

AÍLA ALVES ROCHA VIEIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DA POLPA DENTÁRIA IMATURA
DE CÃES**

Teresina

Piauí - Brasil

2016

AÍLA ALVES ROCHA VIEIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS- TRONCO
MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DA POLPA DENTÁRIA IMATURA
DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

Sanidade e Reprodução Animal

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Betânia Souza Monteiro

Teresina

Piauí – Brasil

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

V657i Vieira, Aíla Alves Rocha
Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais
a partir da polpa dentária imatura de cães / Aíla Alves Rocha –
2016.
43 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2016.
Orientação: Profª. Drª. Maria Acelina Martins de Carvalho

1 .Cães 2. Dentes 3. Decíduo 4. Células-tronco 5. Cultivo
celular I. Título

CDD 636.7

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DA POLPA DENTÁRIA
IMATURA DE CÃES**

AÍLA ALVES ROCHA VIEIRA

Dissertação aprovada em: 31/03/2016

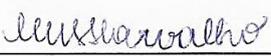
Banca Examinadora:



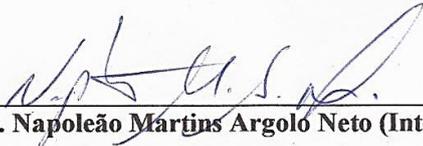
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externo) / IFPI



Profa. Dra. Carmen Milena Rodrigues Siqueira Carvalho (Interna) / CCS/UFPI



Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DMV/CCA/UFPI

Dedico,

*À Deus por me dar forças, me manter com fé e ser meus pés, minhas
mãos e minha razão quando preciso.*

*Aos meus pais, Luís Carlos e Lucélia, às minhas irmãs por serem minha
paz e repouso em todos os momentos, por estarem sempre ao meu lado e
nunca duvidarem que eu sou capaz de vencer todos os obstáculos da
vida.*

*Aos amigos, que foram anjos de Deus, me apoiando e me aconselhando
quando precisei.*

Agradecimentos,

À Universidade Federal do Piauí, onde conclui minha graduação, me especializei e segui no Mestrado em Ciência Animal, onde tive um ambiente adequado para a realização da minha pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela bolsa de estudo que me auxiliou financeiramente durante o período de realização do mestrado.

À professora Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, minha orientadora, que sempre esteve presente desde a escolha do tema da pesquisa a ser desenvolvida, ao auxílio durante as aulas da disciplina de Estágio a Docência, o auxílio para melhor desenvolvimento da minha pesquisa e por manter sempre o NUPCelt, forte e com ótimos pesquisadores, sendo um exemplo para quem está iniciando pós-graduação.

Sou grata ao Professor Dr. Napoleão Argolo Neto por ter sido um amigo nos momentos finais e cruciais do meu experimento, sempre presente dentro do laboratório quando eu precisei, me ajudando e me acalmando nos momentos finais. Obrigada professor por ter ido até o fim comigo.

Aos meus colegas pós-graduandos, que me permitiram acompanhar seus trabalhos adquirindo maior experiência nas técnicas do LABCelt e aos que me ajudaram diretamente na execução do meu experimento.

Aos amigos que criei durante mestrado e que me ajudaram dando força e auxílio. Agradeço a doutora Clautina Ribeiro pelas palavras de incentivo e disponibilidade em ajudar. Sou grata às doutorandas Isadora Soares, que mesmo distante sempre esteve disponível para tirar dúvidas e orientar, Yulla de Carvalho, que nunca me negou ajuda, sempre prestativa e me ajudou diversas vezes no laboratório. À doutoranda Dayseanny Bezerra sempre presente, pela força e amizade eterna. À minha amiga mestranda, Mariá Carvalho por ter iniciado comigo essa jornada e pelas palavras de força durante a caminhada e ao Mestre Gustavo Cardoso sempre otimista e prestativo.

A todos os funcionários do NUPCelt, Flavinha, Fabiana, Janete e Hermínio por estarem sempre em prontidão para ajudar no que for preciso no desenvolvimento dos experimentos do núcleo. Agradeço ao Prof. Dr. Adalberto e ao Técnico, Raimundo pela colaboração na realização da citometria de fluxo da pesquisa.

Minha eterna gratidão aos meus pais, Luís Carlos e Lucélia e às minhas irmãs, Luana e Geovana, pelo amor e confiança. Aos meus familiares, meus amigos e ao meu namorado, Alexandre, que sempre acreditaram e torceram por mim.

E agradeço, sempre e acima de tudo, a Deus por estar sempre comigo, mantendo minha Fé e me fortalecendo sempre nas batalhas da vida.

