

PAULA NASCIMENTO ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO*
A PARTIR DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DE
PACIENTE COM NEUROFIBROMATOSE TIPO 1**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Juiz de Fora

2013

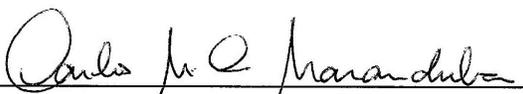
PAULA NASCIMENTO ALMEIDA

Caracterização da diferenciação osteogênica in vitro a partir das células tronco da polpa dentária de pacientes com Neurofibromatose Tipo 1

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22 / 02 / 2013.

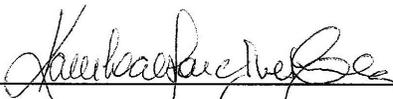
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

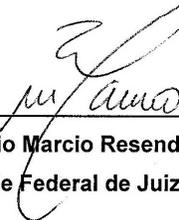
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Karin Soares Gonçalves Cunha

Universidade Federal Fluminense



Prof. Dr. Antônio Marcio Resende do Carmo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho a Bióloga e amiga Ana Lúcia Campos, por falar as palavras certas na hora certa.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa e aos amigos espirituais, pelo amparo e proteção de sempre;

Ao Professor Dr. Carlos, por ter fornecido todo o possível para tornar esse trabalho uma realidade. Pela orientação, confiança, disponibilidade e paciência;

Aos meus pais e meu irmão, pelo incentivo e apoio constantes. Por enxugarem as minhas lágrimas sempre que elas caíam. Por deixarem de fazer coisas que queriam, ou se atribularem mais com as atividades domésticas, para que eu tivesse tempo e o melhor ambiente para estudar. Como sou uma pessoa abençoada por ter essa família;

Ao meu namorado Hélio, pela paciência e carinho. Por ir várias vezes ao laboratório comigo nos finais de semana para que eu não fosse sozinha. Pelo companheirismo, respeito, amizade. Amo você;

Aos membros da minha família, tias e tios, primos e primas, padrinhos, que torceram e vibraram junto comigo a cada conquista, a cada resultado obtido;

À Myriam Carnicelli, pela formatação da qualificação e dissertação. Pelas imensas ajudas com pôster, banner e apresentações. Paulinha ama Tia Lili;

À Isabel Marques pela imensa ajuda com o Português. Obrigada por ser essa pessoa tão prestativa;

Aos professores do Laboratório de Genética pelo exemplo e por estarem sempre prontos a ajudar e discutir resultados;

À médica Amélie Falconi, pela imensa ajuda com a anamnese. Pela torcida e vibração;

À AMANF, Associação Mineira de Apoio aos Portadores de Neurofibromatose, por oferecer Simpósios e materiais de apoio tão necessário para o estudo e entendimento da Neurofibromatose Tipo 1. Pela oportunidade, mesma que rápida, de conviver e conversar com pacientes com NF1;

Ao Fernando de Sá Silva, que mesmo sem conhecê-lo pessoalmente, considero meu anjo da guarda! Obrigada pelo apoio e ajuda fundamentais para a finalização desse projeto;

À Doutora Lílian, da Embrapa, e o Professor Vinícius, do Herbário, por gentilmente cederem espaço para que o projeto fosse desenvolvido enquanto o laboratório estava sendo construído;

À Camila, Gustavo, Rafaella e João Vitor pela imensa colaboração durante todo o mestrado. Por sofrerem e vibrarem junto comigo. Por trabalharmos em equipe. Pelos momentos de descontração tão necessários à pesquisa científica;

À Letícia Stephan, pelas conversas e disponibilidade em ajudar;

Às colegas do mestrado, Aryane, Camila, Joyce, Natália e Shayane, pela colaboração direta ou indireta em todo o processo de formação;

Aos amigos da FEAK, pelo carinho e vibração;

Aos amigos do ESDE, por me ouvirem e me acolherem;

Aos amigos do CNA, por ajudar a tornar a caminhada mais agradável;

Aos amigos Alexander, Josemare, Paulo Henrique, Lígia, Ely e Denise, por sempre me ouvirem e por compartilharem a vivência acadêmica que possuem;

Aos amigos Ana Amélia, Elisa, Glaucia, Midiã, Carioca, Bel, Mário, Tonho, Renata, Carol, Dan, João Vítor, Paula, Mari e Dênis, pelos ótimos momentos passados juntos, pela companhia maravilhosa, pela torcida de sempre;

À amiga Jacqueline, pela preocupação e torcida constantes. Por sempre deixar a casa tão organizada e aconchegante, permitindo um bom ambiente de estudo;

Às pedras do caminho, que me ensinaram muito sobre mim, sobre valorizar as pequenas coisas e sobre o valor da perseverança;

A todos o meu muito obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A Neurofibromatose Tipo 1 (NF1) é uma doença genética caracterizada por hiperpigmentação na pele (manchas 'café com leite') e neurofibromas, e também apresenta outras manifestações clínicas, dentre elas as anomalias ósseas, que atingem até 50% dos pacientes. Modelos animais como roedores e mesmo a *Drosófila* têm sido importantes na elucidação de mecanismos moleculares e celulares decorrentes da NF1, mas estes modelos apresentam limitações. Camundongos transgênicos homozigotos (NF1^{-/-}) têm morte ainda no útero no 12^o/14^o dias de gestação, enquanto que camundongos heterozigotos (NF1^{+/-}), embora viáveis, não desenvolvem neurofibromas e manchas 'café com leite' *in vivo*. Dessa forma, há a necessidade de desenvolvimento de novos modelos. As células-tronco são células indiferenciadas capazes de se autorrenovar e se diferenciar para uma linhagem celular específica. Elas podem ser classificadas de acordo com sua origem em dois tipos principais: embrionárias (CTEs) ou adultas (CTAs). O uso das CTAs em pesquisas visando à terapia celular e bioengenharia tecidual é importante e apresenta vantagens em comparação com as CTEs, uma vez que sua diferenciação é mais controlada e, quando introduzidas no organismo, dificilmente produz tumores. Dentre as células-tronco adultas, destacam-se as células-tronco da polpa dentária (CTPDs). As CTPDs apresentam um perfil molecular semelhante às células embrionárias humanas, possuem capacidade de se diferenciar espontaneamente sob condições de cultura apropriadas, além de terem origem pós-natal, tendo sido utilizadas para o estudo *in vitro* de diversas doenças. Propomos utilizar as CTPDs como um modelo de estudo *in vitro* também para a NF1. O objetivo do presente trabalho foi comparar as células-tronco da polpa de dente decíduo de um paciente com Neurofibromatose do Tipo 1, com células-tronco de polpa dentária de pessoas saudáveis, avaliando especificamente a taxa de proliferação e de senescência destas células, bem como a diferenciação osteogênica das mesmas, seguida de quantificação do cálcio. A análise da proliferação celular sugere que as CTPDs do paciente têm elevada taxa de proliferação em relação aos controles. A análise da senescência celular sugere que estas células entram em senescência de forma tardia quando comparadas às células controles. A análise conjunta da proliferação e senescência celular mostra que as CTPDs de um paciente NF1 já apresenta perfil tumoral. Isto pode nos ajudar a entender a formação de neurofibromas por toda a extensão corporal. Visando responder se as CTPDs são um excelente modelo de estudo *in vitro*, uma vez que o modelo animal apresenta limitações, foi realizada a diferenciação osteogênica com essas células e a quantificação de cálcio nas células NF1 diferenciadas. Os resultados obtidos sugerem uma baixa produção de cálcio pelas células NF1 quando comparadas com as células controle. A análise estatística revelou diferença significativa entre as amostras. Nossa conclusão mostra que as CTPDs são um excelente modelo para estudo *in vitro* de diversas doenças humanas em função do potencial que essas células apresentam.

Palavras-chave: Neurofibromatose 1. Células-tronco. Proliferação celular.
Senescência celular. Osteogênese.

ABSTRACT

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a genetic disorder characterized by hyperpigmentation of the skin (Café-au-lait spots) and neurofibromas and also has other clinical manifestations, among them the bone abnormalities, affecting up to 50% of patients. Animal models such as rodents and even *Drosophila* have been important in elucidating the molecular and cellular mechanisms resulting from NF1, but these models have limitations. Homozygous transgenic mice (NF1^{-/-}) die in womb in 12^o/14^o days of gestation, whereas heterozygous mice (NF1^{+/-}), although viable and do not develop neither neurofibromas nor Café-au-lait spots *in vivo*. Thus, there is a need to develop new models. Stem cells are undifferentiated cells capable of self renew and differentiate into a specific cell lineage. They can be classified according to their origin into two main types: embryonic (ESCs) or adult (ASCs). The use of ASCs in research aiming at cell therapy and tissue bioengineer is important and provides advantages compared to ESCs, since their differentiation is more controlled and, when introduced into the body, is unlikely to produce tumors. Among the adult stem cells, we highlight the dental pulp stem cells (DPSCs). The DPSCs show a molecular profile similar to human embryonic cells, have the capacity to differentiate spontaneously under appropriate culture conditions, and have postnatal origin, being used to *in vitro* study of various diseases. We propose to use the DPSCs also as a model for *in vitro* NF1 study. The aim of this study is to compare the stem cells from the pulp of deciduous teeth of a patient with Neurofibromatosis Type 1, with dental pulp stem cells of healthy people, specifically evaluating the rate of proliferation and senescence of these cells, as well as osteogenic differentiation followed by calcium quantification. The analysis of cell proliferation suggests that the patient's DPSCs have a high proliferative rate relative to controls. The analysis of cellular senescence suggests that these cells enter in a delayed senescence compared to control cells. A pooled analysis of cellular proliferation and senescence shows that NF1 patient's DPSCs already presents tumor profile. This can help us understand the formation of neurofibromas throughout the body extension. In order to answer whether the DPSCs are an excellent model for *in vitro* study, once the animal model has limitations, osteogenic differentiation and NF1 differentiated cells calcium quantification was performed. The results suggest low NF1 cells calcium production compared to control cells. Statistical analysis revealed significant differences between the samples. Our conclusion shows that DPSCs are an excellent model for *in vitro* study of several human diseases due to the potential that these cells present.

Keywords: Neurofibromatosis 1. Stem cell. Cell Proliferation. Cell Senescence. Osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Múltiplos neurofibromas cutâneos.	16
Figura 2: Neurofibroma plexiforme (tornozelo).	17
Figura 3: Manchas 'café com leite' na coxa de uma criança.	18
Figura 4: "Efélides" axilares em criança.	18
Figura 5: Nódulos de Lisch na íris.	19
Figura 6: Localização dos domínios SEC14 e RasGAP na neurofibromina.	26
Figura 7: Interações de NF1 com diferentes vias de sinalização celular, incluindo a ativação de p21ras (RAS), modulação de adenil ciclase, associação a microtúbulos e interação com outros efetores.	27
Figura 8: Heredograma da família com caso de Neurofibromatose do Tipo 1. Seta indicando o probando.	43
Figura 9: Células da polpa dentária com morfologia fusiforme.	44
Figura 10: Fotografia de culturas dos grupos experimentais, aos 14 dias do experimento para detecção dos depósitos de cálcio evidenciados pela reação de vermelho de Alizarina.	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise realizada comparando, através da contagem utilizando a Câmara de Neubauer, a taxa de proliferação de células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles.	45
Gráfico 2 – Análise realizada comparando, através do MTT, a taxa de proliferação células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles.	45
Gráfico 3 – Análise realizada comparando, através da contagem utilizando a Câmara de Neubauer, a taxa de senescência de células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles.	46
Gráfico 4 – Resultado da densidade óptica da coloração com vermelho de Alizarina das linhagens UFJF1 e NF1.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFU-F	Unidade formadora de colônia-fibroblástica
CTAs	Células-tronco adultas
CTEs	Células-tronco embrionárias
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
CTPDs	Células-tronco da polpa de dente
CTs	Células-tronco
DD1	Linhagem de célula-tronco da polpa de dente controle
DMEM-F12	Meio de cultura celular
DNA	Ácido desoxiribonucleico
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
Kb	Unidade de milhar(s) de par(s) de base(s)
kDa	Kilodaltons
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NF	Neurofibromatose
<i>NF1</i>	Gene <i>NF1</i>
NF1	Neurofibromatose Tipo 1
Nf1	Proteína neurofibromina
NF2	Neurofibromatose Tipo 2
NIH	“National Institute of Health” - Instituto Nacional da Saúde
NLS	Sinais de localização nuclear

pb	Pares de bases
PDH1	Linhagem de célula-tronco da polpa de dente controle
RasGAP	Domínio funcional da neurofibromina
RM	Resonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SEC14	Domínio funcional da neurofibromina
TMBNP	Tumor Maligno da Bainha do Nervo Periférico
UFJF1	Linhagem de célula-tronco da polpa de dente controle
UFJF2	Linhagem de célula-tronco da polpa de dente controle
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1.....	15
1.1.1 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA NF1	21
1.2 ESTUDO MOLECULAR DA NEUROFIBROMATOSE TIPO 1	24
1.2.1 O PRODUTO DO GENE <i>NF1</i> : NEUROFIBROMINA	26
1.3 MODELOS ANIMAIS PARA A DOENÇA NF1	28
1.4 ASPÉCTOS GERAIS DAS CÉLULAS-TRONCO	30
1.4.1 CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTE (CTPDs)	31
1.5 USO DAS CTPDs COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDO DE DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA	32
2 OBJETIVOS GERAIS	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA.....	34
3.2 ANAMNESE.....	35
3.3 GENEALOGIA	35
3.4 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTE	35
3.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO	36
3.6 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA.....	37
3.7 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.....	38
3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DEPÓSITO DE CÁLCIO	39
4 RESULTADOS	41
4.1 HISTÓRICO CLÍNICO DO PACIENTE	41

4.3 O CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA	44
4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO	44
4.5 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA.....	46
4.5 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.....	46
4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DEPÓSITO DE CÁLCIO	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Neurofibromatose (NF) é um termo utilizado para um grupo de doenças genéticas que afetam primariamente o desenvolvimento celular dos tecidos neurais (NEUROFIBROMATOSIS, CONFERENCE STATEMENT, 1988). Elas apresentam-se nas formas clínicas como Neurofibromatose Tipo 1 (NF1), Neurofibromatose Tipo 2 (NF2) e Schwannomatose (ZUBAY, PORTER e SPETZLER, 2001; BASER, FRIEDMAN e EVANS, 2006). Dois tipos de tumores ocorrem nessas manifestações clínicas: os neurofibromas e os schwannomas. Os primeiros afetam somente pacientes com NF1 e os segundos afetam as outras duas formas clínicas da doença. Ao contrário dos schwannomas, que são formados somente por células de Schwann, os neurofibromas consistem de células de Schwann, fibroblastos, células perineurais e mastócitos (FERNER, 2007). Nos schwannomas, apesar de a taxa de proliferação das células de Schwann ser elevada, ocasionando o surgimento do tumor, elas crescem de forma organizada, sem infiltrar o nervo de origem. O mesmo não acontece nos neurofibromas, uma vez que suas células se proliferam de forma desorganizada e dispersa, tendendo a espalhar difusamente pelos tecidos vizinhos, como a derme (MURĂRESCU, IVAN e MIHAILOVICI, 2005). O presente trabalho se restringe somente a Neurofibromatose tipo 1 e suas características clínicas e moleculares serão descritas abaixo.

