

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

ANA CAROLINA BONTEMPI BATISTA

**IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL COM FENÓTIPO OSTEOGÊNICO DE BAIXA
PRODUÇÃO MINERAL**

SÃO PAULO

2025

ANA CAROLINA BONTEMPI BATISTA

**IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL COM FENÓTIPO OSTEOGÊNICO DE BAIXA
PRODUÇÃO MINERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia

SÃO PAULO

2025

Batista, Ana Carolina Bontempi.

Imortalização de células mesenquimais do ligamento periodontal com fenótipo osteogênico de baixa produção mineral / Ana Carolina Bontempi Batista. - 2025.

14 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Ligamento periodontal. 3. Imortalização celular. 4. *in vitro*. I. Andia, Denise Carleto (orientadora). II. Título.

ANA CAROLINA BONTEMPI BATISTA

**IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL COM FENÓTIPO OSTEOGÊNICO DE BAIXA
PRODUÇÃO MINERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof. Denise Carleto Andia
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Adriano Fonseca de Lima
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Elis J. Lira dos Santos
The Ohio State University – OSU

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo privilégio de finalizar esta Dissertação de Mestrado. Ao longo de todo o processo, pude desfrutar de Sua companhia e amor, que me acompanham desde o princípio de todas as coisas. Ele está presente em todas as cartas de agradecimento que precisei fazer e estará presente nas demais que virão. Afinal, d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço também à minha família, que nunca parou de me incentivar quando a carreira acadêmica se tornou meu objetivo principal. Meus pais, Alessandro e Alessandra Bontempi, me viam como professora quando meus alunos eram apenas pelúcias e brinquedos. Desde então, o meu sonho se tornou o sonho deles. Da mesma forma, agradeço ao meu irmão caçula, Marcus Vinícius, que, por um bom tempo, foi um desses alunos. De modo ainda mais especial, agradeço ao meu marido, Miguel Batista. Na minha conclusão de curso da graduação, ele era apenas meu noivo. Hoje, como meu marido, tem sido meu porto seguro e o grande motivo pelo qual continuo sonhando e perseguindo os meus objetivos.

Agradeço de coração à minha orientadora, Prof.^a Dra. Denise Carleto Andia, por, de modo visionário, ter me enxergado ainda no primeiro semestre da graduação em Odontologia. Ao longo desses seis anos, pude aprender não só com a profissional exemplar que ela é, mas também com o ser humano excepcional, que respira Educação. Sem ela, esta Dissertação jamais teria nascido. Que privilégio fazer parte desse grupo de pesquisa, composto por colegas tão excelentes em tudo o que fazem. Gostaria de estender meu agradecimento, ainda, a todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, com destaque para os professores Adriano Lima e Matheus Kury, que se tornaram coorientadores e amigos, e à coordenadora, Cintia Saraceni, por conduzir esse programa de modo correto, excelente e inspirador.

À CAPES/PROSUP, o meu maior agradecimento por financiar esta Dissertação durante todo o meu período de Mestrado. Foi através desse apoio que esse sonho se tornou possível, e grande parte da minha evolução profissional e acadêmica decorre desse suporte e sustento.

