

Avaliação do papel da via de sinalização CCK na diferenciação cementoblástica

Palavras-Chave: Periodontia, Cementoblastos, Mineralização, Diferenciação, CCK.

Autores(as):

Maria Luiza Rocha Ferreira Sato, FOP– UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Karina Gonzales Silvério Ruiz (orientadora), FOP-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Atualmente, sabe-se que o sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação das células mesenquimais indiferenciadas presentes no ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes das matrizes teciduais.

Dentro dos princípios da regeneração periodontal, a neoformação do cimento radicular é considerado um processo crucial para a restauração do tecido conjuntivo de suporte do dente, uma vez que a dentina radicular previamente acometida pela doença periodontal não tem habilidade para promover a formação de ligamento periodontal perpendicularmente inserido, e estruturalmente funcional.

Desta maneira, tendo como objetivo desenvolver novas abordagens regenerativas baseadas no emprego da engenharia tecidual como alternativa aos tratamentos convencionais, é possível sugerir que a identificação de moléculas sinalizadoras que favorecem a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal em cementoblastos, aumentaria a previsibilidade para a formação do aparato cimento-ligamento nos defeitos periodontais.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa realizou estudos que visaram isolar e caracterizar as PDLMSCs que apresentavam maior potencial *in vitro* para diferenciação em células formadoras de tecidos mineralizados, ou seja, em osteoblastos e cementoblastos 19-20

Por meio da análise de transcriptoma (RNAseq), as células identificadas como sendo de alto potencial osteo/cementoblástico apresentaram uma expressão elevada de um conjunto genes relacionados à angiogênese e osteogênese tais como, Growth Arrest and DNA-damage-inducible 45β (GADD45-B), Annexin A2 (ANXA2), proteína óssea morfogênica 2 (BMP2) e fibroblast growth fator 7 (FGF7)20

Adicionalmente, nas células com alto potencial osteo/cementoblástico, a expressão de genes relacionados à via de sinalização CCK (colecistocinina), encontravam-se significativamente elevados nos resultados do RNA-seq20 A via de sinalização CCK é uma via gastrointestinal, na qual o hormônio CCK é um agonista e exerce seus efeitos por meio da ligação à família do receptor CCK (CCKR)21

A colecistocinina (CCK) é um neuropeptídeo que regula vários processos fisiológicos, como contração da vesícula biliar, motilidade gastrointestinal, secreção do pâncreas, secreção de ácido gástrico, pânico e ansiedade. Além disso, este hormônio parece ser importante para o metabolismo ósseo, uma vez que os CCKR são

receptores acoplados à proteína G, os quais após ativação pela ligação de CCK, induzem a liberação de calcitonina, resultando em aumento do cálcio intracelular liberado pelo retículo endoplasmático, mecanismo semelhante ao observado na ativação da via Wnt não canônica por WNT5A, a qual é considerada uma das principais moléculas que regulam a diferenciação osteoblástica por aumento de cálcio intracelular^{26,27}

Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa revelaram que o bloqueio da via CCK leva à supressão da produção de matriz mineralizada, reduzindo o potencial de diferenciação osteoblástica de células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de humanos. O presente estudo terá como objetivo principal avaliar in vitro a relação da colecistocinina com a cementogênese.

METODOLOGIA:

1.1 Cultura celular

Foi realizada a cultura de células OCCM-30, cementoblastos imortalizados, em meio padrão composto por α -MEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific) 1% de penicilina/estreptomicina (P/S), em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂. Essas células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, utilizando-se como meio de congelamento o *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium* (Gibco BRL.) Após as células alcançarem confluência, estas foram soltas com solução de Tripsina 0,25% (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA) e plaqueadas de acordo com os ensaios seguintes.

1.2. Ensaio de MTT – capacidade metabólica

As células OCCM-30 foram semeadas em placas de 96 poços (Corning Brasil Indústria e Comércio Ltda – São Paulo/SP/Brasil) 0,5 x 10⁴ células/poço. Estas foram cultivadas em meio de cultura padrão durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído em: a) Controle: células cultivadas em meio de cultura padrão, b) OM: células cultivadas em meio osteogênico (α -MEM suplementado com 2% FBS, 1% antibiótico, 50 μ M de ácido ascórbico e 10mM de β -glicerolfosfato) e c) OM + LORG: células cultivadas em meio osteogênico associado com Lorglumide nas concentrações de 0,1 μ M, 0,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M. Ao final dos períodos de 1 e 5 dias, o ensaio de viabilidade celular foi realizado, utilizando o reagente MTT; M6494, Thermo Scientific. Para tal, o reagente MTT foi adicionado em cada poço e as células incubadas por 4 h (37°C, 5% de CO₂). Ao final desse período, o meio de cultura foi aspirado, 200 μ L de etanol 100% foi adicionado em cada poço e realizada a leitura de absorbância a 570nm no aparelho VersaMax ELISA Microplate Reader, sendo que essa absorbância corresponde ao reagente MTT que foi bioreduzido em formazan pelas células viáveis.