*“Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade
de Deus para vocês em Cristo Jesus.”*

(Tessalonicenses 1:5,8 – Bíblia Sagrada)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO I.....	16
ABSTRACT.....	17
1. Introdução	18
2. Materiais e Métodos	19
2.1. <i>Meio de Cultivo Celular</i>	19
2.2. <i>Obtenção de dentes decíduos de cães</i>	19
2.3. <i>Isolamento e expansão das células-tronco da polpa dentária imatura canina</i>	20
2.4. <i>Ensaio de unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F)</i>	21
2.5. <i>Ensaio de cinética celular sob curva de crescimento por saturação</i>	21
2.6. <i>Ensaio de diferenciação celular</i>	22
2.7. <i>Citometria de fluxo</i>	23
2.8. <i>Criopreservação</i>	25
3. Resultados	25
4. Discussão.....	32
5. Conclusões	35
Referências.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

Capítulo		Página
Figura 1.	(A) Dente pré-molar sobre a placa de <i>Petri</i> e polpa de dente removida (seta); (B) Fotomicrografia de células em formato fibroblastóide, com confluência celular de 70%. Objetiva 100x; (C) Fotomicrografia do explante de polpa de dente após isolamento com crescimento celular a partir do explante, células em formato fibroblastóide. Objetiva 100x. Barras de 100 μ m.	26
Figura 2.	Fotomicrografia de luz. Ensaio da unidade formadora de colônias fibroblastóides de CTMPD-ic. (A) Colônias de CTMPD-ic coradas com Giemsa, ao redor do explante da polpa dentária (seta), objetiva 40x; (B) Colônia de CTMPD-ic e intensa interação celular produzindo uma imagem em 3D, sendo possível observar o núcleo das células na UFC, objetiva 400x. Barras de 100 μ m.	27
Figura 3.	Representação gráfica da cinética de crescimento celular de uma cultura de células-tronco mesenquimais caninas obtidas de dentes decíduos, correlacionada com as taxas de viabilidade e concentração celulares. (A) Gráfico da curva de crescimento, representando a concentração média por poço de cultivo ao longo de 10 dias, em duplicata. (B) Parâmetros médios e estatísticos descritivos das variáveis dependentes ‘total de células contadas’, ‘total de células mortas’, ‘viabilidade celular’ e ‘concentração celular’ ao longo de dez dias.	28
Figura 4.	Representação gráfica da viabilidade celular (%) com seus respectivos desvios padrão de acordo com a contagem diária das células durante dez passagens de CTMPD-ic.	28
Figura 5.	Caracterização imunofenotípica da população de CTMPD-ic por citometria de fluxo - gráficos representativos da expressão de moléculas de superfície de membrana por fluorescência. (A) Controle negativo; (B) Ausência de expressão dos CD14 e CD45; (C) Ausência de expressão do CD90; (D) Baixo nível de expressão do CD105.	30
Figura 6.	Fotomicrografia de luz das células da polpa de dente imatura de cão. A e B: Células coradas com Alizarin Red. (A) Evidenciam-se as células no centro, com coloração vermelha, tonalidade escura, a matriz celular e suas ramificações por toda a imagem. Objetiva 4x10; (B) Verificam-se, células em formato fibroblastóide, com núcleo e nucléolo corados com vermelho em tonalidade mais escura e citoplasma celular com granulações, Aumento de 20x10. (C e D) Notam-se regiões com células coradas em	32

azul (corante Alcian Blue). Aumento de 20x10 e 40x10, respectivamente.
E e F: Células coradas com Oil Red. (E e F). Evidenciam-se vacúolos de
gordura dispersamente distribuídos e corados em vermelho-acastanhado.
Aumento de 20x10 e 40x10, respectivamente. Barras de 100 μ m.

LISTA DE TABELAS

Capítulo		Página
Tabela 1	Anticorpos primários conjugados utilizados na citometria de fluxo para marcação das CTMPD-ic	25

RESUMO

Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais obtidas a partir da polpa dentária imatura de cães

Estudos com células-tronco de tecidos adultos representam uma relevante alternativa para a identificação de nichos celulares de elevada plasticidade e coleta inócua ao paciente. A polpa de dente representa um nicho de células-tronco mesenquimais (CTM), cujas características de plasticidade não estão totalmente definidas, mas que apresentam um promissor potencial de diferenciação. Acredita-se que a polpa de dente decíduo possa apresentar características de plasticidade similares à de outras CTM, fato que suscita a necessidade de investigação científica. Dessa forma, esta pesquisa teve por objetivo adequar protocolos para isolamento, expansão e caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das CTM de polpa dentária imatura de cães (CTPD-ic). Para tanto, foram utilizados três dentes decíduos, dos quais foram obtidas as polpas dentárias. O tecido foi dissociado mecanicamente e as células obtidas, cultivadas e expandidas em meio DMEM-F12 suplementado até a obtenção de uma monocamada celular aderente, homogênea e de morfologia fusiforme. Realizaram-se ensaios de unidades formadoras de colônias (UFC) e cinética celular por curva de crescimento por saturação. Induziu-se diferenciação das células em três linhagens distintas e caracterizou-se as células por citometria de fluxo. O ensaio de UFC permitiu identificar 38 colônias homogêneas e o estudo de cinética celular demonstrou intensa proliferação celular. As células induzidas *in vitro* às diferenciações osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas, evidenciaram satisfatoriamente osteoblastos, adipócitos e condrócitos, respectivamente. Na citometria de fluxo, as células aderentes apresentaram expressão do marcador CD105 e ausência de marcação em CD14 e CD45. Desta forma, pôde-se constatar que as células oriundas da polpa de dente imatura canina constituem-se de uma população bem definida de CTM, com características semelhantes às encontradas em outros nichos anatômicos, em diferentes espécies. O tecido dentário decíduo é de fácil obtenção, inócua e indolor, dispensando o uso de procedimentos anestésicos ou cirúrgicos. As CTMPD-ic representam uma importante alternativa para manutenção de um banco de células-tronco mesenquimais caninas e, por conseguinte, poderão colaborar com futuros estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Cão, dentes, decíduos, célula-tronco, cultivo celular.