Por fim, queria agradecer a todos os meus colegas de Mestrado e Doutorado, que se tornaram meus companheiros de trajetória e amigos para a vida. A todos os que torceram pela linha de chegada, eu não teria conseguido sem vocês.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais oriundas do ligamento periodontal (PDLs) constituem uma fonte celular acessível e com potencial multipotente, sendo amplamente estudadas em estratégias terapêuticas regenerativas. No entanto, sua heterogeneidade fenotípica, especialmente nas subpopulações com reduzida capacidade de mineralização (l-PDLs), compromete a previsibilidade dos resultados clínicos. Além disso, a limitação replicativa das células primárias dificulta a condução de experimentos prolongados *in vitro*. Visando contornar esses entraves, foi desenvolvida uma linhagem imortalizada de l-PDLs (il-PDLs) por meio da inserção do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (*hTERT*) via vetor lentiviral, seguindo-se da caracterização fenotípica e molecular comparativa entre as il-PDLs e as células primárias. A análise dos marcadores de superfície (CD105, CD166 e CD34) foi feita por citometria de fluxo. A expressão dos genes *hTERT*, *OCT4* e *NANOG* foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR), assim como a de genes relacionados à osteogênese (*RUNX2*, *SP7*, *ALPL*) e à proliferação celular (*MAPK14*, *YAP1* e *CREB1*), analisados nos dias 3, 7 e 10 após indução osteogênica. A atividade da enzima fosfatase alcalina (ALPL) e a coloração por Alizarina Vermelha foram utilizadas para avaliar o potencial de mineralização nos dias 14, 21 e 28, sendo que a atividade enzimática foi quantificada apenas no dia 14. As il-PDLs apresentaram aumento expressivo na expressão de *hTERT* (2.300 vezes), mantiveram o perfil mesenquimal (positividade para CD105/CD166 e ausência de CD34) e exibiram níveis elevados dos marcadores de pluripotência *OCT4* e *NANOG*, em comparação às l-PDLs ($p \leq 0,05$). Após a indução osteogênica, genes associados à proliferação celular (*MAPK14*, *YAP1* e *CREB1*) mostraram-se regulados positivamente nas il-PDLs, que também apresentaram expressão antecipada e intensificada de *RUNX2*, *SP7* e *ALPL*, com picos no dia 7 (aproximadamente 200 vezes para *RUNX2* e *SP7* e 100 vezes para *ALPL*), quando comparadas às l-PDLs ($p \leq 0,05$). Observou-se ainda correlação positiva significativa entre *YAP1* e os marcadores osteogênicos *RUNX2* e *SP7*, especialmente nos dias 7 e 10. Apesar dessa vantagem molecular inicial observada nas il-PDLs, a deposição mineral foi mais progressiva nas l-PDLs, atingindo seu pico no dia 28 ($p \leq 0,05$ em relação às il-PDLs). A atividade enzimática da ALPL reforçou o padrão global de baixa mineralização nas duas populações celulares. Em conjunto, os achados indicam que as il-PDLs conservam o fenótipo de baixa capacidade de mineralização característico de suas células originais primárias, ao mesmo tempo em que oferecem um modelo estável para estudos sobre o baixo potencial osteogênico em células-tronco mesenquimais.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal; Osso; Imortalização celular; Baixo potencial osteogênico; Formação mineral; *In vitro*.

ABSTRACT

Periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells (PDLs) are an accessible multipotent cell source with promising applications in regenerative therapies. However, phenotypic heterogeneity among PDLs, particularly those with low mineralization capacity (l-PDLs), poses challenges for clinical predictability. Moreover, the limited replicative capacity of primary cells hinders long-term *in vitro* studies. To overcome these limitations, we established an immortalized line of l-PDLs (il-PDLs) by introducing the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene using a lentiviral vector. We then compared il-PDLs with their primary counterparts in terms of phenotypic and molecular characteristics. Surface markers (CD105, CD166, and CD34) were assessed using flow cytometry. Quantitative PCR (qPCR) was performed to assess the gene expression of *hTERT*, *OCT4*, and *NANOG*. The expressions of *RUNX2*, *SP7*, *ALPL*, *MAPK14*, *YAPI*, and *CREB1* were also analyzed by qPCR at 3, 7, and 10 days following osteogenic induction. Additionally, ALPL enzymatic activity and Alizarin Red staining were conducted to evaluate mineralization potential at 14-, 21- and 28-days post-induction. Notably, ALPL enzymatic activity was measured exclusively at 14 days after osteogenic induction. il-PDLs exhibited a 2,300-fold increase in *hTERT* expression and retained typical mesenchymal features, including CD105/CD166 positivity and the absence of CD34, along with elevated expression of pluripotency markers *OCT4* and *NANOG*, compared to l-PDLs ($p \leq 0.05$). Upon osteogenic induction, proliferation-related genes such as *MAPK14*, *YAPI*, and *CREB1* were upregulated in il-PDLs, which also exhibited early and enhanced expression of osteogenic markers *RUNX2*, *SP7*, and *ALPL*, peaking on day 7 (approximately 200-fold for *RUNX2* and *SP7*, and 100-fold for *ALPL*) compared to l-PDLs ($p \leq 0.05$). Furthermore, significant positive correlations were observed between *YAPI* and *RUNX2* and *SP7*, particularly on days 7 and 10. Despite this early molecular advantage in il-PDLs, mineral deposition progressively increased in l-PDLs, reaching the highest levels by day 28 ($p \leq 0.05$ vs. il-PDLs). *ALPL* enzymatic activity corroborated the overall low-mineralization profile in both cell populations. These results suggest that il-PDLs preserve the low-capacity mineral formation phenotype of their primary counterparts while offering a stable model for investigating the low osteogenic potential in mesenchymal stem cells.