1.1 NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

A neurofibromatose tipo 1, ou doença de *von Recklinghausen*, caracteriza-se por áreas de hiperpigmentação (denominadas como manchas 'café com leite') na pele e pela presença de neurofibromas. Estes, conforme mencionado, são tumores da bainha de nervos periféricos, compostos por células de Schwann, fibroblastos, células perineurais e mastócitos (WARD E GUTMANN, 2005; FERNER, 2006;

JUNIOR et al., 2008; BOYD, KORF e THEOS, 2009). De um modo geral, os tumores são classificados como cutâneos, subcutâneos e plexiformes. Os neurofibromas cutâneos (Figura 1) têm uma consistência flácida e podem se localizar em qualquer parte do corpo, sendo geralmente assintomáticos, podendo causar prurido (devido aos mastócitos) e ardor. Não costumam se desenvolver antes da puberdade e existe a possibilidade de continuarem aumentando em tamanho e em quantidade durante toda a vida adulta, influenciando a estética do paciente e, conseqüentemente, sua vida social (WARD e GUTMANN, 2005). Quanto mais precocemente aparecem, maior a probabilidade de que sejam mais numerosos e mais disseminados na idade adulta. São observados em 84% dos pacientes com NF1 aos 20 anos de idade (DEBELLA, SZUDECK e FRIEDMAN, 2000).

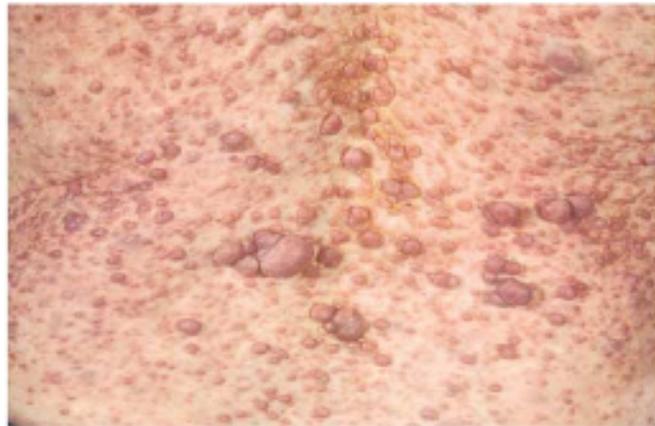


Figura 1: Múltiplos neurofibromas cutâneos. Fonte: FERNER, 2006.

Neurofibromas subcutâneos têm uma consistência firme e geralmente são assintomáticos, mas, dependendo da sua localização, podem produzir dor e déficit neurológico devido à pressão sobre os nervos periféricos (BOYD, KORF e THEOS, 2009). São normalmente pequenos e raramente sofrem transformação maligna.

Neurofibromas plexiformes (Figura 2) são capazes de se tornar tumores maiores, malignos e difusos, crescendo ao longo do comprimento do nervo (FERNER, 2006). Apresentam padrão de crescimento imprevisível, embora a infância, a puberdade e nas mulheres a gravidez sejam períodos em que se observa maior crescimento destas lesões (ESPIG et al., 2008). São geralmente congênitos e primariamente benignos, embora exista chance de 8 a 13% de transformação maligna dos plexiformes para os chamados Tumores Malignos da Bainha do Nervo Periférico (TMBNP). Um sinal de alerta dessa malignização é a presença de dor

persistente ou um rápido crescimento de um neurofibroma (EVANS et al., 2002). A ressecção cirúrgica daqueles que se tornam sintomáticos e/ou muito grandes é dificultada pela característica difusa da lesão e sua rica vascularização (GELLER e BONALUMI, 2004).



Figura 2: Neurofibroma plexiforme (tornozelo). Fonte: SOUZA, 2008.

As manchas 'café com leite' (Figura 3) são máculas que apresentam cor do marrom claro ao escuro e geralmente variam em média entre 2-5 cm em adultos. No entanto, também sofrem variação de 2 mm a 20 cm em alguns casos. Elas são monocromáticas, de limites bem definidos, não produzem dor e não há sinal de inflamação. Podem estar presentes desde o nascimento, normalmente se desenvolvem durante a infância e, geralmente, aumentam de tamanho e quantidade proporcionalmente com o crescimento do corpo e o envelhecimento do paciente (SCHEPPER, 2006; FERNER, 2007). Cerca de 10-20% de crianças e jovens saudáveis possuem manchas 'café com leite' isoladas. Elas não demonstram qualquer tendência para a malignidade e não requerem tratamento médico. Ter seis ou mais manchas 'café com leite' é um dos critérios para o diagnóstico da NF1. Schepper (2006) demonstrou que as máculas encontradas em pacientes com NF1 são diferentes das manchas isoladas encontradas em crianças e jovens saudáveis por possuírem uma maior quantidade de melanócitos. Kemkemer et al. (2002) atribuiu este fato a um problema na migração dos precursores de melanócitos durante a embriogênese, levando a uma distribuição epidérmica desigual destas

células. Múltiplos neurofibromas, associados às manchas 'café com leite', são a principal manifestação da NF1.



Figura 3: Manchas 'café com leite' na coxa de uma criança. Fonte: BOYD, KORF e THEOS, 2009.

As lesões semelhantes à efélides que ocorrem na NF1 são máculas lentiginosas menores que 5 mm (normalmente variam entre 1mm e 3 mm) e constituem a segunda manifestação clínica mais frequente em crianças (Figura 4) ocorrendo, na maioria dos casos, entre 3 e 5 anos de idade (BOYD, KORF e THEOS, 2009). Na maioria dos pacientes com NF1, elas se apresentam na região axilar e inguinal. Outras localizações comuns incluem nuca, pescoço e região inframamária nas mulheres. Desse modo, a presença de múltiplas sardas menores que 5 mm em região axilar, inguinal e pescoço é altamente sugestiva de NF1. Sua aparência é similar a das sardas provocadas por exposição solar, mas, notavelmente, estas sardas ocorrem em áreas com pouca ou nenhuma exposição ao sol. Elas acometem até 90% dos pacientes com idade até sete anos e são consideradas como critério diagnóstico importante na infância e na pré-adolescência (JUNIOR et al., 2008).



Figura 4: "Efélides" axilares em criança. Fonte: BOYD, KORF e THEOS, 2009.

Outra característica clínica importante da NF1 são os nódulos de Lisch (Figura 5). Estes são elevações arredondadas da superfície da íris, variando em cor do transparente ao tom amarelo ou marrom. Sua avaliação histopatológica demonstrou a presença de células pigmentadas, células semelhantes aos fibroblastos e mastócitos, mostrando um padrão semelhante ao dos neurofibromas (RICHETTA et al., 2004). Os nódulos de Lisch são comuns na NF1, afetando de 15% a 20% em crianças com seis anos e cerca de 95% dos adultos (BOYD, KORF e THEOS, 2009). Estes nódulos são exclusivos deste tipo de neurofibromatose e não ocasionam comprometimento da visão.

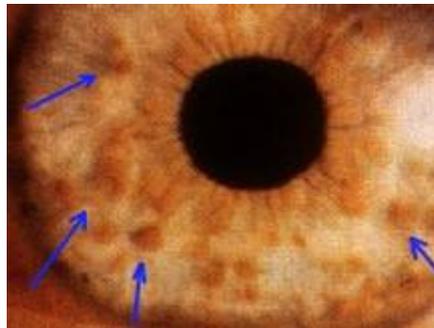


Figura 5: Nódulos de Lisch na íris. Fonte: SOUZA, 2008.

O glioma óptico é um tumor do nervo óptico e está presente em 15% a 20% dos pacientes com NF1 (SINGHAL et al., 2002). É um tumor de crescimento lento e pode se apresentar clinicamente com proptose ocular (em cerca de 30% dos casos), atrofia do nervo óptico, diminuição da acuidade visual e dificuldade na visualização de cores, ou puberdade precoce (crescimento linear acelerado é uma evidência da puberdade precoce, necessitando o uso de tabelas de crescimento em pacientes com NF1). Quanto à sua localização, o glioma óptico geralmente acomete a via anterior (nervo óptico intraorbital, nervo óptico intracranial e quiasma óptico) e, raramente, estende-se para o interior do trato óptico. Os gliomas ópticos sintomáticos estão tipicamente presentes antes dos seis anos de idade, com a maioria das crianças diagnosticadas aos três anos. Após os seis anos, o desenvolvimento de tumores sintomáticos é extremamente raro (LISTERNICK et al., 1994; JUNIOR et al., 2008). Apesar disso, crianças com NF1 devem passar por avaliações oftalmológicas anuais durante a primeira década de vida (WARD e GUTMANN, 2005).

Alterações esqueléticas acometem até 50% dos pacientes NF1, sendo frequente nas fases avançadas da doença e compreendem escoliose, fusão de costelas, espinha bífida, luxações e agenesias, pseudoartrose da tíbia, displasia da asa do esfenoide e de ossos longos, dentre outras alterações (LESKELA et al., 2008). Dessas, a escoliose é a manifestação óssea mais comum na NF1 com uma incidência que varia de 10 a 30%, envolvendo a coluna vertebral cervical inferior e torácica superior, e podendo ser idiopática ou distrófica. A maior forma dos casos é de escoliose idiopática, geralmente um acometimento de menor gravidade sem associações com alterações da conformação vertebral (MUNIZ et al., 2002). A escoliose distrófica está associada a anormalidades ósseas que podem ser identificadas através de radiografias. Ela causa grandes curvaturas da coluna vertebral, geralmente envolvendo quatro a seis vértebras da coluna torácica, e tem progressão rápida. Apresenta-se mais frequentemente entre os seis e os dez anos de idade, sendo dificilmente identificada após este período. Geralmente, há uma curvatura em ângulo agudo sobre poucas vértebras com rotação apical grave, além de distorção dos corpos vertebrais e costelas (ALWAN, TREDWELL e FRIEDMAN, 2005).

A curvatura congênita e pseudoartrose da tíbia têm prevalência de 3,5% e 2%, respectivamente, em pacientes com NF1 (MESSIAEN et al., 2000). Já a displasia de um osso longo ocorre em quase 14% dos pacientes com NF1, e é geralmente observada dentro do primeiro ano de vida. O osso mais frequentemente afetado é a tíbia, que apresenta uma curvatura na direção anterolateral. Juntamente com o número e o tamanho apropriado de manchas 'café com leite', esta manifestação ortopédica é suficiente para fazer o diagnóstico de NF1 (DEBELLA, SZUDEK e FRIEDMAN, 2000). Na maioria dos casos, a intervenção cirúrgica é necessária sendo, porém, bastante delicada.

Cerca de 80% dos pacientes com NF1 apresentam baixa estatura, mas as proporções corporais geralmente não estão alteradas, sugerindo um decréscimo generalizado do crescimento ósseo em todo o esqueleto (ALWAN et al., 2007).

Os problemas ortopédicos apresentam alta frequência em pacientes com NF1 e são causados por acometimento direto do sistema esquelético por displasia mesodérmica, indiretamente como resultado de outra lesão (crescimento de neurofibroma plexiforme) ou devido ao crescimento ósseo exagerado (ALWAN, TREDWELL e FRIEDMAN, 2005). As alterações ósseas observadas na NF1

relacionam-se à incapacidade em manter a estrutura óssea e à redução da densidade mineral óssea. Os mecanismos patogênicos subjacentes não são totalmente conhecidos, mas evidências experimentais sugerem uma incompleta maturação dos precursores dos osteoblastos (mediadores da construção óssea) e que os osteoclastos possuem elevadas taxas de sobrevivência, levando à reduzida densidade mineral óssea (FERNER, 2007; BOYD, KORF e THEOS, 2009). Além disso, Stevenson et al (2006) demonstraram em pacientes NF1 clara redução da massa muscular, o que também poderia alterar o completo desenvolvimento da massa óssea ou favorecer um aumento da reabsorção óssea. O risco de desenvolver osteoporose e osteopenia é maior entre os indivíduos com NF1, do que na população em geral, acometendo primordialmente as estruturas que sustentam o peso corporal (KUORILEHTO et al., 2005).

Alguns casos apresentam ainda feocromocitomas, acromegalia e puberdade precoce. Cerca de 10% dos afetados têm epilepsia e deficiência mental (LEVINE et al., 2006). Em um sentido mais amplo, foi observado que os pacientes com NF1 apresentam deficiências cognitivas e déficits visuoespaciais em quase metade de todos os casos analisados e descritos, além de hiperatividade (LEHTONEN et al., 2012).

1.1.1 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA NF1

Para que o diagnóstico da NF1 seja feito, o paciente deve apresentar dois ou mais dos critérios apresentados a seguir (Quadro 1) e que foram estabelecidos em uma conferência realizada pelo *National Institutes of Health* (NIH) em 1988.

