



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE DECÍDUA COMO
UM MODELO *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA
NEUROFIBROMATOSE TIPO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
DO RESVERATROL NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA**

CLAUDINÉIA PEREIRA MARANDUBA

JUIZ DE FORA

2017

CLAUDINÉIA PEREIRA MARANDUBA

**CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE DECÍDUA COMO UM
MODELO *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA NEUROFIBROMATOSE
TIPO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO RESVERATROL NA
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador:

Dr. José Marcello Salabert de Campos

Co-orientador:

Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Juiz de Fora, MG

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Maranduba, Claudinéia Pereira.

Células-Tronco da Polpa de Dente Decídua como um modelo in vitro para o estudo da Neurofibromatose Tipo 1 : Avaliação dos efeitos do Resveratrol na proliferação e diferenciação osteogênica / Claudinéia Pereira Maranduba. -- 2017.

52 f. : il.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Coorientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Resveratrol. 2. Neurofibromatose tipo I. 3. Mineralização. 4. Células-tronco da polpa de dente decídua. I. Campos, José Marcello Salabert de, orient. II. Maranduba, Carlos Magno da Costa, coorient. III. Título.

**CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE DECÍDUA COMO UM MODELO *IN VITRO*
PARA O ESTUDO DA NEUROFIBROMATOSE TIPO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO
RESVERATROL NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA**

Claudinéia Pereira Maranduba

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas, área 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: ____/____/____.

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Orientador)

Prof. Dr. Leandro Marques de Resende
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro Interno)

Prof. Dr. Mateus Rodrigues Pereira
Faculdade Estácio de Sá
(Membro externo)

Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Suplente Interno)

Dedico este trabalho a Deus, minha
família e amigos que acreditaram em mim
e em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos, meu orientador e, sobretudo, um querido e grande amigo, pela pessoa e profissional que é. Obrigada por sua compreensão, confiança e amizade, não somente neste trabalho, mas em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

Aos meus pais, Margarida Rosa Pereira e Genebaldo Marciano Pereira (*in memoriam*), pelo apoio incondicional e incentivo.

Aos meus grandes amores, meu esposo Carlos e aos meus filhos Cauã e Caroline, pelo amor, incentivo, apoio, dedicação, amizade, compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos Elias, Osmar e Edgar pelo apoio, incentivo e convivência.

Aos cunhados: Elisangela, Noé, Luzia, Maria Pureza, Patrícia e Sérgio, e querido sobrinhos, agradeço e muito a torcida para que esse momento chegasse.

Aos queridos amigos do Laboratório GENETEC: Camila, Danielle, Francisco, Gustavo, João, Júlio, Rafaela e Urias pelo apoio imprescindível ao bom andamento deste estudo.

Aos Professores: Doutores Lyderson, Saulo, Marcelo e Michele, por atuarem direta ou indiretamente nesse trabalho, meu muito obrigada.

Aos demais colegas do Laboratório de Genética, grata pela convivência nas disciplinas.

Aos professores: Dra Nádia Raposo, Dr. Fernando de Sá Silva e Dr. Raúl, por colaborarem nesse projeto, muitíssimo obrigada.

Ao amigo Silvioney pela ajuda em todos os momentos, permitindo que o trabalho chegasse até aqui, meu muito obrigada.

As funcionárias Graça e Fernanda, muitíssimo obrigada por tudo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade, o meu MUITO OBRIGADA.

RESUMO

O Resveratrol, uma fitoalexina presente nas uvas e em outras plantas e, dada as propriedades terapêuticas, tais como anticâncer, antiviral, anti-inflamatório, antioxidante e neuroprotetor, tem chamado atenção de muitos pesquisadores. A atividade anticâncer, ou antiproliferativa, contribui para uma ação quimiopreventiva e estudos mostram que o Resveratrol afeta células tumorais. Os mecanismos do efeito antitumoral do Resveratrol não são completamente compreendidos, mas para uma variedade de células tumorais tratadas com Resveratrol é observado apoptose. O presente projeto de pesquisa teve como objetivo geral validar o modelo para estudo de doenças humanas usando as células-tronco da polpa dentária decídua, em especial para a doença Neurofibromatose Tipo I, observando os efeitos do resveratrol na proliferação e diferenciação osteogênica dessas células. Concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM de Resveratrol foram adicionadas aos meios de cultivo e após 3, 5 e 7 dias, a proliferação celular foi avaliada pela técnica de MTT. Para avaliar os efeitos do Resveratrol na diferenciação osteogênica, as concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM foram suplementadas nas culturas de células por 21 dias, sendo posteriormente coradas com Vermelho de Alizarina para quantificação das áreas mineralizadas através do espectrofotômetro. Foram observadas que nas células-tronco de dentes decíduos saudáveis, as quais foram usadas como controle, houve inibição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 25 e 50 μM no dia 7, enquanto nas células NF1 houveram inibições nas concentrações de 10, 25 e 50 μM no dia 5, e de todas as concentrações testadas no dia 7 ($p < 0,05$). De acordo com uma revisão sistemática realizada nesse projeto, observamos que, dependendo do tipo celular, células saudáveis podem apresentar tanto proliferação quanto inibição, dependendo das concentrações de Resveratrol. Existe um consenso entre os pesquisadores quanto a propriedade antitumoral do Resveratrol, e nossos resultados com as células NF1 corroboram com outros da literatura em função do perfil tumoral dessas células. Na parte de mineralização, o Resveratrol apresentou melhores depósitos de cálcio (>90%) para as concentrações de 10 e 25 μM . Mesmo afetando a proliferação celular nessas concentrações, observamos que o Resveratrol contribui para mineralização das células e apresenta potencial terapêutico para controle do crescimento dos neurofibromas e melhora da condição óssea dos pacientes.

Palavras-chave: Resveratrol, Neurofibromatose, Proliferação, Inibição, Mineralização

ABSTRACT

Resveratrol, a phytoalexin present in grapes and other plants and, due the therapeutic properties, such as anticancer, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective, has attracted attention of many researchers. The anticancer activity, or antiproliferative, contributes to a chemopreventive action and studies show that Resveratrol affects tumor cells. The mechanisms of the antitumor effect of Resveratrol are not fully understood, but apoptosis is observed for a variety of tumor cells treated with Resveratrol. The present research project had a general objective to validate the model for the study of human diseases using stem cells of deciduous pulp, especially for the disease Neurofibromatosis Type I, observing the effects of resveratrol on the proliferation and osteogenic differentiation of these cells. Concentrations of 5, 10, 25 and 50 μM Resveratrol were added to the culture media and after 3, 5 and 7 days, cell proliferation was assessed by the MTT technique. To evaluate the effects of Resveratrol on osteogenic differentiation, concentrations of 5, 10, 25 and 50 μM were supplemented in cell cultures for 21 days, and were subsequently stained with Alizarin Red for quantification of the mineralized areas by the spectrophotometer. It was observed that in the stem cells of healthy primary teeth, which were used as control, there was significant inhibition ($p < 0.05$) at concentrations of 25 and 50 μM at day 7, while in NF1 cells there were inhibitions at concentrations of 10, 25 and 50 μM on day 5, and all concentrations tested on day 7 ($p < 0.05$). According to a systematic review in this project, we observed that, depending on the cell type, healthy cells may exhibit both proliferation and inhibition, depending on the concentrations of Resveratrol. There is consensus among researchers regarding the antitumor property of Resveratrol, and our results with NF1 cells corroborate with others in the literature as a function of the tumor profile of these cells. In the mineralization part, Resveratrol presented better deposits of calcium ($> 90\%$) for concentrations of 10 and 25 μM . Even affecting cell proliferation at these concentrations, we observed that Resveratrol contributes to cell mineralization and has therapeutic potential to control the growth of neurofibromas and improve bone condition in patients.

Key words: Resveratrol, Neurofibromatosis, Proliferation, Inhibition, Mineralization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos isômeros trans-Resveratrol e cis-resverarol. Fonte: SAUTTER et al., 2005.....	14
Figura 2 – Contagem de células em Câmera de Neubauer. A proliferação de células foi maior nas culturas de células NF1 do que nos controles (* p <0,05).	31
Figura 3 - Micrografia após 7 dias de exposição das células NF1 ao Resveratrol. A, Células não tratadas com Resveratrol; B-E, células expostas a diferentes concentrações de Resveratrol. Objetiva de 10X e barra de escala: 100 µm.....	32
Figura 4 - Exposição do Resveratrol em células-tronco da polpa de dente decíduo saudável. Observa-se diferença estatística entre o SFB (10%) e 25 µM ou entre o SFB (10%) e 50 µM no dia 7 (p<0,05).....	33
Figura 5 - Exposição de Resveratrol em células-tronco de dente decíduo do paciente com NF1. Observam-se diferenças estatísticas (p<0,05) para as concentrações 10, 25 e 50 µM no dia 5, e de todas as concentrações testadas no dia 7.	33
Figura 6 - Avaliação da eficiência em diferentes concentrações de Resveratrol na mineralização de células osteogênicas após diferenciação. Note-se uma diminuição na proliferação de células NF1 em comparação com os controles. A eficiência de mineralização é evidente entre 10 e 25 µM (p<0,05). NT = Não tratado.	34
Figura 7 - Proliferação e mineralização de células NF1. A-E, microscopia de luz transmitida e A'-E', diferenciação osteogênica. A-A', Controle; B-B', células expostas a 5 µM de Resveratrol; C-C', 10 µM; D-D', 25 µM; E-E', 50 µM. Barra de escala: 100 µm.....	35
Figura 8 - Análise realizada com o software ImageJ. Micrografias mostrando as colorações de vermelho de alizarina (à esquerda) e as respectivas imagens convertidas em 8 bits (à direita das respectivas colunas). Os pontos pretos correspondem aos depósitos de cálcio nas células tronco da polpa de dentes decíduos induzidas a diferenciação osteogênica. Objetiva de 4X.....	36
Figura 9 - Quantificação dos depósitos de cálcio usando o software de análise de imagens, o ImageJ. Os dados representam a média ± desvio padrão.	37
Figura 10 - Fluxograma mostrando o processo de seleção de artigos publicados....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação Clínica.....	21
Tabela 2 - Dados técnicos das imagens adquiridas	28
Tabela 3 - Relação entre micrômetro e pixels	29
Tabela 4 - Proporção de mineração das células NF1 em diferentes concentrações de Resveratrol	35
Tabela 5 – Efeitos do Resveratrol no estímulo à proliferação em células saudáveis.	39
Tabela 6 – Efeitos do Resveratrol na inibição da proliferação de células saudáveis	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mM	(Milimolar)
mm	(milímetros)
MTT	(Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)
NF	(Neurofibrominina)
NF1	(Neurofibromatose tipo I)
SFB	(Soro Fetal Bovino)
SHED	(Células-Tronco de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos; do inglês, <i>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth</i>)
µg/ml	(Micrograma por mililitro)
µl	(Microlitro)
µM	(Micromolar)
µm	(Micrometro)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	ESTRUTURA QUÍMICA DO RESVERATROL	14
1.3	RESVERATROL E VIABILIDADE CELULAR	14
1.4	RESVERATROL E IMPACTOS NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	16
1.5	PROBLEMAS ÓSSEOS NA NEUROFIBROMATOSE TIPO 1	18
1.6	CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS	22
2.	OBJETIVO GERAL	24
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	COMITÊ DE ÉTICA	25
3.2	CULTIVO CELULAR.....	25
3.4	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL PELO ENSAIO DE MTT ...	26
3.5	DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA <i>IN VITRO</i>	26
3.6	DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS-TRONCO NA PRESENÇA DE RESVERATROL.....	27
3.7	COLORAÇÃO DE VERMELHO DE ALIZARINA	27
3.8	QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR ESPECTROFOTÔMETRO	27
3.9	QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR AVALIAÇÃO DAS IMAGENS USANDO O SOFTWARE IMAGEJ ...	28
3.10	REVISÃO SISTEMÁTICA	29
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS	31
4.1	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	31
4.2	O RESVERATROL AFETA A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA NF1.....	31
4.3	MINERALIZAÇÃO	34
4.4	VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ÁREAS MINERALIZADAS APÓS DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA ATRAVÉS DO SOFTWARE <i>IMAGEJ</i>	36
4.5	REVISÃO SISTEMÁTICA DOS EFEITOS DO RESVERATROL EM CÉLULAS SAUDÁVEIS.....	37
5	DISCUSSÃO	42
6	REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

As plantas, em geral, são capazes de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixa massa molecular, os quais são essenciais para o seu crescimento, reprodução e defesa (infecções, radiação ultravioleta, ferimentos e agressões externas). Muitos desses compostos são fenólicos, envolvendo desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (OLIVEIRA, 2010). Os compostos fenólicos presentes nas plantas são classificados em diversos grupos, como: ácidos fenólicos (ácido cinâmico e derivados do ácido benzóico), fenóis simples, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas, lignina e estilbenos (NACZK & SHAHIDI, 2004). Dentre os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos têm recebido especial atenção por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Os estilbenos representam um pequeno grupo dos fenilpropanóides, sendo que a maioria dos estilbenos naturais são derivados da unidade básica *trans*-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxytransstilbene). Muitos de seus derivados são extraídos de plantas e apresentam atividades biológicas e terapêuticas importantes. Desde que o Resveratrol foi detectado no vinho por Siemann e Creasy, os quais sugeriram que esse era um composto biologicamente ativo do vinho (SIEMANN & CREASY, 1992), o Resveratrol tem recebido especial atenção devido às suas atividades biológicas e possíveis aplicações medicinais (Chong *et al.*, 2009). O Resveratrol é encontrado em alguns tipos de casca de uva (principalmente na uva vermelha), possui propriedades terapêuticas, tais como: anticâncer (ATHAR *et al.*, 2007), antiviral (CAMPAGNA *et al.*, 2010), anti-inflamatório (Bandyopadhyay, 2009; Carrasco-Pozo *et al.*, 2012), antioxidante (Lee *et al.*, 2009) e neuroprotetor (Han *et al.*, 2009). Foi observado em roedores que o Resveratrol também favorece a redução da produção de LDL no fígado, sugerindo assim a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio ou derrame, atuando dessa forma como cardioprotetor (MIURA, MIURA & YAGASAKI, 2003).