Keywords: Periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells; Bone; Cell immortalization; Low osteogenic potential; Mineral formation; *In vitro*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPL – *Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney* – Fosfatase alcalina.

ACTB – *Beta-actin* – Gene da beta-actina.

AP – *Alkaline Phosphatase* – Fosfatase alcalina (forma abreviada usada em ensaios de atividade enzimática).

cDNA – Complementary DNA – DNA complementar.

CREB1 – *cAMP Response Element-Binding Protein 1*.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – Meio Eagle modificado por Dulbecco.

DNA – Deoxyribonucleic Acid – Ácido desoxirribonucleico.

FBS – Fetal Bovine Serum – Soro fetal bovino.

FITC – Fluorescein Isothiocyanate – Isotiocianato de fluoresceína.

hTERT – *Human Telomerase Reverse Transcriptase* – Transcriptase reversa da telomerase humana.

il-PDLCs – Immortalized Low Mineralizing Periodontal Ligament Cells – Células do ligamento periodontal imortalizadas com baixo potencial osteogênico.

I-PDLCs/low-PDLCs – Low Mineralizing Periodontal Ligament Cells – Células do ligamento periodontal com baixo potencial osteogênico.

MAPK14 – *Mitogen-Activated Protein Kinase 14*.

MSCs – Mesenchymal Stem Cells – Células-tronco mesenquimais.

NANOG – *Fator de transcrição associado à pluripotência de células-tronco*.

OCT4 – *Octamer-binding Transcription Factor 4*.

OM – Osteogenic Medium – Meio de diferenciação osteogênica (grupo submetido à indução osteogênica).

PBS – Phosphate Buffered Saline – Solução salina tamponada com fosfato.

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase (técnica de amplificação de DNA).

PDLCs – Periodontal Ligament Cells – Células do ligamento periodontal.

PE – Phycoerythrin – Ficoeritrina.

RUNX2 – *Runt-related transcription factor 2*.

RNA – Ribonucleic Acid – Ácido ribonucleico.

SP7 – *SP7 transcription factor*.

TERT – *Telomerase Reverse Transcriptase* – mesmo gene que hTERT.

YAP1 – *Yes-Associated Protein 1*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	CONCLUSÃO GERAL.....	11
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	12

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que acomete a gengiva e os tecidos de suporte dentário, em especial o osso alveolar e o ligamento periodontal [1-2]. Embora apresente maior prevalência em adultos, a periodontite também pode ser diagnosticada em crianças e adolescentes [2]. Em suas formas mais agressivas [3] ou com progressão lenta ao longo do tempo, essa condição leva à degeneração dos tecidos de suporte dental [4], à perda progressiva de inserção e à reabsorção do osso alveolar [1;3], podendo resultar em perda dentária precoce. [3;5].

As propostas de tratamento da periodontite visam, portanto, não apenas paralisar a progressão da doença, mas também promover a regeneração das estruturas danificadas, como o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal [4]. Com esse objetivo, diversas estratégias têm sido amplamente investigadas, incluindo a regeneração tecidual guiada, enxertos ósseos [6;7], aplicação de fatores de crescimento e terapias de modulação do hospedeiro [7;8]. No entanto, essas abordagens apresentam variabilidade quanto aos desfechos clínicos e à previsibilidade [9], além de enfrentarem desafios impostos pela complexidade da arquitetura periodontal [4] e pelas condições clínicas individuais.

De forma semelhante, a regeneração de defeitos ósseos apresenta dificuldades substanciais, uma vez que exige estabilidade estrutural [10]. Embora o enxerto ósseo autólogo permaneça como o padrão-ouro para o tratamento de defeitos de origem traumática, infecciosa ou patológica [11], a coleta de tecido saudável acarreta morbidade na área doadora e limita a aplicabilidade do procedimento [11;12]. Frente a esses desafios, as terapias celulares com células mesenquimais indiferenciadas têm emergido como uma alternativa promissora, oferecendo potencial para melhores resultados em regeneração tecidual [13].

