

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

Agatha Maria Pelosine¹; Marcela Maciel Palacio Alvarez²; Ivarne Tersariol³; Fábio Dupart Nascimento⁴

1. Estudante do curso de Odontologia; e-mail: mariapelosine@outlook.com
2. Doutoranda da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: mpalvarez.marcela@gmail.com
3. Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: ivarne@umc.br
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fdnascimento@gmail.com

Área do conhecimento: **Biologia Molecular**

Palavras-chave: Células-tronco, Odontoblastos, PARs.

INTRODUÇÃO

Há estudos demonstrando que o tecido da polpa dental constitui uma fonte acessível de células-tronco adultas, que podem ser coletadas tanto de dentes permanentes indicados à extração quanto de dentes decíduos recém esfoliados (Gong *et al.*, 2016). Gronthos e cols., foram os primeiros a identificar e caracterizar uma população de células-tronco presente no tecido pulpar adulto (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002). Até o momento, várias populações de células-tronco adultas foram isoladas do tecido pulpar, incluindo as células-tronco da polpa dental (DPSCs), as células-tronco de dentes decíduos (SHEDs) e as células-tronco da papila apical (SCAPs), todas elas mostraram potencial de diferenciação para os vários tipos celulares presentes no órgão dental. Isoladas a partir de terceiros molares humanos de pacientes adultos as DPSCs demonstraram alto potencial proliferativo, de auto renovação e capacidade de diferenciação, quando submetidas à estímulos específicos. 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

O presente trabalho teve como objetivo coletar, cultivar e caracterizar odontoblastos a partir de tecido pulpar adulto.

METODOLOGIA

Dentes permanentes indicados a exodontia foram coletados em um recipiente estéril com soro fisiológico, sendo lavados com etanol 70%, justamente para evitar contaminações por bactérias de origem bucal. Posteriormente, os elementos dentais foram lavados cinco vezes com tampão fosfato de sódio (PBS), no intuito de remover o etanol. Após esse procedimento os dentes foram cortados, com broca Zecrya® estéril em aparelho de alta rotação com refrigeração abundante na região da 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 imediatamente acondicionado ao meio α -MEM sem SFB (soro fetal bovino). Em seguida, foi realizado a digestão enzimática e, acondicionados em frascos para cultura celular de 25cm², incubado em estufa a 37°C com fluxo de 5% de CO₂. As células, de aparência fibroblastóide, 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 as células apresentaram característica fibroblastóide. Os ensaios de imunofluorescência foram realizados para analisar o padrão de expressão e distribuição dos receptores PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Para isso, as linhagens celulares foram cultivadas sobre lamínulas circulares de 12mm de diâmetro, em densidade de $1,0 \times 10^4$ células por lamínula e mantidas em placas de cultura de 24 poços em condições de manutenção até atingirem a confluência de 70 %. As células foram incubadas por 1 hora a 4°C com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-PAR-1, -2, -3 e -4. Após esse período, as células foram lavadas com tampão PBS e aos poços foi adicionado o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao fluorocromo alexa flúor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). As células permaneceram em contato com o anticorpo por 40 minutos, a 4°C de temperatura e protegidas da luz. Para coloração do núcleo, as células foram incubadas com reagente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Finalizado o procedimento, as lamínulas foram lavadas por três vezes em tampão PBS e montadas em lâminas histológicas com Prolong® Gold antifade Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram analisadas e as imagens capturadas em microscópio confocal LSM 510 META (Carl Zeiss). Para análise de marcadores inflamatórios por citometria de fluxo, as células em cultura foram estimuladas com o peptídeo agonista do receptor PAR-1 (SFFLRN-NH2) (100µM) e Trombina (25U/ml), ativador natural de PAR-1; e com o peptídeo agonista de PAR-2 (SLIGRL-NH2) (100uM), e Tripsina (3nM), ativador natural dos receptores PAR-2, por 24h. Sequencialmente, o Kit CBA (Becton Dickinson, BD) (cytometric beads array) foi usado para a avaliação da expressão das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1β, IL-12P70 e TNF em todas as amostras experimentais. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software FCAP (BDTM). No intuito de verificar o possível papel modulador dos PARs durante a diferenciação osteogênica, a análise da expressão de 84 genes relacionado a este processo foram analisados por meio do ensaio de RT2 Profiler™ PCR array, as células foram estimuladas com o peptídeo agonista do receptor PAR-1 (SFFLRN-NH2) (100µM) e com o peptídeo agonista de PAR-2 (SLIGRL-NH2) (100uM), os valores de CT foram exportados para um arquivo do Excel para criar uma tabela de valores de CT. Esta tabela foi então enviada para o portal em <http://www.qiagen.com/geneglobe>, onde os resultados foram analisados. Os valores de CT foram normalizados com base em uma seleção automática de um painel completo de genes de referência.

