

ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA POLPA DE DENTE DE CUTIAS NATIVAS DO PIAUÍ (*DASYPROCTAPRYMNOLOPHA*, WAGLER, 1831)

Janete Barros da Silva (ICV/UFPI), Yulla Klinger Pereira de Carvalho (colaborador, Pós-graduanda – Ciência Animal/CCA/UFPI), Maria Acelina Martins de Carvalho (colaborador, Depto de Morfofisiologia– UFPI), Flávio Ribeiro Alves (Orientador, Depto de Morfofisiologia– UFPI)

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, definidas pela capacidade de auto-renovação e são capazes de se dividirem indefinidamente (SCADDEN, 2006).

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes capazes de se diferenciarem em tecidos ósseo, adiposo, cartilaginoso e muscular, demonstrando assim, sua alta plasticidade. O sítio mais estudado para obtenção de células-tronco é a medula óssea, contudo, o processo para coleta dessas células é invasivo, sendo indicadas outras fontes para a obtenção de células-tronco mesenquimais, como por exemplo, a polpa dentária (SUCHANEK et al., 2009).

Estudos demonstram que as células-tronco de origem dentária podem, potencialmente, ser utilizadas para a regeneração dos tecidos do complexo dentino pulpar e periodontal. Além disso, a identificação dessas células fornece uma melhor compreensão da biologia pulpar e do ligamento periodontal como potencial de regeneração após uma lesão tecidual (HUANG, 2008).

Pertencente à família Dasyproctidae, a cutia é um roedor de médio porte. Isso ocorre devido às diversas características fisiológicas e reprodutivas semelhantes às observado em indivíduos humanos (ASSIS-NETO et al., 2003).

Em razão disso, tem-se a necessidade da determinação de protocolos descongelamento de células-tronco mesenquimais (CTM) a partir da polpa de dente, bem como da formação de um banco de células composto de progenitores celulares derivados da polpa de dente de cutia, onde poderão ser empregadas para a recuperação de lesões em modelos animais, e futuramente em humanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O projeto de iniciação científica utilizou culturas de células-tronco provenientes da polpa dentária de cutia (*DasyproctaprymnoLOPHA*, Wagler, 1831) previamente coletada durante a execução do projeto de mestrado ao qual está diretamente vinculado. Para isso foram utilizadas células provenientes de duas cutias, do total de oito propostas no projeto “macro” (dissertação de mestrado).

O tecido pulpar foi dissociado mecanicamente em uma placa de Petri de 35mm contendo solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, Cat. Nº 25200-114). Posteriormente o material foi incubado em estufa contendo atmosfera de CO₂ – 95% a 37^oC durante 30 minutos. Após esse momento, o material teve a reação enzimática bloqueada pelo uso de meio de cultura basal completo D-MEM/F-12 (Invitrogen, Cat. Nº 10565-018) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation, Nº 16000-044, 1000 ml). O material foi centrifugado por 1000rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet celular resultante foi ressuspenso em meio de cultura basal DMEM/F-12 completo. A concentração celular foi calculada utilizando hematocitômetro e corante azul de tripan, sendo semeada uma concentração de 10⁵ células/mL em placas de seis poços (TPP,

Switzerland) e a cultura acompanhada até atingida 80% de confluência quando se realizou a primeira passagem. A cultura foi monitorada diariamente para avaliação do crescimento celular e a mudança de meio foi feita a cada três dias ou na dependência da mudança de Ph do meio. As células cultivadas foram mantidas em semi-confluência a fim de evitar diferenciação celular.

Para a composição da curva de crescimento, 20 poços das placas de cultivo foram lavados com PBS com 1% de antibiótico, seguido de tripsinização e contagem celular, até que todos os poços, ao longo de 20 dias, fossem tripsinizados. Os poços que aguardavam tripsinização tiveram o meio de cultivo trocado a cada três dias. A concentração celular foi aferida, em cada poço tripsinizado diariamente para compor um gráfico de concentração x tempo, caracterizando uma curva de crescimento celular.

2.2 Protocolo de diferenciação osteogênica

As células foram semeadas em placas de seis poços (TPP, Switzerland) a uma densidade de 10^4 cel/ml até alcançarem uma confluência de 80% em cultivo. Três poços foram preenchidos com meio de cultivo basal DMEM/F-12 completo e os outros três com meio de diferenciação StemPro® osteogenesis Differentiation kit durante 21 dias, com trocas de meio sucessivas a cada 3 dias até a verificação da diferenciação celular. Após esse período, as células serão fixadas em solução de paraformaldeído à 4% e posteriormente coradas com Alizarin red para avaliação da deposição de matriz extracelular com componente cálcico.

