

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE EXPRESSÃO DE VEGF EM CÉLULAS-TRONCO DE ORIGEM PULPAR

BHÁRBARA MARINHO BARCELLOS¹; JÚLIO CÁ²; MARCUS CRISTIAN
 MUNIZ CONDE³; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO⁴

¹UFPel – Graduando em Odontologia – cajulio125@hotmail.com

²UFPel – Graduada em Odontologia – bharbarambarcellos@hotmail.com

³UFPel – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – marcusconde82@gmail.com

⁴UFPel - Programa de Pós-Graduação em Odontologia – fdemarco@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é um campo interdisciplinar da ciência que funde princípios e inovações da Engenharia e das Ciências Biológicas (LANGER; VACANTI, 1993). Tem por objetivo o reparo ou substituição de tecidos e órgãos baseado em três pilares fundamentais: as moléculas bioativas - Fatores de crescimento (FC), moléculas de origem proteica, com capacidade de se ligarem a receptores específicos presentes na membrana celular, e a partir daí reger o comportamento dessas estruturas (MATTUELLA et al., 2007); os *scaffolds* ou *scaffolds* – estruturas tridimensionais que servem como substrato para a adesão e proliferação das células, atuando como análogos da matriz extracelular (MEC); e as células-tronco (CT) as quais possuem alta capacidade clonogênica, de proliferação e capacidade de diferenciação em uma ampla gama de tecidos (LANGER; VACANTI, 1993). A polpa dental é um tecido conjuntivo altamente especializado. Tem como função primordial de formação de dentina a partir de uma matriz orgânica secretada pelos odontoblastos. A polpa, de dentes permanentes e decíduos, possui uma população de CT denominadas “Dental Pulp Stem Cells (DPSC)” e “Stem Cells from Exfoliated Human Teeth (SHED)”, respectivamente (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003). Um dos princípios fundamentais que governa a ET diz que o tecido engendrado (*construct*) deve possuir e manter uma vascularização adequada para suportar seu crescimento devido à alta atividade metabólica das células (SAKAI et al., 2010). É importante salientar que a anastomose de vasos sanguíneos do organismo hospedeiro com o *construct* desempenha papel categórico nesse processo de neoformação tecidual (GALLER et al., 2012). O maior limitante para a regeneração pulpar é sua localização anatômica, já que é circundada quase em sua totalidade por paredes rígidas mineralizadas e seu aporte sanguíneo advém somente do forame apical (DEMARCO et al., 2011). Isso torna inviável que a nutrição das CTs implantadas no canal radicular seja suportada unicamente pelos vasos sanguíneos do organismo hospedeiro. A angiogênese, ou neovascularização, é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes tendo o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) como ator principal nessa função, já que aquele exerce influência mitogênica sobre células de origem endotelial (JABBARZADEH et al., 2008). O VEGF proporciona a neovascularização de polpas submetidas a traumas e pode ser utilizado como agente tópico para o replante de dentes avulsionados (MULLANE et al., 2008). Assim, foram desenvolvidas estratégias utilizando VEGF recombinante (rhVEGF) para estimular a proliferação e migração de células endoteliais ou utilizando células que possam se diferenciar em tecidos de origem endotelial (DEMARCO et al., 2011). Ambas as abordagens, isoladamente ou em combinação, resultaram em

uma melhoria significativa do crescimento vascular, provando a hipótese de que o fornecimento de rhVEGF induz a migração de Células Endoteliais hospedeiras (GALLER et al., 2012). Entretanto, o rhVEGF é extremamente sensível ao processamento térmico e exposição a solventes, possui uma meia-vida insuficiente quando implantadas in vivo e é extremamente difícil prever e controlar sua distribuição temporal e espacial após a inoculação no organismo de interesse (SCHELLER et al., 2012). Nesse contexto, seria de extrema importância para a evolução das pesquisas que visam a regeneração do complexo dentino-pulpar (CDP) que as CTs utilizadas nas terapias desenvolvidas tivessem a capacidade de expressar de maneira inerente este fator pró-angiogênico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão VEGF em diferentes linhagens celulares de origem pulpar.

2. METODOLOGIA

DPSC e SHED foram cultivadas utilizando DMEM com baixo teor de glicose (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Fibroblastos da polpa dental humana foram isolados pelo método de overgrowth, e cultivados com DMEM alta glicose, 10% de SFB e 1% de antibiótico. Células endoteliais da microvasculatura humana (HDMECs) desenvolveram-se em in EBM (Cambrex, Walkersville, MD), suplementados de acordo com as instruções do provedor das células. Apenas células entre as 4^o e 6^o passagens foram utilizadas para os experimentos. Quando as células adquiriam um estado de 80% de subconfluência, mediante averiguação em microscópio ótico de luz invertida, foram tripsinizadas para então serem submetidas ao isolamento do RNA. Brevemente, o RNA odontoblástico foi obtido de terceiros molares humanos. Para isso os dentes foram cortados longitudinalmente utilizando uma micro cortadeira com disco diamantado utilizando solução salina estéril (PBS) como agente refrigerante. O tecido pulpar foi cuidadosamente removido do interior da câmara pulpar e a pré-dentina foi raspada com uma colher de dentina para remoção da camada odontoblástica. O RNA foi isolado de todas as linhagens celulares utilizadas nesse estudo utilizando TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA (0.2µg) foi utilizado para avaliar a expressão de VEGF nas linhas celulares de interesse através da técnica de RT-PCR (desnaturação, 94°C durante 45s; anelamento, 57°C durante 45s, e extensão, 72°C durante 60s, durante 35 ciclos, em seguida 72°C durante 5 min e mantida a 4°C para ambas as condições). O primer específico para o VEGF foi desenhado de acordo com as sequências de cDNA publicadas no GenBank. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio; imagens digitais foram feitas usando um fundo ultravioleta. A análise da expressão de VEGF nas linhagens celulares avaliadas foi normalizada diante das bandas de densidades expressas por HDMECS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão do VEGF mRNA foi observada em DSPC, SHED e fibroblastos pulpares. Essa expressão foi maior em DSPC e SHED do que em fibroblastos pulpares. As células odontoblásticas não expressaram mRNA VEGF. Foi possível observar que as células-tronco de origem dental apresentaram bandas

