

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO de TGF- β 1 EM POLPAS DESENVOLVIDAS POR ENGENHARIA TECIDUAL

LUIZ ALEXANDRE CHISINI¹; BHÁRBARA MARINHO BARCELLOS²; JÚLIO CÁ²;
FLÁVIO FERNANDO DEMARCO³; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE³

¹Universidade Federal de Pelotas – luizalexandrechisini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - bharbarambarcellos@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cajulio125@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – Marcusconde82@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo de características únicas que apresenta uma capacidade de regeneração limitada. Assim, este tecido possui um requintado mecanismo de defesa que permite a regeneração parcial das estruturas do complexo dentino-pulpar (CDP) (SMITH et al., 1998). Tradicionalmente o material utilizado para induzir o reparo do CDP é o Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)₂), ou materiais a base de Ca(OH)₂ como o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) (FORD et al., 1996). Estes produtos promovem a formação de tecido mineralizado, e devido ao seu elevado pH possuem propriedades bacteriostáticas e bactericidas (HILTON, 2009). Recentemente foi esclarecido que tais materiais a base de Ca(OH)₂ são capazes de induzir o reparo do CDP a partir da dissolução da matriz extracelular dentinária (DCEM) e consequente liberação das moléculas bioativas (GRAHAM et al., 2006; TOMSON et al., 2007) que seriam responsáveis pelos eventos moleculares de reparo que remontam os processos de diferenciação da odontogênese. Assim, esses materiais proporcionariam a liberação dos fatores de crescimento, principalmente TGF β s e BMPs, os quais iniciariam a cascata de eventos que modula o reparo (GRAHAM et al., 2006). Porém, esse reparo ocorre as custas de tecido sadio e seu prognóstico a longo prazo não é promissor.

Nesse contexto, empregar a engenharia de tecidos para a estruturação de um tecido pulpar que permita a completa formação dos tecidos e anexos radiculares é uma estratégia que se mostra cada vez mais factível e atrativa do ponto de vista clínico. Assim, a engenharia tecidual (ET) surge como uma ciência interdisciplinar, que visa o desenvolvimento de estratégias para regeneração de órgãos que tenham sua função comprometida, ou melhorar a função de tecidos do corpo, baseada essencialmente em três pilares fundamentais: Células-tronco, scaffolds e fatores de crescimento (FC).

O TGF- β 1, do inglês *Transforming Growth Factor β 1*, tem sido sugerido como o fator central para a regulação da resposta do CDP à cárie (MAGLOIRE et al., 1992). De fato tem sido proposto o desenvolvimento de terapias vitais pulpares baseados na utilização de TGF- β em detrimento dos materiais sintéticos a base de Ca(OH)₂. Estudos (HU et al., 1998; TZIAFAS et al., 1998) que avaliaram a aplicação de TGF- β recombinante (rhTGF- β) diretamente sobre a polpa de animais foram pioneiros em demonstrar a capacidade dessa molécula em induzir o reparo das estruturas que compõem o CDP.

Assim, o objetivo de nosso estudo foi analisar, através da técnica imunoistoquímica, a localização e a expressão de TGF- β 1 em polpas

desenvolvidas por engenharia tecidual utilizando o modelo *tooth slices/scaffolds* (TS/S).

2. METODOLOGIA

O presente trabalho utilizou, para a análise imunoistoquímica amostras já emblocadas dos estudos de Piva (2006) e Demarco (2010). Para a confecção dos “*tooth slices*” (TS), terceiros molares com indicação de extração foram obtidos de pacientes saudáveis entre 17 e 23 anos. Os dentes foram seccionados transversalmente na região cervical. Depois disso, o tecido pulpar foi cuidadosamente removido, cloreto de sódio foi peneirado (250 - 425 μ m) e usado para preencher a câmara pulpar vazia. Então, PLLA (poli ácido L-láctico) foi solubilizado em clorofórmio em uma concentração de 5% e gotejado sobre as partículas de sal que foram utilizadas para preencher a câmara pulpar previamente. O conjunto TS/S foi armazenado durante a noite para permitir a polimerização do PLLA. Depois disso, o sal foi lavado. Previamente ao cultivo das células tronco da polpa dental (DPSC), numa concentração de 6×10^5 , os TS/S foram tratados durante 1 minuto com 10% de EDTA (pH = 7,2). Como controles negativos para avaliar a atividade dos fatores de crescimento advindos da dentina, *scaffolds* de PLLA, também semeados com as DPSC's, foram preparados sem o corte de dente em moldes metálicos cúbicos. Tanto o controle negativo quanto o TS/S foram implantados subcutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos e após 28 dias foram removidos e realizados processos histológicos.

