

# **CULTIVO, DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ODONTOBLASTOS À PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL**

Maria Luísa Gubolin Torres<sup>1</sup>; Fábio Dupart Nascimento<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Odontologia; e-mail: malu.gubolin@hotmail.com<sup>1</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes e-mail: fabionascimento@umc.br<sup>2</sup>

Área do conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Receptores Ativados por Proteases, Polpa dental, odontoblastos e Inflamação.

## **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. Baseado no conceito de plasticidade, ou melhor, capacidade das células-tronco em dar origem a diferentes tipos de células especializadas, esta classe celular pode ser dividida em dois grupos: Células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco adultas (ASCs) (Rao, 2004). Embora, no início, as ECSs tenham despertado grande interesse da comunidade científica sua aplicação prática na engenharia de tecidos e em terapias celulares foi diminuindo ao decorrer do tempo, provavelmente, devido ao seu alto risco de oncogenicidade e às questões éticas e legais associadas à sua origem embrionária. Atualmente, cada vez mais os interesses neste campo específico de pesquisa têm se desviado para um tipo de engenharia tecidual baseada na utilização de células-tronco adultas, que foram, posteriormente, identificadas a partir de vários tecidos e órgãos do corpo humano (Gong et al., 2016). Durante o desenvolvimento da doença danos teciduais e nas células da polpa estão diretamente relacionados a ação de proteases bacterianas e moléculas/enzimas provenientes de células do próprio sistema imune do hospedeiro. Ainda, várias evidências indicam que a inflamação pulpar, aguda ou crônica, seria o ponto de partida do processo de reparo, que, por sua vez, iniciará efetivamente apenas após o término da inflamação ou da infecção (Bergenholtz, 1981). Apesar dos inúmeros estudos evidenciando a importância de um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos que envolvem a progressão da doença cárie, até o momento nada foi descrito sobre o possível papel dos PARs no complexo dentina-polpa mediante ao estímulo inflamatório causado pelo avanço da doença.

## **OBJETIVOS**

O presente projeto teve como objetivo avaliar e expressão gênica dos receptores ativados por proteases (PARs), bem como suas moléculas correlatas, em tecido pulpar sadio e inflamado.

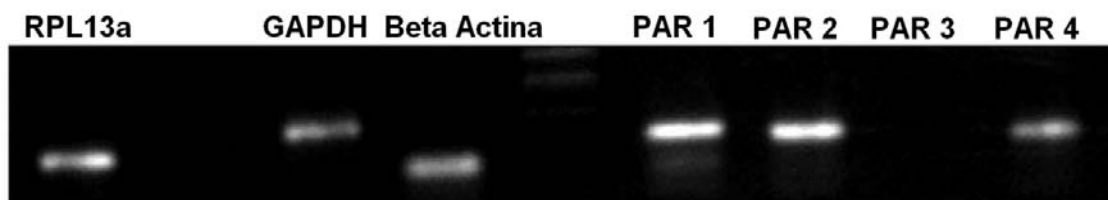
## **METODOLOGIA**

Dentes hígidos adultos ou decíduos com indicação para remoção cirúrgica foram colocados em recipiente estéril contendo solução salina. Terceiros molares e pré-molares são os elementos dentais mais comuns para o isolamento de células-tronco originadas do tecido pulpar, devido à relativa facilidade em obter dentes hígidos, ou devido a indicações ortodônticas, no caso dos pré-molares, ou em cirurgias de terceiros molares impactados. Porém, os terceiros molares são os últimos dentes a desenvolverem-se nos humanos e se

encontra, na maioria das vezes, em estágios iniciais de desenvolvimento, tornando-se capaz de produzir quantidades satisfatórias de tecido pulpar para isolamento de células-tronco. O elemento dental foi posteriormente lavado com solução de iodina e etanol, 70%, no intuito de se evitar contaminações relacionadas à presença de bactérias de origem bucal. Em seguida, os elementos dentais foram lavados 5 vezes com tampão fosfato de sódio (PBS), para remoção da iodina e do etanol. Posteriormente, o elemento dental foi cortado, com broca estéril em aparelho de alta rotação na região da junção esmalte-cimento, a fim de separar a coroa dentária da porção radicular, e assim acessar a câmara pulpar e conseqüentemente o tecido pulpar. Em seguida, o tecido pulpar foi removido da câmara pulpar com lima endodôntica estéril. Após a extração do RNA total do tecido pulpar, as reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando os “primers” específicos para cada PAR. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata com 2 µg do cDNA sintetizado diluído 1:10, primer AS (reverse) 600 nM, primer S (forward) 600 nM, 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix e água Milli-Q (Millipore, Billerica, USA), autoclavada para 25 µl. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foi otimizado iniciando-se com incubações a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos seguido de anelamento a 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados concomitantemente controles negativos para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional. As reações de PCR convencionais foram utilizadas para otimização do protocolo anteriormente a realização da análise quantitativa por qPCR.