ABSTRACT

Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from dog immature dental pulp

Researches on stem cells from adult tissues provide a relevant alternative to the identification of niches with high plasticity and harmless collection to the patient. The dental pulp constitutes a niche of mesenchymal stem cells (MSCs), whose have a promising differentiation potential. It is believed that the pulp of a deciduous tooth can present similar plasticity characteristics to other MSCs, which makes room to the need of scientific investigation. Therefore, this study aimed to adapt protocols for isolation, expansion and immunophenotypic characterization by flow cytometry of MSC of canine immature dental pulp (MSCDP-ci). For this purpose, three deciduous teeth were used from which dental pulp was obtained. The tissue was mechanically dissociated then resulting cells were cultivated and expanded in culture medium DMEM-F12 supplemented until obtaining an adherent cell monolayer, homogeneous and fusiform morphology. They were held colony forming unit (CFU) assay and cell kinetics with growth curve for saturation. It was induce differentiation of the cells into three distinct lineages and was characterized the cells by flow cytometry. The CFU essay identified 38 colonies homogeneous and cell kinetics study It showed intense cell proliferation. The induced cells, *in vitro*, to the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, demonstrated satisfactorily, osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, respectively. In flow cytometry, the adherent cells exhibited the expression of marker CD105 and absence of expression of CD14 and CD45. Thus, It could be seen that the cells derived from canine immature dental pulp constitute a well-defined population of MSC, with similar characteristics to those found in other anatomical niches in different species. The deciduous tooth tissue is easily obtainable, harmless and painless, eliminating the use of anesthetic or surgical procedures. The MSCDP-ci represents an important alternative to maintaining a database of canine mesenchymal stem cells and, following, can cooperate with future pre-clinical studies.

Key words: Canine, teeth, deciduous, stem cell, cell culture

INTRODUÇÃO

As células-tronco somáticas (CTS), isoladas a partir de tecidos adultos, vem adquirindo notoriedade científica nos últimos anos, pela demonstração, *in vitro*, em algumas linhagens destas células, de características de plasticidade e expressão de marcadores moleculares semelhantes às células-tronco embrionárias (CAPLAN e BRUDER, 2001; KREBSBACH e ROBEY, 2002; PITTENGER e MARTIN, 2004). Embora as CTS, de uma forma geral, representem uma relevante alternativa para estudos pré-clínicos dadas às características de multipotencialidade, permitindo a indução de diferenciação em tecidos mesodermis e não mesodermis, algumas linhagens de CTS, particularmente, demonstram pluripotência, tal qual células-tronco embrionárias (CTE) isoladas de blastocistos (KREBSBACH e ROBEY, 2002).

Jiang *et al.* (2002) já haviam demonstrado a existência de uma pequena população de células-tronco similares às células-tronco embrionárias (*very small embryonic-like stem cells*) em tecidos pós-natais. Posteriormente, Pierantozzi *et al.* (2011) confirmaram os achados de Jiang *et al.* (2002), demonstrando a expressão de marcadores moleculares de pluripotência, como NANOG, expresso progressivamente em culturas de células-tronco mesenquimais (CTM), uma linhagem de CTS, em passagens iniciais.

Além das características de multi ou pluripotencialidade, as CTS apresentam outras vantagens como grande variedade de linhagens pós-natais, segurança clínico/cirúrgico para obtenção de amostras, ausência de questões éticas e religiosas associados às técnicas de coleta e possibilidade de transplante *in situ* ou administração sistêmica, de forma indiferenciada, sem riscos à indução de neoplasias (ULMER *et al.*, 2010)

Das linhagens de CTS pesquisadas até o presente momento, as mesenquimais (MSC) apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (MEIRELLES *et al.*, 2006). Essas células estão presentes em pequenas quantidades, nas regiões perivascularis adultas, em humanos e animais, incluindo a medula óssea (MO), cordão umbilical, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular, polpa dentária e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES *et al.*, 2008; MAMBELLI *et al.*, 2009; ZUCCONI *et al.*, 2010; BHARTIYA *et al.*, 2012).

