell-conditioned medium modulate in situ imbalance between collagen I- and collagen V-mediated IL-17 immune response recovering bleomycin pulmonary fibrosis. **Histology and Histopathology**, jul. 2019. Disponível em: <<http://www.hh.um.es/Articles-Proofs/18-152-manuscript.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2019.

FLIEDNER, T. M. The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. **Stem Cells**, v. 16, n. 1, p. 13-29, 1998.

GALVE-ROPERH, I. *et al.* Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 633-650, 2013.

GARCÍA-OVEJERO, D. *et al.* Neuroimmune interactions of cannabinoids in neurogenesis focus on interleukin-1beta (IL-1beta) signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, p. 1577-1582, 2013

GOWRAN ,A.; NOONAN, J.; CAMPBELL, V.A. The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 637-644, 2011.

GOWRAN ,A.; MCKAYED, K., J.; CAMPBELL, V.A. The cannabinoid receptor type 1 is essential for mesenchymal stem cell survival and differentiation: implications for bone health. **Stem Cells International**, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2013/796715/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

GRILL, M. *et al.* Members of the endocannabinoid system are distinctly regulated in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **Nature: Scientific Reports**, v. 9, p. 2358, 2019.

GRONTHOS, S. *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

HASWEH, N. *et al.* Characterization of the biological effect of Biodentine™ on primary dental pulp stem cells. **Indian Journal of Dental Research**, v. 29, n. 6, p. 787-793, nov-dec. 2018.

HILL, T. D. *et al.* Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. **The British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 3, p. 679-692, oct. 2013..

HIPP, J.; ATALA, A. 2008. Sources of stem cells for regenerative medicine. **Stem Cell Rev**, v. 4, p. 3-11, 2008.

HIRSCH, S.; TAM, J. Cannabis: from a plant that modulates feeding behaviors toward developing selective inhibitors of the peripheral endocannabinoid system for the treatment of obesity and metabolic syndrome. **Toxins**, v. 11, n. 5, may. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/11/5/275/htm#>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

HODGES, E. L.; ASHPOLE, N. M. Aging circadian rhythms and cannabinoids. **Neurobiology of Aging**, v. 79, p. 110-118, mar. 2019.

HOOGDUIJN, M. J.; LOMBARDO, E. Concise review: mesenchymal stromal cells anno 2019: dawn of the Therapeutic Era? **Stem Cells Translational Medicine**, v. 00, p. 01-09, 2019.

HOSSEIN-KHANNAZER, N. *et al.* Study of the immunomodulatory effects of osteogenic differentiated human dental pulp stem cells. *Life Sciences*, v. 216, p. 111-118, jan. 2019.

HUANG, H. C. *et al.* Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 9, p. 571-574, 2008.

IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress in Lipid Research**, v. 62, p. 107-128, 2016.

ISKEDJIAN, M. *et al.* TR. Meta-analysis of cannabis based treatments for neuropathic and multiple sclerosis-related pain. **Current Medical Research and Opinion**, v. 23, p. 17-24, 2007.

JENSEN, B. *et al.* Medical marijuana and chronic pain: A review of basic science and clinical evidence. **Current Pain Headache Report**, v. 19, n.v10, p. 50, 2015.

JIA, F. *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. **Nature Methods**, v. 7, p. 197-199, 2010.

JIANG, S. *et al.* Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. **PLoS One**, v. 2, n. 7, 2007.

JONES, P. H.; WATT, F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. **Cell**, n. 73, p. 713-724, 1993.

JORGACEVIC, B. *et al.* The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on adipokine and proinflammatory cytokine concentration. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 120-129, 2019

KARAOZ, E. *et al.* Isolation and in vitro characterization of dental pulp stem cells from natal teeth. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 133, n. 1, p. 95-112, 2010.

KARUSSIS, D. *et al.* Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 10, p. 1187-1194, 2010.

KEMTER, A. M. *et al.* The cannabinoid receptor 2 is involved in acute rejection of cardiac allografts. **Life Sciences**, v. 138, p. 29-34, 2015

KERKIS, I. *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, p. 105-116, 2006.

