

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAR O POTENCIAL DAS CÉLULAS TRONCO EM REPONDEREM A PROCESSOS PATOLÓGICOS

**EDUARDA GERVINI ZAMPIERI CENTENO¹; CAMILA PERELLÓ FERRÚA²;
LUCIANO DIAS DE MATTOS SOUZA³; GABRIELE CORDENONZI GHISLENE³;
FLÁVIO FERNANDO DEMARCO⁴; FERNANDA NEDEL³**

¹Universidade Federal de Pelotas – eduardacenteno@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camila_perello@hotmail.com

³Universidade Católica de Pelotas - luciano.dms@gmail.com

³Universidade Católica de Pelotas - bibighis@gmail.com

³Universidade Católica de Pelotas – fernanda.nedel@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Estresse Oxidativo (EO) pode ser definido como um excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) em relação à capacidade do sistema antioxidante removê-las (MONAGHAN, 2009). EROs e ERNS são naturalmente metabolizadas pelas mitocôndrias no processo de formação de ATP. Dentro dessa organela ocorre a redução do oxigênio em água. Entretanto, esse processo não é totalmente eficiente, e assim, uma parcela de partículas instáveis são liberadas e formam radicais reativos. Esses componentes instáveis, altamente reativos tendem a afetar diversas moléculas, causando danos celulares, como destruição de membranas, lipoperoxidação e apoptose. Dessa forma, é imprescindível que o controle do volume de espécies reativas no interior das células aconteça de modo eficaz, no intuito de tentar minimizar patologias relacionadas ao EO, como por exemplo, transtorno depressivo (MICHEL, 2012), osteoporose (SUN, 2013) e diabetes (CRUJEIRAS, 2013). Assim, como possível forma de combate ao excesso de EROs e ERNs, o uso de células tronco adultas (CT) tem sido sugerido como opção promissora devido sua capacidade antioxidante (ZHOU, 2013). Dessa forma, esse estudo propôs um modelo para avaliar o potencial das CT, oriundas da polpa de terceiros molares humanos, de manejar o soro humano proveniente de pacientes com uma patologia (neste caso a depressão) que possuísse os níveis de estresse oxidativo no soro alterados.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo Celular

Células tronco oriundas da polpa de terceiros molares recém-extraídos pela técnica de explante, foram obtidas através de trabalho prévio, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Odontologia, sob o número de protocolo 16/2012, realizado no laboratório de cultivo celular da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas. As DPSCs foram mantidas com meio de cultivo DMEM/Ham F12, com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Hyclone), 1% de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais (AINE) (Gibco). As garrafas de cultivo foram incubadas em estufa de CO₂, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂.

2.2 Ensaio de Proliferação Celular

A viabilidade celular das DPSCs foi determinada através de um ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), onde este composto solúvel é reduzido a cristais insolúveis de formazan (Nedel et al., 2012). O ensaio de proliferação celular foi realizado no momento em que as células encontravam-se na sexta passagem. Plaqueou-se 18 poços de uma placa de 96 poços, numa densidade celular de 2×10^4 células por poço. Depois de 24 horas, quando as células já estavam aderidas a parede de fundo da placa, o meio de cultivo foi substituído por 200 μ L de meio com diferentes suplementações de soro, embora todos tenham recebido 1% de antibióticos e 1% de Aminoácidos Não Essenciais (AINEs). O meio de cultivo foi suplementado da seguinte forma: 15% de SFB; 15% de Soro Humano (SH) como controle; 15% de SH de um pool com alta taxa de EO; 15% de SH de um pool com baixa taxa de EO. O contato do meio com as células se deu em triplicata. Após 48 e 72 horas de contato entre as células e o meio com diferentes suplementações, foram adicionados aos 200 μ L de meio de cultivo preexistentes 20 μ L de MTT (5 mg de MTT/mL de meio de cultivo) por poço, o qual foi mantido em contato com as células por 4 h. Em seguida, desprezou-se o líquido contido nos poços, adicionou-se 200 μ L de DMSO e colocou-se as placas em um *shaker* por 5 min a 150 rpm. Realizou-se então a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em um comprimento de onda de 450 nm.