1.1 ESTRUTURA QUÍMICA DO RESVERATROL

O Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) apresenta dois anéis aromáticos unidos por uma espécie de "ponte eteno" (RABESIAKA *et al*, 2011). Apresenta-se também como uma fitoalexina produzida naturalmente por várias espécies vegetais como: amendoim, eucalipto, amoras, framboesas, pinheiro, uvas, membros da família *polygonaceae*, entre outras (SAUTTER *et al*, 2005; KEREM *et al.*, 2006; RABESIAKA *et al*, 2011).

O Resveratrol é encontrado sob a forma de dois isômeros: o *trans*-Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-Resveratrol (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), sendo que o isômero *trans*-Resveratrol é convertido para *cis*-Resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável (Figura 1).

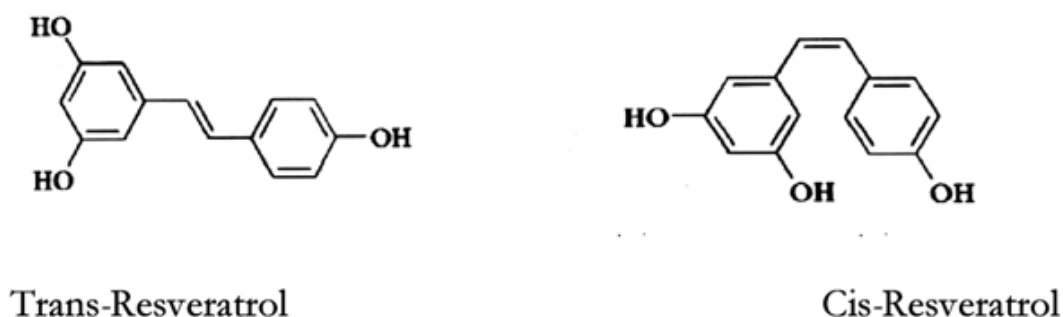


Figura 1 - Fórmula estrutural dos isômeros *trans*-Resveratrol e *cis*-resverarol. Fonte: SAUTTER *et al.*, 2005.

1.3 RESVERATROL E VIABILIDADE CELULAR

No músculo esquelético, o Resveratrol está envolvido na regulação do metabolismo muscular, o catabolismo protéico e função, sendo capaz para conferir resistência contra o estresse oxidativo, lesões e a morte de células do músculo esquelético. Vários trabalhos tem sugerido que o Resveratrol melhora a força e resistência dos músculos esqueléticos, tendo um papel ativo na diferenciação de músculos esqueléticos (PARK *et al.*, 2007; DIRKS NAYLOR, 2009; ALAMDARI *et al.*,

2012; KAMINSKI et al., 2012; KIM et al., 2013; MENZIES et al., 2013), entretanto seu mecanismo de atuação ainda é pouco compreendido.

De uma maneira geral não existe um consenso na literatura científica quantos aos efeitos do Resveratrol na parte muscular. Uma grande parte dos trabalhos relatam a eficácia do Resveratrol para melhora da função de contratilidade muscular e de metabolismo. Tem sido relatado, por exemplo, que o Resveratrol tem efeitos positivos sobre a função e massa muscular (LAGOUGE. et al., 2006; Dirks Naylor, 2009; PARK et al., 2012; TONKIN et al., 2012; BENNET et al., 2013), aumenta o metabolismo oxidativo das fibras, a função mitocondrial e a capacidade aeróbica muscular em roedores (LAGOUGE. et al., 2006; TONKIN et al., 2012), melhora a recuperação de massa muscular (BENNET et al., 2013) e reduz a morte de células musculares (Dirks Naylor, 2009). Outros trabalhos, no entanto, não encontraram efeitos benéficos do Resveratrol (FANG et al., 2000; ZHENG et al., 2000; PETERNELJ et al., 2011; STROBEL et al., 2011; GLIEMANN et al., 2013; HIGASHIDA et al., 2013), e até mesmo relatam efeitos tóxicos do Resveratrol em células e mitocôndrias (BOYER et al., 2012; SASSI et al., 2014), dependendo da dose de Resveratrol usadas.

MONTESANO et al. (2013) avaliaram o Resveratrol em mioblastos C2C12 em diferentes concentrações (0,1 e 25 μM) por 24, 48 e 72 horas e foi notado uma redução na taxa de proliferação celular. Após 72 horas de exposição ao Resveratrol, com cerca de 70% de confluência das células C2C12, o meio foi substituído por meio de diferenciação miogênica contendo Resveratrol (0,1 ou 25 μM) ou não (controle), sendo cultivadas por mais 24, 48, 72 e 96 horas. Após 24 horas de exposição ao Resveratrol na diferenciação miogênica, as células C2C12 apresentavam expressão de fatores de transcrição e marcadores de diferenciação específicos. Após 72 horas, foi observada uma alteração morfológica nas células tratadas com o Resveratrol em ambas as concentrações, sendo que as células perdiam sua forma arredondada original e assumiam outra forma específica, sendo morfolologicamente mais alongada, típica do fenótipo de células musculares. Os autores relataram que em nenhum momento houve injúria celular (apoptose). Segundo os autores, o Resveratrol deve controlar o ciclo celular promovendo a diferenciação miogênica *in vitro*, abrindo um novo campo de aplicação do Resveratrol em condições clínicas de lesões musculares.

BOSUTTI e DEGENS (2015) sugerem que 10 μM de Resveratrol induz a parada do ciclo celular e melhora a qualidade celular. Os autores relatam que não encontraram um aumento na formação de miotubos em mioblastos tratados com 10 μM de Resveratrol, indicando que tal concentração inibe a proliferação e promove as primeiras fases da diferenciação miogênica, mas não estimula a fase tardia de diferenciação de mioblastos. Com concentrações mais elevadas ($> 20 \mu\text{M}$) houve evidência para uma maior progressão do ciclo celular (aumento da proporção de células nas fases S+G2) e inibição, em vez de estimulação, de diferenciação como refletido pela formação de um broto quase completamente bloqueado e de fusão celular de mioblastos. Os autores sugerem que os efeitos do Resveratrol na diferenciação e proliferação são dependentes da dose.

De acordo com a literatura, concentrações elevadas de Resveratrol maiores 30 μM prejudicam a viabilidade celular (FANG et al., 2000; ZHENG et al., 2000; DORRIE et al., 2011; BOYER et al., 2012; KAMINSKI et al., 2012; SASSI et al., 2014). A diminuição da viabilidade celular pode ter relação com a atividade mitocondrial. Embora alguns estudos tenham mostrado efeitos benéficos do Resveratrol na função mitocondrial, também tem sido relatado uma inibição simultânea de NADH:ubiquinona oxidoredutase e F0F1-ATPase/ATP sintetase (FANG et al., 2000; ZHENG et al., 2000) e a acumulação de metabólitos na mitocôndria (SASSI et al., 2014) prejudicando significativamente a função mitocondrial.

Vários trabalhos mostram que a diminuição dos níveis de ATP em função de altas doses de Resveratrol despolarizam a membrana mitocondrial, gerando a produção de espécies de oxigênio reativas induzindo a apoptose. De acordo com os autores, o grau de citotoxicidade depende do tipo celular, organismo e/ou a dose, além do tempo de exposição ao Resveratrol. Aqui verificou-se a despolarização da membrana mitocondrial (ZHENG et al. (2000); RYAN et al., 2010; BOSUTTI & DEGENS, 2015).

1.4 RESVERATROL E IMPACTOS NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Existem vários estudos mostrando os efeitos do Resveratrol relação ao tecido ósseo. De acordo com a literatura, o Resveratrol estimula a diferenciação dos osteoblastos (MIZUTANI et al., 1998; DAI et al., 2007; ZHOU et al., 2009; ORNSTRUP

et al., 2014), inibe a atividade dos osteoclastos (BOISSY et al., 2005; SHAKIBAEI et al., 2011), e protege contra a perda óssea em ratos ovariectomizado, ratos imobilizados, e ratos idosos (PEARSON et al., 2008; HABOLD et al., 2011; DURBIN et al., 2013; ZHAO et al., 2013).

Recente estudo clínico avaliou os efeitos do Resveratrol *in vivo* para marcadores bioquímicos de remodelação óssea em um estudo randomizado controlado por placebo concebido para investigar os efeitos potenciais da suplementação e do Resveratrol em altas doses sobre o metabolismo do substrato, a sensibilidade à insulina e composição corporal (POULSEN et al., 2013). Homens obesos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, um grupo para ingestão de um placebo e o outro para ingestão de 1.500 mg de Resveratrol por dia durante 4 semanas. Foram encontrados um aumento significativo da fosfatase alcalina óssea, sem alterações em outros marcadores bioquímicos de remodelação óssea ou homeostase do cálcio (POULSEN et al., 2014).

ORNSTRUP et al. (2014) avaliaram pacientes que fizeram uso de placebo (controle), pacientes que fizeram ingestão de concentrações de 1000 mg e outro grupo de pacientes que ingeriram 150 mg de Resveratrol, todos durante 16 semanas de tratamento. Após esse período, os autores observaram, além do aumento da atividade fosfatase alcalina, um aumento do volume da coluna lombar dos pacientes que fizeram uso do Resveratrol. Dessa forma, os autores sugerem que o efeito do Resveratrol no tecido ósseo é dose-dependente e estimula a formação óssea e a mineralização ORNSTRUP et al. (2014).

Em recente estudo *in vitro* foi investigado se o Resveratrol afeta a proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, ou se a inflamação afeta negativamente a proliferação e diferenciação osteogênica, atuando o Resveratrol com um anti-inflamatório (ORNSTRUP et al., 2016). Inicialmente, as células-tronco mesenquimais foram obtidas de aspiração da medula óssea de 13 indivíduos saudáveis e posteriormente as linhagens estabelecidas foram diferenciadas para osteoblastos. As células foram estimuladas com Resveratrol (25 μ M), lipopolissacarídeo (LPS, 1000 ng/ml), LPS(1000 ng/ml)+Resveratrol (25 μ M), ou somente o veículo (controle) durante 21 dias. Em comparação com o controle, o Resveratrol diminuiu a taxa de proliferação celular em

35% ($p < 0,05$) e aumentou a diferenciação osteogênica, sendo constatado por um aumento de 3 vezes a fosfatase alcalino ($p < 0,002$) em relação ao controle. Na indução a inflamação com LPS houve um aumento de 44 vezes na produção de interleucina-6 ($p < 0,05$) e um aumento extremamente importante na produção de interleucina-8 ($P < 0,05$) em relação ao controle. Ainda, o LPS aumentou a proliferação de células ($p < 0,05$) e diminuição da diferenciação osteogênica ($p < 0,02$). A co-estimulação com LPS+Resveratrol não reduziu a interleucina-6 ou IL-8, mas, no entanto, observou-se uma redução na proliferação de células ($P < 0,05$) e um aumento da expressão de fosfatase alcalina ($P < 0,05$). Assim, conclui-se que o Resveratrol estimula a diferenciação dos osteoblastos de forma independente de inflamação (ORNSTRUP et al., 2016).