RESULTADOS / DISCUSSÃO

- Coleta dos dentes e cultivo celular

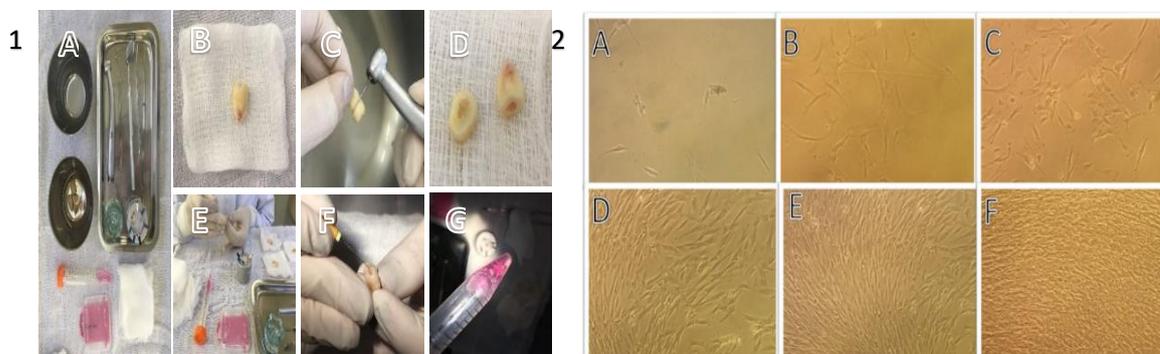


Figura 1. Obtenção, tratamento de tecidos pulpares e cultivo celular (imagem a esquerda): (1-A) Instrumentais esterilizados utilizados para obtenção do tecido pulpar; (1-B) Dente hígido após a antissepsia; (1-C) Secção transversal da coroa; (1-D) Dente seccionado; (1-E) Instrumentação endodôntica; (1-F) Tecido pulpar sendo removido com lima endodôntica; (1-

G) Tecido pulpar fresco antes da digestão enzimática. Microscopia de luz convencional (imagem à direita). (2-A) células do tecido pulpar após 24 horas de cultura; (2-B) células de tecido pulpar com 5 dias de cultura; (2-C) células de tecido pulpar com 10 dias de cultura ; (2-D) células de tecido pulpar com 15 dias de cultura; (2-E) células de tecido pulpar com 20 dias e (2-F) com 21 dias.

- Expressão dos PARs por microscopia confocal a laser e análise de marcadores inflamatório por citometria de fluxo

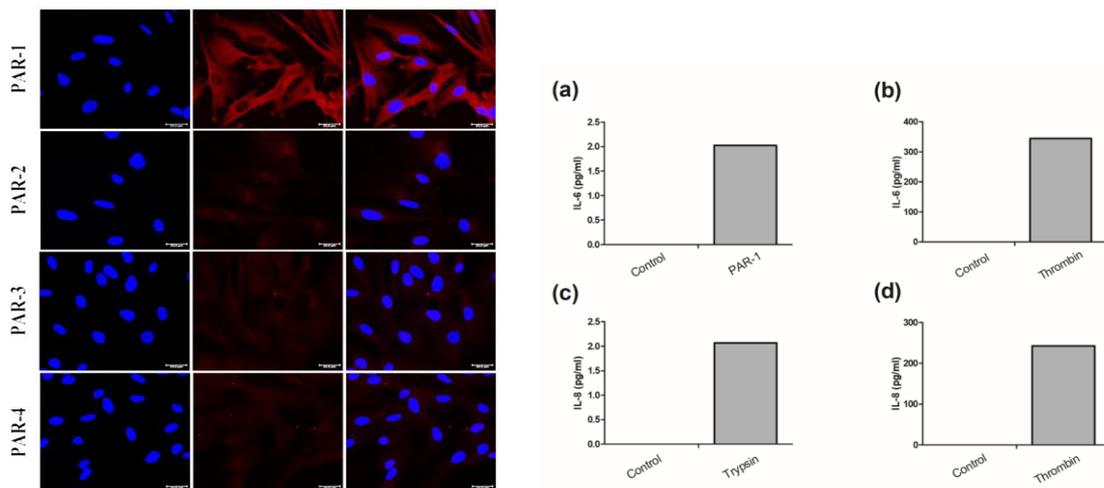


Figure 3. Análise por microscopia confocal das células pulpares humanas (figura a esquerda), as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpos monoclonais anti-PAR-1, -2, -3 e -4 e reveladas com anticorpo secundário fluorescente Alexa Flúor 594 (vermelho). Os núcleos das células pulpares foram corados com DAPI (4',6-diamidine-2-phenylindole) (azul). A imagem à direita representa a citometria de fluxo para análise de marcadores inflamatórios, os painéis (a) e (b) representam a concentração da citocina IL-6 após estímulo e os painéis (c) e (d) representam a produção de IL-8. Não houve aumento da produção de citocinas IL-1 β , IL-10, TNF e IL-12P70 (dados não mostrados). Cada barra de erro com a mesma letra tem o mesmo nível significativo de valor p.