Para avaliar a imunexpressão de TGF- β 1 em polpas humanas reparadas utilizamos cortes histológicos de terceiros molares hígidos submetidos a terapia com hidróxido de cálcio por 90 dias, nos quais o tecido pulpar humano foi exposto pela confecção de cavidades de classe I, sob refrigeração com PBS. Os locais de exposição foram limpos por aplicação de PBS e a hemorragia foi controlada usando algodão estéril. O tecido pulpar exposto foi coberto com Ca(OH)₂ pré-análise - Ca(OH)₂PA (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil). Então, cimento de hidróxido de cálcio (Dycal; Dentsply, Petrópolis, Brasil) foi aplicado sobre o Ca(OH)₂PA. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol (IRM; Dentsply). Os dentes, que previamente foram indicados para extração por motivos ortodônticos, foram extraídos após 90 dias.

Realizou-se então, a técnica de imunoistoquímica, a análise e descrição por microscopia óptica das amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

DPSC's foram semeadas nos TS/S e nos controles negativos e implantadas por 28 dias no dorso de ratos imunodeficientes para avaliar o impacto de fatores derivados de dentina na diferenciação de células-tronco. Tal modelo se utiliza do princípio de mobilização dos fatores de crescimento fossilizados no tecido dentinário (CORDEIRO et al., 2008) e tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para investigar a proliferação e diferenciação de células-tronco adultas advindas do tecido pulpar. Foi possível observar um tecido com características morfológicas que se assemelha à polpa dental na câmara pulpar preenchida com scaffold (Figura 1). Um tecido conjuntivo também foi formado nos scaffolds controles (sem corte de dente). No entanto, este tecido não apresentou a organização observada quando os discos de dentes estavam.

As análises imunoistoquímicas, tanto do tecido presente nos TS/S após 28 dias de implantação subcutânea quanto no tecido pulpar submetido à terapia vital pulpar por 90 dias, demonstraram que ambos foram imunorreativos ao TGF- β . O padrão de marcação foi bastante semelhante. As marcações imunoistoquímicas, foram bastante semelhantes onde a matriz extracelular mostrou uma forte coloração em padrão fibrilar (Figura 2), o qual descreve a afinidade do anticorpo pela matriz extracelular segregada por DPSC. Além disso, a pré-dentina remanescente nos discos de dentina foi fortemente corada pelo TGF- β . Os fatores de crescimento da matriz dentinária desmineralizada têm um papel fundamental como indutores da diferenciação de células-tronco da polpa dental em direção à um fenótipo odontoblástico (SMITH, MATTHEWS e HALL, 1998; DEMARCO et al., 2010). TGF- β 1 também é expresso por odontoblastos durante a odontogênese e depois da diferenciação celular, moléculas de reserva de TGF- β 1 estarão presentes na dentina. Fatores de crescimento liberados - quando a dentina é desmineralizada - estão disponíveis para atuar como mediadores durante o processo de reparo pulpar (SMITH, MATTHEWS e HALL, 1998).