Quadro 1 – Critérios Diagnósticos da Neurofibromatose tipo 1 de acordo com os critérios do Instituto Nacional de Saúde americano

Critérios Diagnósticos para NF1

- √ Seis ou mais manchas café com leite maiores que 5mm em indivíduos pré-puberis ou maiores que 15mm depois da puberdade;
-

-
- √ Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um ou mais neurofibromas plexiformes, baseados em parâmetros clínicos e histológicos.
 - √ “Efélides” axilares ou inguinais;
 - √ Glioma do nervo óptico;
 - √ Dois ou mais nódulos de Lisch (hamartomas pigmentados de iris);
 - √ Lesão óssea característica, como displasia do osso esfenóide ou afilamento dos ossos longos do córtex, com ou sem pseudoartrose;
 - √ Um parente de primeiro grau afetado com NF1 que preencha os critérios precedentes.
-

Fonte: GUTMANN, et al., 1997

Os casos decorrentes de transmissão vertical, ou seja, quando um dos genitores também é acometido pela NF1, podem ser identificados durante o primeiro ano de vida, uma vez que o diagnóstico requer apenas uma característica clínica já apresentada anteriormente, além do relato de antecedentes acometidos pela NF1 na história familiar investigada (DEBELLA, SZUDEK e FRIEDMAN, 2000). No entanto, os critérios do NIH podem ser insuficientes para o diagnóstico da NF1 em casos esporádicos, ou seja, em crianças que são casos únicos em suas famílias e manifestam somente manchas ‘café com leite’, sem outras alterações. Nesses casos, recomenda-se o acompanhamento do paciente e pode-se indicar o teste molecular para a confirmação da NF1 (JUNIOR et al., 2008). O teste molecular é também indicado para pacientes (adultos) que apresentam somente um critério diagnóstico ou quando o diagnóstico pré-natal é desejado.

Uma limitação deste teste é a falta de correlação genótipo-fenótipo. Desta forma, testes positivos não poderão prever a gravidade da doença. Entretanto, existem duas exceções: (a) a primeira, se o resultado do teste molecular for a deleção do gene *NF1* e DNA adjacente, o paciente apresentará características faciais dismórficas, maiores problemas cognitivos e grande probabilidade de desenvolver TMBNP. Cerca de 4% a 5% dos pacientes com NF1 apresentam a perda total do gene (BOYD, KORF e THEOS, 2009); e (b) a segunda exceção é uma deleção *inframe* em três pares de base no éxon 17 do gene *NF1*. Pacientes com essa mutação genética não apresentam neurofibromas cutâneos e parecem ter uma menor incidência de complicações mais sérias da doença (UPADHYAYA et al., 2007).

O acompanhamento de um paciente com NF1 deve ser anual para adultos e semestral para crianças e deve incluir uma avaliação oftalmológica, radiografia de esqueleto, ultrassonografia de abdome e, em casos especiais, tomografia computadorizada de crânio e triagem para feocromocitoma. Devido à alta frequência de pacientes com NF1 que possuem déficits de aprendizagem, recomenda-se uma avaliação cognitiva da criança antes dela começar seus estudos, afim de identificar déficits específicos e desenvolver um programa educacional individualizado (OZONOFF, 1999).

Ainda não há um tratamento médico eficaz para prevenir ou reverter às lesões características da NF1, exceto a detecção precoce de complicações tratáveis e o aconselhamento genético (JUNIOR et al., 2008). No entanto, alguns estudos clínicos com diferentes drogas têm sido conduzidos, sugerindo que o tratamento farmacológico da NF1 poderá tornar-se realidade (THEOS e KORF, 2006). Duas substâncias merecem especial destaque: os inibidores da tirosina quinase, cuja principal ação consiste no bloqueio de estímulos de crescimento enviados aos receptores do fator de crescimento tumoral, e os inibidores da farnesiltransferase, que apresentam a vantagem de bloquear os sinais através dos receptores da via da proteína Ras, cessando o envio de estímulos de crescimento para a célula (WARD e GUTMANN, 2005). Na fase clínica I, outros estudos de lesões sintomáticas foram feitos com talidomida, com redução do tamanho dos neurofibromas em 1/3 dos casos e melhora dos sintomas em 1/3 dos pacientes com NF1. Estudos clínicos na fase II foram realizados com fumarato de cetotifeno e foi observado que o mesmo não reduzia o tamanho dos neurofibromas, porém melhorava os sintomas em alguns pacientes. Quando foi administrado o ácido retinóico ou interferon alfa, houve uma melhora sintomática em 14% dos casos e redução dos neurofibromas em 8% dos casos (revisado por PACKER et al., 2002).

Atualmente, para pacientes que apresentam TMPNB, o tratamento padrão é a remoção cirúrgica do tumor seguido de radioterapia local. Este tratamento pode atrasar, mas não impedir o surgimento de um novo tumor (FRIEDMAN, 2002).

1.2 ESTUDO MOLECULAR DA NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

A NF1 é uma doença autossômica dominante. O fenótipo é variável, mesmo entre membros de uma mesma família, existindo casos praticamente assintomáticos e outros graves. Desta forma, um paciente gravemente acometido pode gerar descendentes com quadro clínico mais leve e vice-versa (SCHEPPER et al., 2006; BOYD, KORF e THEOS, 2009). Inúmeros trabalhos na literatura descreveram mutações no gene *NF1* e tentaram estabelecer uma correlação de genótipo-fenótipo. No entanto, não foi obtida uma correlação bem definida, exceto em uma minoria de casos (aqueles com microdeleção do gene *NF1*) devido à expressividade variável observada não apenas em pacientes com mutações distintas, mas também naqueles com mutações idênticas, provenientes tanto da mesma ou de diferentes famílias (TROVO-MARQUI e TAJARA., 2006).

A incidência na população geral é de 1/3-4.000, sendo uma das doenças autossômicas dominantes mais frequentes na espécie humana (FERNER, 2007). O gene *NF1* está localizado na banda q11.2 do cromossomo 17 (17q11.2) e possui 60 regiões codificadoras (exons) distribuídas entre 280 Kb de DNA genômico (CUNHA e GELLER, 2011). Mutações em indivíduos afetados podem ocorrer em qualquer lugar dentro do gene *NF1* e consistem em deleções, inserções, mutações *nonsense* e mutações nos introns, podendo alterar o código de leitura. A taxa de mutação é extremamente alta (1/10.000), provavelmente pelo gene ser muito grande. Como resultado, cerca de 50% dos afetados é resultado de mutações novas, não possuindo histórico familiar (BOYD, KORF e THEOS, 2009).

O gene *NF1* é considerado um supressor de tumor e a mutação em apenas um dos alelos é aparentemente suficiente para causar muitas das manifestações clínicas observadas em pacientes com NF1, uma vez que um único alelo *NF1* ativo não codifica o nível necessário da proteína para obter uma resposta biológica normal (TROVÓ- MARQUI e TAJARA, 2006). Zhu et al. (2002) evidenciaram que o estado de haploinsuficiência (um alelo normal e um alelo mutante) do tecido somático pode criar um microambiente aparentemente permissivo para o desenvolvimento de neurofibromas. Evidências de estudos feitos com animais quiméricos parcialmente compostos de células *NF1*^{-/-} demonstram que uma segunda mutação pode levar ao

desenvolvimento de neurofibromas plexiformes. Estes estudos demonstrando um aumento na proliferação de células de Schwann nulizigóticas (*NF1*^{-/-}) também são consistentes com a função de regulador do crescimento do gene *NF1*. Portanto, tanto a perda completa do produto do gene *NF1* na célula progenitora do neurofibroma, a célula de Schwann, quanto a heterozigozidade em células não-tumorais são necessários para a tumorigenicidade (CICHOWSKI et al., 1999, YANG et al., 2008).

O gene *NF1* tem quatro éxons com *splicing* alternativo: éxons 9a, 10a-2, 23a e 48a. Estes éxons não alteram o quadro de leitura e sua inclusão gera isoformas de proteínas com, respectivamente, 10, 15 e 21 aminoácidos na região 5', exceto 48a, o qual insere 18 aminoácidos na região terminal 3'. Outros transcritos alternativos envolvendo éxons distintos já foram descritos, mas não existe confirmação ao nível da proteína. Há também variantes descritas envolvendo a deleção dos éxons 4b, 29, 30, 33, 37, 43 e 45, e a inserção de 31bp entre éxons 4a e 4b (TROVÓ- MARQUI e TAJARA, 2006). Vandenbroucke et al. (2002) sugeriu que as diferenças quantitativas nos níveis entre essas variantes pode estar relacionado com a variabilidade fenotípica dos pacientes com *NF1*.

Além dos transcritos descritos acima, existem dois outros, nomeados tipo III e IV (com inclusão dos éxons 23a e 23b ou somente do 23b, respectivamente), que são exclusivos de roedores. Ambos alteram o quadro de leitura e provavelmente produzem proteínas truncadas (MANTANI et al., 1994).

Uma característica interessante do gene *NF1* é a presença de três genes no íntron 27b, na fita antisense, nomeados *OMGP*, *EVI2A* e *EVI2B*. *OMPG* (glicoproteína oligodendrócito-mielina) é uma glicoproteína de membrana expressa no sistema nervoso central humano durante a mielinização e parece funcionar como uma molécula de adesão celular. É um importante inibidor da proliferação de fibroblastos e neurônios *in vitro*. O gene *EVI2A* é altamente expresso no cérebro, medula óssea e células sanguíneas, enquanto o *EVI2B* é expresso nos mesmos tecidos, exceto cérebro (SHEN e HAPPER, 1996). *EVI2A* e *EVI2B* são homólogos dos genes *Evi-2A* e *Evi-2B* de murinos, que estão envolvidos no desenvolvimento da leucemia nesses animais. É possível que estes genes estejam relacionados com a leucemia observada em alguns pacientes com *NF1*, mas ainda não existem dados confirmando essa associação (TROVÓ- MARQUI e TAJARA, 2006).

1.2.1 O PRODUTO DO GENE *NF1*: NEUROFIBROMINA

O gene *NF1* codifica uma proteína denominada neurofibromina (Nf1), que atua como supressor de tumor. Ela é predominantemente expressa em neurônios, células de Schwann, oligodendrócitos, astrócitos e leucócitos. A neurofibromina tem 2818 aminoácidos e massa molecular de 250 a 280 kDa e não possui domínios funcionais claramente definidos, exceto SEC14 e RasGAP (Figura 6).

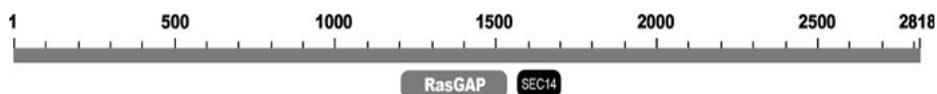


Figura 6: Localização dos domínios SEC14 e RasGAP na neurofibromina. Fonte: TROVÓ-MARQUI e TAJARA, 2006.

SEC14 é encontrado em proteínas reguladas por lipídios, tais como RhoGAPs e o RhoGEFs. Pouca informação se sabe a respeito desse domínio.

RasGAP corresponde a uma pequena região localizada na parte central da neurofibromina com atividade análoga à família das proteínas ativadoras da guanosina trifosfatase - GTPase (GAP). Está envolvida na modulação e controle da atividade da p21ras, uma pequena proteína intracelular ligada à face citossólica da membrana plasmática que apresenta papel fundamental na via mitogênica intracelular.

A Ras realiza um ciclo entre uma forma inativa GDP e outra ativa GTP. Quando ligada à GTP, promove a transdução tanto de sinais de crescimento ao núcleo da célula, quanto de diferenciação. Como outras proteínas G, a Ras tem uma atividade GTPase (estimulada por uma GAP) que hidroliza o GTP ligado para a forma GDP ligada. A neurofibromina participa da conversão da RasGTP ativa para sua forma inativa que é a RasGDP (Figura 7) (FRIEDMAN, 2002). Quando o gene *NF1* está mutado, a forma Ras é constitutivamente ativa, possibilitando as células afetadas a proliferarem-se extensivamente. Esta proliferação pode resultar em formação de tumores, em particular nas células derivadas da crista neural no sistema nervoso periférico, que têm a mais alta expressão de neurofibromina (FRIEDMAN, 2002; CICHOWSKI et al., 2003).

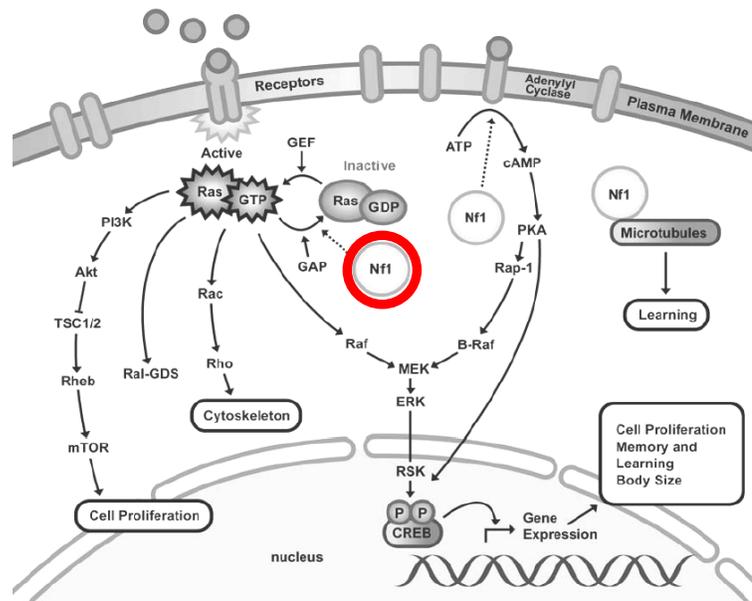


Figura 7: Interações de NF1 com diferentes vias de sinalização celular, incluindo a ativação de p21ras (RAS), modulação de adenil ciclase, associação a microtúbulos e interação com outros efetores. A neurofibromina contribui para o controle da proliferação celular. Fonte: TROVÓ-MARQUI e TAJARA, 2006.

Shen e Harper (1996) sugerem pelo menos três outros possíveis mecanismos de controle do crescimento e diferenciação celulares pela neurofibromina: regulação negativa da região *upstream* do gene *Ras* (sequências que regulam positivamente o início da transcrição, localizadas à 100 pares de bases do sítio de iniciação), atividade efetora da região *downstream* do gene *Ras* (sequências que regulam negativamente a transcrição, situadas próximas à terminação 3') e uma "ponte" entre a tubulina e o gene *Ras*. Esses mecanismos não atuam apenas isoladamente, mas sim, em conjunto em vários tecidos.

