

CULTIVO, DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ODONTOBLASTOS A PARTIR DE CELULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL

Agatha Maria Pelosine¹; Migue Luiz Batista Junior²; Fábio Dupart Nascimento³

1. Estudante de Odontologia; e-mail: mariapelosine@outlook.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabionascimento@umc.br
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: miguelj@umc.br

Área de conhecimento: **Biologia Molecular**

Palavras-chave: Células-Tronco; Odontoblastos; Polpa dental; PARs.

INTRODUÇÃO

Células-tronco são comumente definidas como células de origem clonogênica que exibem alto potencial de renovação à longo prazo e capacidade de diferenciação multilinhagens. O termo células-tronco mesenquimais (MSCs), vem sendo amplamente utilizado para descrever populações distintas de células fibroblásticas heterogêneas que possuem capacidade limitada de diferenciação multilinhagem. Dentro deste grupo os tecidos dentais aparecem como candidatos a potenciais nichos de MSCs. Vários estudos têm demonstrado que o tecido da polpa dental constitui uma fonte acessível de células-tronco adultas, que podem ser coletadas tanto de dentes permanentes indicados para a extração quanto de dentes decíduos recém esfoliados, em processos minimamente invasivos para o paciente (Gong et al., 2016). Contudo, os mecanismos pelos quais as células-tronco da polpa adulta se diferenciam em odontoblastos e, conseqüentemente, produzem matriz orgânica mineralizada, mediante à diferentes estímulos moleculares ainda é uma área de pesquisa de interface odontologia/biologia celular que carece de estudos mais profundos.

OBJETIVO

Nosso trabalho teve como objetivo estabelecer técnicas de cultivo, diferenciação e caracterização de odontoblastos provenientes de células-tronco originadas da polpa dental.

MATERIAIS E METODOS

Foram coletados dentes permanentes do curso de cirurgia, na clínica Odontológica da Universidade de Mogi das Cruzes - UMC. Cada paciente foi informado e assinou o TCLE. Foi feita a antisepsia dos elementos dentais, após esse procedimento os dentes foram cortados na região de junção amelocementária, para separar a coroa do dente da porção radicular e ter acesso a câmara pulpar. O tecido pulpar foi retirado com lima endodôntica estéril e imediatamente acondicionado ao meio α -MEM sem SFB (Soro Fetal Bovino). Em seguida, foram digeridos por 45 min a 37°C em solução contendo colagenase do tipo 1 (3mg/ml) e dispase (4mg/ml). Após a digestão o material foi centrifugado a 1200 RPM por 10 min, o pellet foi então ressuscitado em meio de cultura α -MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina e penicilina (100 U/mL) / streptomycina (100mg/mL), sendo filtrado em filtros com poros de 70 μ m, acondicionados em frascos para cultura celular de 25cm² e, incubado em estufa a 37°C com fluxo de 5% de CO₂. As células nos primeiros dias aderiram ao fundo do frasco, apresentando crescimento celular lento, contudo no período de 2 semanas o frasco já apresentava alta confluência celular e característica fibroblastóide. A

partir disso, foi extraído o RNA para a análise da expressão gênica de diversas moléculas, marcadoras ou não de células-tronco de origem mesenquimal, bem como dos PARs e foi feita a caracterização das células mesenquimais, para isso, foram utilizados marcadores positivos e negativos de células mesenquimais.

RESULTADOS

1. Obtenção dos tecidos pulpares humanos

Os tecidos pulpares humanos foram obtidos na clínica odontológica da UMC durante procedimentos cirúrgicos que tinham como indicação a remoção do elemento dental. A Figura 1, mostra as etapas de obtenção do tecido pulpar.