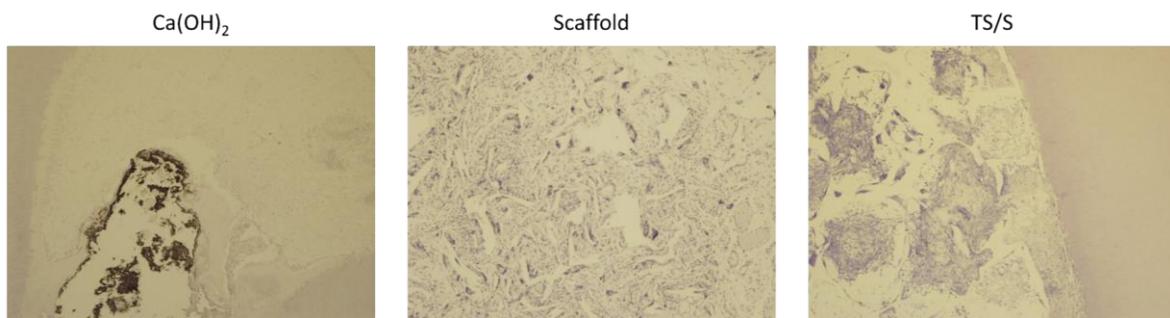


Figura 1. Visualização em microscopia ótica dos tecidos analisados no experimento

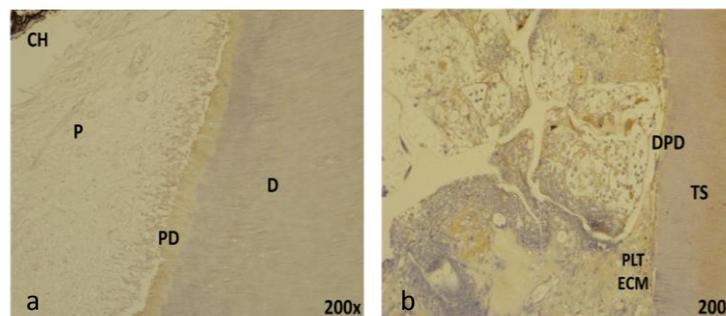


Figura 2. Microscopia ótica de cortes submetidos à técnica de imunoistoquímica em polpa reparada com hidróxido de cálcio (a) e em polpa desenvolvida por engenharia tecidual (b). PD: Pré-Dentina; CH: Ca(OH)₂; P: Polpa D: Dentina

4. CONCLUSÕES

Reunindo as informações acima mencionado, podemos supor que o fator de crescimento aqui avaliado age de forma semelhante no reparo da polpa e da regeneração. TGF- β 1 está envolvido na atração das células progenitoras do tecido pulpar e estabiliza a matriz extracelular onde as células tronco vão se

prender. Eventos regenerativos do CDP, parecem seguir um padrão semelhante de reparo e eventos da polpa em relação a expressão do TGF- β 1.

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.; CASAGRANDE, L.; ZHANG, Z. C.; DONG, Z. H.; TARQUINIO, S. B.; ZEITLIN, B. D.; SHI, S. T.; SMITH, A. J.; NOR, J. E. Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1805-1811, Nov 2010.

FORD, T. R.; TORABINEJAD, M.; ABEDI, H. R.; BAKLAND, L. K.; KARIYAWASAM, S. P. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 10, p. 1491-1494, Oct 1996.

GRAHAM, L.; COOPER, P. R.; CASSIDY, N.; NOR, J. E.; SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2865-2873, May 2006.

GU K., CHANG S., RITCHIE H.H., CLARKSON B.H., RUTHERFORD RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. **European Journal of Oral Sciences**, v.108, n.1, p.35-42, 2000.

HILTON, T. J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, Sep-Oct 2009.

MAGLOIRE, H. et al. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. **Advanced Dental Research**, v. 15, p. 46-50, Aug 2001.

PIVA, E. et al. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin after direct pulp capping with calcium hydroxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 4, p. e66-71, Oct 2006.

SMITH, A. J.; MATTHEWS, J. B.; HALL, R. C. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. **European Journal of Oral Science**, v. 106 Suppl 1, p. 179-84, Jan 1998.

TOMSON, P. L. et al. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. **J Dent**, v. 35, n. 8, p. 636-42, Aug 2007.

TZIAFAS, D. et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Arch Oral Biol**, v. 40, n. 10, p. 883-93, Oct 1995.

TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J Dent**, v. 28, n. 2, p. 77-92, Feb 2000.