A localização da Nf1 é, principalmente, no citoplasma, localizada próxima aos microtúbulos, mas alguns estudos encontraram essa proteína no núcleo (TROVÓ- MARQUI e TAJARA, 2006). Pequenas proteínas (<45kDa) podem se difundir livremente para o núcleo, enquanto que proteínas com maior massa molecular (como a neurofibromina) são ativamente transportadas através dos poros nucleares pelos sinais de localização nuclear (NLS). A neurofibromina contém um NLS codificado pelo éxon 43. Vandenbroucke et al. (2002) descreveu um Nf1

variante com perda no éxon 43 (NF1- Δ E43), presente somente no citoplasma. Estes autores sugerem que a translocação para o núcleo pode representar um mecanismo regulatório funcional dessa proteína, uma vez que seus parceiros (proteína p21ras e microtúbulos) são citoplasmáticos.

1.3 MODELOS ANIMAIS PARA A DOENÇA NF1

Modelos animais como roedores e mesmo a *Drosófila* têm sido muito importantes na elucidação de mecanismos moleculares e celulares causados por processos da deficiência da neurofibromina. Alguns exemplos podem ser citados. Camundongos transgênicos com mutação nos dois alelos do gene *NF1* têm morte ainda no útero no 12^o/14^o dias de gestação (BRANNAN et al., 1994) e apresentam anormalidades cardíacas, mas nenhum outro defeito de desenvolvimento (JACKS et al., 1994). O defeito cardíaco é causado pelo aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose no desenvolvimento cardíaco, mediada pela atividade de p21ras (MAHGOUB et al., 1999). Camundongos que são heterozigotos (*Nf1*^{+/-}), embora viáveis, não desenvolvem neurofibromas, nódulos de Lisch e manchas “café com leite”. No entanto, têm uma maior predisposição para tumores associados ou não associados à neurofibromatose humana, e aparentemente para dificuldades de aprendizagem.

Em termos de defeitos ósseos, camundongo *Nf1* heterozigoto é, em muitos aspectos, um modelo imperfeito. Displasias ósseas (por exemplo, displasia congênita da tíbia e escoliose) (YOUNG, YMAN e NORTH, 2002) e, mais recentemente, osteopenia sistêmica (KUORILEHTO et al., 2005) são sintomas clínicos presentes em até 50% dos indivíduos com NF1. No entanto, nem displasias ou baixa densidade óssea foram observadas em camundongos *Nf1*^{+/-}. Uma possível razão para essa divergência fenotípica encontrada nos camundongos quando comparada com os pacientes é que *Nf1* pode apresentar diferentes papéis nas células osteoprogenitoras do que o desenvolvido em células ósseas maduras (CUNHA e GELLER, 2011).

Cichowski et al. (1999) desenvolveram camundongos quiméricos, formados parcialmente de células $Nf1^{-/-}$. Esses animais apresentavam neurofibromas plexiformes, entretanto, a linhagem de células homocigotas normais estava presente. Por esse fato, as células progenitoras de neurofibromas foram difíceis de ser identificadas. Zhu et al. (2002) geraram um camundongo na qual o gene *NF1* estava inativado somente nas células-tronco que originavam células de Schwann. Os camundongos podiam desenvolver neurofibromas somente se células heterocigotas estavam presentes, reforçando que o microambiente que retém neurofibromina é importante para a formação do neurofibroma. Camundongos *knockouts* com completa deleção de *NF1* em neurônios e glia têm permitido analisar a contribuições desses tipos celulares na dificuldade de aprendizado e tumorigênese, respectivamente.

Consistente com estudos em humanos com *NF1*, camundongos $Nf1^{+/-}$ mostram deficiência de aprendizado espacial, que pode ser superada com treinamento prolongado. Guo et al. (2000) relataram que os mutantes *Drosophila Nf1* também têm dificuldades de aprendizagem. Os mecanismos envolvidos na cognição, tanto em humanos como em camundongos $Nf1$, permanecem desconhecidos. No entanto, essas observações sugerem que a neurofibromina pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento neuronal e fisiológico. (COSTA et al., 2001).

Como mencionado anteriormente, apesar dos modelos animais heterocigotos não desenvolverem neurofibromas, recente trabalho utilizando camundongos $Nf1$ haploinsuficiente demonstrou que Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) isoladas desses animais apresentam as seguintes características: aumento da proliferação celular e da capacidade de formação de unidade formadora de colônia-fibroblástica (CFU-F), menos células senescentes e significativa elevação da atividade da telomerase quando comparada com as CTMs tipo selvagem (WU, WALLACE e MUIR, 2005). As CTMs $NF1^{+/-}$ afetavam a diferenciação osteoblástica conforme observado pela coloração da fosfatase alcalina, e confirmado pelo único ensaio de CFU-F realizado. A diferenciação dos osteoblastos prejudicada é consistente com a reduzida expressão de marcadores osteoblásticos a nível de mRNA, incluindo a osteocalcina e osteonectina.

Tendo em vista que modelos animais para o estudo da Neurofibromatose Tipo 1 não evidenciam a formação de neurofibromas e manchas 'café com leite',

que juntas são a principal manifestação clínica da doença, bem como não apresentarem as alterações ósseas encontradas em cerca de 50% dos pacientes, o estudo de células-tronco isoladas de pacientes com Neurofibromatose tipo 1 como modelo *in vitro* pode auxiliar na compreensão da doença.

1.4 ASPÉCTOS GERAIS DAS CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco (CT) são células capazes de se autorrenovar e se diferenciar para uma linhagem celular específica, tendo por isso recebido considerável atenção. O avanço tecnológico tem ajudado a identificar o potencial das células-tronco e sua capacidade de regenerar os tecidos está sendo estudada em modelos transplantados. Estudos do isolamento, natureza e potencial de diferenciação das células-tronco terão um impacto positivo no nosso conhecimento do desenvolvimento humano e da medicina regenerativa (SILVA et al., 2012).

As CT podem ser classificadas de acordo com sua origem em dois tipos principais: embrionárias ou adultas (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; SEO et al., 2004).

As células-tronco embrionárias (CTEs) são células primitivas, ou seja, não diferenciadas, que são capazes de se autorrenovar e se diferenciar para uma linhagem específica. O zigoto e as células derivadas a partir das primeiras duas divisões constituem as células mais primitivas (células totipotentes) que são capazes de formar o embrião, bem como os anexos embrionários. As células da massa celular interna do blastocisto podem formar todos os tipos celulares, derivados dos três folhetos germinativos, sendo assim designadas células pluripotentes (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003).

As células-tronco adultas (CTAs) são células indiferenciadas presentes em vários tecidos de um organismo adulto e são extremamente importantes para a regeneração dos mesmos. Em geral, estas células são consideradas multipotentes sendo capazes de se diferenciar nos tipos celulares restritos ao tipo do folheto germinativo de origem: mesoderma, ectoderma e endoderma. Desta forma, elas são

mais restritas quando comparadas com as CTEs. Apesar do grande potencial terapêutico das CTEs, o isolamento de CTEs humanas tornou-se muito problemático no mundo inteiro e no Brasil devido aos entraves éticos na utilização de um blastocisto humano como material biológico. Além disso, um grande problema do cultivo das CTEs é que elas se diferenciam em um tipo celular (população homogênea) e quando introduzidas de volta ao organismo, elas têm a capacidade de produzir tumores (teratomas) (THOMSON et al., 1998, GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003). Por outro lado, as CTAs são menos problemáticas para se trabalhar do que as CTEs, já que a destruição de embriões não é necessária. O uso das CTAs no desenvolvimento de pesquisas em engenharia de tecidos e medicina regenerativa é importante e apresenta vantagens, uma vez que sua diferenciação é mais controlada e, quando introduzidas no organismo, dificilmente produz tumores (KUEHLE e GOODELL, 2004; YOUNG et al., 2005, SILVA et al., 2012).

1.4.1 CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTE (CTPDs)

Dentre as células-tronco adultas, destacam-se as Células-Tronco da Polpa Dentária (CTPDs). De acordo com a literatura científica, as CTPDs são capazes de se diferenciarem *in vivo* em osteoblasto, condroblasto e odontoblasto, e foram isoladas tanto de humanos quanto de camundongos (CAPLAN, 1991). Estudos mais aprofundados de uma população mais restrita de CTPD humana demonstraram rápida expansão e proliferação *in vitro* e, no estado indiferenciado, demonstraram a expressão de alguns marcadores de células-tronco mesenquimais, tais como o STRO-1 e CD146 (MIURA et al., 2003). Após a indução da diferenciação, em condições de cultura apropriadas e utilizando diferentes agentes indutores de diferenciação, foi possível a produção *in vitro* de células neuronais e adipócitos (GRONTHOS et al., 2002; KOYAMA et al., 2009), odontoblastos, condroblastos e células miogênicas (d'AQUINO et al., 2007; KOYAMA et al., 2009) além da formação especializada de dentina e osso após o transplante em camundongo (ABOTT, 2000; GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003).

As CTPDs expressam estavelmente os marcadores de células-tronco mesenquimais (SH2, SH3 e SH4) durante as passagens contínuas. Além disso, estas células da polpa de dente expressam no seu estado indiferenciado um grupo de marcadores embrionários de superfície celular (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81) e marcadores moleculares (Oct-4 e Nanog) (LASLETT, FILIPEZYK, e PERA, 2003), demonstrando as propriedades semelhantes de células-tronco embrionárias humanas. Recentemente foi demonstrado que o Nanog, na presença do Oct-4, é suficiente não apenas para a manutenção da pluripotência, mas também para a auto-renovação das células-tronco (CONSTANTINESCU, 2003). Tanto o Nanog como o Oct-4 são expressos na população de CTPDs utilizada no presente trabalho.

O perfil molecular semelhante às CTEs humanas, a capacidade de se diferenciar espontaneamente sob condições de cultura apropriadas, mais a origem pós-natal, permitem classificar as CTs isoladas da polpa dentária como um tipo intermediário de célula, ou seja, entre as CTAs e CTEs humanas.

1.5 USO DAS CTPDs COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDO DE DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA

De acordo com a literatura, modelos animais são falhos para reprodutibilidade das características clínicas apresentadas pelos pacientes com NF1. Assim sendo, como as células-tronco têm sido utilizadas como modelo de estudo *in vitro* e *in vivo* para outras doenças, a proposta deste trabalho foi estudar as células-tronco isoladas da polpa dentária de um paciente com NF1 como modelo *in vitro*, uma proposta pioneira e inovadora, uma vez que não há relato na literatura científica de tal estudo.

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente projeto de pesquisa foi comparar a nível molecular e celular, as células-tronco da polpa de dente decíduo de indivíduo com Neurofibromatose do Tipo 1 com células-tronco de polpa dentária humana normais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- √ Utilizar as CTPDs como novo modelo de estudo da NF1 *in vitro*;
- √ Avaliar a proliferação e senescência das células NF1;
- √ Avaliar a diferenciação osteogênica das células NF1;
- √ Avaliar a quantificação de cálcio após a diferenciação osteogênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA

As linhagens de células-tronco de polpa dentária PDH1, DD1 (oriundas de crianças saudáveis) e NF1 (oriunda do paciente) usadas nesse projeto foram isoladas pelo Dr. Carlos M.C. Maranduba, no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, durante o estágio como Jovem Pesquisador/FAPESP. A manipulação com células-tronco de polpa de dente foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP, quando foram estabelecidas as linhagem dessas células. As linhagens UFJF1 e UFJF2 foram obtidas de crianças saudáveis na Universidade Federal de Juiz de Fora após aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP/UFJF Parecer no. 003/2011 – em anexo).

Imediatamente após a extração do dente decíduo realizada por um médico-dentista, o dente foi colocado em um tubo contendo 5 mL do meio de cultura DMEM-F12 (Invitrogen, CA), suplementado com 100 U/mL de Penicilina e 100 ug/mL de Streptomicina, e levado para o laboratório de cultura celular. Sob capela de fluxo laminar (ESCO Class II BSC), a polpa dentária foi extraída e cultivada com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Invitrogen, CA), suplementadas com 15% (v/v) Soro Fetal Bovino (Hyclone), 100 U/mL de Penicilina e 100 ug/mL de Streptomicina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, CA) em placa de petri de 35x10 mm (Corning). O meio foi trocado a cada três dias e entre o 7º e 10º dia as primeiras células-tronco isoladas da polpa dentária eram obtidas.

3.2 ANAMNESE

Para o desenvolvimento do presente projeto de pesquisa, contactamos os responsáveis pelo paciente com NF1, e foram solicitadas algumas informações de exames realizados para melhor compreensão da doença. Com a colaboração da médica Amélie Falconi foi possível estabelecermos a anamnese.

3.3 GENEALOGIA

Visando à análise da família do paciente com NF1, realizamos uma consultoria genética procurando conhecer o padrão de herança o qual possivelmente vem segregando com a doença.

3.4 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA

As CTPDs (controle e do paciente) foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 (Invitrogen, CA), suplementadas com 15% (v/v) Soro Fetal Bovino (Hyclone), 100 U/mL de Penicilina e 100 ug/mL de Streptomicina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, CA), de acordo com o protocolo de Kerkis et al (2006). As células foram incubadas (REVCO 3000) a 37°C a uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% CO₂.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados sob capela de fluxo laminar (ESCO Class II BSC), seguindo os protocolos de manutenção da esterilidade tanto de materiais quanto das soluções utilizadas (FRESHNEY, 2010). O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F, Jap.) e o meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias.

Visando à manutenção de um estoque das células utilizadas no presente trabalho, as culturas foram mantidas até atingirem 80% de confluência e foram criopreservadas. Para o congelamento, as células foram resuspendidas em meio de cultura contendo DMEM-F12 suplementado com 20% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Hyclone) e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

3.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar o padrão de proliferação das CTPDs, foram utilizadas duas metodologias: a contagem utilizando a Câmara de Neubauer e o ensaio de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue, Sigma).