1.5 PROBLEMAS ÓSSEOS NA NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

Neurofibromatose tipo 1 (NF1) é a mais comum das doenças hereditárias agrupadas entre as neurofibromatose, sendo esta denominação utilizada para descrever anomalias genéticas nas quais os pacientes apresentam alta probabilidade de desenvolver tumores derivado de células do sistema nervoso. Os tumores são nomeados neurofibromas, na qual se desenvolvem nas bainhas nervosas periféricas constituindo de células neoplásicas de Schwann, fibroblastos, células perineurais e mastócitos (WILLIAMS et al., 2009), e schwannomas, na qual designam apenas a proliferação neoplásica de células de Schwann (HILTON & HANEMANN, 2014).

Neurofibromas são os principais achados em pacientes com NF1, enquanto schwannomas são características exibidas na Neurofibromatose Tipo 2 e Schwannomatosis (ARDERN-HOLMES & NORTH, 2011). A NF1 é uma doença autossômica de distúrbio genético dominante causada por uma mutação no gene *neurofibrina* (NF) que está localizado no cromossoma 17q11.2 (WALLACE et al., 1990). A NF atua normalmente, suprimindo a atividade da proteína Ras e o controle do ciclo celular. O NF mutado produzido em pacientes NF1 não interagem com a proteína Ras ativa, resultando em um ciclo celular não controlado adequadamente, aumentando a probabilidade de formação de tumor, o que parece ser uma característica fundamental da NF1 (BOYD, KORF AND THEOS, 2009).

Além da presença de neurofibromas que podem aparecer mais tarde na vida do paciente, existem vários fatores que possam auxiliar o diagnóstico clínico precoce. Uma delas é a existência de um primeiro grau relativo previamente diagnosticado com NF1, a presença de áreas de hiperpigmentação (manchas café com leite) típicas as quais são visíveis na infância, juntamente com nódulos de Lisch na íris, glioma do nervo óptico e, em até 50% dos pacientes, relatam-se algumas deformidades ósseas (FERNER, 2013). Esses achados clínicos são exibidos em intensidade muito variável, e a presença desses sinais em pacientes não é uma regra. Esta intrigante alta variabilidade pode aparecer mesmo entre indivíduos aparentados, mais provavelmente devido ao fato de genes modificadores podem atuar em cada um dos afetados (GARG et al., 2013). As diferenças fenotípicas em meio a pacientes não relacionados, assim apresentando mutações de novo o, é provável que derivam da expressão de genes modificadores, juntamente com as variações na região mutada no gene NF que irá, em certos casos, resultar em diferentes graus de perda de atividade de NF. Desde o sequênciã do gene NF é de longe mais na grande maioria das sequências de genes, é intuitivo pensar que haja um maior probabilidade de múltiplos alelos mutados para aparecer no população (GARG et al., 2013).

Embora estes resultados são extremamente necessário a fim de obter um diagnóstico clínico de NF1, a sua perceptível variabilidade impõe um obstáculo importante na previsão de sintomas futuros. Como resultado, há pouca coisa a ser feito no sentido de contornar qualquer das consequências desta doença, resultando assim, a necessidade de criar modelos adequados que podem ser utilizados para prever os padrões de alterações fisiológicas e patológicas em NF1. Wang et al. (2011) estudaram ratos com alelo NF mutado com essa finalidade, no entanto não resultam em fenótipos comparáveis aos presentes nos seres humanos.

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. Normalmente, 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 incidências 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.

Os problemas ortopédicos apresentam alta frequência em portadores de 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 a uma reduzida densidade mineral óssea (FERNER, 2007; BOYD, KORF e THEOS, 2009). Além disso, Stevenson et al (2006) demonstraram em pacientes NF1 uma 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).

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.

Tabela 1- Avaliação Clínica

Critérios Diagnósticos para NF1
√ Seis ou mais manchas café com leite maiores que 5mm em indivíduos pré-puberais 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.
√ Sardas axilares ou inguinais;
√ Tumor na via óptica;
√ Dois ou mais nódulos de Lisch;
√ Lesão óssea característica (descrita na página 22);
√ Um parente de primeiro grau afetado com NF1 que preencha os critérios precedentes.

As células tronco adultas, em geral, são considerados como um modelo útil para compreensão de várias doenças (SILVA et al., 2012), reforçando a possibilidade da sua utilização como um modelo para o estudo para a Neurofibromatose predizendo no início da vida de portadores quais alterações provavelmente irão desenvolver.

1.6 CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS

Vários tipos de células-tronco têm sido isoladas da dentição humana que incluem, Células-Tronco da Polpa Dentária Humana (GRONTHOS et al., 2000), Células-Tronco do Ligamento Periodontal (SEO et al., 2004), Células-Tronco da Papila Apical (HUANG et al., 2009), Células Progenitoras do Germe Dental (IKEDA et al., 2008) e Células-Tronco de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos (do Inglês, *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* – SHED) (MIURA et al., 2003).

As SHED foram identificadas como sendo uma população de células autorrenováveis, altamente proliferativas e capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo células neuronais, adipócitos e odontoblastos (MIURA et al. 2003; TIRINO et al. 2011). Além disso, demonstram propriedades de células-tronco típicas as quais incluem clonogenicidade, proliferação celular extensiva e multipotência, e se destacam por possuírem mais eficiência em determinadas características quando comparadas com células-troncos isoladas de medula óssea, como maior potencial imunossupressor (YAMAZA et al., 2010). Estudos mais aprofundados de uma população mais restrita de CTPD humanas demonstraram uma rápida expansão e proliferação *in vitro* e a expressão de alguns marcadores de células-tronco mesenquimais, tais como o STRO-1 e CD146 (MIURA et al., 2003).

O fato das SHED serem isoladas de dentes decíduos e de alguns trabalhos mostrarem que estas células expressam Nestin (molécula presente em células da linhagem neuronal e em células originadas da crista neuronal embrionária) e Oct-4 (marcador embrionário), acredita-se que as SHED possuem a facilidade de diferenciarem-se para células das linhagens mesenquimal e ectodermal (CHAI et al., 2000, HUANG et al., 2009, MIURA et al., 2003, YAMAZA et al., 2010). Além disso, trabalhos tem mostrado a capacidade imunomoduladora das células-tronco da polpa dentária (PIERDOMENICO et al., 2005; SILVA, et al., 2014). Essas células também se destacam por um fato importante, pois desenvolvem tecidos que podem conter células-tronco distintas dos tecidos maduros (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2009).

As SHED são particularmente úteis uma vez que eles podem ser isolados a partir de um tecido facilmente extraído (CORDEIRO et al., 2008), estando disponível para coleta logo no início da vida de uma criança (4-8 anos de idade). Tal período de

vida coincide com o início de hiperpigmentação (manchas do café-com-leite) em pacientes com Neurofibromatose, sendo utilizadas como parte do diagnóstico clínico da doença. Além disso, o protocolo de diferenciação osteogênica das SHED é bem estabelecido (KARBANOVÁ et al., 2010). Este processo de diferenciação provavelmente está alterada em indivíduos NF1, considerando-se que 50 % deles apresentam deformidades ósseas (LESKELÄ et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa propôs usar as SHED como modelo para estudo de duas características relacionadas a Neurofibromatose Tipo 1 (NF1): a capacidade de proliferação aumentada e diferenciação osteogênica alterada (ALMEIDA et al., 2015). As células-tronco foram isoladas de dentes decíduos de uma criança com 6 anos de idade apresentando somente manchas do café-com-leite, com diagnóstico clínico para NF1 e de outras duas crianças de mesma faixa etária, como controles. A taxa de proliferação celular foi realizada pela contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para comparação da diferenciação osteogênica, foi usado meio de diferenciação com indutores químicos e as células foram posteriormente coradas com Alizarina para quantificação dos níveis de mineralização alcançados. Também foram avaliados a expressão gênica de marcadores osteoblásticos pela técnica de RT-PCR (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*) (ALMEIDA et al., 2015). Foi observado que as células do paciente com NF1 apresentavam alta ataxa de proliferação quando comparadas aos controles, e a princípio a diferenciação osteogênica ocorreu como esperado, tanto para as células NF1 quanto os controles, relacionados a morfologia e expressão para os marcadores osteoblásticos (*ALP*, *BMP2*, *BMP4*, *OCN* e *SPP1*). Pela avaliação da coloração com Vermelho de Alizarina, observou-se uma fraca mineralização por parte das células NF1, considerando que poucos depósitos de cálcio foram visualizados sob microscopia de luz transmitida e uma pequena quantidade de alizarina pode ser quantificada por espectrometria após a extração de células coradas. Nosso grupo de pesquisa sugere que as SHED podem ser utilizadas como modelo de estudo de NF1 e pode prever o prognóstico dos pacientes, uma vez que seu comportamento *in vitro* parece imitar pelo menos as duas características para essa doença: fraca mineralização de células diferenciadas para osteoblastos e alta taxa de proliferação (ALMEIDA et al., 2015).

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo geral validar o modelo para estudo de doenças humanas usando as células tronco da polpa dentária decídua, em especial para a doença Neurofibromatose Tipo I, observando os efeitos do Resveratrol.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar os efeitos do Resveratrol na taxa de proliferação celular de células tronco da polpa de dentes decíduos humanos.
- Observar os efeitos do Resveratrol na mineralização das células tronco da polpa de dentes decíduos humanos induzidas a diferenciação osteogênica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

As linhagens de células tronco da polpa dentária de dentes decíduos foram obtidas de crianças saudáveis e de um paciente com 6 anos de idade com diagnóstico de Neurofibromatose Tipo I, apresentando somente manchas do café-com-leite, após aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP/UFJF Parecer CAAE no27681214.7.0000.5147) e se encontram estocadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC; Parecer 22/2015 -Processo nº 25000.113045/2014-88) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2 CULTIVO CELULAR

O processamento da polpa dentária foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Gronthos et al. (2000) e cultivada em garrafas 25 cm² (Corning) usando meio basal constituído de meio α -MEM (LGC Biotecnologia), suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (SFB) (Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina (LGC Biotecnologia), 2 mM L-glutamina (LGC Biotecnologia) e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia). A cultura foi mantida a 37°C a uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% CO₂, até atingir confluência máxima de 80-90%. A seguir, as células foram lavadas com salina estéril e submetidas a uma solução de 0,25% tripsina – 1 mM EDTA (Sigma) por cerca de 3 minutos a 37°C, para que as ligações das células com a matriz extracelular fossem desfeitas. A tripsina foi inativada utilizando SFB. Após a tripsinização as células resuspendidas em 1 mL de meio completo foram contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em placas de 96 poços para diferenciação osteogênica.

3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Cerca de 1×10^4 células de cada linhagem foram plaqueadas (Dia 0) em placas de petri de 60 mm e cultivadas nas condições descritas no item anterior, sendo os

experimentos realizados em triplicatas. Nos dias 2, 4, 6, 8 e 10, as células foram dissociadas com a ação de tripsina e contadas com auxílio da câmara de Neubauer.

3.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL PELO ENSAIO DE MTT

Para avaliar o padrão de proliferação das células tronco da polpa de dente decíduo em diferentes concentrações de Resveratrol, 500 células foram plaqueadas em placas de 96-poços (Corning, USA). Após 24 horas, foram adicionados ao meio de cultura 5, 10, 25 e 50 μM , respectivamente, totalizando para cada concentração 12 repetições. Após 3, 5 e 7 dias de cultivo, as leituras foram realizadas. Para tanto, meio de cultivo foi removido e foram adicionados 90 μl de meio puro mais 10 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 100 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 100 μl de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) a absorvância de 570 nm.

3.5 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO*

Uma densidade inicial de 5×10^3 células (Passagem P7) foram semeadas (D0) em placas de 24-poços (Corning) e cultivadas por 24 horas com meio de basal de cultivo celular e incubadas em estufas com 5% CO_2 e temperatura de 37°C para aderirem ao fundo da placa. No dia seguinte (D1), o meio basal foi substituído pelo meio de indução osteogênica contendo DMEM-Low Glucose (LGC Biotecnologia), soluções de 10^{-7} M de dexametasona (Sigma), 50 μM de 2-fosfato ácido ascórbico (Sigma), 2 mM de β -glicerolfosfato (Sigma) e suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 0,01 mM de aminoácidos não essenciais. A cultura foi mantida por 21 dias, trocando-se o meio a cada três dias, como descrito por Zuk et al (2002). Após a diferenciação osteogênica (21 dias), a placa de cultura foi submetida a coloração com vermelho de alizarina.

3.6 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO NA PRESENÇA DE RESVERATROL

A diferenciação foi realizada nas mesmas condições descritas acima, entretanto, adicionou-se o Resveratrol ao meio de diferenciação osteogênica apenas no grupo experimental. Os experimentos foram realizados em duplicata e foram avaliadas as concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM .

Após a diferenciação osteogênica, a placa de cultura foi corada com vermelho de Alizarina, como descrito a seguir, e fotografada com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F).