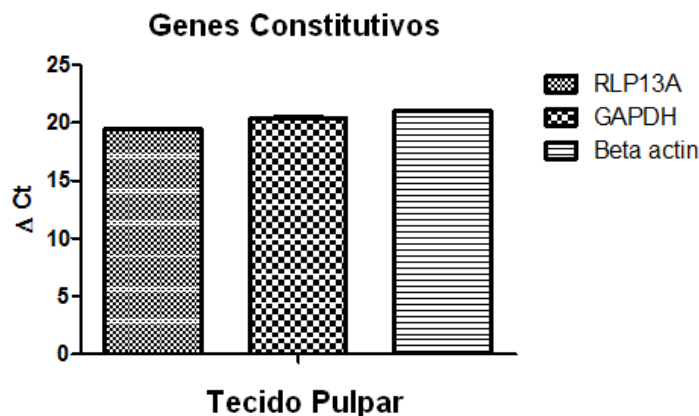
## RESULTADOS/DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra, após a eletroforese em gel de agarose, o produto de PCR resultante da avaliação da expressão gênica em amostra de tecido pulpar sadio. Foi possível notar a ausência de sequência codificante para o PAR 3.



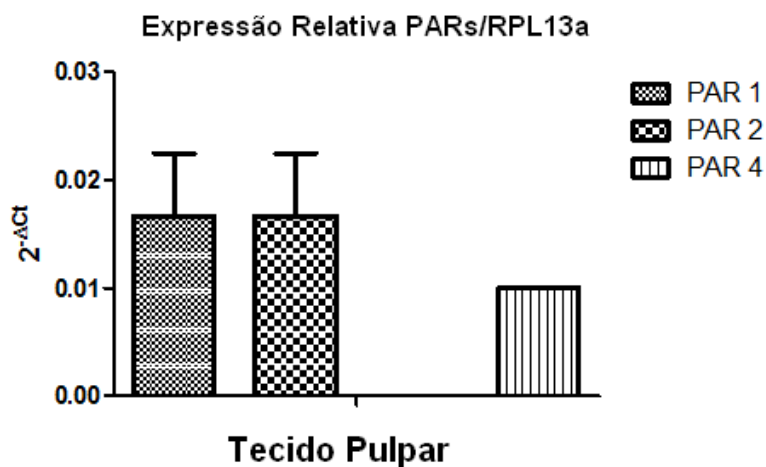
**Figura 1. Expressão dos genes PARs em tecido pulpar sadio.** O RNA total do tecido pulpar foi extraído utilizando o reagente de Trizol®. Após a transcrição reversa o DNA complementar foi submetido a uma reação de PCR convencional. GAPDH e Beta actina correspondem a expressão de genes constitutivos usados como controle positivo na reação.

A Figura 2 mostra os resultados da avaliação quantitativa da expressão dos receptores PARs em tecido pulpar sadio. A Figura 2a corresponde aos resultados obtidos no experimento controle, que avaliou a expressão dos genes constitutivos RPL13a, GAPDH e Beta Actina, os quais foram utilizados como controles positivos normalizadores da reação e, interessante, apresentaram níveis equivalentes de expressão no tecido pulpar.



**Figura 2. Análise da expressão dos genes constitutivos por PCR quantitativo.** Foram utilizados primers especialmente desenhados, e comuns na literatura, para avaliar a expressão dos genes constitutivos RLP13a, GAPDH e Beta Actina.

A Figura 3 corresponde aos resultados obtidos na reação de PCR quantitativo, que avaliou a expressão gênica dos quatro membros da família dos PARs.



**Figura 3. Análise dos genes da família PAR por PCR quantitativo.** A expressão dos genes dos quatro membros da família PAR no tecido pulpar foi avaliada por qPCR.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram claramente que o tecido pulpar adulto expressa diferentemente os genes de três dos quatro PARs descritos na literatura. A ausência do PAR-3 era esperada, uma vez que ele é expresso apenas em períodos embrionários, em todos os tecidos até agora estudados. Além disso, foi possível determinar quais moléculas envolvidas no processo de mineralização dentinária estariam sendo moduladas pelos receptores PAR-1 ou PAR-2. A Figura 4 (A e B) mostra que o gene da Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) pode ser modulado diferentemente dependendo da ativação

de cada receptor. Ainda, o estudo possibilitou mostrar o real envolvimento dos PARs com o processo de remodelação de tecidos mineralizados, como a dentina, uma vez que a expressão dessas moléculas nos odontoblastos pôde ser modulada mesmo sem a presença das enzimas tipicamente descritas como ativadoras de PARs.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J Endod**, v. 7, n. 3, p. 100-4, Mar 1981. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6938628> >.

GONG, T. et al. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 9204574, 2016. ISSN 1687-966X (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069484> >.

RAO, M. S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 5, p. 452-5, Oct 2004. ISSN 1547-3287 (Print) 1547-3287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588501> >.