No ensaio utilizando a Câmara de Neubauer, foram plaqueadas inicialmente (Dia 0) 1×10^3 células em diferentes placas de petri de 35x10 mm (Corning) e a cada dois dias, durante 15 dias, o meio de cultivo foi removido, as células aderidas foram lavadas em PBS para remoção do soro. A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco) e incubadas a 37° C por 5 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio DMEM-F12 (Invitrogen) contendo 10% (v/v) Soro Fetal Bovino (Hyclone) e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 3 minutos. O

pellet formado foi resuspendido em 1 mL de meio DMEM-F12 (Invitrogen) e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer (hemocitômetro). As células usadas nesse ensaio eram das linhagens NF1 e uma das linhagens controle e estavam inicialmente na passagem P3. Os experimentos foram realizados em triplicata.

No ensaio de MTT, foram plaqueadas inicialmente (Dia 0) 500 células por poço em uma placa de 96-poços (Corning, USA) e as leituras foram realizadas nos 4º, 8º, 12º, 16º e 20º dias. O meio de cultivo foi removido e foram adicionados 180 µL de meio puro mais 20 µL de MTT. Em seguida, a placa foi mantida no escuro na estufa por 4 horas e, após esse período, o meio mais MTT foi removido e 200 µL de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A placa foi mantida no escuro na estufa por 1 hora, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e como controle 200 µL de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) à absorbância de 570 nm. As células usadas nesse ensaio eram das linhagens NF1, UFJF1 e DD1 e estavam inicialmente na passagem P4. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR

Para estudar o padrão de senescência, das CTPDs, 5×10^3 células foram plaqueadas em placas 35x10 mm (Corning) e, a cada dois dias, o meio de cultivo foi removido, as células aderidas foram lavadas em PBS. A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco) e incubadas a 37°C por 3 minutos. A

tripsina foi neutralizada com meio DMEM-F12 (Invitrogen) contendo 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Hyclone) e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos. O *pellet* formado foi resuspendido em 1 ml de meio DMEM-12 (Invitrogen) e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer. As CTPDs foram re-plaqueadas em placas de 35x10 mm (Corning) e os experimentos foram repetidos sucessivamente até a passagem 16. As células usadas nesse ensaio eram das linhagens NF1 e uma das linhagens controle que estavam inicialmente na passagem P3. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para indução das células-tronco da polpa dentária para diferenciação osteogênica, uma densidade inicial de 5×10^3 células das linhagens UFJF1, PDH1, DD1 e NF1 foram plaqueadas em placas de 35x10 mm (Corning) em meio de cultura DMEM LOW GLUCOSE (Invitrogen) suplementado com 12% (v/v) Soro Fetal Bovino (Hyclone), 100 U/mL de Penicilina e 100 ug/mL de Streptomicina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, CA), 0,2 mM ácido ascórbico (Sigma), 10^{-8} M dexametasona (Sigma) e 10 mM glicerol-fosfato (Sigma) (este somente a partir do 10º dia), e a cultura foi mantida por quatorze dias, substituindo o meio de cultivo a cada três dias. Para demonstrar a diferenciação osteogênica, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) por 24 horas e foram coradas com a técnica de Vermelho de Alizarina, específica para diferenciação osteogênica, e descrita a seguir.

As placas foram lavadas com água destilada e as células foram fixadas com álcool 70% por 30 minutos. Após esse período, as células foram novamente lavadas com água destilada, e as placas foram mantidas abertas até a secagem total a temperatura ambiente. A seguir, foram preenchidas com uma solução com 1% de vermelho de Alizarina e 1% hidróxido de amônio (10:1, respectivamente), e mantidas em temperatura ambiente por 45 minutos sob leve agitação (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA). O excesso de corante foi removido após esse período, as placas novamente foram mantidas abertas até a secagem. Após a secagem, 10 campos aleatórios de cada linhagem foram fotografados com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F, Jap).

3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DEPÓSITO DE CÁLCIO

As linhagens UFJF1, PDH1, e NF1 foram plaqueadas a uma densidade de 500 células/poço, sendo que para cada linhagem foram realizadas 12 repetições. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM Low Glucose (Invitrogen) suplementado com 15% (v/v) Soro Fetal Bovino (Hyclone), 100 U/mL de Penicilina e 100 ug/mL de Streptomicina, 2 mM L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen, CA), 0,2 mM ácido ascórbico (Sigma), 10^{-8} M dexametasona (Sigma) e 10 mM glicerol-fosfato (Sigma) (este somente a partir do 10º. dia), e a cultura foi mantida por três semanas, substituindo o meio de cultivo a cada três dias. As culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 24 horas e foram coradas com a técnica de Vermelho de Alizarina, conforme descrita no item 3.7.

Para a quantificação da coloração, foram adicionados 250 μ L da solução de extração feita com ácido acético a 1% e metanol (4:1, respectivamente) em cada poço previamente corado com Vermelho de Alizarina e, em seguida, as placas foram levadas ao agitador (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente.

O conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa e 200 μ L da solução de extração foram utilizados em 3 poços como branco para calibragem do espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA). A quantificação do cálcio foi monitorada pela absorbância à 495 nm.

4 RESULTADOS

4.1 HISTÓRICO CLÍNICO DO PACIENTE

O paciente H.V.C., atualmente 8 anos e 11 meses, foi clinicamente avaliado e diagnosticado com Neurofibromatose tipo I. Os pais e o irmão são saudáveis. A gestação ocorreu sem intercorrências. A mãe fez uso de ácido fólico profilático antes da concepção. A via de parto foi a cesárea, por ausência de dilatação. Nas primeiras horas após o nascimento o paciente apresentou um quadro de icterícia, que após maiores investigações foi caracterizada como icterícia fisiológica do recém-nascido.

O paciente apresenta as manifestações cutâneas típicas, caracterizadas por manchas “café com leite”, disseminadas pelo corpo. A primeira mancha surgiu aos quatro meses de idade, ao redor do umbigo, e passou a apresentar crescimento constante. Novas manchas surgiram a partir dessa. Então, a mãe procurou o pediatra, e foi encaminhada a um geneticista, que confirmou o diagnóstico molecular de Neurofibromatose Tipo I. O paciente passou por avaliação com dermatologista, oftalmologista e neurologista. Foram realizados exames de fundoscopia, ultrassom de fontanelas e ressonância magnética. Na íris apresenta hamatomas pigmentados, caracterizados como Nódulos de Lisch. Entretanto, não apresentava neurofibromas visíveis ou palpáveis até a última consulta realizada em março de 2010. Ausência de efélides em região inguinal ou axilar. O paciente tratou a neurofibromatose com o medicamento Fumarato de Cetotifeno, por um tempo limitado.

Ao exame neurológico, o paciente apresentava-se sem alterações significativas. O desenvolvimento do paciente foi compatível com sua idade cronológica, sem apresentar nenhum atraso. O paciente apresentava um quadro

cognitivo excelente, e não cursava com queixas escolares ou de aprendizagem na última consulta. A mãe relatou que o filho tem dificuldade em iniciar o sono, possui este agitado e acorda ainda cansado. A família foi orientada a realizar higiene do sono, e o paciente está em tratamento com melatonina 1mg. História patológica pregressa de uma hernioplastia inguinal ao um ano e dois meses de idade, e um quadro de artrite reativa aos dois anos.

Apesar do desenvolvimento normal, o paciente apresentava um crescimento inadequado para a faixa etária (baixa estatura). Baseado na curva de crescimento NHCS, ele apresentou-se no percentil 3. A mãe do paciente informa que o paciente alimenta-se sem dificuldades.

O paciente realiza exames de ressonância magnética (RM) periódicos, de crânio e de sistema nervoso central, para rastreio do surgimento de tumores. As RMN de órbita realizadas periodicamente excluíram processos expansivos, descartando assim a possibilidade de que o paciente é portador de gliomas ópticos, uma das manifestações características da neurofibromatose tipo 1, até o momento. Não foram encontradas alterações estruturais significativas nos exames de imagem realizados até o momento.

O paciente é acompanhado por uma equipe multidisciplinar, envolvendo neurologista pediátrico, oftalmologista e ortopedista, facilitando uma intervenção precoce nas complicações da doença.

4.2 HEREDOGRAMA

Com base nas informações fornecidas na consultoria genética, foi possível estabelecer a genealogia da família do paciente com a NF1 em cinco gerações (Figura 8).

No lado paterno do paciente H.V.C., foi relatado que o avô paterno casou-se 5 vezes, sendo uma de sua ex esposa com quem teve filhos, sua prima em primeiro grau, configurando casamento consanguíneo. Entretanto, não foi relatado nenhum problema genético nos descendentes. Ainda em relação aos dados paternos do paciente com NF1, houve falta de informações, o que impossibilitou uma análise mais detalhada em relação a montagem do heredograma.

No lado materno do paciente H.V.C., houve o relato de óbito de cinco indivíduos na geração II, com causas desconhecidas.

Excluindo os casos relatados em ambas as famílias, tais como diabetes, problemas cardíacos, hipertensão arterial sistêmica, alguns casos de câncer de outras origens, foi possível avaliar cinco gerações e observarmos que a doença não vem segregando com os indivíduos parentais.

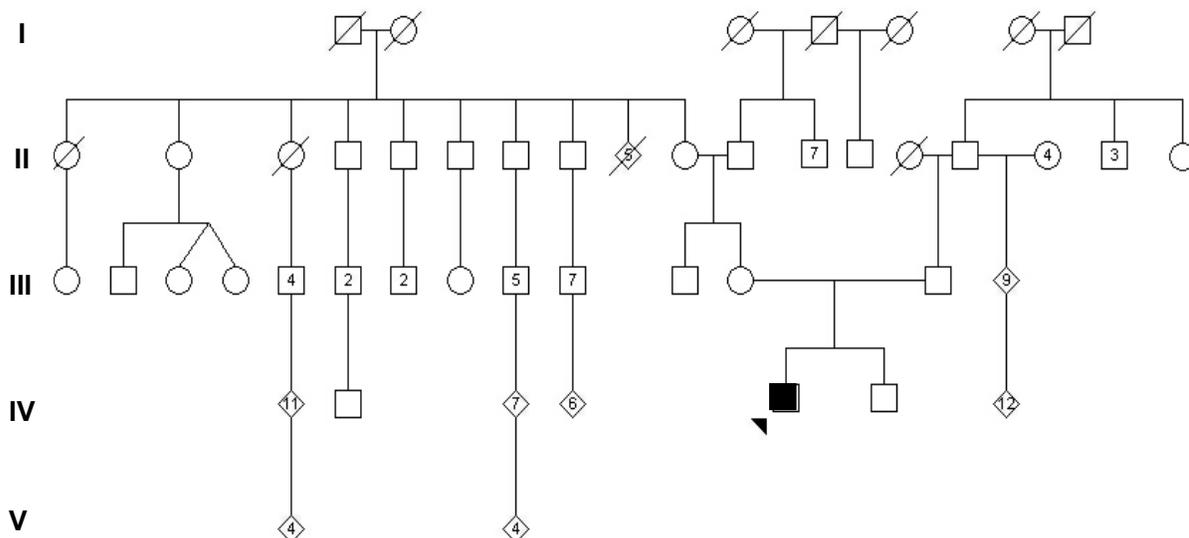


Figura 8: Heredograma da família com caso de Neurofibromatose do Tipo 1. Seta indicando o probando.

4.3 O CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA

As células-tronco da polpa dentária, tanto das linhagens controles quanto da linhagem NF1, apresentaram morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos, ao serem cultivadas *in vitro* conforme descrito no item 3.4 (Figura 9).

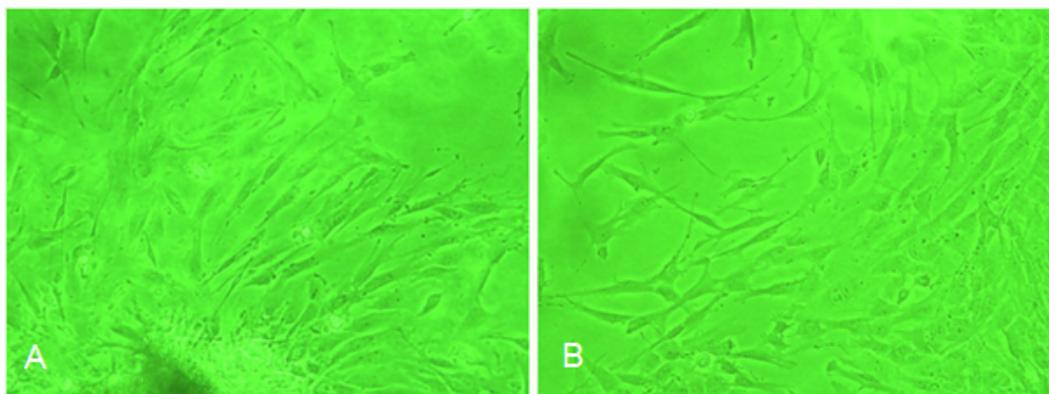


Figura 9: Células da polpa dentária com morfologia fusiforme. A: linhagem controle. B: linhagem NF1. Aumento de 10X.

4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os resultados da avaliação do padrão de proliferação das CTPDs utilizando a contagem com a Câmara de Neubauer como metodologia demonstram que as células da linhagem NF1 apresentam uma taxa de proliferação elevada significativa (ANOVA, $p < 0,05$) quando comparada com as linhagens controles. Essa diferença na proliferação é mais perceptível a partir do 8º dia (Gráfico 1).

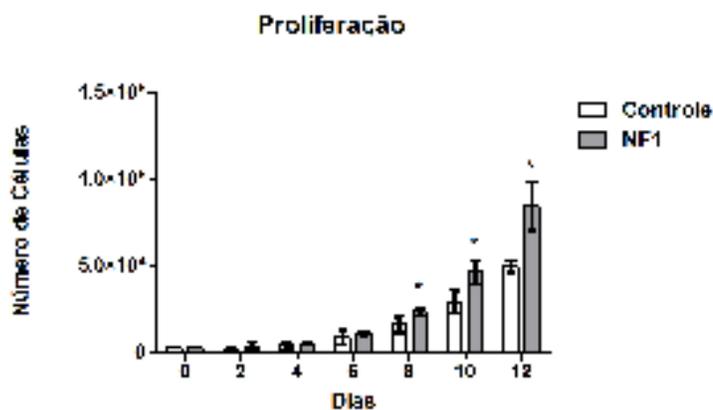


Gráfico 1 – Análise realizada comparando, através da contagem utilizando a Câmara de Neubauer, a taxa de proliferação de células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles. As amostras são apresentadas como média e desvio padrão e a análise estatística realizada demonstra diferença significativa ($p < 0,05$).