3.7 COLORAÇÃO DE VERMELHO DE ALIZARINA

As culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (v/v) por 24 horas e coradas com a técnica Vermelha de Alizarina, específica para diferenciação osteogênica, que foi realizada como se segue. As placas foram lavadas com água destilada e as células foram fixadas com etanol a 70% (v/v) durante 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas mais uma vez com água destilada e as placas mantidas abertas até secagem total à temperatura ambiente. Depois, as placas foram preenchidas com uma solução contendo 1% (v/v) de Vermelho de Alizarina e 1% (v/v) de hidróxido de amônio na proporção 10:1, respectivamente, e mantidas sob agitação leve à temperatura ambiente por 45 minutos (Forma Orbital Shaker, Thermo, EUA). O excesso de coloração foi removido após agitação e as placas foram mantidas abertas até à secagem. Finalmente, 10 campos aleatórios de visão de cada linhagem foram fotografados com o auxílio do microscópio invertido em fase (Nikon TS100F, Japão).

3.8 QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR ESPECTROFOTÔMETRO

Para quantificar os depósitos de cálcio impregnados pela coloração Vermelho de Alizarina, em cada poço foi adicionado 250 μL de uma solução de extração (1% (v/v) de ácido acético e 1% (v/v) de metanol na proporção de 4:1). Posteriormente, as

placas foram levadas para o agitador (Forma Orbital Shaker, Thermo, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

O conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa e 200 μL da solução de extracção foram utilizados como solução em branco para calibrar o espectrofotómetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, EUA). A concentração de cálcio foi relacionada com a absorvância a 495 nm.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO APÓS COLOCAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA POR AVALIAÇÃO DAS IMAGENS USANDO O SOFTWARE IMAGEJ

Foram obtidas cinco imagens das diferenciações osteogênicas, tanto das células NF1 quanto SHED (controle), por meio do *Software MOTIC Image Plus 2.0ML* (Motic China Group Co. Ltd.). As análises das áreas mineralizadas foram realizadas com o *Software ImageJ* (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Para tanto, estabelecemos a correlação de μm e pixels de cada imagem, conforme descrito na Tabela 2. O *Ratio* 0,61 foi usado para calibragem do *software*.

Tabela 2 - Dados técnicos das imagens adquiridas

	Imagens	
	Largura x Altura	
Resolução	1024 X 768 pixels	625 x 455 μm
Relação	pixels/ μm	$\mu\text{m}/\text{pixels}$
	$(1024 / 625) = 1,64$	$(625 / 1024) = 0,61$

Sabendo-se que o número de pixels da imagem de uma célula em uma câmara de CCD depende da (1) ampliação (objetiva) usada e do (2) tamanho físico dos pixels na câmara CCD, relacionamos o tamanho de uma célula em pixels para o seu tamanho em μm , utilizando a seguinte fórmula (disponível em <http://openwetware.org/wiki/Methods_to_determine_the_size_of_an_object_in_microns>; Acessado em 25/06/2016):

$$\text{Tamanho da célula por pixel} = \frac{\text{Comprimento físico de um pixel no CCD}}{\text{Ampliação total (Objetiva usada)}}$$

Dessa forma conseguimos estabelecer os parâmetros para ajustes dos do *Software ImageJ*, como apresentados na Quadro 2 para cada objetiva, sendo que as imagens foram capturadas na objetiva 4X. Dessa forma, usamos o coeficiente 0,1525 na medida da área dos depósitos de cálcio.

Tabela 3 - Relação entre micrômetro e pixels

	Relação
Objetivas	µm / Pixel
4x	0,1525
10x	0,061
20x	0,0305
40x	0,0153

3.10 REVISÃO SISTEMÁTICA

Foi realizado um estudo sistemático visando identificar pesquisas que abordassem os efeitos do Resveratrol na proliferação de células saudáveis (sem efeito inibitório, ou células com características tumorais), sendo todos trabalhos realizados *in vitro*.

Foram seguidas as diretrizes do PRISMA Statement (MOHER et al. 2009) e pesquisas em revistas científicas foram realizadas no banco de dados eletrônico PubMed (U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health), com ajuda do software Endnote X7.5® (Thomson Reuters), para organização dos estudos.

Foram excluídos dessa análise estudos *in vivo*, células com perfil tumoral, estudos com nanopartículas e artigos em outro idioma que não fosse o inglês.

As palavras-chave usadas nas buscas foram: Resveratrol AND Proliferação AND (*in vitro*).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de todas as análises realizadas com o *Software ImageJ* foram avaliadas no GraphPad Prism7 (GraphPad *Software* Inc.), aplicando o teste *t-student* e os dados apresentados como média \pm desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Para avaliação da proliferação das células-tronco da polpa dentária, todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para as variáveis analisadas, foi utilizado a ANOVA *two way*; quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). O *software* utilizado em todos os testes estatísticos foi o GraphPad Prism7 (GraphPad *Software* Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Como relatado previamente por ALMEIDA et al. (2015), observou-se que as células do paciente com NF1 apresentaram um perfil tumoral, proliferando-se de modo significativo ($p < 0,05$) quando comparadas as células saudáveis (controle) (Figura 2).

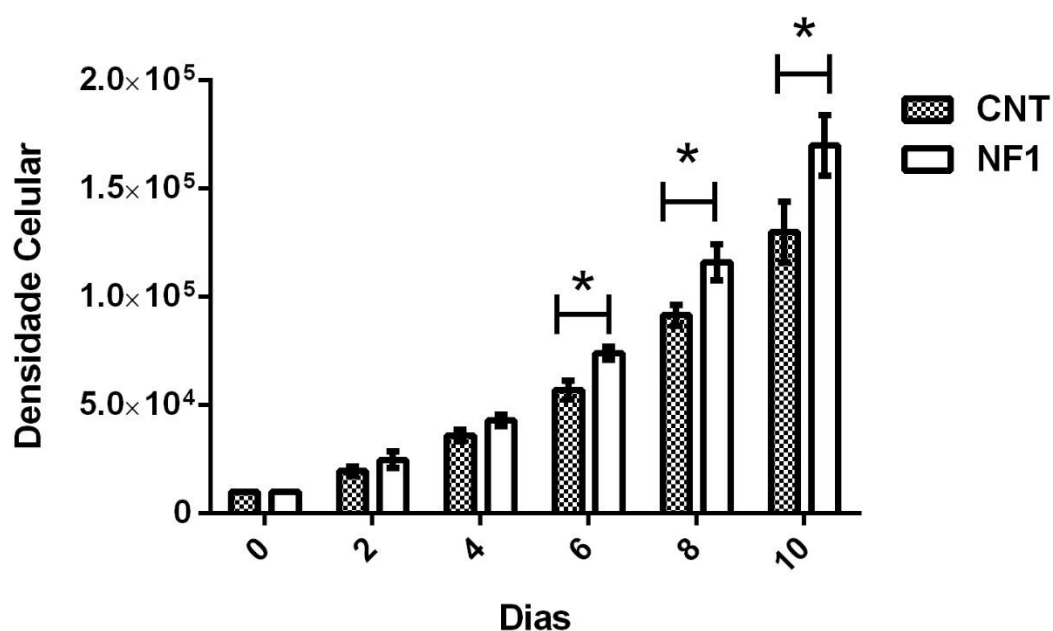


Figura 2 – Contagem de células em Câmara de Neubauer. A proliferação de células foi maior nas culturas de células NF1 do que nos controles (* $p < 0,05$).

4.2 O RESVERATROL AFETA A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA DECÍDUA NF1

Inicialmente, foram observadas, através da luz transmitida, que a proliferação celular NF1 é afetada com a exposição a diferentes concentrações de Resveratrol. Na Fig. 3A é apresentado as células NF1 sem o tratamento com Resveratrol apresentando uma confluência total das células. Nota-se que em 5 μM (Fig. 3B), 10 μM (Fig. 3C), 25 μM (Fig. 3D) e 50 μM (Fig. 3E), o Resveratrol se torna citotóxico de um modo dependente da dosagem.

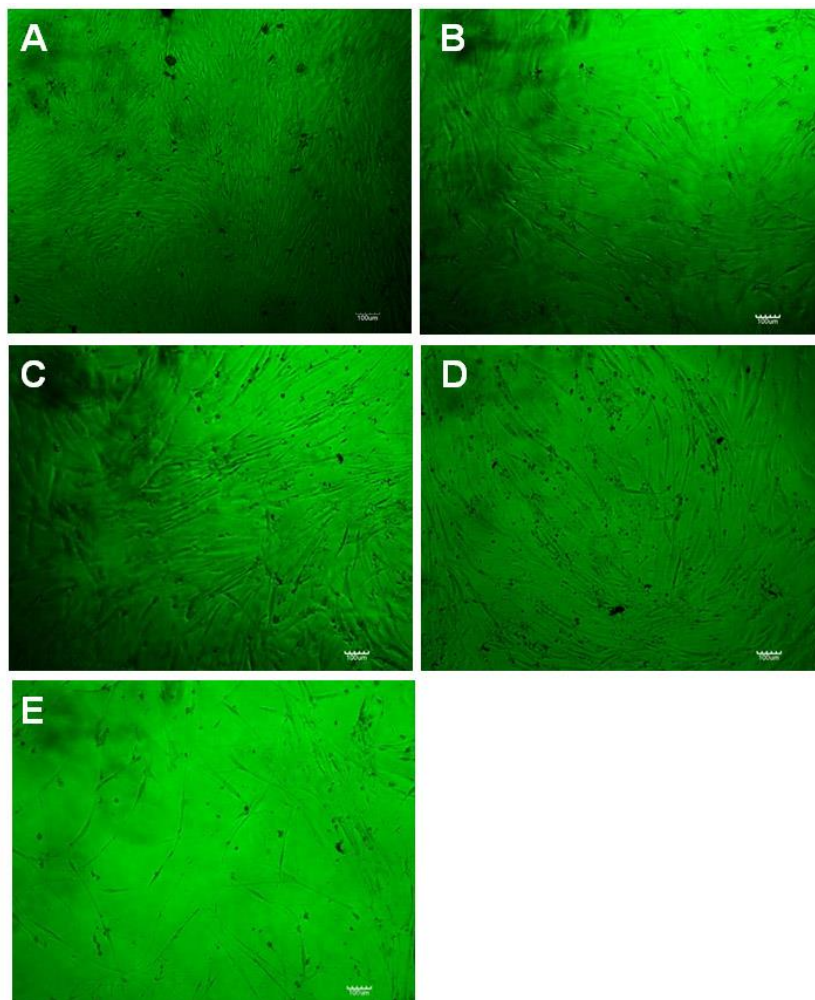


Figura 3 - Micrografia após 7 dias de exposição das células NF1 ao Resveratrol. A, Células não tratadas com Resveratrol; B-E, células expostas a diferentes concentrações de Resveratrol. Objetiva de 10X e barra de escala: 100 μ m.

Comparando-se a proliferação das NF1 com as células SHED (controle), observamos que diferentes concentrações de Resveratrol afetam a proliferação das células saudáveis (Fig. 4), sendo mais acentuada nas células NF1 em um modo dependente do tempo e da dose, sendo justificável nessas por apresentarem um perfil tumoral (Fig. 5).

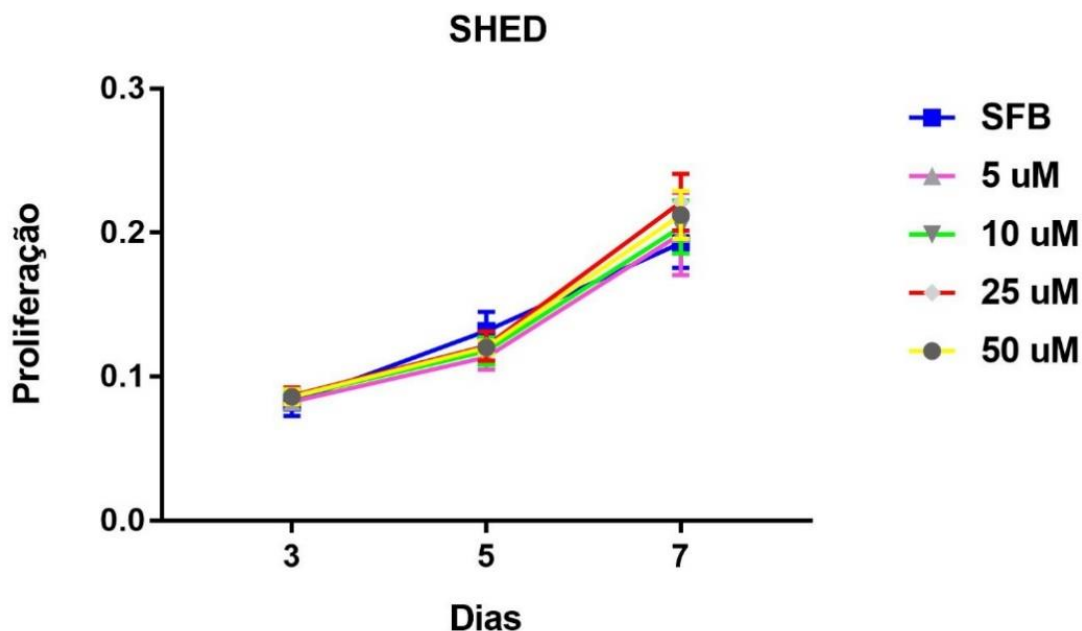


Figura 4 - Exposição do Resveratrol em células-tronco da polpa de dente decíduo saudável. Observa-se diferença estatística entre o SFB (10%) e 25 μ M ou entre o SFB (10%) e 50 μ M no dia 7 ($p < 0,05$).