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo que preenche o espaço entre o cemento radicular e a parede interna do osso alveolar, sendo uma fonte rica em células-tronco mesenquimais (MSCs) [14]. Esse tecido fornece uma população acessível de células-tronco do ligamento periodontal (PDLs), que pode ser obtida com relativa facilidade [15]. No entanto, as PDLs apresentam natureza heterogênea [14–17], sendo caracterizadas por alta capacidade proliferativa, aderência ao plástico, expressão de antígenos de superfície específicos [16] e potencial de diferenciação em diversos tipos celulares, como osteoblastos, adipócitos, condrócitos [15;16;18], cementoblastos [14;19] e células neuronais [20]. Apesar de sua multipotencialidade, as PDLs apresentam variabilidade considerável quanto ao potencial osteogênico [15].

Descobertas anteriores do nosso grupo de pesquisa indicam que tanto o perfil epigenético individual quanto os mecanismos epigenéticos pós-transcricionais podem exercer um papel regulador sobre a capacidade de deposição mineral das PDLCs [15;17;20]. Essas células podem apresentar um potencial osteogênico variável, manifestando-se como baixa deposição mineral, em casos de capacidade osteogênica reduzida, ou como formação mineral acentuada, nos casos de elevado potencial osteogênico. Essa variabilidade fenotípica impacta significativamente o potencial regenerativo das PDLCs e pode contribuir para os resultados terapêuticos imprevisíveis observados na prática clínica [15; 17-20]

A fim de enfrentar essas inconsistências, torna-se fundamental aprofundar o entendimento das características moleculares relacionadas ao fenótipo com baixo potencial osteogênico. Esse conhecimento pode possibilitar o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais acuradas, bem como de abordagens terapêuticas específicas. Nesse contexto, nosso grupo identificou uma subpopulação de PDLCs com capacidade limitada de formar nódulos minerais quando submetida à indução osteogênica, a qual foi denominada de PDLCs com baixo potencial osteogênico (l-PDLCs) [18]. Para viabilizar análises mais aprofundadas, torna-se necessário imortalizar essa subpopulação, de modo a contornar as limitações replicativas inerentes às culturas primárias.

Células primárias cultivadas *in vitro* entram em senescência replicativa após um número limitado de divisões celulares, caracterizando um estado irreversível de paralisação do crescimento e da proliferação [21-23]. Essa condição compromete a realização de estudos de longa duração [23], uma vez que, embora permaneçam viáveis e metabolicamente ativas, as células senescentes perdem a capacidade de se dividir [21]. O esgotamento do potencial proliferativo está geralmente associado à disfunção dos telômeros — estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares — que, ao perderem sua função protetiva, desencadeiam a resposta senescente [24]. A cada ciclo de divisão celular, os telômeros sofrem encurtamento progressivo e desgaste estrutural [25], o que leva à ativação de sinais de dano ao DNA [21;23]. Como consequência, ocorre a indução do estado irreversível de paralisação do crescimento e da proliferação celular previamente mencionado [26].

Como alternativa para superar a limitação fisiológica imposta ao número de divisões celulares, a imortalização permite que as células adquiram imortalidade replicativa [27]. Diversas estratégias vêm sendo discutidas na literatura para atingir esse fim, incluindo imortalização espontânea [28], introdução de oncogenes virais, mutações nos pontos de controle do ciclo celular [23; 29-30] e a expressão ectópica da enzima transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) [21;22;31;32]. Entre essas abordagens, a superexpressão de

oncogenes virais e a introdução da hTERT destacam-se como os principais métodos empregados na imortalização de células mesenquimais derivadas de tecidos dentais ou odontogênicos [33]. Comparativamente ao uso de oncogenes, como o *simian virus 40 large T antigen* (SV40 Tag), a expressão de hTERT apresenta-se como uma alternativa mais segura, pois reduz o risco de instabilidades genéticas e fenotípicas, além de preservar a multipotencialidade celular [34]. Evidências demonstram que células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea e do tecido adiposo mantêm, mesmo após a imortalização, tanto a capacidade de diferenciação quanto o perfil de formação de nódulos minerais *in vitro* [22;35-37].

Diante da importância da imortalização para a preservação das características das células primárias e para a viabilização de estudos prolongados, o presente estudo tem como objetivo estabelecer uma linhagem imortalizada de PDLcs com baixo potencial osteogênico. Além disso, busca-se comparar suas características fenotípicas e moleculares com as da população primária. Por meio dessa abordagem, pretende-se desenvolver um modelo *in vitro* robusto e reprodutível, adequado para investigações de longo prazo voltadas à elucidação dos mecanismos epigenéticos subjacentes ao fenótipo de reduzido potencial osteogênico — uma condição de elevada relevância clínica e ainda desafiadora no campo da regeneração tecidual.