O ensaio de proliferação usando o MTT como metodologia (item 3.5) apresentou resultados condizentes com os descritos acima. As células da linhagem NF1 apresentaram uma alta taxa de proliferação significativa (ANOVA, $p < 0,05$) quando comparadas com as células de duas linhagens controle (Gráfico 2).

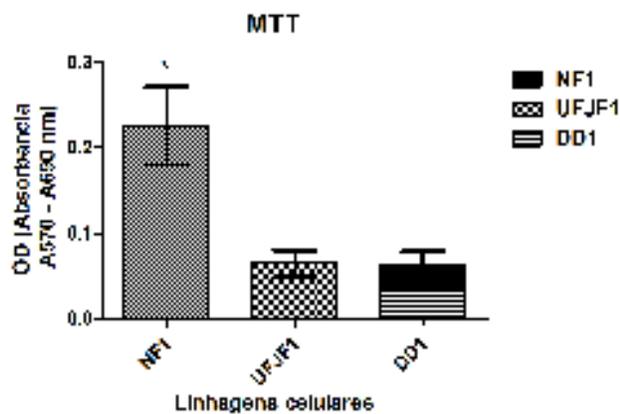


Gráfico 2 – Análise realizada comparando, através do MTT, a taxa de proliferação células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles. As amostras são apresentadas como média e desvio padrão e a análise estatística realizada demonstra diferença significativa ($p < 0,05$).

4.5 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR

A avaliação do padrão de senescência das CTPDs utilizando a contagem com a Câmara de Neubauer como metodologia (item 3.6) demonstrou uma taxa menor de senescência significativa ($p < 0,05$) das células da linhagem NF1 quando comparadas com o controle (Gráfico 3).

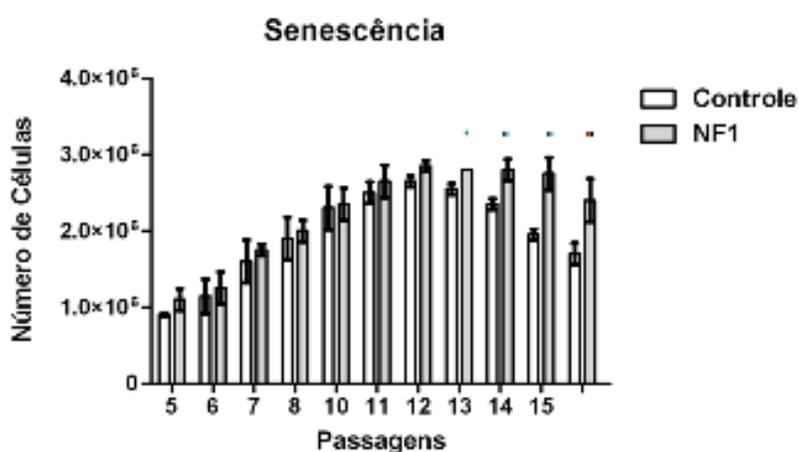


Gráfico 3 – Análise realizada comparando, através da contagem utilizando a Câmara de Neubauer, a taxa de senescência de células-tronco isoladas de dentes decíduos do paciente com células-tronco isoladas de dentes decíduos controles. As amostras são apresentadas como média e desvio padrão e a análise estatística realizada demonstra diferença significativa ($p < 0,05$).

4.5 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Após quatorze dias de indução, tanto as linhagens CTPDs controles quanto a NF1 apresentaram alteração morfológica, adquirindo morfologia semelhante a osteoblasto. A confirmação do sucesso da diferenciação foi alcançada pela coloração Vermelho de Alizarina, que marca depósito de cálcio (Figura 10).

Os depósitos de cálcio mostram diferença na quantidade e forma entre as linhagens controles e a linhagem NF1. As linhagens controles apresentaram

depósitos de cálcio em maior quantidade e bem definidos em comparação com a linhagem NF1.

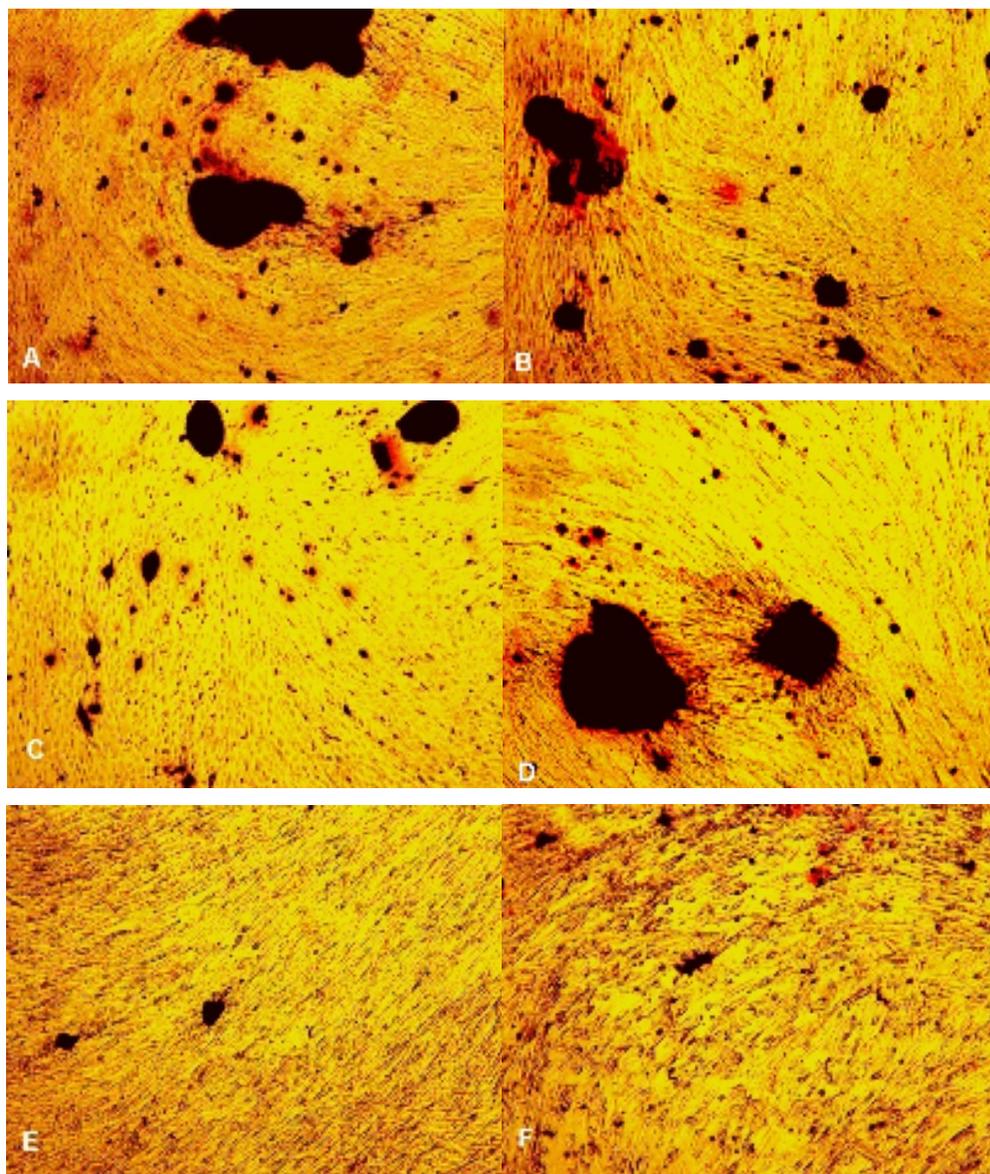


Figura 10: Fotografia de culturas dos grupos experimentais, aos 14 dias do experimento para detecção dos depósitos de cálcio evidenciados pela reação de vermelho de Alizarina. Aumento de 4X.

Fotos A e B: linhagem UFJF1, fotos C e D: linhagem DD1, fotos E e F: linhagem NF1.

4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DEPÓSITO DE CÁLCIO

Após os 14 dias de diferenciação osteogênica, os maiores níveis de depósito de cálcio foram observados na linhagem celular UFJF1 (Gráfico 4), sendo 3 vezes superior a da linhagem NF1 ($p < 0,05$).

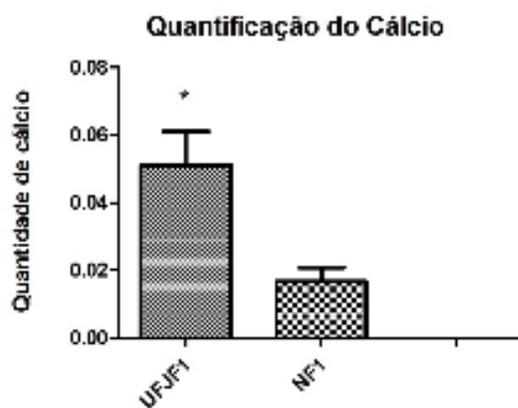


Gráfico 4 – Resultado da densidade óptica da coloração com vermelho de Alizarina das linhagens UFJF1 e NF1.

5 DISCUSSÃO

A NF1 é uma das doenças autossômicas dominante mais frequente em humanos. Estudos a respeito da NF1 são conduzidos utilizando modelos animais, tais como camundongo, que não reproduzem fielmente todas as manifestações clínicas da doença, incluindo a ausência da principal característica da NF1: manchas 'café com leite' e neurofibromas (BRANNAN et al., 1994). Além disso, diferentes padrões ósseos são observados nos camundongos em comparação com os encontrados nos pacientes (WANG et al., 2011). Por exemplo, nem a perda óssea ou lesões distróficas são observadas nesses camundongos. Desta forma, nos propusemos nesse trabalho utilizar células-tronco adultas da polpa dentária como modelo de estudo *in vitro* para a NF1, uma vez que não existe trabalho na literatura usando essas células. Como as CTs tem sido utilizadas como modelo de estudo *in vitro* para diversas doenças (SILVA et al., 2012), o presente trabalho apresenta-se de forma inédita.

Como o paciente com NF1 apresenta tumores espalhados por todo corpo, resolvemos investigar se as células-tronco da polpa dentária de uma criança que apresenta somente as manchas "café com leite" se proliferam mais dos que células de indivíduos normais (controles). As características de proliferação e senescência das CTPDs de um paciente de 8 anos, diagnosticado com NF1 foram analisadas. Ao compararmos com células-tronco de polpa dentária de indivíduos normais (controles), observamos que as células do paciente apresentam elevada proliferação, o que já era observado no cultivo celular, pois para a mesma área de cultivo (células/cm²), elas precisavam ser tripsinizadas e passadas para nova placa de cultivo. Isso é característica de células com perfil tumoral. É sabido que células tumorais apresentam alta capacidade proliferativa, em virtude de a célula ter divisões descontroladas (OLIVEIRA, 1994).

Senescência celular é o fenômeno pelo qual as células diploides normais perdem a capacidade de dividir-se, normalmente, após cerca de 50 divisões de células *in vitro*. Isso acontece porque os telômeros que protegem as extremidades dos cromossomos se encurtam demais até alcançar o Limite de Hayflick - em cada divisão celular, os telômeros perdem uma parte e se encurtam, quando atingem um tamanho mínimo, os cromossomos deixam de se replicar, impedindo a divisão

correta da célula (VIDAL et al., 2011). Ao avaliarmos a senescência das células, observamos que as células controle chegavam rapidamente no platô perto da passagem 12, o mesmo não acontecendo com as NF1 que ultrapassavam a passagem 15 atingindo seu platô.

A análise da proliferação e senescência são importantes para entendermos como uma criança apresentando simplesmente manchas “café com leite” desencadeia os diversos tumores ao longo de seu desenvolvimento. As células-tronco de polpa dentária já comportam-se de forma tumoral, apresentando uma taxa de proliferação elevada e entrando em senescência tardiamente.

Como é relatado na literatura científica que 50% dos pacientes com NF1 apresentam diversos problemas ósseos, e como já está bem estabelecido em diversos laboratórios o protocolo de diferenciação osteogênica, resolvemos testar o potencial de diferenciação nas células do paciente. O processo de diferenciação osteogênica das CTPDs é dinâmico e envolve uma série de eventos como o aumento da expressão de genes relacionados à produção de proteínas da matriz extracelular e o aumento da atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de mineralização da matriz produzida. Como consequência desses eventos tem-se, *in vitro*, a formação de nódulos de matriz mineralizada caracterizada por alto conteúdo de cálcio (FERREIRA, 2011).

A coloração Vermelho de Alizarina marca depósitos de cálcio, e foi utilizada após quatorze dias de diferenciação osteogênica. Realizando uma análise qualitativa, foram observados depósitos de cálcio com tamanhos menores e em menor quantidade nas células NF1, em comparação com as células controle. A análise da quantificação do cálcio corrobora essas observações uma vez que a quantidade de cálcio obtida nas células NF1 foi significativamente menor do que aquela obtida nas células controle. Essa menor quantidade de cálcio pode estar relacionada com os diversos problemas ósseos.

Tucker et al. (2008) observaram maior incidência de fraturas em indivíduos com NF1 do que a observada nos familiares saudáveis desses pacientes. A fração de pacientes com NF1 que sofreram fraturas foi ainda maior no estudo de Brunetti-Pierri et al. (2008), cerca de 52%. Esses pesquisadores realizaram uma biópsia dos ossos fraturados dos pacientes com NF1 e foi observado severa redução da mineralização. Seitz et al. (2009) também realizou biópsia óssea e relatou várias áreas com menor conteúdo de cálcio. Além de maior incidência de fraturas, é

relatado na literatura que maior índice de osteoporose é encontrado em pacientes com NF1, quando comparado com pessoas saudáveis (BRUNETTI-PIERRI et al., 2008; PETRAMALA et al., 2011).

