



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E PERIODONTIA**

**RESUMO DE ATIVIDADES**

**AValiação *IN VITRO* DA VIABILIDADE E DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS  
CELULARES ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS CD146/MCAM POSITIVAS ISOLADAS DO  
LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS.**

Bruno Cazotti Pereira\*; Catharina Marques Sacramento; Roberta Gava Pratti; Mércia Jussara Cunha; Enilson Antonio Sallum; Marcio Zaffalon Casati; Karina Gonzales Silvério Ruiz

**1. INTRODUÇÃO**

Um dos maiores desafios da terapia periodontal contemporânea tem sido o restabelecimento do ligamento periodontal, cimento dental e osso alveolar perdidos durante o processo da doença periodontal inflamatória. Clinicamente, diferentes modalidades terapêuticas têm sido utilizadas visando à regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos. Entretanto, os resultados clínicos obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo (formação de ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular) destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987, Jepsen et al., 2002, Trombelli et al., 2002, Villar and Cochran, 2010). Desta forma, há uma necessidade eminente de se desenvolver novos paradigmas fundamentados no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que regulam o desenvolvimento e a regeneração dos tecidos periodontais.

Recentemente, estudos mostraram que, o ligamento periodontal de dentes permanentes e decíduos abriga populações celulares com características de células mesenquimais indiferenciadas (MSCs). Alguns estudos sugerem que as MSCs estariam localizadas na região perivascular dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, uma vez que expressam, *in vitro* (Seo et al., 2004, Gay et al., 2007) e *in situ* (Iwasaki et al., 2013), marcadores específicos para pericitos (ex.CD146/MUC18/MCAM), os quais são definidos como

pequenas células alojadas na região periférica vascular e que apresentam a capacidade de migrar e proliferar em caso de danos teciduais (Doherty et al., 1998, Farrington-Rock et al., 2004, Iwasaki et al., 2013). Sugere-se também que, as MSCs possuem características semelhantes aos pericitos. Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi possível identificar que, cerca de 14 a 21% das células cultivadas a partir do ligamento periodontal de humanos expressam o marcador CD146/MCAM, uma glicoproteína de membrana que funciona como uma molécula de adesão celular independente de  $\text{Ca}^{+2}$  envolvida em interações heterofílicas célula-célula (Miaohua Mo, 2016). Os resultados mostraram que somente as células CD146 positivas apresentavam capacidade para diferenciarem em células semelhantes a osteoblastos e a adipócitos.

Alguns estudos têm proposto a aplicação de células diretamente no interior dos defeitos ósseos, sem o carregamento em scaffolds (Akahane et al., 2008; Inagaki et al., 2013; Ueyama et al., 2016). Comparada à abordagem da engenharia tecidual baseada no carregamento celular via scaffold, o modelo de membrana celular parece oferecer vantagens tais como, a preservação da matriz extracelular e as adesões célula-célula e célula-matriz, as quais poderiam aumentar as chances de sucesso do transplante celular na terapia regenerativa (Yamato & Okano, 2004).

Visando futuramente, a aplicação das membranas celulares na terapia periodontal regenerativa, o presente estudo tem como objetivo desenvolver as membranas celulares a partir de células PDL-CD146+ (*cell sheet* de PDL-CD146+) e caracterizá-las *in vitro* quanto à atividade metabólica, potencial osteogênico e produção de matriz extracelular.