2.3 Análise dos Dados

Os dados obtidos a partir dos ensaios de MTT foram analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) two-way seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Para a elaboração dos gráficos foi utilizado o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que o contato das DPSCs com SH, seja com alto ou baixo teor de EO, não foi capaz de alterar a morfologia celular, independente do tempo de contato (Fig.1). As DPSCs mantiveram seu aspecto morfológico semelhante à de fibroblastos como esperado, com característica fusiforme e citoplasmas afilados (PELEGRINO, 2009).

Em relação ao ensaio de proliferação constata-se que não foram encontradas diferenças significativas entre as células mantidas em contato por 48 ou 72 horas. Além disso, a viabilidade celular não foi alterada independente do tipo de soro colocado em contato, seja com SFB, SH como controle ou SH com baixo ou alto teor de EO (Fig.2).

Desse modo, nossos dados sugerem que as DPSCs são tolerantes ao contato com meio de cultivo suplementado com diferentes tipos de soro, de origem humana ou animal, com alta ou baixa concentração de EO. No entanto, estudos relacionados à verificação da capacidade antioxidante das DPSCs estão sendo realizados a fim de consolidar um modelo de estudo alternativo através de CT para tratamento de possíveis desordens decorrentes de EO.

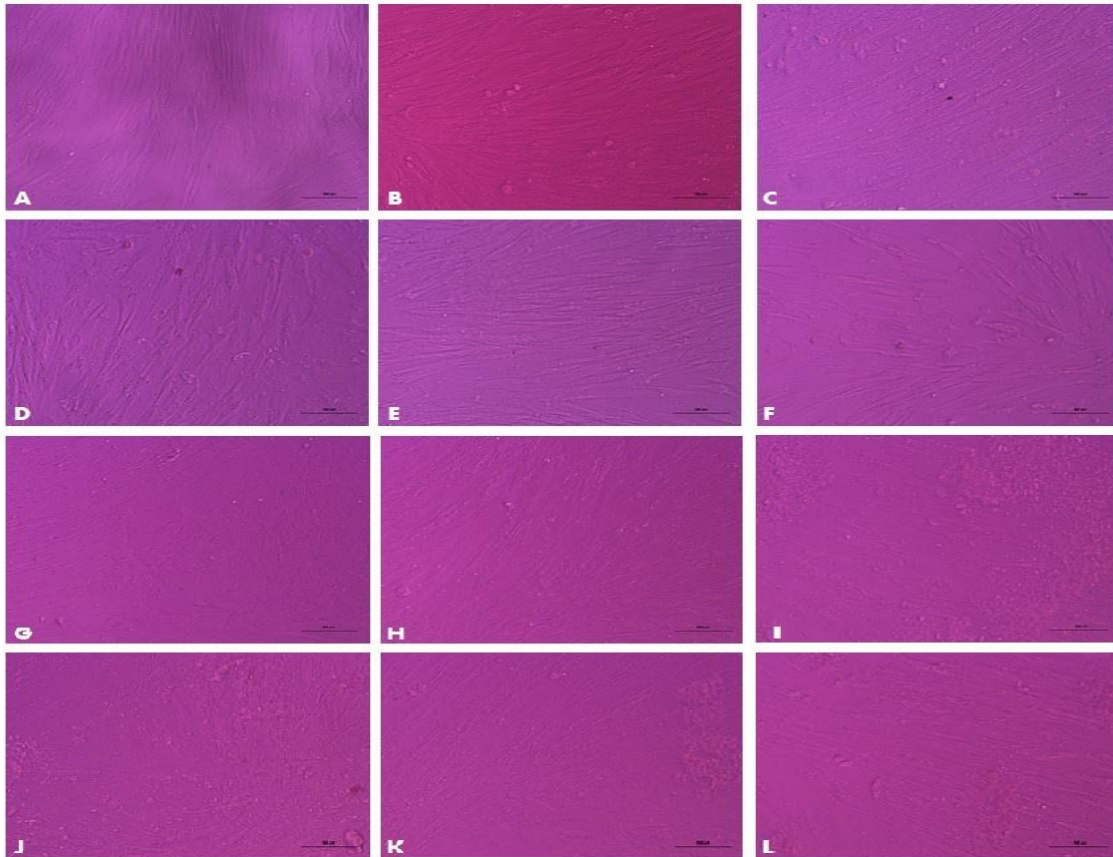


Figura 1. Análise e acompanhamento microscópico de DPSCs na passagem 6, após 48 e 72 horas em contato com SFB, SH como controle e SH com alto e baixo teor de estresse oxidativo. Sendo as de 48h: A – SFB; B – SH Controle, C – SH com alto teor de EO, pool 1; D – SH com alto teor de EO, pool 2; E – SH com baixo teor de EO, pool 1; F – SH com baixo teor de EO, pool 2. E as de 72h: G – SFB; H – SH Controle, I – SH com alto teor de EO, pool 1; J – SH com alto teor de EO, pool 2; K – SH com baixo teor de EO, pool 1; L – SH com baixo teor de EO, pool 2.