Estudos foram desenvolvidos no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt/UFPI) sobre coleta e isolamento de CTM de cutias (*Dasyprocta*

prymnolopha) obtidas a partir da medula óssea (CABRAL *et al.*, 2012; ROCHA, 2015) e da polpa de dente (CARVALHO *et al.*, 2015). Ainda, em animais silvestres, como no cateto (*Tayassu tajacu*) obtiveram êxito na coleta e isolamento de CTM oriundas da medula óssea (ARGÔLO NETO *et al.*, 2016) e do tecido adiposo (PESSOA *et al.*, 2014). Semelhantes estudos, foram realizados com a espécie caprina utilizando CTM da medula óssea (SILVA FILHO *et al.*, 2014), do tecido adiposo (COSTA, 2015) e da geléia de Warthon do cordão umbilical (SILVA, 2016). Nestas pesquisas, foi demonstrada a elevada plasticidade das CTM isoladas, por meio da indução de diferenciação celular nas linhagens adipogênica, ostogênica e condrogênica, e identificaram expressão dos marcadores CD90, CD105 (CARVALHO *et al.*, 2015; SILVA, 2016) e OCT-4, NANOG, PCNA, Vimentina e CK-PAN (SILVA FILHO *et al.*, 2014).

Argôlo Neto *et al.* (2012) demonstraram a eficácia de CTM medulares autólogas murinas no tratamento de feridas cutâneas diabéticas em camundongos. Analogamente, Cabral *et al.* (2012) induziram reparação glomerular em rins de cutias portadoras de insuficiência renal iatrogênica por meio do transplante autólogo de CTM medulares.

Em humanos, Martin-Rendon *et al.* (2008), induziram diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica em CTM isoladas de parede de cordão umbilical e medula óssea. Para os autores, as CTM de medula óssea apresentaram maior plasticidade que as da parede do cordão umbilical.

Outra fonte de CTS, as da polpa dentária, foram, primeiramente, isoladas e caracterizadas em humanos por Gronthos *et al.* (2000). Estas células constituem-se numa linhagem de CTM. Segundo estes autores as CTM de polpa dentária apresentam plasticidade superior às isoladas da medula óssea e do tecido adiposo humano.

Estudos *in vitro* e pré-clínicos com CTM da polpa dentária tem ganhado espaço na pesquisa científica. Yamada *et al.* (2006) identificaram expressão de marcadores de indiferenciação celular (OCT-4 e NANOG) e relataram maior plasticidade das CTM da polpa dentária humana comparada as CTM isoladas da MO. Sloan e Smith (2007); Kadar *et al.* (2009), Dissanayaka *et al.* (2011), Soares (2015) e Carvalho *et al.* (2015) induziram diferenciação de CTM de polpa dentária humana em osteoblastos, adipócitos, condroblastos, odontoblastos, demonstrando a elevada plasticidade dessas células.

Os protocolos para CTM de polpa dentária humana imatura (hiDPSC – *human immature dental pulp stem cell*) ainda estão sendo desenvolvidos e aprimorados (KERKIS *et al.*, 2006). Pesquisas recentes *in vitro* utilizando estas células, identificaram

a expressão de marcadores de pluripotência similares aos expressos por CTE de blastocistos (KERKIS *et al.*, 2006; DISSANAYAKA *et al.*, 2011).

Yamada *et al.* (2011), em um estudo comparativo com CTM da polpa de dente imatura, polpa de dente adulta e medula óssea de cães, demonstraram maior eficácia das primeiras, em relação às demais, no tratamento pré-clínico alógeno de lesões ósseas experimentalmente induzidas. De forma análoga, Kadar *et al.* (2009) e Dissanayaka *et al.* (2011) demonstraram intensa proliferação de CTM da polpa dentária quando comparada as CTM da medula óssea em cães.

A polpa de dente pode ser obtida a partir da extração cirúrgica do dente, um procedimento rotineiro em clínicas odontológicas, ou através da troca natural dos dentes decíduos pelos permanentes. Em humanos, o terceiro dente molar pode se manter dentro da mandíbula até a vida adulta. Até esta fase, o tecido embrionário da lâmina dentária está em repouso, apresentando-se indiferenciado. Isso significa que a estrutura dentária ainda é imatura com células indiferenciadas dentro da polpa dentária germinativa (TIRINO *et al.*, 2011).

Os cães não apresentam dentição molar decídua, apenas pré-molar, totalizando 28 dentes decíduos e 42 permanentes. A polpa dentária é longa, situada em um canal recoberto por uma camada com odontoblastos. Esse canal mostra-se reduzido na medida em que o dente envelhece, devido à deposição de dentina. Assim, a polpa dentária de cães apresenta estrutura semelhante à encontrada no dente humano, apresentando a polpa dentária imatura, vantagens por seu revestimento com odontoblastos e características do mesênquima derivadas da embriogênese (BEZUIDENHOUT, 2007).

