

---

Daniela Franco Bueno

Uso de Células Tronco Adultas para Estudo da  
Etiopatogenia das Fissuras Lábio Palatinas e  
Bioengenharia de Tecidos

São Paulo

2007

---

Daniela Franco Bueno

Uso de Células Tronco Adultas para Estudo da  
Etiopatogenia das Fissuras Lábio Palatinas e  
Bioengenharia de Tecidos

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de Doutor em  
Ciências, na Área de Genética e Biologia  
Evolutiva.

Orientador(a): Maria Rita dos Santos  
Passos Bueno

São Paulo

2007

---

Bueno, Daniela Franco  
Uso das Células Tronco Adultas para  
Estudo da Etiopatogenia das Fissuras Lábio  
Palatinas e Bioengenharia de Tecidos, 116 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências  
da Universidade de São Paulo. Departamento de  
Genética e Biologia Evolutiva.

1. Fissuras Lábio Palatinas 2. Células  
tronco adultas  
Universidade de São Paulo. Instituto de  
Biociencias. Departamento de Genética  
e Biologia Evolutiva.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

A todos os pacientes portadores de  
Fissuras Lábio Palatinas e  
Malformações Crânio Faciais.

## Agradecimentos

A DEUS, por ter me concedido uma família maravilhosa, bons amigos e o dom de trabalhar com pacientes portadores de malformações crânio faciais.

Aos meus amados pais, Daise e Francisco, por todo amor e todo apoio que me deram para que eu pudesse realizar esta tese.

À minha querida irmã, Fernanda, pela presença constante durante o desenvolvimento desta tese e por sempre levar minha sobrinha Beatriz ao meu encontro nos momentos de finalização deste trabalho, para que eu pudesse me alegrar nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Dra. Maria Rita Passos Bueno, com quem compartilhei durante a realização do meu doutorado seus profundos conhecimentos na área de genética humana, pelas oportunidades dispensadas, por ser uma grande orientadora e amiga. Muito obrigada, Rita, por guiar meus passos no árduo estudo de genética do desenvolvimento crânio facial, ontem, hoje e sempre.

À Dra. Lucy Dalva Lopes e ao Dr. Cássio Raposo do Amaral (“in memoriam”) por terem me transmitido seus conhecimentos profundos em reabilitação estética e funcional em pacientes portadores de deformidades craniofaciais e por terem me ensinado que precisamos de muito estudo, dedicação e persistência para proporcionar a estes pacientes uma correta reabilitação. Também pelo incentivo que me deram para que eu estudasse os mecanismos etiológicos das fissuras lábio palatinas.

À Dra. Mayana Zatz, Dra. Mariz Vainzof e Dra. Célia Koiffmann pelo apoio, incentivo e ensinamentos, foi um imenso prazer poder conviver com vocês.

À Dra. Irina Kerkis por me transmitir seus conhecimentos em células tronco e por sempre me ajudar no planejamento e execução dos meus experimentos, pela sua alegria, determinação e amizade.

À Dra. Marília T. Martins grande amiga e incentivadora desde o dia que ingressei no doutorado, sempre esteve presente. Obrigada pelo incentivo, pela amizade, pelos risos e por tudo que sempre fez por mim! Obrigada também por ter topado ser colaboradora neste projeto e ter realizado todos os cortes histológicos.

Ao Dr. Sergio Verjovski e Eduardo Reis do Instituto de Química pela colaboração na interpretação dos dados das lâminas de “*microarray*”.

À Marta Canovas pela ajuda na execução das imunofluorescências e pela amizade.

À Dra. Maristher Fabretti dos Santos Pinto, por ceder seu consultório odontológico para que eu pudesse realizar a exodontia dos dentes decíduos de pacientes envolvidos nesta pesquisa e principalmente por ser uma grande amiga, por sempre me dar bons conselhos, e por sempre manter sua energia positiva e a de todos à sua volta.

Ao André Mendonça pela ajuda com o experimento dos ratos e por fornecer a gordura de lipoaspiração para realização de parte do projeto.

A todos os funcionários, médicos, dentistas, psicólogos e fonoaudiólogos do Hospital SOBRAPAR, por toda ajuda na seleção dos pacientes e coleta do material para que eu pudesse realizar esta tese, especialmente a Dra. Ana Beatriz Almeida, Dr. Celso Buzzo, Dr. Cássio Eduardo Raposo do Amaral, Dra. Vera Raposo do Amaral e Marly .

A todos os amigos do “labrita”, do “labgenética” e “labcelulastronco”, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas boas risadas, pelo aprendizado...Vocês todos são e sempre serão pessoas muito especiais em minha vida.

À Dra. Andréa Setié, por ser um exemplo de pesquisadora e por me transmitir seus conhecimentos em biologia molecular e estar sempre presente para discutir meus projetos, minhas idéias e sempre com a maior paciência.