2.3 Congelamento Celular

Para o congelamento das células provenientes do cultivo celular, as células da polpa dentária foram primeiramente dissociadas através da Tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen, Cat. Nº 25200-114), como descrito anteriormente. O "pellet" de células foi ressuspenso, rapidamente em meio de congelamento. A concentração do meio utilizado foi 50% de D-MEM High glicose (Invitrogen, 10313-039), suplementado com 40% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation, Nº 16000-044, 1000 ml), 10% de DMSO (Vetec-cat. Cat. nº 590) e 1% de antibióticos (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122).

As células foram acondicionadas em criotubos, sendo posteriormente transferidas em freezer a -40°C *overnight*, aparelho Mister Froste. Após 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permanecem armazenados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células totipotentes podem diferenciar-se em qualquer tipo de células progenitoras, células pluripotentes podem diferenciar-se em qualquer tipo de célula progenitora, excepto aqueles totipotente; células multipotenciais podem diferenciar apenas em certos tipos de tecidos; uni-potentes células podem diferenciar em apenas um tipo de tecido (JONES e WAGERS, 2008). Tais características foram estudadas e avaliadas em nosso experimento. A capacidade de multiplicação *in vitro* por um longo período de tempo, conforme foi registrado para a polpa dentária da cutia, além da manutenção da morfologia "fibroblast-like cell" demonstra o potencial de proliferação dos progenitores celulares isolados da polpa dentária desta espécie silvestre.

A capacidade de formar colônias (UFC) também foi observada por Grontos et al. (2000) também pode ser observada em nossos experimentos, haja vista a rápida confluência destas células

pela junção de colônias separadas que se juntam rapidamente. Particularmente semelhante a Gronthos et al. (2002) demonstramos a capacidade de auto-duplicação destas células *in vivo*.

O surgimento de uma população heterogênea de células aderidas ao fundo da garrafa de cultura marca o início do crescimento celular e foi observada até o décimo nono dia de cultura, demonstrando uma cultura altamente heterogênea. As células mantiveram formato arredondado e em semi-adesão, corroborando com os estudos de (TROPEL et al., 2004).

Nossos achados se assemelham aos estudos de (KORBLING; STROV; CHAMPLIN, 2003) com células mesenquimais da medula óssea extraída de camundongos. Aliado a isso, o potencial de proliferação das células em estudo é bem maior quando comparado ao da medula óssea da mesma espécie já descrita por (ROCHA et al., 2011).

O potencial de plasticidades das células-tronco da polpa dentária foi demonstrado pela sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos (Miura et al., 2003). Em nossos experimentos verificamos que as células progenitoras isoladas da polpa dentária da cutia apresentam potencial de diferenciação osteogênica com ampla produção de matriz óssea, como foi descrito por (Batouli et al., 2003), quando descreveram a capacidade de células-tronco da polpa dentária humana em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, myelosupportive fibro-estroma, e talvez até mesmo tecidos musculares e neurais.

Uma vez que estudamos a manutenção a sua capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens de células estromais, acreditamos que a diferenciação das células-tronco da polpa dentária em tecidos específicos comporta-se como BM-SCS, provavelmente dependente do seu estado de diferenciação e de compromisso, e do microambiente em que eles são localizado.

4 CONCLUSÕES

O comportamento em cultura demonstrou que estas células apresentam capacidade para “manutenção própria” por um longo tempo, sem perda de morfologia e prosseguindo com sua capacidade de divisão, o que é sustentado pela característica de sua curva de crescimento. Aliado a isso, as células progenitoras da polpa dentária da cutia apresentaram alta capacidade para diferenciação osteogênica em um período de tempo menor do que o observado na literatura, característica que nos permite sugerir a existência de uma população transiente de células-tronco entre as células isoladas da polpa dentária da cutia neste experimento.

REFERÊNCIAS

- ASSIS-NETO, A. C. et al. 2003. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Braslian Journal of Veterinary and Animal Science**. 40. Suplemento.
- HUANG GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. **J Dent**,36(6): 379-86, 2008.
- SUCHANEK, J.; SOUKUP, T.; VISEK, B.; IVANCAKOVA, R.; KUCEROVA, L.; MOKRY, J. Dental pulp stem cells and their characterization. **Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub**. v. 153, n. 01, p. 31 – 36, 2009.