O objetivo desse estudo foi adequar protocolos para isolamento, expansão e caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das CTM de polpa dentária imatura de cães (CTPD-ic). Aliado a isso, criopreservar as CTPD-ic, para formação de um banco dessas células, visando futura utilização em estudos pré-clínicos.

Este trabalho encontra-se estruturado com uma Introdução, Capítulo I, Considerações Finais e Referências. O Capítulo I apresenta organização estrutural de um artigo científico cujo título é **“Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais obtidas a partir da polpa dentária imatura de cães”** foi desenvolvido conforme as normas do periódico “Research in Veterinary Science” (ISSN: 034-5288).

CAPÍTULO I *

* Apresentado de acordo com as normas do periódico “Research in Veterinary Science”

Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from dog immature dental pulp

A.A.R.Vieira^a, M.A.M.Carvalho^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Câmpus Ministro Petrônio Portela,

^b Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina-PI, Brasil.

ABSTRACT

Researches on stem cells from adult tissues provide a relevant alternative to the identification of niches of niches with high plasticity and harmless collection to the patient. The dental pulp constitutes a niche of mesenchymal stem cells (MSCs), whose have a promising differentiation potential. It is believed that the pulp of a deciduous tooth can present similar plasticity characteristics to other MSCs, which makes room to the need of scientific investigation. Therefore, this study aimed to adapt protocols for isolation, expansion and immunophenotypic characterization by flow cytometry of MSC of canine immature dental pulp (MSCDP-ci). For this purpose, three deciduous teeth were used from which dental pulp was obtained. The tissue was mechanically dissociated then resulting cells were cultivated and expanded in culture medium DMEM-F12 supplemented until obtaining an adherent cell monolayer, homogeneous and fusiform morphology. They were held colony forming unit (CFU) essay and cell kinetics with growth curve for saturation. It was induce differentiation of the cells into three distinct lineages and was characterized the cells by flow cytometry. The CFU essay identified 38 colonies homogeneous and cell kinetics study It showed intense cell proliferation. The induced cells, *in vitro*, to the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, demonstrated satisfactorily, osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, respectively. In flow cytometry, the adherent cells exhibited the expression of marker CD105 and absence of expression of CD14 and CD45. Thus, It could be seen that the cells derived from canine immature dental pulp constitute a well-defined population of MSC, with similar characteristics to those found in other anatomical niches in different species. The deciduous tooth tissue is easily obtainable, harmless and painless, eliminating the use of anesthetic or surgical procedures. The MSCDP-ci represents an important alternative to maintaining a database of canine mesenchymal stem cells and, following, can cooperate with future pre-clinical studies.

Key words: Canine, teeth, deciduous, stem cell, cell culture

1. Introdução

Estudos com células-tronco somáticas (CTS) representam uma relevante alternativa para a identificação de linhagens celulares com elevada plasticidade e cujo nicho anatômico permita coletas inócuas aos pacientes. A polpa de dente humana ou animal é um sítio anatômico pós-natal constituído por uma população de células-tronco mesenquimais (CTM), cujas características de plasticidade não estão totalmente definidas, mas que demonstram um promissor potencial de diferenciação *in vitro*, supostamente superior às CTS isoladas da medula óssea e do tecido adiposo (Gronthos et al. 2000).

Investigações recentes utilizando CTM da polpa dentária têm identificado à expressão de marcadores de pluripotência celular (OCT-4 e NANOG), similar aos expressos em células-tronco embrionárias de blastocistos (Yamada et al., 2006), além de demonstrar o potencial *in vitro* de diferenciação dessas células, em osteoblastos, adipócitos, condroblastos e odontoblastos (Sloan e Smith, 2007; Kadar et al., 2009; Dissanayaka et al., 2011; Carvalho et al., 2015; Soares, 2015).

De acordo com Kadar et al. (2009), as CTM da polpa dentária molar humana, apresentam maior taxa de proliferação que CTM de medula óssea. Estes autores atribuem os resultados obtidos, possivelmente, ao desenvolvimento tardio dos dentes molares, com manutenção de uma polpa dentária imatura por mais tempo, com maiores taxas proliferativas celulares. Dissanayaka et al. (2011), informam que a polpa de dente do cão apresenta uma população de CTM com plasticidade similar às humanas.

A espécie canina apresenta estrutura tecidual dentária semelhante à humana, possuindo polpa dentária longa, alojada em um canal recoberto por uma camada com odontoblastos. Esse espaço reduz-se conforme a maturidade dentária, devido à deposição de dentina no canal, reduzindo o percentual da polpa (Bezuidenhout, 2007). Desta forma, o dente decíduo, ainda imaturo, por apresentar uma polpa revestida por odontoblastos, provavelmente possui maior concentração de CTM e, portanto, constituir-se-ia num nicho anatômico superior à polpa de dente permanente (Dissanayaka et al., 2011).