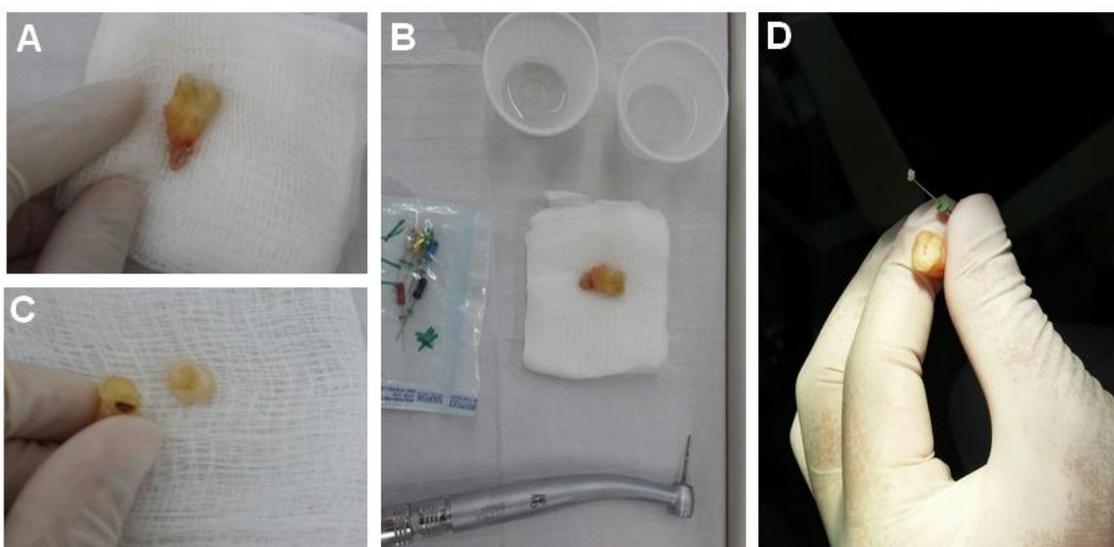


Figura 1. Obtenção dos tecidos pulpares: **(A)** Dente fresco e hígido recém extraído; **(B)** Descontaminação e assepsia do elemento dental antes da exposição da câmara pulpar; **(C)** Corte transversal da coroa e acesso a câmara pulpar; **(D)** Tecido pulpar retirado com lima endodôntica.

2. Cultura primária e caracterização das células da polpa dental

O tecido pulpar recém-hidrolisado foi cultivado em frascos de cultura celular de 25 cm², conforme descrito em métodos. A Figura 2A-D mostra as células de característica fibroblastóide nos dias 1, 5, 10 e 20 de cultivo. Uma vez que se trata de uma cultura primária de tecido pulpar adulto, a caracterização das células aderidas é de extrema importância. Para tanto, foi realizado um experimento utilizando os marcadores de superfície celular CD11b (macrófagos), CD15 (granulócitos) e CD34 (células primitivas), os quais funcionaram como marcadores negativos para as pretendidas células-tronco mesenquimais adultas, uma vez que estas células não expressão esses tipos de receptores. A Figura 2E-F mostra os resultados deste experimento comparando a porcentagem de células marcadas em relação ao controle, sem marcação.