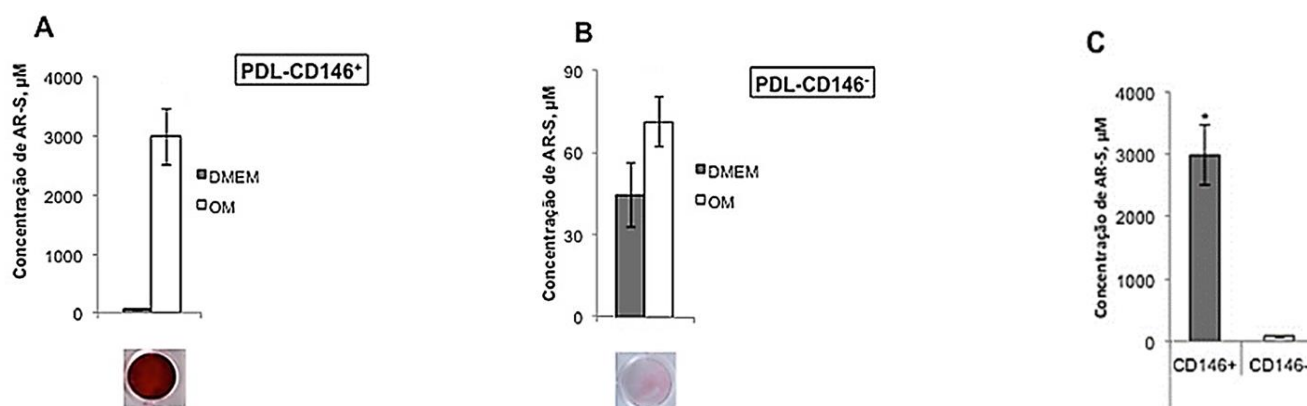
## 2. METODOLOGIA A SER EMPREGADA

Uma população celular foi isolada do ligamento periodontal e, previamente caracterizadas como PDL-CD146+ e PDL-CD146-. O potencial de diferenciação e capacidade de produção de mineral foram avaliados através da coloração de Vermelho de Alizarina. A formação da membrana celular foi realizada através da indução com Dexametasona ( $10^{-5}$  M) e Ácido Ascórbico (50 mg/mL) por 14 dias. A capacidade metabólica foi analisada através do ensaio de MTT. A expressão de marcadores osteogênicos foi analisada através de qRT-PCR.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. *Potencial Osteogênico de células PDL-CD146*

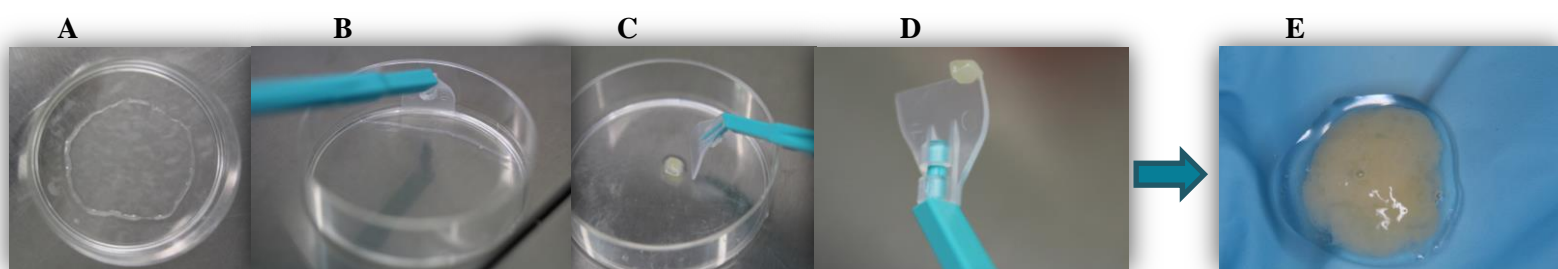
A comparação do potencial de diferenciação osteogênica de células PDL-CD146+ e PDL-CDL-, revelou que as células que apresentam marcadores de superfícies CD146+ possuem maior capacidade de deposição de matriz mineralizada quando comparada às células CD146- (Figura 1).



**Figura 1.** Avaliação da capacidade e quantidade de deposição de nódulos minerais pelas células PDL-CD146+ e PDL-CD146- utilizando a coloração de Vermelho de Alizarina. Células cultivadas em meio padrão e meio osteogênico (OM) durante 14 dias. (A) PDL-CD146+ e (B) PDL-CD146-. (C) Comparação entre PDL-CD146+ e CD146- cultivadas em OM. A presença do símbolo (\*) indica diferença estatisticamente significativa.

### 3.2 Formação de membrana celular (cell sheet)

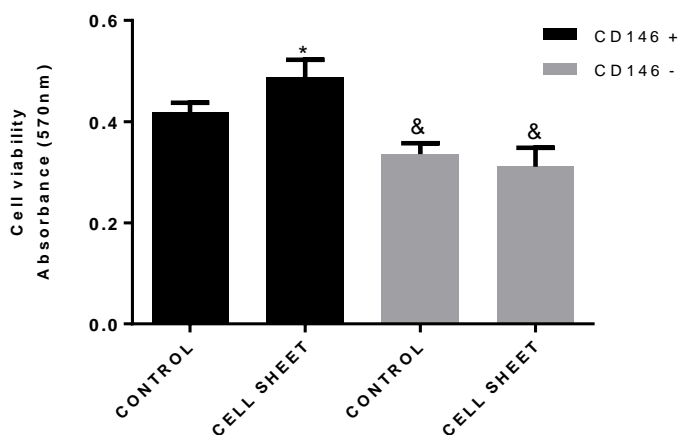
A técnica empregada para confecção de membranas celulares se mostrou eficaz tanto para células PDL CD146 positivas quanto para negativas, mostrando que essas populações celulares apresentam potencial para serem utilizadas como terapia regenerativa sem a utilização de outros materiais como veículos (Figura 2).