Iohara et al. (2014) comparam, *in vitro*, a cinética celular das CTM da polpa de dente de cães jovens com a de cães adultos, identificando taxas clonogênicas superiores nas CTM de polpas de dentes de cães jovens. As características de clonogenicidade e plasticidade em cultivo, associadas à expressão de marcadores moleculares de

pluripotência em linhagens humanas, embora inconsistentes, dada as diferenças entre as polpas dentárias imaturas e maduras (Dissanayaka et al., 2011), suscitam indubitavelmente a necessidade de investigação científica dessa linhagem de CTM da polpa dentária imatura em cães.

O objetivo desse estudo foi adequar protocolos para isolamento, expansão e caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das CTM de polpa dentária imatura de cães (CTPD-ic). Aliado a isso, criopreservar as CTPD-ic, para formação de um banco dessas células, visando futura utilização em estudos pré-clínicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Meio de Cultivo Celular

Utilizou-se o meio de cultivo basal Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) pH 7.4, high glucose, sodium pyruvate, phenol red (SIGMA®, St Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO®, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (SIGMA®, St Louis, MO, USA), 1% de L-glutamina (2µM) (GIBCO®, Grand Island, NY, USA), 1% de aminoácidos não essenciais (GIBCO®, Grand Island, NY, USA), 0,001% de β-mercaptoetanol (55mM) (SIGMA®, St Louis, MO, USA) e 5,96g de solução tamponante HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (SIGMA®, St Louis, MO, USA), aquecidos a 37°C.

Para o congelamento celular, utilizou-se meio de cultivo basal suplementado com 40% de soro fetal bovino, solução tamponante HEPES e 10% de dimetilsulfóxido (SIGMA®, St Louis, MO, USA) resfriados a 4°C e manipulados em câmara escura.

2.2. Obtenção de dentes decíduos de cães

Foram obtidos três dentes decíduos de cães com idade entre cinco e seis meses, sem raça definida, um canino de um animal de porte médio e dois pré-molares de um animal de porte pequeno, por meio de desprendimento alveolar espontâneo e doados pelos proprietários dos animais. Os dentes foram identificados, mantidos sob refrigeração por 12 horas em meio de cultivo celular DMEM-F12 suplementado, e, em seguida,

encaminhados ao Laboratório de Cultivo de Células-Tronco (LABCelt) do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) para extração da polpa dentária em ambiente estéril de fluxo laminar.

Os protocolos utilizados neste experimento foram conduzidos seguindo as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal, Universidade Federal do Piauí (CEEA-UFPI, parecer nº 105/14), de acordo com as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.3. Isolamento e expansão das células-tronco da polpa dentária imatura canina

Os canais dentários foram acessados mecanicamente em ambiente de fluxo laminar, com auxílio de agulha estéril 22G as polpas foram retiradas por tração. As polpas foram lavadas três vezes com PBS estéril (PBS; 0,01 M, pH = 7,4), suplementado com 10% de penicilina-estreptomicina (ATB) e dissociadas mecanicamente com auxílio de lâmina bisturi em placa de Petri de 35 mm contendo meio de cultura basal completo DMEM/F-12 suplementado com 20% de soro fetal bovino, ATB a 5%, L-glutamina a 1% e aminoácidos não-essenciais a 1%.

Em seguida, os explantes foram transferidos para poços de placa de cultivo de seis poços ($4,9 \times 10^4$ cells/cm² TPP[®], Trasadingen, Suíça) contendo meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 5% de ATB. O tecido foi incubado em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após este período, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM-F12 suplementado com menor concentração de antibiótico (1%) e mantido sob incubação.

As células em expansão, nas placas de cultivo, foram tripsinizadas a cada 72 horas ou quando a confluência celular alcançava 80% da superfície de cultivo, com taxa de repique 1:2. As culturas eram lavadas duas vezes com PBS, adicionado solução de tripsina a 0,25% e incubadas por 5 minutos em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂. Os poços de cultivo foram observados em microscópio óptico de luz invertida (Coleman Nib-100[®]) para a identificação do desprendimento celular e a solução de tripsina inativada pela adição do dobro do volume de meio basal de cultivo. O material foi transferido para tubos tipo falcon de 15 ml e centrifugados a 1500 rpm, 35 aceleração, durante 10 minutos. O *pellet* resultante foi ressuscitado em meio basal completo e semeado em placas de cultivo de seis poços para ensaios de cinética celular.

2.4. Ensaio de unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F)

As culturas foram monitoradas e expandidas durante 20 dias, sendo o meio basal substituído a cada 72 horas, até a identificação de grupamentos celulares organizados em colônias esparsamente dispostas na superfície de cultivo. A placa de cultivo foi lavada com solução de PBS estéril e a cultura fixada com um mililitro de formaldeído tamponado durante 30 minutos. Novamente, lavada com solução de PBS estéril e a cultura corada com corante *May-Grunwald Giemsa* por 30 minutos.