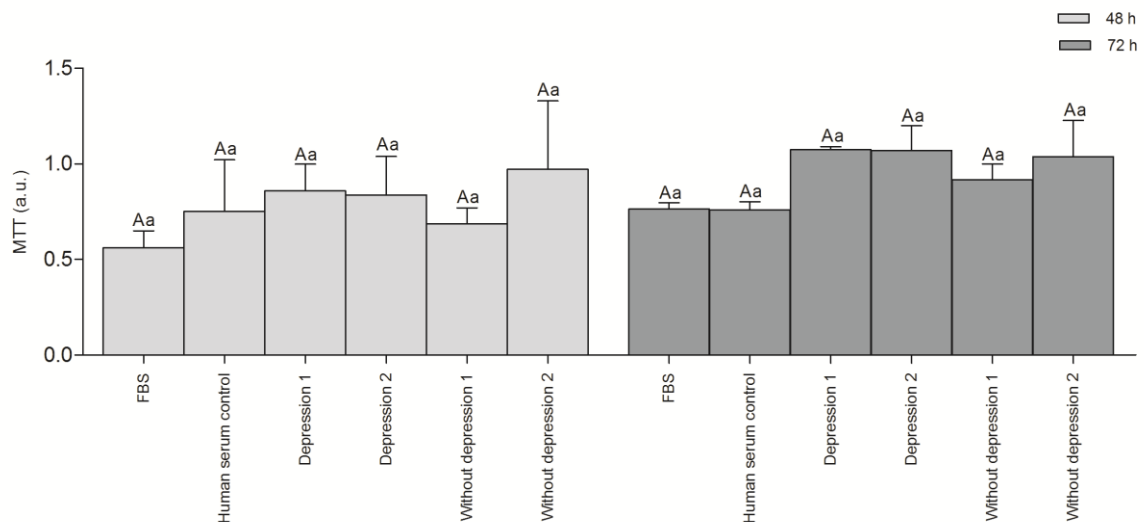


Figura 2. Gráfico relativo ao ensaio de proliferação de DPSCs, na passagem seis, após contato com SFB, SH como controle e SH com alto e baixo teor de estresse oxidativo, por 48 e 72 horas.

4. CONCLUSÕES

Apesar das limitações presentes no referido estudo, é possível concluir que o SH, seja na forma de controle, com alto ou baixo teor de EO, não é capaz de alterar a morfologia das DPSCs, bem como sua capacidade proliferativa. Sugere-se assim que, uma vez comprovada a sua capacidade antioxidante em estudos futuros, as DPSCs mostram-se uma possível alternativa para o tratamento de doenças advindas de alto EO, uma vez que são altamente toleráveis a essas condições.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUJEIRAS, A.B.; DÍAZ-LAGARES, A.; CARREIRA, M.C. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. **Free Radical Research**, v.47, n.4, p.243-256, 2013.
- MICHEL, T.M.; PULSCHEN, D.; THOME, J. The role of oxidative stress in depressive disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, n. 36, p.5890-5899, 2012.
- MONAGHAN, P.; METCALFE, N.B; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, v.12, n.1, p. 75-92, 2009.
- NEDEL, F.; ANDRE DDE, A.; DE OLIVEIRA, I. O.; CORDEIRO, M. M.; CASAGRANDE, L.; TARQUINIO, S. B.; NOR, J. E. ; DEMARCO, F. F. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v.10, n.4, p.90-6, 2009.
- PELEGRINO, K.O **Caracterização e diferenciação neural *in vitro* de células-tronco de polpa de dente decíduo humano**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- SUN, N.; YANG, L.; LI, Y. Effect of advanced oxidation protein products on the proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. **International Journal of molecular medicine**, v.32, n.2, p. 485-491, 2013.
- ZHOU, Y.; XU, H.; XU, W. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. **Stem Cell Research and Therapy**, v.4, n.34, 2013.