KOLB, B. *et al.* The endocannabinoid system and stroke: a focused review. **Brain Circulation**, v. 5, n. 1, jan-mar. 2019.

KOTTON, N.; FINE, A. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. **Cytotherapy**, v. 5, n. 2, p. 169-173, 2003.

KRAMPERA, M. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722-3729, 2003.

LE BLANC, K. *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 10, p. 890-896, 2003a.

LE BLANC, K. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major

histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, n. 1, p. 11-20, 2003b.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 383-396, 2012.

LEE, S. *et al.* DPSCs from inflamed pulp modulate macrophage function via the TNF- α /IDO axis. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 11, p. 1274-1281, 2016.

LIBRO, R. *et al.* Cannabidiol modulates the expression of alzheimer's disease-related genes in mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 26, 2017.

LIBRO, R. *et al.* Cannabidiol modulates the immunophenotype and inhibits the activation of the inflammasome in human gingival mesenchymal stem cells. **Frontiers in Physiology**, v. 7, nov. 2016.

LOPRINZI, P. D.; ZOU, L.; LI, H. The endocannabinoid system as a potential mechanism through which exercise influences episodic memory function. **Brain Sciences**, v. 9, n. 112, 2019.

LUO, L. *et al.* Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. **Stem Cells International**, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/1731289/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

MA, S. *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, p. 216-225, 2014.

MA, W. *et al.* Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, n. 47, 2016.

MAA, E.; FIGI, P. The case for medical marijuana in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 783-786, apr. 2014.

MALEK, N. *et al.* Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures. **Neural Plasticity**, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/np/2015/130639/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

MALLICK-SEARLE, T.; MARIE, B. S. Cannabinoids in pain treatment an overview. **Pain Management Nursing**, v. 20, n. 2, p. 107-112, apr. 2019.

MAO, A. S. *et al.* Programmable microencapsulation for enhanced mesenchymal stem cell persistence and immunomodulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, jul. 2019. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/early/2019/07/15/1819415116.long>>. Acesso em: 21 jul. 2019.

MARINO, S.; IDRIS, A. I. *et al.* Emerging therapeutic targets in cancer induced bone disease: A focus on the peripheral type 2 cannabinoid receptor. **Pharmacology Research**, v. 119, p. 391-403, may. 2017.

MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MECHA, M. *et al.* Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. **Cell Death and Disease**, v. 28, n. 3, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388241/pdf/cddis201271a.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MOCAN, M. *et al.* Biomarkers of inflammation in left ventricular diastolic dysfunction. **Disease Markers**, 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/dm/2019/7583690/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

MONTANARI, S. *et al.* Discovery of novel benzofuran-based compounds with neuroprotective and immunomodulatory properties for Alzheimer's disease treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 243-258, sept. 2019.

MORENO, E. *et al.*, 2019. The endocannabinoid system as a target in cancer diseases: are we there yet? **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, apr. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00339/full>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

MORISHIMA, N. *et al.* TGF- β is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, n. 1, p. 105-110, 2009.

NURIEVA, R. I.; LIU, X.; DONG, C. Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. **Immunological Reviews**, v. 229, n. 1, p. 88-100, 2009.

OMI, M. *et al.* Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 4, p. 485-496, jul. 2016.

OPITZ, C. A. *et al.* Production of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol by endothelial progenitor cells. **FEBS Letters**, v. 581, n. 25, p. 4927-4931, oct. 2007.

PALADINO, F. V. *et al.* The immunomodulatory of wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells. **Stem Cells International**, 2019. isponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/3548917/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

PERON, J. P. *et al.* Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 3, p. 940-952, 2012.

PIERDOMENICO, L. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-842, 2005.

PORTER, B. E.; JACOBSON, C. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 29, n. 3, p. 574-577, dec. 2013.

RAMER, R.; SCHWARZ, R.; HINZ, B. Modulation of the endocannabinoid system as a potential anticancer strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, may. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31143113>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

RASMUSSEN, I. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. **Experimental Cell Research**, v. 305, n. 1, p. 33-41, jan. 2005.