**Figura 2.** (A) Cultura inicial, (B) Início de confecção da membrana, (C) Início de aglutinação, (D) Aglutinação da membrana e (E) Resultado final.

### 3.3 Avaliação da atividade metabólica das células cultivadas no modelo de cell sheet

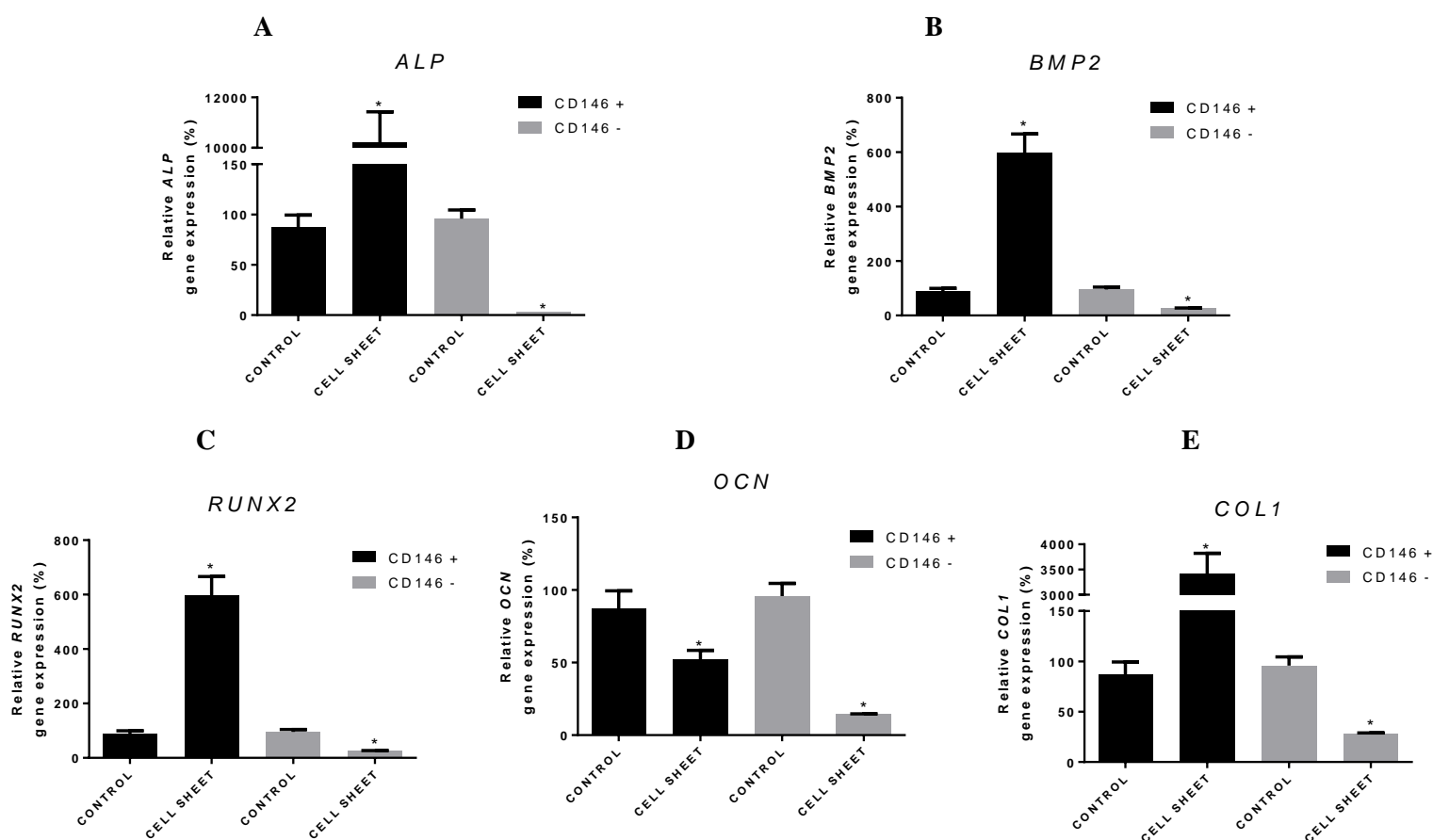
Os resultados do ensaio de MTT mostraram que as membranas celulares confeccionadas com células PDL-CD146<sup>+</sup> apresentam maior capacidade metabólica comparadas ao cultivo padrão (control). Além disso, as células PDL-CD146<sup>+</sup> apresentam maior viabilidade que as PDL-CD146<sup>-</sup>, tanto em cultivo padrão (control) quanto em suas respectivas membranas celulares (Figura 3).