Nossos resultados corroboram com dados da literatura. Menor quantidade de cálcio pode formar áreas mais porosas dentro da matriz óssea que serão, subsequentemente, preenchidas por um tecido fibroso que é menos resistente. Como resultado, o osso torna-se menos estável e, conseqüentemente, mais frágil (SEITZ et al., 2009). Indivíduos com NF1 também são menores do que esperado, mas suas proporções corporais normalmente não são alteradas, sugerindo que existe um menor crescimento ósseo generalizado. Estudos recentes demonstraram que a densidade mineral óssea desses pacientes é menor do que a de pessoas saudáveis, e essa redução geralmente é maior nas regiões do corpo que carregam mais peso. (KUORILEHTO et al., 2004; TURKER et al., 2008).

Além da produção alterada da matriz mineralizada, alterações ósseas em pacientes com NF1 também estão relacionadas com fatores celulares, tais como uma baixa produção óssea e uma alta taxa de absorção, induzida por uma diferenciação incompleta dos precursores de osteoblastos e uma sobrevivência maior dos osteoclastos, processos nos quais a neurofibromina possui um papel importante (PETRAMALA et al., 2011). A neurofibromina regula negativamente a ativação da proteína p21Ras inativando a p21Ras-GTP em p21Ras-GDP. Ras está no ápice de várias cascatas de sinalização, que modulam várias funções celulares, tais como proliferação, diferenciação e sobrevivência. Wu et al., 2006 demonstraram que a superexpressão de RAS e MAP kinase estavam associadas com a supressão de c-fos, cuja up-regulação é necessária para a função normal dos osteoblastos. A elevada atividade de Ras também contribui para um aumento no número de osteoclastos, resultando em maior atividade de reabsorção óssea (SEITZ et al., 2010).

Outra característica observada em pacientes com NF1 é a redução de níveis séricos de 25-hidroxi-vitamina D, que desempenha um papel no metabolismo ósseo e aumenta a absorção de cálcio no intestino, utilizado na formação e manutenção óssea. Baixas concentrações de 25-hidroxi-vitamina D no sangue podem reduzir a deposição óssea de cálcio, agravando as manifestações clínicas dos pacientes. Além disso, é observada alta taxa de excreção de cálcio na urina (TUCKER et al., 2008; PETRAMALA et al., 2011).

Diversos estudos têm sido realizados buscando uma suplementação diária de Vitamina D e Cálcio nos pacientes. Todos relatam uma regulação do nível de 25-hidroxi-vitamina D no sangue após um ano de uso, mas a densidade mineral óssea dos pacientes continua reduzida (BRUNETTI-PIERRI et al., 2008; SEITZ et al., 2010; PETRAMALA et al., 2011). Mais estudos são necessários para chegar a um valor ideal de suplementação. As células-tronco podem ser utilizadas como modelo de estudo *in vitro* para esses tipos de estudos, favorecendo melhor compreensão da patogenia das alterações ósseas na NF1.

6 CONCLUSÃO

- √ A análise da taxa de proliferação e senescência celular indicam que as células-tronco da polpa dentária do paciente com Neurofibromatose Tipo 1 apresentam perfil tumoral.
- √ Os problemas ósseos associados à NF1 estão relacionados com a deficiência na diferenciação osteogênica das células tronco do indivíduo para formação dos osteoblastos, em função da baixa calcificação celular.
- √ As células-tronco da polpa dentária apresentaram como um excelente modelo *in vitro* para estudo da Neurofibromatose Tipo 1.

7 REFERÊNCIAS

ABOTT, A. 2000. German researchers seek legal backing for stem cell work. **Nature**, **404 (6777)**: 424.

ALWAN, S.; TREDWELL, S. J.; FRIEDMAN, J. M. 2005. Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)? **Clinical Genetics**, **67**: 378-390.

BASER, M. E.; FRIEDMAN, J. M.; EVANS, D. G. R. 2006. Increasing the specificity of the diagnostic criteria for schwannomatosis. **Neurology**, **66**: 730–32.

BOYD, K. P.; KORF, B. R.; THEOS, A. 2009. Neurofibromatosis type 1. **Journal American Academy of Dermatology**, **61**.

BRANNAN, C. I.; PERKINS, A. S.; VOGEL, K. S.; RATNER, N.; NORDLUND, M. L.; REID, S. W.; BUCHBERG, A. M.; JENKINS, N. A.; PARADA, L. F.; COPELAND, N. G. 1994. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. **Genes and Development**, **8 (9)**: 1019–1029.

BRUNETTI-PIERRI, N.; DOTY, S. B.; HICKS, J.; PHAN, K.; MENDOZA-LONDONO, R.; BLAZO, M.; TRAN, A.; CARTER, S.; LEWIS, R. A.; PLON, S. E.; PHILLIPS, W. A.; SMITH, O.; ELLIS, K. J.; LEE, B. 2008. Generalized metabolic bone disease in Neurofibromatosis type I. **Molecular Genetics and Metabolism**, **94**: 105-111.

CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, **9 (5)**: 641-650.

CICHOWSKI, K.; SANTIAGO, S.; JARDIM, M.; JOHNSON, B. W.; JACKS, T. 2003. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. **Genes and Development**, **17 (4)**: 449–454.

CICHOWSKI, K.; SHIH, T. S.; SCHMITT, E.; SANTIAGO, S.; KATLYNE, R.; MCLAUGHLIN, M. E.; BRONSON, R. T.; JACKS, T. 1999. Mouse models of tumor development in Neurofibromatosis Type 1. **Science**, **286 (5447)**: 2172–2176.

CONSTANTINESCU, S. 2003. Stemness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **7 (2)**: 103-112.

COSTA, R. M.; YANG, T.; HUYNH, D. P.; PULST, S. M.; VISKOCHIL, D. H.; SILVA, A.J.; BRANNAN, C.L. 2001. Learning deficits, but normal development and tumor predisposition, in mice lacking exon 23a of Nf1. **Nature Genetics**, **27 (4)**: 399–405.

CUNHA, K. S. G.; GELLER, M. 2011. **Advances in Neurofibromatosis Research**. Nova Science Publishers, Inc.

d'AQUINO, R.; GRAZIANO, A.; SAMPAOLESI, M.; LAINO, G.; PIROZZI, G.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, G. 2007. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. **Cell Death and Differentiation**, **14 (6)**: 1162-1171.

DEBELLA, K.; SZUDEK, J.; FRIEDMAN, J. M. 2000. Use of the National Institutes of Health criteria for diagnosis of Neurofibromatosis 1 in children. **Pediatrics**, **105**: 608-614.

ESPIG, A. F.; SLOMP, A. A.; CAMPAGNOLO, A. Q.; ROCKENBACH, D. M.; DA SILVA, B. D.; POMBLUM, V. J. 2008. Neurofibromatosis Type 1: Update. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, **6**: 243-249.

EVANS, D. G.; BASER, M. E.; MCGAUGHRAN, J.; SHARIF, S.; HOWARD, E.; MORAN, A. 2002. Malignant peripheral nerve sheath tumors in Neurofibromatosis 1. **Journal of Medical Genetics**, **39**: 311-324.

FERNER, R. E. 2006. Neurofibromatosis 1. **European Journal of Human Genetics** **15**, 131–138.

FERNER, R. E. 2007. Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. **The Lancet Neurology**, **6**: 340–351.

FERREIRA, L. S. 2011. **Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil. São Paulo, 83p.

FRESHNEY, R. I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th edition. Hoboken. NJ:Wiley-Blackwell.

FRIEDMAN, J. M. 2002. Neurofibromatosis 1: Clinical manifestations and diagnostic criteria. **Journal of Child Neurology**, **17**: 548-554.

GELLER, M.; BONALUMI, A. 2004. Neurofibromatose: clínica, genética e terapêutica. 1^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**, **97 (25)**: 13625-30.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, **81 (8)**: 531-5.

GUO, H. F.; TONG, J.; HANNAN, F.; LUO, L.; ZHONG, Y. 2000. A Neurofibromatosis 1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. **Nature**, **403 (6772)**: 895–898.

JACKS, T.; SHIH, T. S.; SCHMITT, E. M.; BRONSON, R. T.; BERNARDS, A.; WEINBERG, R. A. 1994. Tumor predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *Nf1*. **Nature Genetics**, **7 (3)**: 353–361.

JUNIOR, L. G. D.; FILHO, A. B.; D'ALESSANDRO, D. S. M.; GELLER, M. 2008. Neurofibromatosis type 1 in childhood: review of clinical aspects. **Revista Paulista de Pediatria**, **26 (2)**: 176-82.

KEMKEMER, R.; SCHRANK, S.; VOGEL, W.; GRULER, H.; KAUFMANN, D. 2002. Increased noise as an effect of haploinsufficiency of the tumor-suppressor gene Neurofibromatosis Type 1 *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **99**: 13783–13788.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. 2006 Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs** **184**: 105-116.

KOYAMA, N.; OKUBO, Y.; NAKAO, K.; BESSHO, K. 2009. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, **67 (3)**: 501-6.

KUEHLE, I.; GOODELL, M. A. 2004. The therapeutic potential of stem cells from adults. **British Medical Journal**, **325**: 372-376.

KUORILEHTO, T.; POYHONEN, M.; BLOIGU, R.; HEIKKINEN, J.; VAANANEN, K.; PELTONEN, J. 2005. Decreased bone mineral density and content in

Neurofibromatosis Type 1: Lowest local values are located in the load-carrying parts of the body. **Osteoporoses International**, **16(8)**: 928-36.

LASLETT, A. L.; FILIPEZYK, A. A.; PERA, M. F. 2003. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Trends in Cardiovascular Medicine**, **13**: 295-301.

LEHTONEN, A.; HOWIE, E.; TRUMP, D.; HUSON, S. M. 2012. Behavior in children with neurofibromatosis type 1: cognition, executive function, attention, emotion, and social competence. **Developmental Medicine and Child Neurology**, **54 (6)**: 1-15.

LESKELÄ, H. V.; KUORILEHTO, T.; RISTELI, J.; KOIVUNEN, J.; NISSINEN, M.; PELTONEN, S.; KINNUNEN, P.; MESSIAEN, L.; LEHENKARI, P.; PELTONEN, J. 2008. Congenital pseudarthrosis of Neurofibromatosis Type 1: Impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression. **Bone**, **08273**.

LEVINE, T. M.; MATEREK, A.; ABEL, J.; O'DONNELL, M.; CUTTING, L. E. 2006. Cognitive profile of neurofibromatosis type 1. **Seminars in Pediatric Neurology**, **13**: 8-20.

LISTERNICK, R.; CHARROW, J.; GREENWALD, M.; METS, M. 1994. Natural history of optic pathway tumors in children with neurofibromatosis type 1: a longitudinal study. **Journal of Pediatric**, **125**: 63-6.

MAHGOUB, N.; TAYLOR, B. R.; GRATIOT, M.; KOHL, N. E.; GIBBS, J. B.; JACKS, T.; SHANNON, K.M. 1999. *In vitro* and *in vivo* effects of a farnesyltransferase inhibitor on Nf1-deficient hematopoietic cells. **Blood**, **94 (7)**: 2469-2476.

MANTANI, A.; WAKASUGI, S.; YOKOTA, Y.; KUNIYA, A.; YUKITAKA, U.; KENICHI, Y. 1994. A novel isoform of the Neurofibromatosis Type-1 mRNA and a switch of isoforms during murine cell differentiation and proliferation. **Gene**, **148 (2)**: 245-251.

MESSIAEN, L. M.; CALLENS, T.; MORTIER, G.; BEYSEN, D.; VANDENBROUCKE, I.; VAN ROY, N.; SPELEMAN, F.; PAEPE, A. D. 2000. Exhaustive mutation analysis of the *NF1* gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. **Human Mutation**, **15**: 541–55.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P.G.; SHI, S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**, **100 (10)**: 5807-12.

MUNIZ, M. P.; ALMEIDA, J. M. R.; AIRES, A. S.; FRANÇA, F. C.; GOLONIBERTOLLO, E. M. 2002. Prevalência de achados radiográficos da neurofibromatose tipo 1: estudo de 82 casos. **Radiologia Brasileira**; **35**: 65-70.

MURĂRESCU, E. D.; IVAN, L.; MIHAILOVICI, M. S. 2005. Neurofibroma, Schwannoma or a hybrid tumor of the peripheral nerve sheath? *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 46(2):113–116.

OZONOFF, S. 1999. Cognitive impairment in Neurofibromatosis Type 1. **American Journal of Medical Genetics**, **89**: 45-52.

PARKER, R.J.; GUTMANN, D.H.; RUBENSTEIN, A.; VISKOCHIL, D.; ZIMMERMAN, R.A.; VEZINA, G.; SMALL, J.; KORF, B. 2002. Plexiform neurofibromas in NF1: Toward biological based therapy. **Neurology**, **58**: 1461-70.

PETRAMALA, L.; GIUSTINI, S.; ZINNAMOSCA, L.; MARINELLI, C.; COLANGELO, L.; CILENTI, G.; FORMICUCCIA, M.C.; D'ERASMO, E.; CALVIERI, S.; LETIZIA, C. 2011. Bone mineral metabolism in patients with Neurofibromatosis Type 1 (*Von Recklinghausen* disease). **Archives of Dermatological Research**, **304**: 325–331.

RICHETTA, A.; GIUSTINE, S.; RECUPERO, S.M.; PEZZA, M.; CARLOMAGNO, V.; AMORUSO, G. 2004. Lisch nodules of the iris in Neurofibromatosis Type 1. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, **18(3)**: 342-4.

SCHEPPER, S.D. 2006. Café-au-lait spots in Neurofibromatosis Type 1 and in healthy control individuals: hyperpigmentation of a different kind? **Archives of Dermatological Research**, **297**: 439–449.

SEITZ, S.; SCHNABEL, C.; BUSSE, B.; SCHMIDT, H. U.; BEIL, F. T.; FRIEDRICH, R. E.; SCHINKE, T.; MAUTNER, V. F.; AMLING, M. 2009. High bone turnover and accumulation of osteoid in patients with Neurofibromatosis 1. **Osteoporosis International**, **21**: 119-127.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P. G.; WANG, C. Y.; SHI, S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **The Lancet**, **364 (9429)**: 149-155.