A cultura foi avaliada em microscópio invertido, nos aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x, observando-se a morfologia celular e a organização dos agrupamentos celulares. Foram consideradas colônias, agrupamentos celulares morfologicamente homogêneos compostos por, no mínimo, 50 células, as quais as imagens foram registradas através de sistema de captura de imagem Studio Launcher.

2.5. Ensaio de cinética celular sob curva de crescimento por saturação

Quatro placas de seis poços foram reservadas para o ensaio de cinética celular, sendo tripsinizadas, identificadas e replaqueadas em concentração de 10^4 células/mL. As culturas foram mantidas sob incubação durante 10 dias e o meio trocado a cada 72 horas.

A cada 24 horas, selecionou-se aleatoriamente apenas um poço de cada placa de cultivo, os quais foram tripsinizados para avaliação de densidade e viabilidade celular. Nos poços que apresentaram confluência acima de 80%, com desprendimento celular, as células em suspensão foram descartadas e as células aderidas, tripsinizadas usualmente.

Após a tripsinização, as células foram suspendidas em um mililitro de meio basal, sendo retirada uma alíquota de 10 μ l da suspensão celular, transferida para um poço de uma placa de 96 poços e corada com 10 μ l de solução de Azul de Trypan.

A solução foi homogeneizada, mantida em repouso por cinco minutos e uma nova alíquota de 10 μ l da solução foi transferida para câmara de Neubauer. As células foram observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E 200®, Japan), objetiva 10x, contando-se o número total de células não coradas, com membrana celular íntegra, e coradas em azul, com membrana celular rompida, em quatro quadrantes da câmara. Calculando-se a concentração celular conforme fórmula abaixo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ total de contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contatos}}$$

A viabilidade da amostra foi determinada pela relação entre a quantidade de células coradas pelo total de coradas e não coradas e multiplicado por 100.

2.6. Ensaios de diferenciação celular

Para a indução de diferenciação das CTPD-ic, utilizaram-se os kits de diferenciação StemPro[®] osteogênico, adipogênico e condrogênico, sob metodologia de duplicata, obedecendo os protocolos do fabricante. As células foram então observadas em microscópio invertido de contraste de fase e fotografadas em objetivas de 40x, 100x, 200x e 400x.

2.6.1. Osteogênica

Foram semeadas 6×10^4 células/mL em poço de cultivo celular (7×10^4 cells/cm²) contendo meio basal suplementado e mantidas sob incubação, realizando-se a substituição do meio a cada três dias.

Após as culturas atingirem confluência de 80%, o meio basal foi substituído pelo meio de indução osteogênica (Stempro[®]) e as células mantidas sob incubação por 21 dias. O meio de diferenciação foi trocado convencionalmente a cada 3 dias e a morfologia celular avaliada periodicamente em microscópio invertido de contraste de fase (Coleman Nib-100[®]).

Após 21 dias, a cultura celular foi lavada com PBS duas vezes, e fixada com formol tamponado a 10% durante 30 minutos em ambiente de fluxo laminar. Em seguida, o formol foi removido e o poço lavado com água destilada. A cultura foi então coberta com solução de Alizarin Red S e mantida incubada por 45 minutos em ambiente sem luz. O corante foi removido e o poço de cultivo lavado sequencialmente cinco vezes com água destilada e uma vez com PBS.

2.6.2. Adipogênica

As células foram semeadas em concentração de 2×10^4 /mL células por poço, contendo meio basal suplementado e mantidas sob incubação.

Após obtenção de confluência celular de 80%, o meio basal foi substituído pelo meio de diferenciação adipogênica e a cultura mantida sob incubação por 14 dias. O meio de cultivo foi substituído a cada três dias e as células avaliadas periodicamente.

No décimo quinto dia o meio de indução foi descartado e os poços lavados com PBS duas vezes. A cultura foi então fixada com formol tamponado a 10% e novamente, lavada três vezes com PBS. Adicionou-se ao poço de cultivo isopropanol a 60% e mantido sob incubação por 5 minutos. Em seguida, o isopropanol foi descartado, adicionado solução de coloração Oil Red e as células mantidas em repouso, à temperatura ambiente, por 10 minutos. A solução de coloração foi então descartada e o poço novamente lavado com isopropanol e PBS, respectivamente.

2.6.3 Condrogênica

As células foram semeadas na concentração de 3×10^5 células/mL por poço em placa de cultivo de 96 poços contendo meio basal suplementado e mantidas sob incubação, trocando-se o meio a cada 72 horas.

Após obter-se confluência celular de 80%, o meio foi substituído por meio de indução condrogênica (Stempro[®]) e as células mantidas sob incubação por 21 dias. O meio de cultivo foi substituído a cada três dias e as células avaliadas periodicamente.