2 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos ao longo desta dissertação demonstram que a imortalização de células-tronco do ligamento periodontal com baixa capacidade de mineralização (l-PDLCs), por meio da expressão ectópica de *hTERT*, viabiliza a obtenção de uma linhagem celular (il-PDLCs) que preserva características fundamentais do fenótipo mesenquimal, incluindo o estado indiferenciado e a multipotencialidade. A manutenção dos marcadores de pluripotência, bem como a expressão de antígenos de superfície específicos, reforçam este perfil.

O padrão temporal distinto de expressão de genes proliferativos e osteogênicos nas il-PDLCs sugere que, embora essa subpopulação inicie mais precocemente as fases proliferativa e de diferenciação osteogênica em comparação às suas células primárias, seu potencial mineralizador e a formação de nódulos minerais *in vitro* a longo prazo permanecem comparáveis com as l-PDLCs. Este complexo cenário sugere a presença de mecanismos de regulação transcricionais e pós-transcricionais envolvidos na modulação gênica, com impacto direto sobre o fenótipo celular em estágios avançados de diferenciação.

Dessa forma, as il-PDLCs se apresentam como uma ferramenta promissora para investigações futuras voltadas à compreensão dos determinantes moleculares associados ao fenótipo de baixo potencial osteogênico, contribuindo para o avanço de estratégias terapêuticas mais previsíveis e eficazes em regeneração periodontal e óssea — especialmente em casos clínicos que envolvem esse perfil desafiador. Além disso, estudos futuros deverão incluir o monitoramento contínuo do comportamento da linhagem imortalizada, visando compreender até que ponto suas características genômicas e fenotípicas são mantidas ao longo do tempo, oferecendo maior segurança para delineamentos experimentais e possíveis aplicações clínicas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ¹ Yuan Z, Li J, Zou X, et al. Knockdown of Bach1 protects periodontal bone regeneration from inflammatory damage. *J Cell Mol Med.* **2023**;27(22):3465–77. doi:10.1111/jcmm.17916
- ² Kinane D, Stathopoulou P, Papapanou P. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* **2017**;3:17038. doi:10.1038/nrdp.2017.38
- ³ Nibali L, Farias BC, Vajgel A, Tu YK, Donos N. Tooth loss in aggressive periodontitis: a systematic review. *J Dent Res.* **2013**;92(10):868–75. doi:10.1177/0022034513501878
- ⁴ Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung JH, Freire M, et al. Potential for stem cell-based periodontal therapy. *J Cell Physiol.* **2016**;231(1):50–61.
- ⁵ Bäumer A, El Sayed N, Kim TS, Reitmeir P, Eickholz P, Pretzl B. Patient-related risk factors for tooth loss in aggressive periodontitis after active periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* **2011**;38(4):347–54. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01698.x
- ⁶ Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration – intrabony defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol.* **2015**;86(2 Suppl):S77–104. doi:10.1902/jop.2015.130685
- ⁷ Reynolds MA, Kao RT, Camargo PM, et al. Periodontal regeneration – intrabony defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol.* **2015**;86(2 Suppl):S105–7. doi:10.1902/jop.2015.140378
- ⁸ Mellonig JT, Valderrama MP, Cochran DL. Histological and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor combined with beta tricalcium phosphate for the treatment of human Class III furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* **2009**;29(2):169–77.
- ⁹ Koop R, Merheb J, Quirynen M. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in reconstructive periodontal therapy: a systematic review. *J Periodontol.* **2012**;83(6):707–20. doi:10.1902/jop.2011.110266
- ¹⁰ Hasan A, Byambaa B, Morshed M, et al. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med.* **2018**;12(6):1448–68. doi:10.1002/term.2677
- ¹¹ Adolpho LF, Lopes HB, Freitas GP, Weffort D, Campos Totoli GG, Barbosa ACL, et al. Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. *Regen Med.* **2022**;17(6):1–13.
- ¹² Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *J Orthop Trauma.* **2019**;33(4):203–13. doi:10.1097/BOT.0000000000001420
- ¹³ Ding G, Liu Y, Wang W, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* **2010**;28(10):1829–38. doi:10.1002/stem.512