RIVERA, P. *et al.* Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 105-117, 2013.

ROG, D. J.; NURMIKKO, T. J.; YOUNG, C. A. Oromucosal Delta 9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. **Clinical Therapeutics**, v. 29, p. 2068-2079, 2007.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2017. Disponível em: <<https://cshperspectives.cshlp.org/content/early/2017/06/09/cshperspect.a028415>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

ROSSI, F. *et al.* The cannabinoid receptor type 2 as mediator of mesenchymal stromal cell immunosuppressive properties. **PLoS One**, v. 8, n. 11, nov. 2013.

ROSSI, F. *et al.* The endocannabinoid/endovanilloid system in bone: from osteoporosis to osteosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1919, 2019.

ROZALI, E. N. *et al.* Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/656340/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

RUSSO, E. B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoids- terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344-1364, 2011.

SARTIPY, P. Advancing pluripotent stem cell culture: it is a matter of setting the standard. **Stem Cells**, v. 22, p. 1159-1161, 2013.

SELL, S. **Stem cell handbook**. Totowa, New Jersey: Humana Press. 2004.

SHETTY, H. *et al.* Immunohistochemical characterization of stem cell and differentiation markers of the dental pulp of human natal teeth. **Future Science OA**, v. 4, n. 10, 2018.

SILVA, F. S. *et al.* Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/758102/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

SILVA, F. S. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. **PLoS One**, v. 9, n. 5, 2014.

SOETHOUDT, M. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. **Nature communications**, v. 8, p. 13958, 2017.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676, 2006.

TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 861-872, 2007.

TAN, K. *et al.* CD73 Expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. **Stem Cells International**, 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/8717694/>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

TERSKIKH, A. V. *et al.* From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 98, p. 7934-7939, 2001.

VAUGHAN, K. *et al.* Deciphering the MHC-associated peptidome: a review of naturally processed ligand data. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 9, p. 729-736, 2017

WADE, D. T. *et al.* Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. **Multiple Sclerosis**, v. 10, p. 434-441, 2004.

WANG, D. W.; HENNINGFIELD, J. E. Beyond schedule I or II: On the development of cannabinoid-based drugs appropriate for less restrictive scheduling under the controlled substances act (poster). Boston, MA: **CannMed**, 2017

WANG, Y. *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, v 15, n. 11, p. 1009-1016, 2014.

WANG, D. *et al.* The orientation and stability of the GPCR-Arrestin complex in a lipid bilayer. **Science. Report**, v., p. 16985, 2017.

WEI, G. *et al.* Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes? **Stem Cells**, v. 18, p. 409-414, 2000.

WIECZOREK, M. *et al.* Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. **Frontiers of Immunology**, v. 8, n. 292, mar. 2017.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, p. 908-917, 2002.

WU, J. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system yesterday, today, and tomorrow. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, p. 297-299, 2019.

XIAO, L. *et al.* Human dental pulp cells differentiate toward neuronal cells and promote neuroregeneration in adult organotypic hippocampal slices in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1745, 2017.

XIE, J. *et al.* Up-regulation of immunomodulatory effects of mouse bone-marrow derived mesenchymal stem cells by tetrahydrocannabinol pre-treatment involving cannabinoid receptor CB2. **Impact Journals**, v. 7, n. 6, p. 6436-6447, 2016.

YAGI, H. *et al.* Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. **Cell Transplant**, v. 19, p. 19667-19679, 2010.

YAMAZA, T. *et al.* Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 1-10, 2010.

YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF- β function in immune suppression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 350, p. 127-147, 2011.

YU, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, p. 1917-1920, 2007.

ZAJICEK, J. *et al.* Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 362, p. 1517-1526, 2003.

ZHANG, W. *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Stem Cells and Development**, v. 13, p. 263-271, 2004.

ZHANG, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 671-682, 2014.

ZHOU, H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 381-384, 2009.

ZHOU, Y. *et al.* The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice. **Immunology**, v. 133, p. 133-140, 2011.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: A review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 28, p. 153-157, 2006.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.