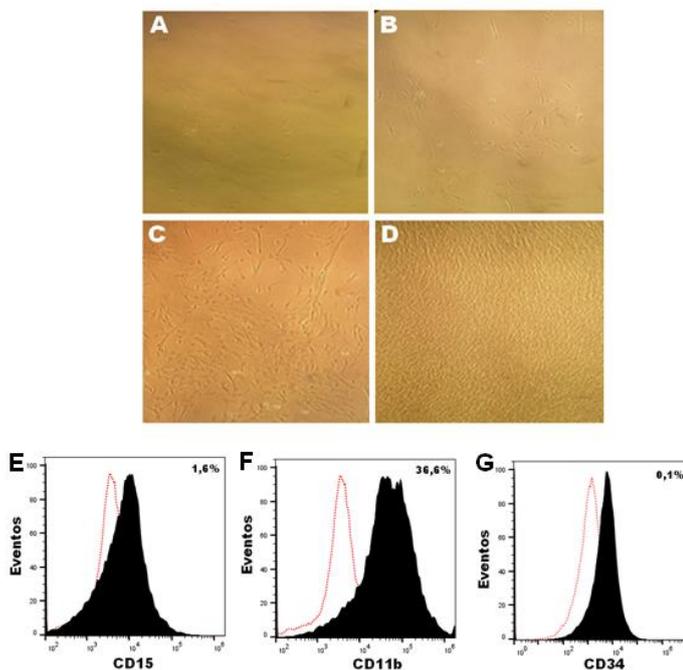


Figura 2. Microscopia de luz convencional. (A) células de tecido pulpar após 24hs de cultivo; (B) células de tecido pulpar com 5 dias de cultivo; (C) células de tecido pulpar com 10 dias de cultivo e (D) células de tecido pulpar com 20 dias de cultivo. Imunomarcagem de receptores de superfície celular. (E) porcentagem de células marcadas com CD15 em relação ao controle; (F) porcentagem de células marcadas com CD11b em relação ao controle; (G) porcentagem de células marcadas com CD34 em relação ao controle.

3. Análise da expressão gênica

O cDNA obtido por transcrição reversa a partir do RNA_t extraído das culturas celulares foi utilizado para o estudo da expressão gênica dos PARs (Figura 3^a), de genes marcadores de células mesenquimais (Figura 3B), de genes expressos por células que secretam material inorgânico (Figura 3C) e metaloproteases de matriz (MMPs) (Figura 3D).

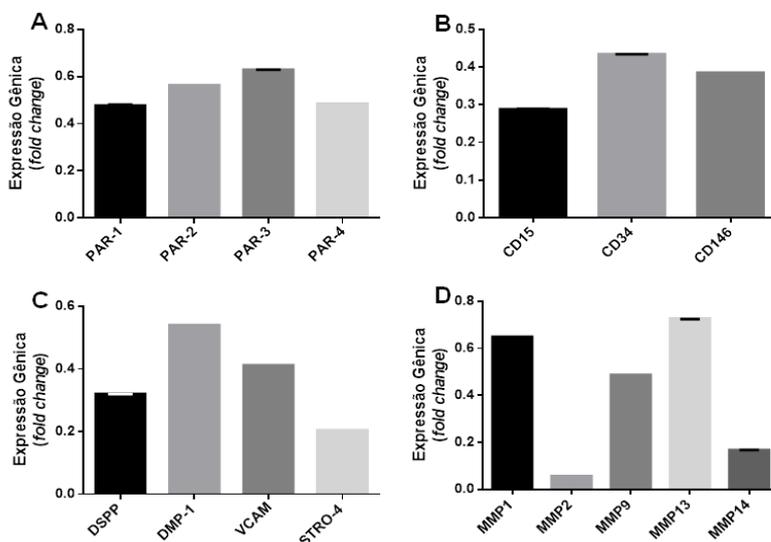


Figura 3. Expressão relativa dos genes de interesse. A expressão dos genes PAR-1, 2, 3 e 4 (A), CD15, CD34 e CD146 (B), DSPP, DMP-1, VCAM e STRO-4 (C), MMP1, MMP2, MMP9, MMP13 e MMP14 (D), nas células mesenquimais de tecido pulpar adulto foi avaliada por qPCR. O gene constitutivo utilizado foi a proteína ribossomal L13a (RPL13a). O experimento foi realizado em quadruplicada e as barras indicam o desvio padrão.

CONCLUSÕES

A expressão dos PARs neste modelo celular, mostra um resultado altamente interessante, uma vez que odontoblastos maduros, humanos ou modelo murino - células MDPC-23 -, não expressam PAR-3. Relatos da literatura, em outros modelos, correlacionam a expressão do PAR-3 em processos embrionários, o que corrobora com nossos achados em células mesenquimais da polpa dental adulta. A expressão de MMP-1 (colagenase 1) e MMP-13 (colagenase 13) é bem documentada em células produtoras de matriz mineralizadas, mas não em odontoblastos. Nossos dados mostram a expressão de ambas proteases, MMP-1 e MMP-13, em níveis significativos.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. M. P. et al. PAR-1 and PAR-2 Expression Is Enhanced in Inflamed Odontoblast Cells. **J. Dent. Res**, 2017 Dec;96(13):1518-1525. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759300>.

COUBLE, M. L. et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int*, v. 66, n. 2, p. 129-38, Feb 2000. ISSN 0171-967X (Print) 0171-967X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652961>.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec 5 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/110>