Ao Carlos Maranduba, Cibele Mazzoti, Eder Zucconi, Erica Kague, Flávia Errera, Lúcia Armelin Correa, Oscar T. Suzuki e Roberto Fanganiello, não consigo me lembrar de um segundo sequer que precisei de vocês e não fui atendida no mesmo momento. Vocês sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias, de tristezas e de conquistas, por este motivo seus nomes estão em ordem alfabética e vocês resumem esta frase: “Em nenhuma época da vida teremos dificuldade em alcançar os objetivos desejados se tivermos ao nosso lado pessoas amigas”. Muito Obrigada!

À Aline e Erica Yeh , obrigada por cuidarem das células e por me ajudarem nos experimentos, nos momentos de finalização do meu doutorado, saibam que sempre podem contar comigo.

À Patricia Adachi Ricardo, obrigada pela ajuda com a extração do DNA de parafina.

À Camila e ao Gerson, muito obrigada por me ajudarem com os ratos, a formatação da tese e figuras. Foi muito bom poder contar com vocês, quero que saibam que se tornaram meus amigos e podem sempre contar comigo.

À Constância Gotto por ser uma segunda mãe nestes anos de doutorado, sempre preocupada, rezando por mim...Muito Obrigada!, você sempre será uma pessoa especial.

Aos funcionários do Instituto de Biociências e do Centro de Estudos do Genoma Humano pela atenção dispensada a mim, especialmente ao Seu Valter, ao Roberto, a Vanessa, a Camila, a Kátia, a Marta e a Kelly, muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Gilberto Xavier e seus alunos por disponibilizarem a infra-estrutura de seu laboratório

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

## Índice

---

---

Resumo _____	1
Abstract _____	2
Capítulo I - Introdução e objetivos _____	3
Capítulo II - Material e Métodos _____	26
Capítulo III - Caracterização de linhagens de células tronco de polpas de dentes decíduos, de gordura de lipoaspiração e de osso medular " <i>in vitro</i> " e sua aplicação em modelos " <i>in vivo</i> " _____	37
Capítulo IV - Isolation and vitro and in vivo characterization of mesenchymal cells from lip muscle of patients with cleft lip and palate(CLP) _____	69
Capítulo V - Comparação do perfil de expressão gênica de células tronco adultas de pacientes portadores de Fissuras lábio palatinas e de indivíduos controles _____	90
Capítulo VI - Discussão e Conclusões _____	102
Capítulo VII - Referências Bibliográficas _____	105
Anexo I. VIII.1 _____	112
Anexo II A _____	113
Anexo II.B _____	114
Anexo II.B(1) _____	115
Anexo II C _____	116

## Resumo

---

As fissuras lábio palatinas (FLP) são as malformações faciais mais comuns presentes ao nascimento e correspondem a cerca de 25% de todos os defeitos congênitos. Sua incidência é alta, de aproximadamente 1/700 nascimentos e varia entre os diferentes grupos étnicos. Elas representam um problema relevante de saúde, pois os portadores necessitam para sua reabilitação estética e funcional de uma equipe multidisciplinar, do nascimento e geralmente, até a vida adulta, o que exige um alto custo econômico.

A etiologia das FLP não síndrômicas ainda é controversa na literatura, apesar de existirem esforços mundiais para identificar os fatores que causam esta patologia.

Nosso trabalho consistiu do estabelecimento e caracterização de 23 linhagens de células tronco adultas (CTA) obtidas de polpa de dentes decíduos (11 indivíduos, sendo 5 controles, 5 portadores de FLP não síndrômica e 1 portador da síndrome de Van der Woude), do músculo orbicular do lábio (5 indivíduos portadores de FLP), do osso medular (2 indivíduos portadores de FLP) e de gordura de lipoaspiração (5 controles), com o objetivo de utilizá-las para ajudar a elucidar os mecanismos etiológicos de origem genética das fissuras lábio palatinas não síndrômicas; bem como para utilizá-las para bioengenharia dos tecidos alterados nesta patologia, especialmente o tecido ósseo.

Demonstramos que os protocolos que utilizamos são facilmente reproduzidos e que as diferentes linhagens CTA obtidas tem plasticidade para diferenciação osteogênica “*in vitro*”, e que as CTA obtidas de polpa de dente e de músculo orbicular do lábio têm plasticidade para se diferenciar “*in vitro*” em tecido ósseo, muscular, condrogênico e adipogênico. Além disso, em nossos experimentos, demonstramos que estas CTA tem capacidade de regenerar grandes defeitos ósseos em ratos Wistar não imunossuprimidos, nos quais não observamos clinicamente nenhum tipo de rejeição destas células humanas.

Utilizamos uma metodologia inédita para estudar a etiopatogenia das FLP, que consistiu da obtenção de RNA das CTA de indivíduos portadores de FLP e de controles para posterior hibridação em lâminas de “microarray” e comparação do perfil de expressão gênica das mesmas. Observamos neste estudo preliminar que 367 genes estão diferencialmente expressos nas amostras, sendo todos mais expressos nas amostras dos portadores de FLP e sugerimos que esta é uma estratégia promissora para estudo da etiopatogenia das FLP.