**Figura 3.** Avaliação da viabilidade celular/capacidade metabólica analisada pelo ensaio de MTT. A presença do símbolo (\*) indica diferença estatisticamente significativa intragrupos e do símbolo (&) indica diferença estatisticamente significativa intergrupos.

### 3.4 Avaliação do potencial osteogênico e produção de matriz extracelular das células PDL-CD146+ cultivadas no modelo de cell sheet

Os resultados de qRT-PCR mostraram que os níveis de transcritos de genes associados a diferenciação osteogênica (*ALP*, *BMP2*, *RUNX2* e *COL1*) se elevaram nas membranas celulares confeccionada com células PDL-CD146+ após 14 dias de indução osteogênica enquanto que, nas membranas celulares com PDL-CD146- houve uma redução nos níveis de RNA mensageiro (Figura 4). Somente os níveis de RNAm para osteocalcina (*OCN*) tiveram redução nos grupos *cell sheet*, independente do tipo celular (CD146<sup>+</sup> ou CD146<sup>-</sup>) utilizado para sua confecção (Figura 4D). A avaliação intragrupo (controle versus *cell sheet*) mostrou haver diferença significativa para todos os genes avaliados (Figura 4A-4E). Ademais, os níveis de *COL1* no grupo Cell sheet/CD146<sup>+</sup> foi significativamente maior comparado ao grupo Cell sheet/CD146<sup>-</sup>, indicando melhor capacidade de formação de matriz extracelular (Figura 4E).



**Figura 4.** Expressão de marcadores osteogênicos *ALP* (A), *BMP2*(B), *RUNX2*(C), *OCN*(D) e *COL1*(E) analisados por qRT-PCR. A presença do símbolo (\*) indica diferença estatisticamente significativa intragrupos.

#### **4. DISCUSSÃO**

Com base nos resultados deste estudo, foi possível observar que o *cell sheet* confeccionado por células PDL-CD146+ apresenta maior atividade metabólica que células PDL-CD146-, demonstrando que, além das células CD146+ apresentarem maior potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica (Cunha, 2016), esta população celular também apresenta maior viabilidade celular. No que diz respeito à técnica, foi observado que a população celular PDL-CD146+, quando cultivadas em modelo *cell sheet*, apresenta maior capacidade metabólica que o cultivo em meio padrão. Este aumento, no entanto, não foi observado em células PDL-CD146-, onde não houve diferença entre as técnicas de cultivos.

A análise da viabilidade celular envolve a utilização de ferramentas que qualificam e/ou quantificam células “vivas”, ou seja, células metabolicamente ativas em uma cultura (Rogero et al., 2000). Uma maior capacidade metabólica das membranas celulares CD146+ podem representar o potencial dessa técnica utilizando esta mesma população celular para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas.

Com a finalidade de confirmar o potencial osteogênico das células PDL- CD146+ foram realizadas as reações “real-time” PCR para genes reguladores da diferenciação osteogênica (*ALP*, *BMP2*, *RUNX2*, *OCN* e *Col1*). Como resultado, comparado ao cultivo em meio padrão, os *cell sheets* confeccionados com células PDL-CD146+ apresentou aumento de mRNA para todos os genes analisados, com exceção do gene *OCN*, enquanto células PDL-CD146- mostraram, para os mesmos genes analisados, uma diminuição de expressão nas mesmas condições de cultivo. Isto sugere que em 14 dias de indução osteogênica, as células PDL-CD146+ estão ainda comprometidas com estádios primários da diferenciação, com o aumento da expressão de *ALP*, *BMP2*, *RUNX2* e *COL1*, o que justifica os baixos níveis de *OCN* encontrado nestas células neste estágio, já que este gene é regulador da produção de mineral propriamente dita. A diminuição de expressão de genes osteogênicos, encontrados em células PDL-CD146-, confirmam o baixo potencial de diferenciação destas células revelado também no ensaio de mineralização (figura 1).

#### **5. CONCLUSÃO**

Sendo assim, é possível concluir que as membranas celulares enriquecidas com células PDL- CD146+ possuem um alto potencial osteogênico e atividade metabólica celular, sendo uma alternativa futura para o transplante de células *in vivo*.