1.3. Diferenciação cementoblástica das células OCCM-30- Ensaio de mineralização celular (Alizarina Red Staining - AR-S)

As células OCCM-30 foram semeadas em triplicata a uma concentração de 5 x 10⁴ células/poço, em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas em meio de cultura padrão. Em seguida, o meio de cultura foi substituído de acordo com os seguintes grupos experimentais: a) OM: células cultivadas em meio osteogênico (α -MEM suplementado com 2% FBS, 1% antibiótico, 50 μ M de ácido ascórbico e 10mM de β -glicerolfosfato), b) OM + 0.5 μ M LORG e c) OM + 5 μ M LORG. Após 7 dias, as células foram coradas com vermelho de alizarina (AR-S)²⁹ e fixadas em etanol 100%.

1.4. Quantificação de fosfatase alcalina

Células OCCM-0 foram semeadas em placas de 6 poços de acordo com os grupos descritos no item 4.3.1. Após 6 dias a proteína total foi coletada utilizando 1% TRITON X e quantificada com Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™), seguindo as recomendações do fabricante. Em uma placa de 96 poços, o input de 1µg de amostra foi utilizado para avaliação da atividade de fosfatase alcalina, utilizando o kit 1- Step™ PNPP Substrate Solution (Thermo Scientific™), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura por espectrometria foi realizada utilizando o comprimento de onda de 405 nm.

1.5. Expressão dos genes da via CCK e genes cementogênicos

Para avaliar o padrão de expressão dos genes Runx2, Alpl, Bglap2, Ibsp, Cck, Cckar e Fos as células OCCM-30 foram semeadas (2 x 10⁵ células/poço) em placas de 60 cm² com meio padrão. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram cultivadas de acordo com os grupos experimentais descritos no item 4.3.1. Ao final dos períodos de 1, 3 e 6 dias, o RNA total foi extraído, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies do Brasil Ltda – São Paulo/SP/Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Então, as amostras de RNA foram suspensas em água MiliQ livre de Rnase e armazenadas a - 70oC. Uma alíquota de 1µl (diluição 1:100) foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA das amostras, utilizando-se um espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA), e 1µg da amostra será utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para isso, as reações foram realizadas utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/ Life Technologies do Brasil Ltda – São Paulo/SP/Brasil), para um volume final de 20µl. Os primers para GAPDH, 18S e β-actina (genes de referência), e para os genes alvos (Runx2, Alpl, Bglap2, Ibsp, Cck, Cckar e Fos) foram desenhados usando o programa Primer 3 e as sequências confirmadas no PCR in silico. Para análise subsequente de estruturas secundárias e confirmação da temperatura de anelamento, foi usada uma edição gratuita do Beacon Designer. A eficiência das reações 6 para cada primer foi otimizada anteriormente ao início das reações de qPCR propriamente ditas. As reações de real time PCR foram realizadas com o sistema LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH – Mannheim/BW/Alemanha) utilizando o LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche Diagnostica Brasil Ltda – São Paulo/SP/Brasil). O perfil das reações foi determinado seguindo a fórmula sugerida pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo e o produto das reações foi quantificado utilizando o programa do próprio fabricante. As reações de RT-PCRq para os genes de referência foram analisadas no software

Normfinder, a fim de identificar qual gene foi o mais eficiente para normalização das reações dos genes alvos.

1.6. Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em pelo menos três ocasiões distintas. Os dados foram inicialmente examinados pela normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e depois expressos como média ou comparação relativa \pm desvio padrão (DP). Após a confirmação da distribuição normal, a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla aos pares (Tukey) foram usados para identificar diferenças entre os grupos. O software utilizado para análises estatísticas foi o GraphPad Prism 8 e valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ensaio de MTT:

Os resultados do ensaio de MTT mostraram a viabilidade celular se manteve estável após todas as concentrações em 1 dia de contato com Lorglumide. As células OCCM apresentaram maior capacidade metabólica nas concentrações de 0,1 μ M, 0,5 μ M e 5 μ M de Lorglumide após 5 dias de indução.