mais evidentes com relação à expressão do gene de interesse (Figura 1.). A expressão de VEGF em DPSC, SHED, fibroblastos pulpares e odontoblastos foi inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular.

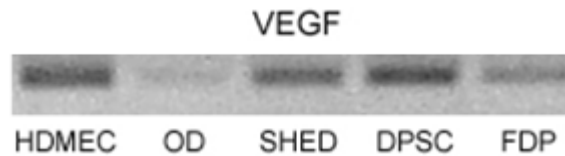


Figura 1. Expressão gênica de VEGF nas diferentes linhagens celulares avaliadas

Isto ocorre, provavelmente, porque os odontoblastos representam uma linhagem celular pós-mitótica, altamente especializada. Quando submetidas à ação de lipopolissacarídeo (LPS), estas células especializadas expressam o VEGF. Nos fibroblastos, o VEGF é expressado em polpas normais (MATUELLA et al., 2007). Entretanto, essa expressão é aumentada em casos de pulpite irreversível ou depois de injúrias, elucidando a capacidade de angiogênese em situações adversas de fibroblastos pulpares. Nós ainda observamos que VEGF foi fortemente ampliado em DPSC e SHED. Na verdade, quando SHED estão capacitadas para se diferenciar em células formadoras de vasos sanguíneos, implantadas *in vivo*. Nossos resultados vão ao encontro dos de CORDEIRO et al (2008), os quais elucidam que células tronco pulpares apresentaram potencial angiogênico. Células-tronco adultas em condições estressantes (hipóxia e.g.) liberam VEGF. No entanto, nosso estudo mostrou pela primeira vez na literatura o perfil de expressão de VEGF pró-angiogênico em células-tronco da polpa dentária (DPSC e SHED) em condições normais de crescimento celular.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, células-tronco (DPSC e SHED) e fibroblastos pulpares expressam o fator pró-angiogênico VEGF em condições normais de cultivo, o que pode elucidar a capacidade dessas células formarem vasos sanguíneos. Considerando-se que a matriz de dentina humana contém moléculas de sinalização, incluindo o VEGF, e que SHED e DPSC possuem um potencial angiogênico constitui uma ferramenta de suma importância nos avanços da pesquisa que objetivam a regeneração do tecido pulpar. Ainda, Células-tronco adultas em condições estressantes (hipóxia e.g.) liberam VEGF. No entanto, nosso estudo mostrou pela primeira vez na literatura o perfil de expressão de VEGF em células-tronco da polpa dentária (DPSC e SHED) em condições normais de crescimento celular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORDEIRO, M. M.; DONG, Z.; KANEKO, T.; ZHANG, Z.; MIYAZAWA, M.; SHI, S.; SMITH, A. J.; NOR, J. E. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 962-969, Aug 2008.
- DEMARCO, F. F.; CONDE, M. C.; CAVALCANTI, B. N.; CASAGRANDE, L.; SAKAI, V. T.; NOR, J. E. Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, Dec 5 2000.
- GALLER, K. M.; HARTGERINK, J. D.; CAVENDER, A. C.; SCHMALZ, G.; D'SOUZA, R. N. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 1-2, p. 176-184, Jan 2012.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, May 14 1993.
- JABBARZADEH, E.; STARNES, T.; KHAN, Y. M.; JIANG, T.; WIRTEL, A. J.; DENG, M.; LV, Q.; NAIR, L. S.; DOTY, S. B.; LAURENCIN, C. T. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11099-11104, Aug 12 2008.
- LINDE, A.; GOLDBERG, M. Dentinogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 5, p. 679-728, 1993.
- MATTUELLA, L. G.; DE FIGUEIREDO, J. A. P.; NOR, J. E.; DE ARAUJO, F. B.; FOSSATI, A. C. M. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 12, p. 1408-1412, Dec 2007.
- MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SCHELLER, E. L.; VILLA-DIAZ, L. G.; KREBSBACH, P. H. Gene therapy: implications for craniofacial regeneration. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 1, p. 333-337, Jan 2012.
- SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, May 13 2003.
- MULLANE, E. M.; DONG, Z.; SEDGLEY, C. M.; HU, J. C.; BOTERO, T. M.; HOLLAND, G. R.; NOR, J. E. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 12, p. 1144-1148, Dec 2008.
- SAKAI, V. T.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; NEIVA, K. G.; MACHADO, M.; SHI, S.; SANTOS, C. F.; NOR, J. E. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 791-796, Aug 2010.