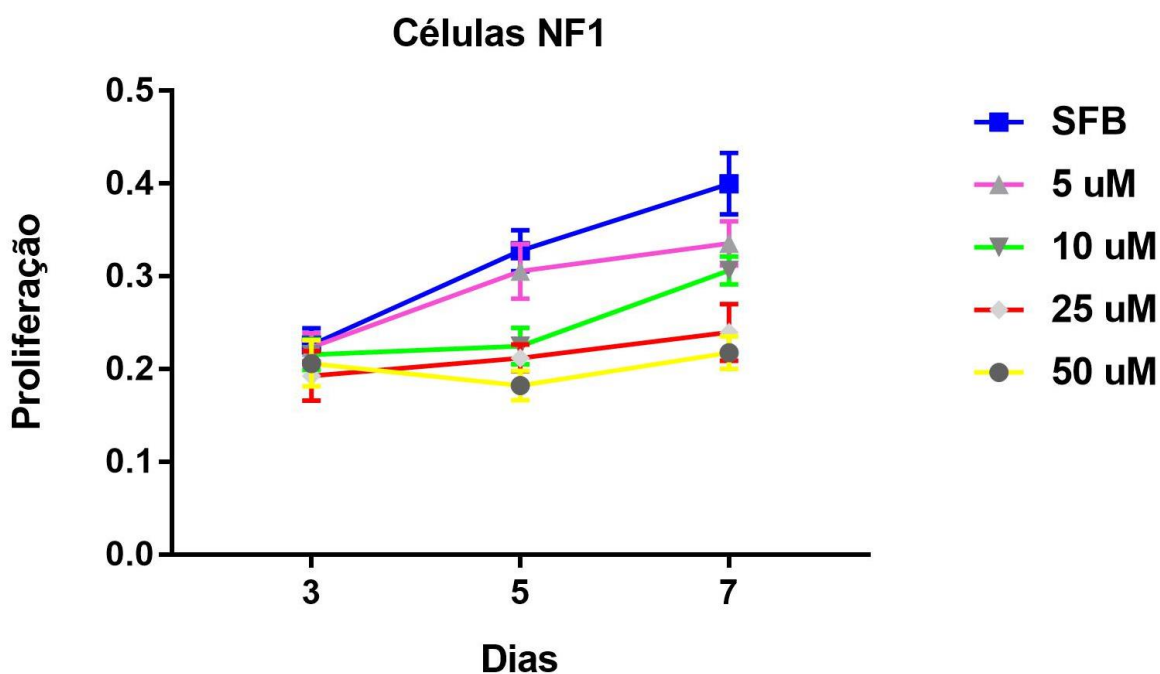


Figura 5 - Exposição de Resveratrol em células-tronco de dente decíduo do paciente com NF1. Observam-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para as concentrações 10, 25 e 50 μ M no dia 5, e de todas as concentrações testadas no dia 7.

4.3 MINERALIZAÇÃO

As células-tronco da polpa de dentes decíduos foram induzidas a diferenciação osteogênica. Em relação as células SHED (controle), as células NF1 que não foram expostas ao Resveratrol (Fig. 6) apresentaram uma deficiência significativa ($p < 0,05$) nos depósitos de cálcio de 27,78% (Tabela 2). Quando as SHEDs (controle) e NF1 eram suplementadas com 5 μM , havia um aumento significativo ($p < 0,05$) da mineralização e a deficiência em relação ao controle diminuiu a 11,68%. Apesar da redução da proliferação celular ser dependente da dose, como relatado previamente, nas concentrações de 10 μM e 25 μM foram observadas acentuadas mineralizações, sendo a porcentagem de 9,82% e 9,38%, respectivamente ($p < 0,05$). Com concentrações de Resveratrol de 50 μM , a proliferação (Figura 5) foi muito reduzida em função da alta citotoxicidade relatada na literatura.

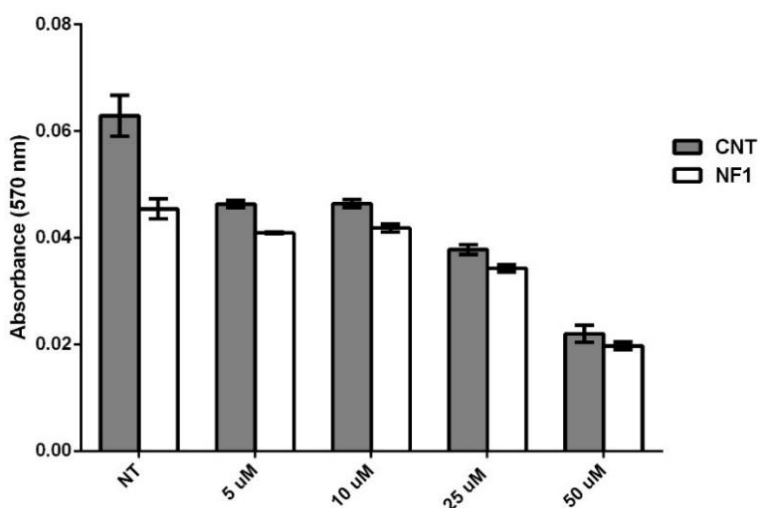


Figura 6 - Avaliação da eficiência em diferentes concentrações de Resveratrol na mineralização de células osteogênicas após diferenciação. Note-se uma diminuição na proliferação de células NF1 em comparação com os controles. A eficiência de mineralização é evidente entre 10 e 25 μM ($p < 0,05$). NT = Não tratado.

Tabela 4 - Proporção de mineralização das células NF1 em diferentes concentrações de Resveratrol

	Absorbância média		Proporção de mineralização em relação ao controle (%)
	CNT	NF1	
Não tratadas	0,063	0,045	72,22
5 μ M	0,046	0,041	88,32
10 μ M	0,046	0,042	90,18
25 μ M	0,038	0,034	90,62
50 μ M	0,022	0,020	89,54

Na Fig. 7 são apresentadas imagens de luz transmitidas do microscópio, onde percebe-se (Fig. 7 A-E) uma diminuição da confluência com o aumento da concentração do Resveratrol. Após indução da diferenciação osteogênica das células tronco da polpa de dentes decíduos e posterior coloração com Vermelho de Alizarina (Fig. 7 A'-E'), nota-se que o Resveratrol de fato afetou a proliferação celular de modo significativo ($p < 0,05$), pois observa-se mais áreas do fundo da placa de cultivo em relação as células não expostas ao Resveratrol (controle). Por outro lado, as concentrações de 10 μ M e 25 μ M foram aquelas que apresentaram melhores mineralizações por parte das células diferenciadas.

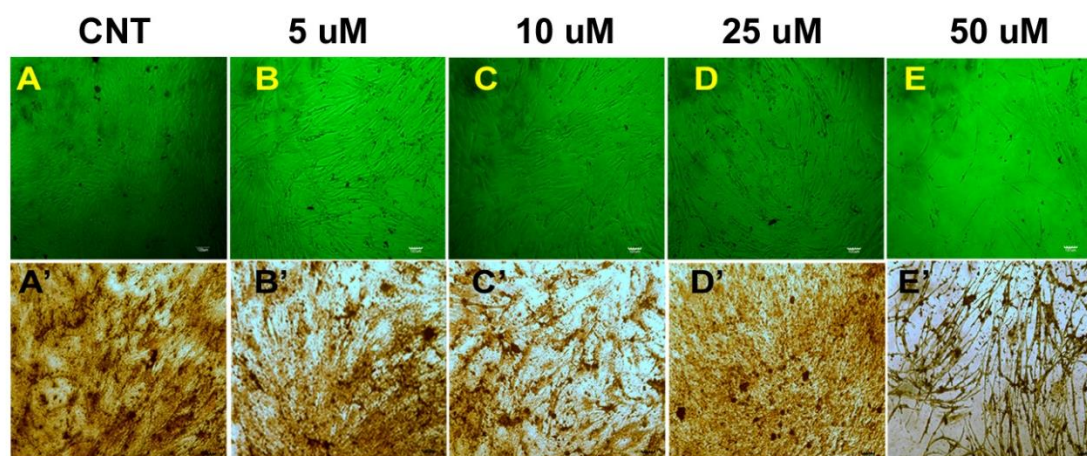


Figura 7 - Proliferação e mineralização de células NF1. A-E, microscopia de luz transmitida e A'-E', diferenciação osteogênica. A-A', Controle; B-B', células expostas a 5 μ M de Resveratrol; C-C', 10 μ M; D-D', 25 μ M; E-E', 50 μ M. Barra de escala: 100 μ m.

4.4 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ÁREAS MINERALIZADAS APÓS DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA ATRAVÉS DO SOFTWARE *IMAGEJ*

Após diferenciação osteogênica das células-tronco da polpa de dentes decíduos, imagens foram capturadas como apresentados na Figura 8. Todas as imagens foram convertidas em escala de branco/preto (8-bit) através do *software ImageJ* e os pontos pretos correspondem as áreas mineralizadas, as quais foram quantificadas como $\mu\text{m}/\text{pixel}$ com parâmetros pré-estabelecidos.

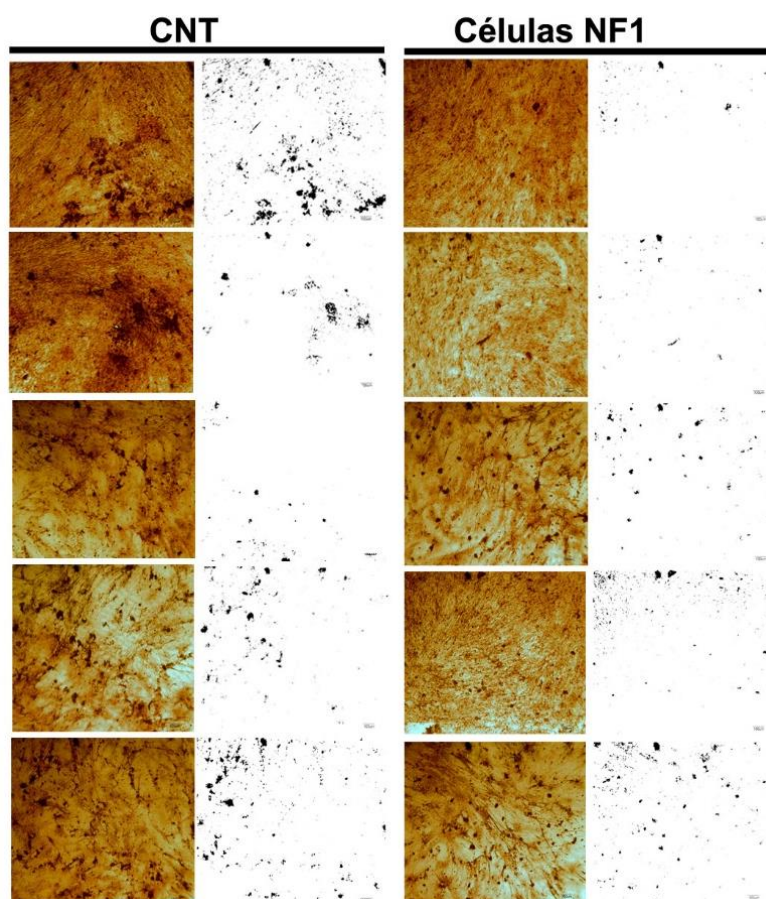


Figura 8 - Análise realizada com o software ImageJ. Micrografias mostrando as colorações de vermelho de alizarina (à esquerda) e as respectivas imagens convertidas em 8 bits (à direita das respectivas colunas). Os pontos pretos correspondem aos depósitos de cálcio nas células tronco da polpa de dentes decíduos induzidas a diferenciação osteogênica. Objetiva de 4X.

Os dados obtidos da análise *in sílico* foram quantificados (Figura 9) e foi observado uma redução significativa no depósito de cálcio de 25,17% ($p < 0,05$) em relação ao controle, dados esses semelhantes aos obtidos anteriormente por ALMEIDA et al. (2015).