- ¹⁴ Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. **2004**;364(9429):149–55. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
- ¹⁵ Assis RIF, Racca F, Ferreira RS, Silvério KG, Silva RA, Clokie SJH, et al. Osteogenic commitment of human periodontal ligament cells is predetermined by methylation, chromatin accessibility and expression of key transcription factors. *Cells*. **2022**;11(7):1126.
- ¹⁶ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **2006**;8(4):315–7.
- ¹⁷ Ferreira RS, Assis RIF, Feltran GS, Palma ICR, Françoso BG, Zambuzzi WF, et al. Genome-wide DNA (hydroxy)methylation reveals the individual epigenetic landscape importance on osteogenic phenotype acquisition in periodontal ligament cells. *J Periodontol*. **2022**;93(3):435–48.
- ¹⁸ Assis RIF, Schmidt AG, Racca F, Silva RA, Zambuzzi WF, Silvério KG, et al. DNMT1 inhibitor restores RUNX2 expression and mineralization in periodontal ligament cells. *DNA Cell Biol*. **2021**;40(5):662–74.
- ¹⁹ Assis RIF, Feltran GDS, Silva MES, Palma ICDR, Rovai ES, Miranda TB, et al. Non-coding RNAs repressive role in post-transcriptional processing of RUNX2 during the acquisition of the osteogenic phenotype of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Dev Biol*. **2021**;470:37–48.
- ²⁰ Ferreira RS, Assis RIF, Racca F, Bontempi AC, da Silva RA, Wiench M, et al. In silico analyses indicate the lncRNAs MIR31HG and LINC00939 as possible epigenetic inhibitors of the osteogenic differentiation in PDLCs. *Genes (Basel)*. **2023**;14(8):1649. doi:10.3390/genes14081649
- ²¹ Chang MW, Grillari J, Mayrhofer C, Fortschegger K, Allmaier G, Marzban G, et al. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells. *Exp Cell Res*. **2005**;309(1):121–36. doi:10.1016/j.yexcr.2005.05.002
- ²² Wolbank S, Stadler G, Peterbauer A, Gillich A, Karbiener M, Streubel B, et al. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue Eng Part A*. **2009**;15(7):1843–54. doi:10.1089/ten.tea.2008.0205
- ²³ Zeng Y, Liu L, Huang D, Song D. Immortalized cell lines derived from dental/odontogenic tissue. *Cell Tissue Res*. **2023**;393(1):1–15. doi:10.1007/s00441-023-03767-5. PMID: 37039940
- ²⁴ d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. **2003**;426(6963):194–8. doi:10.1038/nature02118
- ²⁵ Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*. **1998**;8(5):279–82. doi:10.1016/s0960-9822(98)70109-5

- ²⁶ Reaper PM, di Fagagna Fd, Jackson SP. Activation of the DNA damage response by telomere attrition: a passage to cellular senescence. *Cell Cycle*. **2004**;3(5):543–6.
- ²⁷ Counter CM, Hahn WC, Wei W, et al. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**;95(25):14723–8. doi:10.1073/pnas.95.25.14723
- ²⁸ Nakata A, Kameda T, Nagai H, et al. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**;308(4):834–9. doi:10.1016/s0006-291x(03)01467-0
- ²⁹ MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res*. **1995**;33(1–3):97–103. doi:10.3109/03008209509016988
- ³⁰ Voglauer R, Grillari J, Fortschegger K, et al. Establishment of human fibroma cell lines from a MEN1 patient by introduction of either hTERT or SV40 early region. *Int J Oncol*. **2005**;26(4):961–70. doi:10.3892/ijo.26.4.961
- ³¹ Mi HW, Lee MC, Fu E, Chow LP, Lin CP. Highly efficient multipotent differentiation of human periodontal ligament fibroblasts induced by combined BMP4 and hTERT gene transfer. *Gene Ther*. **2011**;18(5):452–61. doi:10.1038/gt.2010.158
- ³² Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **1998**;279(5349):349–52. doi:10.1126/science.279.5349.349
- ³³ Ramboer E, De Craene B, De Kock J, Vanhaecke T, Berx G, Rogiers V, Vinken M. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol*. **2014**;61:925–43.
- ³⁴ Yalvaç ME, Yilmaz A, Mercan D, Aydin S, Dogan A, Arslan A, et al. Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. *Neurochem Res*. **2011**;36:2227–35.
- ³⁵ Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation [published correction appears in *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 22;329(4):1361]. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**;326(3):527–38. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.059
- ³⁶ Jun ES, Lee TH, Cho HH, Suh SY, Jung JS. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem*. **2004**;14(4–6):261–8. doi:10.1159/000080335
- ³⁷ Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*. **2002**;20(6):592–6. doi:10.1038/nbt0602-592