SHEN, M.H.; HARPER, P.S. 1996. Molecular genetics of Neurofibromatosis Type 1. **Journal of Medical Genetics**, **33**: 2-17.

SILVA, F. S.; ALMEIDA, P. N.; RETTORE, J. V. P.; MARANDUBA, C. P.; MAURMANN, C.; TORRES, G.; ZANINI, R.; MYIAGI, S.; SANTOS, M. O.; MARQUES, M. M.; MARANDUBA, C. M. C. 2012. Personalized Cell Therapies by Using Stem Cells: Seven relevant topics for cell therapy safety and success on stem cell therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **2012**: 1-12.

SINGHAL, S.; BIRCH, J. M.; KERR, B.; LASHFORD, L.; EVANS, D. G. 2002. Neurofibromatosis type 1 and sporadic optic gliomas. **Archives of Disease in Childhood**, **87**: 65-70.

STEVENSON, D. A.; ZHOU, H.; ASHRAFI, S.; MESSIAEN, L. M.; CAREY, J. C.; D'ASTOUS, J. L.; SANTORA, S. D.; VISKOCHIL, D. H. 2006. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. **The American Journal of Human Genetics**, **79**:143-8.

THEOS, A.; KORF, B. R. 2006. Pathophysiology of Neurofibromatosis Type 1. **Annals of Internal Medicine**, **144**: 842-9.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, **282 (5391)**: 1145 – 1147.

TROVO-MARQUI, A. B.; TAJARA, E. H. 2006. Neurofibromin: a general outlook. **Clinical Genetics**, **70**: 1–13.

TUCKER, T.; SCHNABEL, C.; HARTMANN, M.; FRIEDRICH, R. E.; FRIELING, I.; KRUSE, H-P.; MAUTNER, V-F.; FRIEDMAN, J. M. 2008. Bone health and fracture rate in individuals with Neurofibromatosis 1 (NF1). **Journal of Medical Genetics**, **46**: 259-265.

UPADHYAYA, M.; HUSON, S. M.; DAVIES, M.; THOMAS, N.; CHUZHANOVA, N.; GIOVANNINI, S.; EVANS, D.G.; HOWARD, E.; KERR, B.; GRIFFITHS, S.; CONSOLI, C.; SIDE, L.; ADAMS, D.; PIERPONT, M.; HACHEN, R.; BARNICOAT, A.; LI, H.; WALLACE, P.; VAN BIERVLIET J. P.; STEVENSON, D.; VISKOCHIL, D.; BARALLE, D.; HAAN, E.; RICCARDI, V.; TURNPENNY, P.; LAZARO, C.; MESSIAEN, L. 2007. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the *NF1* gene (c.2970 – 2972 del AAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. **The American Journal of Human Genetics** **80**: 140-51.

VANDENBROUCKE, I.; VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A.; MESSIAEN, L. 2002. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. **FEBS Letters**, **522 (1–3)**: 71–76.

VIDAL, M. A.; WALKER, N. J.; NAPOLI, E.; BORJESSON, D. L. 2011. Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue and Umbilical Cord Tissue. **Stem Cells and Development, 0**: 1- 12.

WANG, W.; NYMAN, J. S.; ONO, K.; STEVENSON, D. A.; YANG, X.; ELEFTERIOU, F. 2011. Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with Neurofibromatosis Type I. **Human Molecular Genetics, 20 (20)**: 3910–3924.

WARD B, GUTMANN D. 2005. Neurofibromatosis 1: From Lab Bench to Clinic. **Pediatric Neurology, 32**: 221-228.

WU, M.; WALLACE, M. R.; MUIR, D. 2005. Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient Schwann cells in culture and as syngrafts in Nf1 knockout mice. **Journal of Neuroscience Research, 82 (3)**: 357–367.

WU, X.; ESTWICK, S. A.; CHEN, S.; YU, M.; MING, W.; NEBESIO, T. D.; LI, Y.; YUAN, J.; KAPUR, R.; INGRAM, D.; YODER, M. C.; YANG, F-C. 2006. Neurofibromin plays a critical role in modulating osteoblast differentiation of mesenchymal stem/progenitor cells. **Human Molecular Genetics, 15 (19)**: 2837–2845.

YANG, F.; INGRAM, D. A.; CHEN, S.; ZHU, Y.; YUAN, J.; LI, X.; YANG, X.; KNOWLES, S.; HORN, W.; LI, Y.; ZHANG, S.; YANG, Y.; VAKILI, S. T.; YU, M.; BURNS, D.; ROBERTSON, K.; HUTCHINS, G.; PARADA, L. F.; CLAPP, D. W. 2008. Nf1-Dependent Tumors Require a Microenvironment Containing Nf1^{+/-} and c-kit-Dependent Bone Marrow. **Cell, 135 (3)**: 437 – 448.

YOUNG, H. E.; DUPLAA, C.; KATZ, R.; THOMPSON, T.; HAWKINS, K. C.; BOEV, A. N.; HENSON, N. L.; HEATON, M.; SOOD, R.; ASHLEY, D.; STOUT, C.; MORGAN, J. H.; UCHAKIN, P. N.; RIMANDO, M.; LONG, G. F.; THOMAS, C.; YOON, J. I.; PARK, J. E.; HUNT, D. J.; WALSH, N. M.; DAVIS, J. C.; LIGHTNER, J.

E.; HUTCHINGS, A. M.; MURPHY, M. L.; BOSWELL, E.; MCABEE, J. A.; GRAY, B. M.; PISKURICH, J.; BLAKE, L.; COLLINS, J. A.; MOREAU, C.; HIXSON, D.; BOWYER, F. P.; BLACK, A. C. 2005. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **9 (3)**: 753-69.

YOUNG, H. E.; HYMAN, S.; NORTH, K. 2002. Neurofibromatosis 1: clinical review and exceptions to the rules. **Journal of Child Neurology**, **17**: 613-21.

ZHU, Y.; GHOSH, P.; CHARNAY, P.; BURNS, D. K.; PARADA, L. F. 2002. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. **Science**, **296 (5569)**: 920–922.

ZUBAY, G.; PORTER, R. W.; SPETZLER, R. F. 2001. Neurofibromatosis. **Operative Techniques in Neurosurgery**, **4**: 43-46.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética


 UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA
 PROREITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEPURJF
 SAO PAULO, RUA TRÊS FLORES, 300 - ANEXO

Parecer nº 003/2011

Protocolo CEP-UE/FJF: +2269.003.2011+ **EP:** +394410+ **CAAE:** +3234.0.180.00-10+
Título do Projeto: "Isolamento, Caracterização e diferenciação de Células-Tronco Adultas obtidas a partir da polpa dentária, tecido adiposo e cordão umbilical humano."
Área Temática: +Grav III+
Pesquisador Responsável: +Carice Wagner da Costa Maranhão+
Pesquisadores Participantes: +Édrio Fábio Gauriel da Lanza, Paula Luane Vales Lima, Marília da Pádua Donatas Costa+
Instituição: +Instituto de Ciências Biológicas

Sumário/comentários do protocolo:

Justificativa: O estudo de células-tronco tem recebido considerável atenção desde a descoberta de que células-tronco adultas têm a capacidade de formar diferentes tipos de tecidos. O avanço tecnológico tem ajudado a identificar o potencial das células-tronco e sua capacidade de regenerar os tecidos, não sendo estudada em modelos transplantados. Estudos de isolamento, natureza e potencial de diferenciação das células-tronco terão um impacto positivo no nosso conhecimento do desenvolvimento humano e de medicina regenerativa.
Comentário: Os argumentos apresentados justificam a realização do estudo.

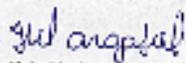
Objetivos: Pretendendo neste projeto isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco adultas isoladas da polpa dentária humana, do tecido adiposo (gênis do leite), tecido adiposo obtido de liposugração e do tecido do cordão umbilical humano, para estabelecer um banco dessas células para uso em pesquisas.
Comentário: Os objetivos são coerentes com a justificativa.

Metodologia: Devido ao fato de fácil acesso para obtenção dos materiais biológicos: polpa dentária (cáscara do "dente de leite"), do tecido adiposo derivado de liposugração e do tecido do cordão umbilical (gelatina de Wharton), tecidos esses que, como mencionado anteriormente, são caracterizados no texto, o estudo com as células-tronco adultas é muito interessante, pois, é uma fonte de células de quantidade não limitada (podem ser usadas várias vezes para estabelecer a cultura de células, quantidade enorme de tecido adiposo ou quase todo o comprimento do cordão umbilical) para um banco de células, sua futura aplicação na terapia celular e enriquecimento tecidual torna-se uma promessa (Perry et al., 2008). Suas características são semelhantes às células-tronco embrionárias humanas são muito importantes, além de não haver problemas éticos (Korits et al., 2008). Vale a pena mencionar que até pode ser interessante para uma criança na idade de "dente de leite" guardar seus dentes em um banco de células para eventual problemas de saúde no futuro (Perry et al., 2008), além dos demais tecidos aqui mencionados.
Comentário: A metodologia é adequada para responder a pergunta do estudo.

Revisão e referências: Deviam ser citadas no texto, atualizadas e adequadas.
Argumento: Claro e adequado.
Fonte de custeio: Pesquisadores.
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE: não elaborado, claro e preciso.
Qualificação do(a) pesquisador(a): Satisfatória.

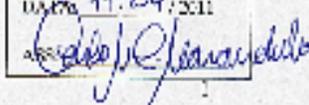
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEPURJF, da assim, com as atribuições definidas na Res. CNS 198/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
 Juiz de Fora, 17 de março 2011


 Profa. Dra. Ieda Maria Vargas Dias
 Coordenadora – CEPURJF

R13130

Data: 11.04.2011



ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (menores de 18 anos)

ESTUDO: “Isolamento, Caracterização e Diferenciação de Células-Tronco Adultas obtidas a partir da Polpa Dentária, Tecido Adiposo e Cordão Umbilical Humano”.

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto da pesquisa acima referido. Este estudo científico é importante para obtenção de células-tronco adultas, visando contribuir para o estabelecimento de linhagens celulares no Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), o qual poderá ser usadas em estudos laboratoriais para melhor compreensão dos potenciais dessas células-tronco quanto a bioengenharia tecidual. Esclarecemos também que a obtenção destes tecidos pelo nosso grupo de pesquisa não trazem riscos ao doador. Sua colaboração neste estudo será de grande importância.

Nome:.....

Data de Nascimento: ___/___/_____

Endereço:..... Nº.....Complemento:.....

Cidade:.....UF:.....CEP:.....

Tel:(....).....

Eu.....,RG:....., abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a)..... nascido(a) em ___/___/_____, seja voluntário do estudo **“Isolamento, Caracterização e Diferenciação de Células-Tronco Adultas obtidas a partir da Polpa Dentária, Tecido Adiposo e Cordão Umbilical Humano”.**

Sei que toda criança com idade entre 6 e 12 anos de idade tem dentes de leite que cairão naturalmente, portanto, para realização deste estudo, concordo em doar a polpa dentária de meu filho(a).

Declaro que obtive todas as informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas levantadas, concordando portanto que este tecido seja utilizado para obtenção de células tronco.

Estou ciente de que:

- I) Esta coleta será feita para este estudo e não causará nenhum problema ao meu(minha) filho(a).
- II) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- III) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a).;
- IV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;
- V) Se eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VII) Concordo que as amostras das linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia no Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba e que sejam utilizadas para os propósitos desta pesquisa.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20____.

.....
Responsável pelo(a) menor de 18 anos

Responsáveis pelo Projeto:

Dr Carlos Magno da Costa Maranduba
Professor Adjunto 1 Laboratório de Genética e Biotecnologia
Instituto de Ciências Biológicas/ UFJF
(32) 2102-3206 ramal 219

ANEXO C – Questionário para a realização do Heredograma

1. Quantos anos você tem? Quando seu filho(a) nasceu, quantos anos você tinha?
2. Onde você nasceu? Cidade e Estado?
3. Seu marido/esposa é seu(sua) primo(a)? Caso seja positiva essa resposta, qual o grau de parentesco?
4. Quantos filhos você tem? Por favor, coloque os nomes deles e idade. Ainda, se cada um deles tiver filhos (seus netos), coloque a quantidade, nome de cada um e de quem são filhos. Caso haja falecimento de algum deles, colocar o nome e qual era a idade da criança.
5. Pergunta somente para a mãe: Você já sofreu algum aborto? Quantos e com que idade? Existe relato de aborto em outras mulheres da família? Você saberia a idade delas na época?
6. Pergunta somente para o pai: Existe relato de aborto em outras mulheres da família? Você saberia a idade delas na época?
7. Quantos irmãos você tem? Por favor, coloque os nomes deles e idade. Ainda, se cada um deles tiver filhos (seus sobrinhos), coloque a quantidade, nome de cada um e de quem são filhos. Caso haja falecimento de algum deles, colocar o nome e qual era a idade dele(a).
8. Seus Pais estão vivos? Nome de cada um deles e idades. Em caso de falecimento, qual era a idade deles na época e qual a causa da morte?
9. Quantos irmãos seu Pai tem (tinha)? Nomes e idades de cada um (se não souber a idade, não tem problema). Esses seus tios paterno têm filhos? Identifique cada tio com seus respectivos filhos, e netos de cada um deles se houver. Ainda, idade se souber de cada um. Em caso de falecimento de um deles, qual era a idade na época e qual a causa da morte?
10. Quantos irmãos sua Mãe tem (tinha)? Nomes e idades de cada um (se não souber a idade, não tem problema). Esses seus tios materno têm filhos? Identifique cada tio com seus respectivos filhos, e netos se houver. Ainda, idade se souber de cada um. Em caso de falecimento de um deles, qual era a idade na época e qual a causa da morte?

11. Com todas as respostas acima de membros de sua família, existe algum relato de doença na família? Caso seja positivo, quem? Cite os nomes, uma vez que você já mencionou eles anteriormente nas perguntas.
12. Existe casamento entre parentes na família (primos, tio e sobrinha, etc)? Se sim, quem são as pessoas da família? Cite os nomes.