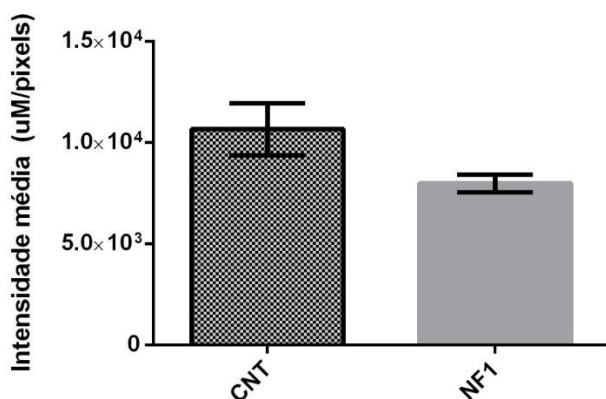


Figura 9 - Quantificação dos depósitos de cálcio usando o software de análise de imagens, o ImageJ. Os dados representam a média \pm desvio padrão.

4.5 REVISÃO SISTEMÁTICA DOS EFEITOS DO RESVERATROL EM CÉLULAS SAUDÁVEIS

Como apresentado no fluxograma (Fig. 10), um total de 9.235 artigos contendo a palavra “Resveratrol” foi encontrado, sendo removido quatro artigos em duplicata no mesmo banco de dados, sendo então selecionados 9.231 artigos. Como critério de inclusão, foram triados os artigos que continham as palavras: Resveratrol AND Proliferação AND (in vitro), resultando em 200 artigos. Sobre esses artigos, aplicou-se o critério de exclusão, sendo removidos 175 artigos dos quais abordavam sobre estudos *in vivo*, ou que abordassem exclusivamente sobre células cancerígenas, estudos com nanotecnologia, ou estarem em outro idioma que não o Inglês. Dessa forma, restaram 25 artigos que foram avaliados pelo título e resumos, sendo excluídos dois artigos por não estarem acessíveis o arquivo (PDF). Dos 23 artigos restantes, todos esses foram incluídos para análise, sendo separados na Tabela 3 estudos aqueles sobre o efeito do Resveratrol no estímulo à proliferação de células saudáveis. Na Tabela 4 são apresentados artigos relatando o efeito inibitório em células saudáveis.

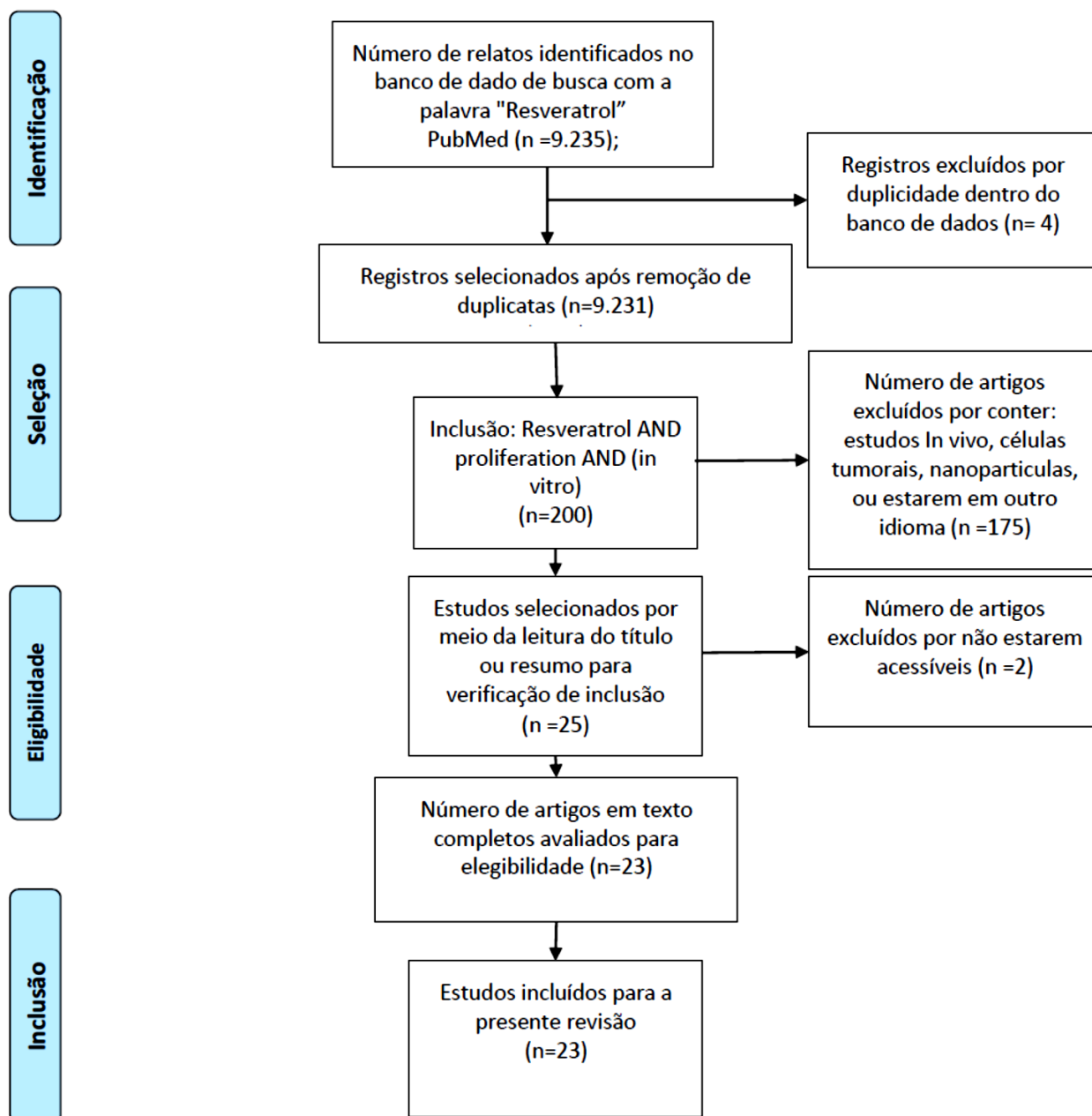


Figura 10 - Fluxograma mostrando o processo de seleção de artigos publicados.

Tabela 5 – Efeitos do Resveratrol no estímulo à proliferação em células saudáveis.

	Tipo celular	Proliferação	Referência
1	Células-tronco neurais (NSCs)	Aumento da proliferação (1, 5 e 20 μM)	(CHENG et al., 2015)
2	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (HBMSC)	As células foram expostas as concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M, e a proliferação celular foi dependente da dose	(DAI et al., 2007)
3	Fibroblastos da pele	Menção de proliferação celular mas não apresenta a concentração	(GIARDINA et al., 2010)
4	Fibroblastos MRC5 humano	Aumentou a proliferação com 5 μM	(GIOVANNELLI et al., 2011)
5	Células endoteliais (HUVEC, HMVEC e HMEC-1)	Estimula a proliferação de um modo dependente da dose (0,5 a 10 μM)	(MIKULA-PIETRASIK et al., 2012)
6	Células-tronco neurais (NSCs)	Promoveu proliferação das células NSCs a 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/l}$, sendo o melhor efeito observado em 5 $\mu\text{mol/l}$, A medida que se aumenta a concentração ocorre incibição da proliferação	(SHEN et al., 2016)
7	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos (BMSC)	A concentração de 10^{-6} mol.l^{-1} melhorou a proliferação e o potencial de diferenciação das células.	(SONG et al., 2006)
8	Células endoteliais (HUV-EC-C)	Células foram tratadas com Resveratrol e avaliadas em 24, 48 e 72 h. Baixas concentrações (0,1-1,0 $\mu\text{g/ml}$) foi observado que o Resveratrol estimula a proliferação, enquanto altas concentrações (10-100 $\mu\text{g/ml}$) induzia a apoptose, diminuía a proliferação e resultava em alteração morfológica	(SZENDE; TYIHAK; KIRALY-VEGHELY, 2000)

Tabela 3 – Continuação...

9	Células progenitoras endoteliais (EPC)	Aumento da proliferação das EPC quando incubadas com Resveratrol (1, 10, 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$)	(WANG, X. B. et al., 2007)
10	Células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical humano (hUC-MSCs)	Proliferação e aumento de viabilidade para as células tratadas com 0,1, 1 e 2,5 μM de Resveratrol	(WANG, X. et al., 2016)
11	Células mononucleares de sangue periférico(PBMC)	Proliferação celular quando expostos a 0, 2, e 5 $\mu\text{mol/L}$ Resveratrol (e inibição observada em 10 $\mu\text{mol/L}$)	(ZUNINO; STORMS, 2009)

Tabela 6 – Efeitos do Resveratrol na inibição da proliferação de células saudáveis

	Tipo celular	Proliferação	
1	Células epiteliais gengivais humanas	Inibição devido a dose 75 a 150 μM RSV durante 2 dias	(BABICH; REISBAUM; ZUCKERBRAUN, 2000)
2	Macrófagos de camundongos RAW 264.7	Inibição em exposição a 50 μM	(BILLACK; RADKAR; ADIABOUAH, 2008)
3	Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	Inibição de 69% das células em quando expostas a 100 μM .	(BOSCOLO et al., 2003)
4	Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) portando diferentes polimorfismos (Ala16Val-SOD2)	Inibição variou em relação ao genótipo da célula, de 5 μM (para homocigotos AA e VV) e 10 μM (para heterocigotos AV).	(CAPELETO et al., 2015)
5	Célula do músculo liso da artéria pulmonar	Inibição quando expostas a 40, 80 e 100 μM em um modo dose dependente	(CHEN et al., 2014)
6	Mioblastos C2C12	Inibição em 100 μM	(HOSODA et al., 2013)
7	Pre-adipócitos primários	A proliferação diminuiu com exposição de 50 μM e 100 μM em 72h e 96h.	(PANG et al., 2006)
8	Sinoviócitos tipo fibroblastos	Inibição das células quando expostas a 50 μM	(TIAN et al., 2010)
9	Célula de músculo liso vascular arterial de coelho	Inibição dose dependente: 20, 40, 80, 160 μM	(WANG, Q. Q. et al., 2009)
10	Fibroblastos cardíacos	Inibição dose e tempo dependentes: 25-100 μM	(WANG, S. J.; WANG; FAN, 2008)
11	Linfócitos T de ratos	Inibição dose dependente: 30-100 μM	(WONG et al., 2010)
12	normal human prostate epithelial (NHPrE) cells	Inibição quando expostas a 2.5-10 μM	(ZHANG et al., 2009)

5 DISCUSSÃO

O Resveratrol, uma fitoalexina presente nas uvas e em outras plantas, tem sido demonstrado ter propriedade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa. A atividade antiproliferativa contribui para uma ação quimiopreventiva e estudos mostram que o Resveratrol afeta células tumorais (HOLIAN AND WALTER, 2001; DERMANI et al., 2016). Os mecanismos do efeito antitumoral do Resveratrol não são completamente compreendidos, mas para uma variedade de células tumorais tratadas com Resveratrol é observado apoptose (PIROLA AND FROJDO, 2008; ZHOU et al., 2011; LIU et al., 2013).

Espera-se que os compostos antitumorais ou quimiopreventivos devam ser seletivos às células transformadas ou malignas e, idealmente, ter pouco ou nenhum efeito na viabilidade e proliferação de células normais. Porém, alguns estudos examinaram os efeitos do Resveratrol sobre a proliferação de células saudáveis e mostraram que o Resveratrol também pode inibir *in vitro* a proliferação de células de músculo liso (ZOU et al., 1999) e queratinócitos (HOLIAN AND WALTER, 2001), mas não afeta a viabilidade de linfócitos periféricos humanos normais ou ativados por fitohemaglutinina (CLEMENT et al., 1998).

Por outro lado, nesta revisão sistemática foram observados que 11 artigos científicos abordaram sobre os efeitos do Resveratrol na proliferação celular e que, dependendo da concentração aplicada no cultivo *in vitro*, as células tanto podem se tornar proliferativas quanto inibidas. Nossos resultados com células-tronco da polpa dentária decídua, usada como controle não apresentaram proliferação elevada, tampouco uma redução significativa na proliferação celular. Em contrapartida, as células NF1 foram muito afetadas dependendo da concentração e do tempo.

CAPELETO et al. (2015) avaliaram os efeitos do Resveratrol em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com diferentes polimorfismos do gene *SOD2* (Superoxide dismutase). De acordo com os autores, diferentes genótipos responderam diferentemente quanto a proliferação celular, sendo relatada uma inibição celular em 10 μ M em 24 h para um dado polimorfismo, sugerindo o trabalho que os efeitos do Resveratrol não é universal, e variam de acordo com a genética e tipo celular (CAPELETO et al., 2015).