- Heat Map do grupo PAR-1 e 2 e ClusterGram

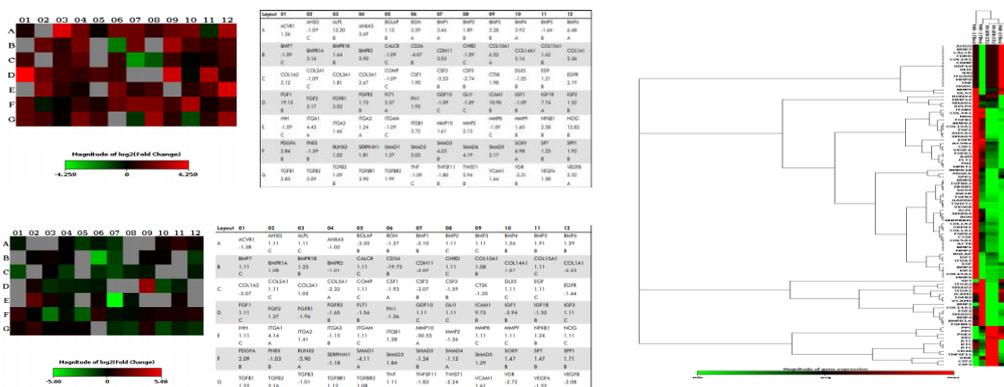


Figura 4. Heat Map (a esquerda) fornece uma visualização das mudanças na expressão entre os grupos selecionados para cada gene no array. A magnitude dos valores é expressa fold change, onde tonalidades de verde representam as modulações negativas, tons de preto

representam ausência de modulação e tons avermelhados representam modulações positivas. ClusterGram (a direita) executa o agrupamento hierárquico não supervisionado de todo o conjunto de dados para exibir um mapa de calor com dendrogramas indicando genes co-regulados através de grupos ou amostras individuais.

CONCLUSÃO

A expressão e localização celular dos PARs nas células-tronco pulpares foi avaliada por microscopia confocal, figura 3. Apesar da presença majoritária dos receptores de PAR-1, como esperado, o resultado confirma a presença de PAR-3 neste modelo celular, fato que demonstra a característica de células mesenquimais, desejadas em células-tronco da polpa adulta, uma vez que esse receptor não está presente em células diferenciadas. Soma-se a isso os importantes resultados obtidos na avaliação da expressão de citocinas inflamatórias, após a ativação, principalmente, dos receptores de PAR-1. Apesar de não termos conseguido aumento expressivo na expressão das citocinas após ativação do PAR-2. Como foi dito anteriormente sobre a diferenciação natural destas células para odontoblastos maduros, foi estudado genes que atuam no metabolismo mineral por meio RT² Profiler PCR Array. No que diz respeito aos genes modulados positivamente por PAR-1, é interessante notar a presença de quase todos os membros da família das Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Dos membros dessa família analisados (BMP1 até 7), apenas a BMP7 não foi modulada positivamente. Este resultado, mostra claramente um potencial papel do PAR-1 na modelação óssea, após a estimulação. Ainda, FGF1, a molécula de adesão ICAM1, também tiveram suas expressões consideravelmente aumentadas, reforçando a hipótese do papel do PAR-1 na osteogênese. Outro resultado que merece destaque, foi o aumento de 12,83 vezes do gene NOG, molécula ativa no processo embrionário, e que comprova a origem indiferenciada das células-tronco do tecido pulpar caracterizadas neste estudo. Finalmente, o PCR Array ainda comprovou os resultados obtidos na fase 1 do estudo, onde mostramos a modulação da expressão de MMPs após o estímulo dos PARs. No que diz respeito ao PAR-2, receptor de tripsina sabidamente mais relacionado à processos inflamatórios, foi possível observar modulação positiva após a sua estimulação apenas dos genes ICAM1, ITGA1, TGFB2 e PDGFA. Este resultado demonstra uma tendência de modulação da fração orgânica da matriz, fato que pode ser crucial durante o processo de mineralização tecidual. Ainda, a inibição da expressão de MMP-10 em 50,55 vezes, bem como de CD36 em 19,75 vezes, mostra claramente uma resposta na matriz extracelular motivada pela estimulação do receptor PAR-2.

REFERÊNCIAS

- Alvarez, M.M.P.; Moura, G.E.; Machado, M.F.M.; Viana, G.M.; de Souza Costa, C.A.; Tjäderhane, L.; Nader, H.B.; Tersariol, I.L.S.; Nascimento, F.D. PAR-1 and PAR-2 expression is enhanced in inflamed odontoblast cells. *Journal of dental research*, v. 96, n. 13, p. 1518-1525, 2017.
- Couple, M.L.; Farges, J.C.; Bleicher, B.; Perrat-Mabillon, M.; Boudeulle, H.; Magloire, H.; Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcified Tissue International*, v. 66, n. 2, p. 129-138, 2000.
- Gronthos, S.; Brahim, J.; Li, W.; Fisher, L. W.; Cherman, N.; Boyde A.; DenBesten, P.; Gehron-Robey, P.; Shi, S.; Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

Gronthos, S.; Mankani M.; Brahim, P., Gehron-Robey, P.; Shi, S.; Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.