Ensaio de mineralização celular (AR-S):

Para confirmar o potencial de diferenciação cementoblástica, as células OCCM-30 foram cultivadas em meio osteogênico (OM) e meio osteogênico associado com Lorglumide nas concentrações de 0,5 μ M e 5 μ M, que foram as concentrações que não reduziram a viabilidade celular. Após 7 dias, foram coradas com vermelho de alizarina (AR-S)²⁹ para identificar a capacidade de deposição de nódulos mineralizados.

CONCLUSÕES:

No dia 5 do ensaio de MTT, a viabilidade celular do grupo das células cultivadas em Lorglumide nas concentrações de 0,1 μ M, 0,5 μ M e 5 μ M apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo de controle, que representa 100% da viabilidade celular. Por outro lado, na concentração de 10 μ M e em meio osteogênico estas não apresentaram aumento significativo na viabilidade celular. As concentrações de 0,5 μ M e 5 μ M foram as que tiveram maior capacidade metabólica após os 5 dias (Fig 1.), por isso essas concentrações foram as escolhidas para a diferenciação cementoblástica.

No ensaio de mineralização (AR-S), as células foram divididas nos seguintes grupos: a) OM: células cultivadas em meio osteogênico (α -MEM suplementado com 2% FBS, 1% antibiótico, 50 μ M de ácido ascórbico e

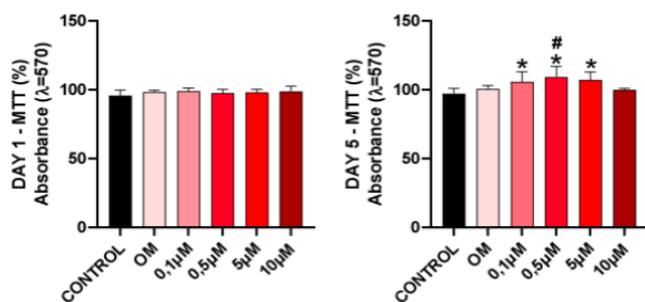


Fig.1. Efeito do Lorglumide na atividade metabólica. As células foram cultivadas em meio padrão (CONTROL), meio osteogênico (OM) e OM + Lorglumide (0,1 μ M; 0,5 μ M; 5 μ M e 10 μ M). O ensaio de MTT avaliou o metabolismo/viabilidade celular por 1 e 5 dias. O controle representa 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata, as barras representam média \pm desvio padrão onde (*) significa diferença estatística com relação ao grupo controle e (#) em relação ao grupo OM ($P < 0,05$).

10mM de β -glicerolfosfato) e c) OM + LORG: células cultivadas em meio osteogênico associado com Lorglumide nas concentrações 0,5 μ M e 5 μ M. Após 7 dias, realizou-se o ensaio de Vermelho de Alizarina juntamente com a análise quantitativa da mineralização. Após os 7 dias foi possível observar que o Lorglumide reduziu a diferenciação cementoblástica das células OCCM-30, em ambas as concentrações (Fig 2.).

BIBLIOGRAFIA

1. Egelberg, J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontol* 1987; 22: 233-242.
2. Jepsen, S., Eberhard, J., Herrera, D. & Needleman, I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol* 2002; 29:103-116.
3. Trombelli, L., Heitz-Mayfield, L. J., Needleman, I., Moles, D. & Scabbia, A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol* 2002; 29:117-135.
4. Villar, C. C. & Cochran, D. L. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am* 2010; 54:73-92. 7
5. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000 2000; 24:253-269.
6. Gay, I. C., Chen, S. & MacDougall, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007; 10:149-160.
7. Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S., Muneta, T. & Ishikawa, I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2006; 41:303-310.
8. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364:149-155.
9. Silverio, K. G., Rodrigues, T. L., Coletta, R. D., Benevides, L., Da Silva, J. S., Casati, M. Z., Sallum, E. A. & Nociti, F. H., Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol* 2010; 81:1207-1215.
10. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:109-16.
11. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *Eur Cell Mater.* 2012 Jul 12;24:46-59.
12. Gao Y, Huang E, Zhang H, Wang J, Wu N, Chen X, Wang N, Wen S, Nan G, Deng F, Liao Z, Wu D, Zhang B, Zhang J, Haydon RC, Luu HH, Shi LL, He TC. Crosstalk between Wnt/ β -catenin and estrogen receptor signaling synergistically promotes osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12):e82436.
13. Jin H, Choung HW, Lim KT, Jin B, Jin C, Chung JH, Choung PH. Recombinant Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Cementogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2015 Dec;21(23-24):2817-28.