Existem outros autores que também relatam efeitos divergentes do Resveratrol na proliferação celular, diferenciação e apoptose (LEONG et al., 2007; DORRIE et al., 2011; BOYER et al., 2012; ZHANG et al., 2013; SASSI et al., 2014), reforçando também que essa divergência possa se dar em função do tipo celular, organismo, tempo de exposição e dose de Resveratrol (RYAN et al., 2010).

BOSUTTI e DEGENS (2015) sugerem que para cada tipo celular, concentrações de Resveratrol sejam testadas avaliando a proliferação. De acordo com prévios relatos na literatura, este trabalho visou testar nas células tronco da polpa de dente decíduo as concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM .

Os dados gerados nesse trabalho corroboram com outros da literatura no sentido que, nas células tronco de polpa de dentes decíduos, o Resveratrol inibiu a proliferação celular em células com perfil tumoral (NF1).

Nos experimentos de diferenciação osteogênica, notou-se redução significativa dos depósitos de cálcio (25,17%) de células não suplementadas com Resveratrol. Quando cultivadas na presença de Resveratrol, evidencia-se melhora nos depósitos de cálcio, sendo mais significativas em 10 e 25 μM , alcançando mais de 90% de mineralização. O Resveratrol atua como um melhora a mineralização das células NF1 induzidas à diferenciação osteogênica de uma forma dependente da dose. Como Resveratrol afeta a proliferação celular, o uso de Resveratrol é interessante, e pode contribuir para o controle do crescimento de neurofibromas, além de melhorar a densidade óssea nesses pacientes, sendo este já demonstrados com a suplementação de Resveratrol em homens obesos e diabéticos.

6 REFERÊNCIAS

- ALAMDARI, N.; AVERSA, Z.; CASTILLERO, E.; GURAV, A.; PETKOVA, V.; TIZIO, S.; HASSELGREN, P.O. 2012. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun** **417(1)**, 528–533.
- ALMEIDA, P.N.; SOUZA, G.T.; DE SOUZA, C.M.; DE ZANETTE, R.S.; MARANDUBA, C.P.; RETTORE, J.V.; DE SANTOS, M.O.; DO CARMO, A.M.; DA MARANDUBA, C.M.; DE SILVA, F.S. 2015. Proposing the use of dental pulp stem cells as a suitable biological model of neurofibromatosis type 1. **Childs Nerv Syst.** **31(1)**, 7-13.
- ALWAN, S.; TREDWELL, S. J.; FRIEDMAN, J. M. 2005. Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)? **Clinical Genetics**, **67**, 378-390.
- BENNETT, B. T.; MOHAMED, J. S.; ALWAY, S. E. 2013. Effects of Resveratrol on the recovery of muscle mass following disuse in the plantaris muscle of aged rats. **PLoS One.** **12**, e83518.
- ARDERN-HOLMES, S.; NORTH, K. 2011. Therapeutics for childhood neurofibromatosis type 1 and type 2. **Curr Treat Options Neurol** **13(6)**, 529–543.
- BABICH, H.; REISBAUM, A. G.; ZUCKERBRAUN, H. L. 2000. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. **Toxicol Lett**, v. **114**, n. 1-3, p.143-53.
- BILLACK, B.; RADKAR, V.; ADIABOUAH, C.2008. In vitro evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of resveratrol and several of its analogs. **Cell Mol Biol Lett**, **13(4)**, 553-69.
- BOISSY, P.; ANDERSEN, T.L.; ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M.; PLESNER, T.; DELAISSÉ, J.M. 2005. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. **Cancer Res.** **65**:9943–9952.
- BOSCOLO, P.; DEL SIGNORE, A.; SABBIONI, E.; DI GIOACCHINO, M.; DI GIAMPAOLO, L.; REALE, M.; CONTI, P.; PAGANELLI, R.; GIACCIO, M. 2003. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. **Ann Clin Lab Sci**, v. **33**, n. **2**, p. 226-31.
- BOSUTTI, A.; DEGENS, H. 2009. The impact of Resveratrol and hydrogen peroxide on muscle cell plasticity shows a dose-dependent interaction. **Sci Rep.** **28(5)**, 8093.
- BOYD, K.; KORF, B.; THEOS, A. 2009. Neurofibromatosis type 1. **J Am Acad Dermatol** **61(1)**:1–14.
- ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.**224**, p.274–283.
- BOYER, J.Z.; JANDOVA, J.; JANDA, J.; VLEUGELS, F.R.; ELLIOTT, D.A.; SLIGH, J.E. 2012. Resveratrol-sensitized UVA induced apoptosis in human keratinocytes through mitochondrial oxidative stress and pore opening. **J. Photochem. Photobiol, B.** **113**, p.42–50 (2012).

- CAMPAGNA, M.; RIVAS, C. 2010. Antiviral activity of Resveratrol. **Biochem Soc Trans**, **38**:50-53.
- CAPELETO, D.; BARBISAN, F.; AZZOLIN, V.; DORNELLES, E.B.; ROGALSKI, F.; TEIXEIRA, C.F.; MACHADO, A.K.; CADONÁ, F.C.; DA SILVA, T.; DUARTE, T.; DUARTE, M.M.; DA CRUZ, I.B. 2015. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, v. **16(5)**, p. 621-30, Oct 2015.
- CARRASCO-POZO, C.; MIZGIER, M. L.; SPEISKY, H.; GOTTELAND, M. 2012. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chem-Biol. Interact**, **195**, 199–205.
- CHAI, Y.; JIANG, X.; ITO, Y.; BRINGAS, P. JR.; HAN, J.; ROWITCH, D. H.; SORIANO, P.; MCMAHON, A. P.; SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**, **127 (8)**, 1671-1679.
- CHEN ,B.; XUE, J.; MENG, X.; SLUTZKY, J.L.; CALVERT, A.E.; CHICOINE, L.G. 2014 Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, **307(4)**, p.L317-325.
- CHENG, W.; YU, P.; WANG, L.; SHEN, C.; SONG, X.; CHEN, J.; TANG, F.; YANG, Q. 2015. Sonic hedgehog signaling mediates Resveratrol to increase proliferation of neural stem cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury in vitro. **Cell Physiol Biochem**, **35(5)**, p. 2019-32, 2015.
- CHONG, J.; POUTARAUD, A.; HUGUENEY, P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. **Plant Science**, v.**177**, p.143 – 155.
- CORDEIRO, M.; DONG, Z.; KANEKO, T.; ZHANG, Z.; MIYAZAWA, M.; SHI, S. 2008. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J. Endod**, **34(8)**:962–969.
- DAI Z, L.I.Y.; QUARLES, L.D.; SONG, T.; PAN, W.; ZHOU, H.; XIAO, Z. 2007. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. **Phytomedicine**, **14**:806–814.
- 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.
- DEY, A.; GUHA, P.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.K. 2009. Biphasic activity of resveratrol on indomethacin-induced gastric ulcers. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **381**, 90–95.
- DERMANI, F.K.; SAIDIJAM, M.; AMINI, R.; MAHDAVINEZHAD, A.; HEYDARI, K.; NAJAFI, R. 2017. Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. **J Cell Biochem.**, **118(6)**,1547-1555.
- DIAS, D. J. S. 2012. Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil. Dissertação Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2012.

- DIRKS NAYLOR, A.J. 2009. Cellular effects of Resveratrol in skeletal muscle. **Life Sci**, **84**, 637–640.
- DORRIE, J.; GERAUER, H.; WACHTER, Y. & ZUNINO, S. J. 2011. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cancer Res.**, **61**, 4731–4739.
- DURBIN, S.M.; JACKSON, J.R.; RYAN, M.J.; GIGLIOTTI, J.C.; ALWAYS, S.E.; TOU, J.C. 2014. Resveratrol supplementation preserves long bone mass, microstructure, and strength in hindlimb-suspended old male rats. **J Bone Miner Metab.**, **32(1)**, 38-47.
- FANG, N. & CASIDA, J. E. 1999. New bioactive flavonoids and stilbenes in cube´ resin insecticide. **J. Nat. Prod.** **62**, 205–210. Erratum in: **J. Nat. Prod.** **63**, 293 (2000).
- FERNER, R.E.; GUTMANN, D.H. 2013. Handbook of clinical neurology. In: Chapter 53. Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management. Elsevier .
- FERNER, R. E. 2007. Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. **The Lancet Neurology**, **6**, 340–351.
- GARG, S.; GREEN, J.; LEADBITTER, K.; EMSLEY, R.; LEHTONEN, A.; EVANS, D.; HUSON, S. 2013 Neurofibromatosis type 1 and autism spectrum disorder. **Pediatrics** **132(6)**, 1642–1648.
- GIARDINA, S.; MICHELOTTI, A.; ZAVATTINI, G.; FINZI, S.; GHISALBERTI, C.; MARZATICO, F. 2010. Efficacy study in vitro: assessment of the properties of Resveratrol and Resveratrol + N-acetyl-cysteine on proliferation and inhibition of collagen activity. **Minerva Ginecol**, **62(3)**, p.195-201.
- GIOVANNELLI, L.; PITOZZI, V.; JACOMELLI, M.; MULINACCI, N.; LAURENZANA, A.; DOLARA, P.; MOCALI, A. 2011. Protective effects of Resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, **66(1)**, p. 9-18.
- GLIEMANN, L.; SCHMIDT, J.F.; OLESEN, J.; BIENSØ, R.S.; PERONARD, S.L.; GRANDJEAN, S.U.; MORTENSEN, S.P.; NYBERG, M.; BANGSBO, J.; PILEGAARD, H.; HELLSTEN, Y. 2013. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. **J. Physiol.** **591**, 5047–5059.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBNEY, P. G.; SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the **National Academy Sciences of the USA**, **97(25)**, 13625-13630
- HABOLD, C.; MOMKEN, I.; OUADI, A.; BEKAERT, V.; BRASSE, D. 2011. Effect of prior treatment with Resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. **J Bone Miner Metab.**, **29**, 15–22.
- HAN, S.; KWON, K. J.; SHIN, C.Y. 2009. Melatonin potentiates neuroprotective property of Resveratrol through heme oxygenase-1 induction. **Alzheimer's and Dementia**, **v.5**, p.336 – 337.
- HASLAM, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, **59(2)**, p.205 – 215, 1996.

- HIGASHIDA, K.; KIM, S.H.; JUNG, S.R.; ASAKA, M.; HOLLOSZY, J.O.; HAN, D.H. 2013. Effects of Resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. **PLoS Biol.** **11**, e1001603 (2013).
- HILTON, D.; HANEMANN, C. 2014. Schwannomas and their pathogenesis. **Brain Pathol**, **24(3)**, 205–220
- HOLIAN, O.; WALTER, R.J. 2001. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. **J Cell Biochem, Suppl** **36**:55-62.
- HOSODA, R.; KUNO, A.; HORI, Y.S.; OHTANI, K.; WAKAMIYA, N.; OOHIRO, A.; HAMADA, H.; HORIO, Y. 2013. Differential cell-protective function of two resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) glucosides against oxidative stress. **J Pharmacol Exp Ther**, **344(1)**, p. 124-32, Jan 2013.
- HUANG, G.T.; GRONTHOS, S.; SHI, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J Dent Res.**, **88(9)**,792-806.
- IKEDA, E.; YAGI, K.; KOJIMA, M.; YAGYUU, T.; OHSHIMA, A.; SOBAJIMA, S.; TADOKORO, M.; KATSUBE, Y.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; GO, M. J.; ADACHI, H.; YOKOTA, Y.; KIRITA, T.; OHGUSHI, H. 2008. Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease. **Differentiation**, **76 (5)**, 495–505.
- KAMINSKI, J.; LANÇON, A.; AIRES, V.; LIMAGNE, E.; TILI, E.; MICHAILLE, J.J.; LATRUFFE, N. 2012. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. **Biochem Pharmacol**, **84(10)**,1251–1259.
- KARBANOVA, J.; SOUKUP, T.; SUCHÁNEK, J.; MOKRÝ, J. 2010. Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. **Acta Med (Hradec Kralove)** **53(2)**,79–84.
- KEREM, Z.; BILKIS, I.; FLAISHMAN, M.A.; SIVAN, L. Antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase by trans-Resveratrol, piceid, and a novel trans-stilbene from the roots of Israeli Rumex Bucephalophorus L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **v.54**, p.1243-1247, 2006.
- KIM, H.J.; KIM, I.K.; SONG, W.; LEE, J.; PARK, S. 2013. The synergic effect of regular exercise and Resveratrol on kainate-induced oxidative stress and seizure activity in mice. **Neurochem Res**, **38(1)**,117–122.
- 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. **Osteoporosis International**, **16(8)**, 928-36.
- LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; MEZIANE, H.; LERIN, C.; DAUSSIN, F.; MESSADEQ, N.; MILNE, J.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, P.; GENY, B.; LAAKSO, M.; PUIGSERVER, P.; AUWERX, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**. **127**, 1109–1122.