Concluimos que a realização de estudos das CTA de afetados por FLP e de controles são importantes não só para utilização das mesmas em bioengenharia de tecidos, mas também para estudo da etiopatogenia das fissuras.



## Abstract

---

Clefts involving the lip and palate (CLP) or palate only (CP) represent the most frequent facial malformation during birth and correspond to approximately 25% of all congenital defects. The incidence of this problem is high; corresponding to approximately 1:700 births, but is different among the ethnic groups.

Clefts represent a major health problem due to the requirement of a multidisciplinary team to deal with the esthetical and functional rehabilitation needs of these patients from birth to, in some cases, adult life, resulting in a high treatment cost.

There still many controversies about the ethiology of non-syndromic CLP, even though there are researchers all over the world trying to identify the factors causing this pathology.

Our work consisted to establish and characterize 23 adult stem cells (ASC) lineages obtained from falling teeth dental pulp (5 controls, 5 non-syndromic CLP patients and 1 Van der Woude syndrome patient), *orbicular oris* muscle (5 non-syndromic CLP patients), bone marrow (2 non-syndromic CLP patients) and adipose tissue (5 controls). The objectives were to use these lineages to help elucidate the genetic mechanisms involved in the development of non-syndromic CLP, as well as, to bioengineer tissues affected by this pathology, mainly bone tissue.

The protocols we used are easily reproducible and we demonstrate that our different ASC lineages have *in vitro* plasticity to osteogenic differentiation, as well as, the lineages obtained from dental pulp and *orbicular oris* muscle have osteogenic, muscular, chondrogenic and adipogenic plasticity. Further more our experiments demonstrate that these ASC lineages have the capacity to regenerate major bone defects in non-immunocompromised Wistar rats, which did not develop any kind of rejection against these human cells.

We have used a new methodology to study the molecular mechanisms involved in CLP, which consisted in comparing the mRNA expression profile of ASC from non-syndromic CLP patients and controls, using microarrays. We observed that 367 genes were differently expressed between the two groups and all these genes have a higher expression in samples from non-syndromic CLP patients, thus suggesting that this is a promising strategy to study the molecular mechanisms involved in CLP.

In conclusion, studies involving ASC from non-syndromic CLP patients and controls are important not only to tissue bioengineering, but also to elucidate the molecular mechanisms involved in CLP.

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

---

### I. Considerações gerais

As fissuras lábio/ palatinas (FLP) são as malformações faciais mais comuns presentes ao nascimento e correspondem à cerca de 25% de todos os defeitos congênitos (Slavkin, 1992). Sua incidência é alta, de aproximadamente 0.5 a 2:1000 nascimentos e varia entre os diferentes grupos étnicos (Fraser, 1970; Vanderas, 1987; Tolarova & Cervenka, 1998; Gorlin *et al.*, 2002). Cerca de 350 síndromes apresentam FLP como parte de seu fenótipo (Gorlin *et al.*, 2002).

As FLP representam um problema relevante de saúde, pois os portadores necessitam para sua reabilitação estética e funcional de uma equipe multidisciplinar (médicos, dentistas, fonoaudiólogos, geneticistas, psicólogos, nutricionistas entre outros), do nascimento e geralmente até a vida adulta, o que exige um alto custo econômico (Gunther, 1995; Bueno & Lopes, 2003).

A etiologia das FLP ainda é controversa na literatura e o modelo de herança mais aceito para as formas não sindrômicas é o multifatorial. Apesar de existirem esforços mundiais para identificar os fatores que causam as fissuras, para que um dia medidas preventivas eficazes possam ser adotadas, são poucos os genes ou fatores de riscos identificados como de susceptibilidade as FLPs não sindrômicas. Assim sendo, estudos de novas estratégias metodológicas, como a utilização de células tronco adultas de pacientes portadores de FLP, poderão ajudar a elucidar os mecanismos etiológicos de origem genética envolvidos nesta patologia. Os estudos do uso das células tronco adultas em bioengenharia de tecidos também poderão trazer novas perspectivas para melhorar as técnicas de reabilitação estética e funcional na face e oclusão dentária destes pacientes num futuro próximo.

No Brasil, há vários centros de atendimento a portadores de fissuras que visam o tratamento desta malformação e à integração destes pacientes na sociedade. O Laboratório de Genética do Desenvolvimento Humano, integrante do Centro de Estudos do Genoma Humano, IB-USP, tem se dedicado à área de pesquisa em genética de fissuras lábio-palatinas desde 1995 e com o presente trabalho iniciamos as pesquisas com células tronco adultas de pacientes portadores de FLP não sindrômicos para estudar sua etiopatogenia, bem como sua utilização em bioengenharia de tecidos a ser aplicada nos portadores de FLP. Além disto também estudamos células tronco adultas de indivíduos não portadores de doenças genéticas ou sistêmicas, também com a

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