LEE, J.P.; MIN, B.S.; AN, R.B.; NA, M.K.; LEE, S.M.; LEE, H.K.; KIM, J.G.; BAE, K.H.; KANGE, S.S. 2003. Stilbenes from the roots of *Pleuropterus ciliinervis* and their antioxidant activities. **Phytochemistry**, **v.64**, p.759–763, 2003.

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.

MENZIES, K.J.; SINGH, K.; SALEEM, A.; HOOD, D.A. 2013. Sirtuin 1-mediated effects of exercise and Resveratrol on mitochondrial biogenesis. **J Biol Chem** **2013**, **288(10)**, 6968–6979.

LEONG, C.W.; WONG, C.H.; LAO, S.C.; LEONG, E.C.; LAO, I.F.; LAW, P.T.; FUNG, K.P.; TSANG, K.S.; WAYE, M.M.; TSUI, S.K.; WANG, Y.T.; LEE, S.M. 2007. Effect of Resveratrol on proliferation and differentiation of embryonic cardiomyoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **360**, 173–180.

LESKELÄ, H.; KUORILEHTO, T.; RISTELI, J.; KOIVUNEN, J.; NISSINEN, M.; PELTONEN, S.; KINNUNEN, P.; MESSIAEN, L.; LEHENKARI, P.; PELTONEN, J. 2009. Congenital pseudarthrosis of neurofibromatosis type 1: impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression. **Bone** **44(2)**, 243–250.

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.

LIU, P.; LIANG, H.; XIA, Q.; LI, P.; KONG, H.; LEI, P.; WANG, S.; TU, Z. 2013. Resveratrol induces apoptosis of pancreatic cancers cells by inhibiting miR-21 regulation of BCL-2 expression. **Clin Transl Oncol.**, **15**, 741–746.

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.

MIKUŁA-PIETRASIK, J.; KUCZMARSKA, A.; KUCIŃSKA, M.; MURIAS, M.; WIERZCHOWSKI, M.; WINCKIEWICZ, M.; STANISZEWSKI, R.; BRĘBOROWICZ, A.; KSIĄŻEK, K. 2012. Resveratrol and its synthetic derivatives exert opposite effects on mesothelial cell-dependent angiogenesis via modulating secretion of VEGF and IL-8/CXCL8. **Angiogenesis**, **15(3)**, p. 361-76.

MIURA, D.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. 2003. Hypolipidemic action of dietary Resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. **Life Sci.**, **73**, 1393-1400.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBAY, P. G.; SHI, S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **100 (10)**, 5807–5812.

MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y.; YAMORI, Y. 1998. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3–E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, **253**, 859–863.

MOHER, D., LIBERATI, A.; TETZLAFF, J. & ALTMAN, D. G. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Annals of Internal Medicine** **151**, 264–269.

MONTESANO, A.; LUZI, L.; SENESI, P.; MAZZOCCHI, N.; TERRUZZI, I. 2013. Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. **J Transl Med.**, **11**:310.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95–111.

OLIVEIRA, D. A. Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah. 2010. 211f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ORNSTRUP, M.J.; HARSLØF, T.; SØRENSEN, L.; STENKJÆR, L.; LANGDAHL, B.L.; PEDERSEN, S.B. 2016. Resveratrol Increases Osteoblast Differentiation In Vitro Independently of Inflammation. **Calcif Tissue Int.**, **99(2)**,155-63

ORNSTRUP, M.J.; HARSLØF, T.; KJÆR, T.N.; LANGDAHL, B.L.; PEDERSEN, S.B. 2014. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab.**, **99**,4720-9.

PANG, W.J.; SUN, S.D.; BAI, L.; YANG, Y.J.; YANG, G.S. 2006. Effects of resveratrol on pig primary preadipocytes proliferation, differentiation and transcription expression of Sirt1 gene. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, **22(5)**, p. 850-5.

PARK, C.E.; KIM, M.J.; LEE, J.H.; MIN, B.I.; BAE, H.; CHOE, W.; KIM, S.S.; HA, J. 2007. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. **Exp Mol Med.**, **39(2)**,222–229.

PARK, S.J.; AHMAD, F.; PHILP, A.; BAAR, K.; WILLIAMS, T.; LUO, H.; KE, H.; REHMANN, H.; TAUSSIG, R.; BROWN, A.L.; KIM, M.K.; BEAVEN, M.A.; BURGIN, A.B.; MANGANIELLO, V.; CHUNG, J.H. 2012. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**. **148**,421–433.

PEARSON, K.J.; BAUR, J.A.; LEWIS, K.N.; PESHKIN, L.; PRICE, N.L.; LABINSKY, N.; SWINDELL, W.R.; KAMARA, D.; MINOR, R.K.; PEREZ, E.; JAMIESON, H.A.; ZHANG, Y.; DUNN, S.R.; SHARMA, K.; PLESHKO, N.; WOOLLETT, L.A.; CSISZAR, A.; IKENO, Y.; LE COUTEUR, D.; ELLIOTT, P.J.; BECKER, K.G.; NAVAS, P.; INGRAM, D.K.; WOLF, N.S.; UNGVARI, Z.; SINCLAIR, D.A.; DE CABO, R. 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab**, **8**:157–168.

PETERNELJ, T.T.; COOMBES, J.S. 2011. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? **Sports. Med.** **41**,1043–1069.

PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E.; MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P. 2005. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, **80(6)**,836-842.

PIROLA, L.; FROJDO, S. 2008. Resveratrol: one molecule, many targets. **IUBMB Life.**, **60**,323–332.

ORNSTRUP, M.J.; HARSLØF, T.; JESSEN, N.; LANGDAHL, B.L.; RICHELSEN, B.; JØRGENSEN, J.O.L.; PEDERSEN, S.B. 2014. Short-term Resveratrol supplementation stimulates serum levels of bone-specific alkaline phosphatase in obese non-diabetic men. **Journal of Functional Foods**, **6**,305–310.

POULSEN, M.M.; VESTERGAARD, P.F.; CLASEN, B.F. 2013. High-dose Resveratrol supplementation in obese men: An investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. **Diabetes**, **62**,1186–1195.

RABESIAKA, M.; RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, L.; MABILLE, I.; PORTE, C.; HAVET, J. 2011. Extraction of trans-Resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, **v.81**, p.56 – 61, 2011.

RASBAND, W.S.; ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

RYAN, M.J.; JACKSON, J.R.; HAO, Y.; WILLIAMSON, C.L.; DABKOWSKI, E.R.; HOLLANDER, J.M.; ALWAYS, S.E. 2010. Suppression of oxidative stress by Resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged mice. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** **65**, 815–831.

SASSI, N.; MATTAREI, A.; AZZOLINI, M.; SZABO', PARADISI, C.; ZORATTI, M.; BIASUTTO, L. 2014. Cytotoxicity of mitochondria-targeted Resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. **Biochim. Biophys. Acta**, **1837**, 1781–1789.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. 2005. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **25(3)**, p.437 – 442, 2005.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, **364 (9429)**,149–155.

SHAKIBAEI, M.; BUHRMANN, C.; MOBASHERI, A. 2011. Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. **J Biol Chem.**, **286**,11492–11505.

Shen, C.; Cheng, W.; Yu, P.; Wang, L.; Zhou, L.; Zeng, L.; Yang, Q. 2016. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in vitro. **Mol Med Rep**, **14(4)**, p.3646-54.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. 1992 Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, **43**, 49-52.

DE SÁ SILVA, F.; ALMEIDA, P.N.; RETTORE, J.V.; MARANDUBA, C.P.; DE SOUZA, C.M.; DE SOUZA, G.T.; ZANETTE, R.S.; MIYAGI, S.P.; SANTOS, M.O., MARQUES, M.M.; MARANDUBA, C.M. 2012. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven

relevant topics for safety and success in stem cell therapy. **J Biomed Biotechnol.** **2012**, 758102.

SILVA, F. S.; RAMOS, R. N.; ALMEIDA, D. C.; BASSI, E. J.; GONZALES, R. P.; MIYAGI, S. P. H.; MARANDUBA, C. P.; SANT'ANNA, O. A. B. E.; MARQUES, M. M.; BARBUTO, J. A. M.; CAMARA, N. O. S.; MARANDUBA, C. M. C. 2014. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHEDs) Induce Immune Modulatory Profile in Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Plos One**, **9 (5)**: e98050.

SOARES, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, **15(1)**, p.71–81, 2002.

SONG, L.H.; PAN, W.; YU, Y.H.; QUARLES, L.D.; ZHOU, H.H.; XIAO, Z.S. 2006. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway. **Toxicol In Vitro**, **20(6)**, p. 915-22, Sep 2006.

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R. S.; WANG, S.; SHI, S. 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. **Journal of Endodontics**, **34 (2)**,166-171.

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.

STROBEL, N.A.; PEAKE, J.M.; MATSUMOTO, A.; MARSH, S.A.; COOMBES, J.S.; WADLEY, G.D. 2011. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. **Med. Sci. Sports Exerc.** **43**,1017–1024.

SZENDE, B.; TYIHAK, E.; KIRALY-VEGHELY, Z. Dose-dependent effect of Resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. **Exp Mol Med**, **32(2)**, p. 88-92.

TIAN, J.; GAO, J.; CHEN, J.; LI, F.; XIE, X.; DU, J.; WANG, J.; MAO, N. 2010. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis of TNF-alpha induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, **35(14)**, p.1878-82.

TIRINO, V.; PAINO, F.; D'AQUINO, R.; DESIDERIO, V.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, G. 2011. Methods for the Identification, characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. **Stem Cell Review**, **7(3)**, 608-615.

TONKIN, J.; VILLARROYA, F.; PURI, P. L.; VINCIGUERRA, M. 2012. SIRT1 signaling as potential modulator of skeletal muscle diseases. **Curr. Opin. Pharmacol.** **12**, 372–376.

WALLACE, M.; MARCHUK, D.; ANDERSEN, L.; LETCHER, R.; ODEH, H.; SAULINO, A. 1990. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. **Science** **249(4965)**,181–186

WANG, W.; NYMAN, J.; ONO, K.; STEVENSON, D.; YANG, X.; ELEFTERIOU, F. 2011. Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with neurofibromatosis type I. **Hum Mol Genet** **20(20)**,3910–3924

WANG, Q.Q.; JIAO, J.J.; LI, W.H.; QU, Q. 2009. Effects of resveratrol on the proliferation and CaN of vascular smooth muscle cell induced by angiotensin II. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, **25(3)**, p.334-7.

WANG, S. J.; WANG, X. X.; FAN, F. H. 2008. Inhibitory effect of resveratrol on cardiac fibroblast proliferation induced by angiotensin II. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi**, **28(4)**, p. 334-8.

WANG, X.; MA, S.; MENG, N.; YAO, N.; ZHANG, K.; LI, Q.; ZHANG, Y.; XING, Q.; HAN, K.; SONG, J.; YANG, B.; GUAN, F. 2016. Resveratrol Exerts Dosage-Dependent Effects on the Self-Renewal and Neural Differentiation of hUC-MSCs. **Mol Cells**, **39(5)**, p. 418-25.

WANG, X. B. 2007. Effects of Resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, **34(11)**, p. 1109-15.

WILLIAMS, V.; LUCAS, J.; BABCOCK, M.; GUTMANN, D.; KORF, B.; MARIA, B. 2009. Neurofibromatosis type 1 revisited. **Pediatrics** **123(1)**,124–133

WONG, D. H. 2010. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. **Mol Hum Reprod**, **16(4)**, p. 251-9.

YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. 2010. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Therapy Research**, **1 (5)**,1-10.

ZHANG, J. J. 2009. Effect of resveratrol and zinc on intracellular zinc status in normal human prostate epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, **297(3)**, p.C632-44.

ZHANG, Y. 2013. Exploiting the role of Resveratrol in rat mitochondrial permeability transition. **J. Membr. Biol.** **246**, 365–373.

ZHAO, H.; LI, X.; LI, N. 2013. Long-term Resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. **Br J Nutr** **2013**;1–11.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V.D. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **Br. J. Pharmacol.** **130**, 1115–1123.

ZHOU, H.; SHANG, L.; LI, X. 2009. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. **Exp Cell Res.**, **315**,2953–2962.

ZHOU JH, CHENG HY, YU ZQ, HE DW, PAN Z, YANG DT. Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Chin Med J (Engl)**. **124**,1695–1699.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**,**13 (12)**, 4279-4295.

ZUNINO, S. J.; STORMS, D. H. 2009. Resveratrol alters proliferative responses and apoptosis in human activated B lymphocytes in vitro. **J Nutr**, **139(8)**, p. 1603-8.