Posteriormente, o meio de indução foi descartado e as células lavadas com PBS. A cultura foi fixada com formol tamponado a 10% durante 20 minutos à temperatura ambiente, sendo lavada, em seguida, com água destilada. As células foram então cobertas com um mililitro de solução de Alcian Blue e incubadas em ambiente sem luz, *overnight*. Após este período, adicionou-se solução descolorante e as células foram mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos. A solução descolorante foi descartada e a cultura lavada com PBS.

2.7. Citometria de fluxo

A análise das células pela citometria de fluxo foi realizada de acordo com metodologia descrita por Wenceslau (2009).

Foram selecionadas três garrafas de cultivo em quinta passagem, que estavam mantidas em expansão. Ao alcançarem 90% de confluência, a garrafa foi tripsinizada de

forma usual. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e avaliado quanto à concentração e viabilidade.

As células foram acondicionadas em tubos falcon de 15 ml, na concentração de 3×10^5 células por tubo. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi desprezado e acrescentado 1 μ L de anticorpo com os marcadores celulares (Tabela 1) CD45, CD14, CD90 e CD105 por tubo e mantidos à temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz.

Tabela 1

Anticorpos primários conjugados utilizados na citometria de fluxo para marcação das CTMPD-ic.

Anticorpos	Fonte	Reatividade	Marca	Cód. Produto	Apresentação
CD105	Camundongo monoclonal	Humano e Porco	abcam®	53321	50 Testes
CD90	Camundongo monoclonal	Humano, cachorro, porco, Primatas não humanos	abcam®	139364	50 Testes
CD14	Camundongo monoclonal	Humano	abcam®	28061	100 Testes
CD45	Coelho policlonal	Humano, porco e rato	abcam®	10559	50 Testes

Em seguida, acrescentou-se um 1mL de PBS à cada tubo tipo Falcon e recentrifugou-se as amostras, sob as mesmas condições, por três vezes seguidas. O *pellet* de cada tubo tipo falcon foi ressuspensionado em 400 μ L de PBS e a suspensão enviada para análise em citômetro de fluxo FACSAria III (Becton Dickinson), equipado com laser de argônio para 488 nm. O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular. Para cada amostra foram adquiridos em torno de 20.000 eventos, e a análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva versão 6.0 (Becton Dickinson).

2.8. Criopreservação

As CTMPD-ic presentes nas garrafas restantes foram criopreservadas e, para isso, foram submetidas à tripsinização. Os *pellets* foram identificados e suspensos, individualmente, em meio para congelamento celular. Utilizou-se para a criopreservação meio contendo 40% de DMEM-F12, 40% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (Sigma[®], St Louis, MO, USA) resfriados a 4°C em câmara escura.

Os tubos com as células e o meio de criopreservação foram identificados e acondicionados, imediatamente, em freezer a -80°C, por *overnight* e, posteriormente, transferidos para botijão com nitrogênio líquido.

3. Resultados

3.1. Isolamento e expansão das CTMPD-ic

As polpas dentárias imaturas de cães, foram facilmente removidas com agulha fina e, por dissociação mecânica, originaram os explantes, alguns destes, aderiram à placa, no período de até cinco dias de cultivo. Os que não apresentaram adesão foram removidos durante as trocas de meio.

Foi observado o desprendimento de células, com morfologia fusiforme, após adesão dos explantes. As células aglutinaram-se radialmente ao tecido de forma irregular, e por vezes, sobrepostas. Exponencialmente, uma monocamada celular formou-se adjacente ao tecido dentário, expandindo-se ao longo da superfície livre de cultivo. Contudo, células de morfologia fusiformes foram também identificadas em pontos equidistantes (Fig. 1). Estas células dividiram-se e expandiram-se, originando colônias menores e isoladas do foco de disseminação celular inicial a partir do explante.

Embora o crescimento das colônias separadas do tecido tenha ocorrido de forma organizada e gradual, o desprendimento celular adjacente ao explante ocorreu com grande sobreposição celular. Essa sobreposição foi identificada pela aglutinação de conglomerados celulares aderidos, de morfologia mononuclear típica entre as células fusiformes dispostas longitudinalmente. Apesar da superfície de cultivo disponível ao crescimento celular, as células que se desprendiam mantinham-se aglutinadas nas regiões mais próximas ao tecido. Sob o risco de diferenciação celular mediada por contato, optou-

se por tripsinizar a cultura após oito dias de incubação e as células foram ressemeadas em poços de cultivo.

A adesão celular à superfície de cultivo foi observada após 24 horas e identificaram-se colônias uniformes com vinte células ou mais, esparsamente distribuídas. Inicialmente, as células exibiram morfologia fusiforme, mas à medida que as colônias cresceram, passaram a apresentar morfologia fibroblastóide, com núcleo centralizado, citoplasma abundante e projeções citoplasmáticas evidentes.

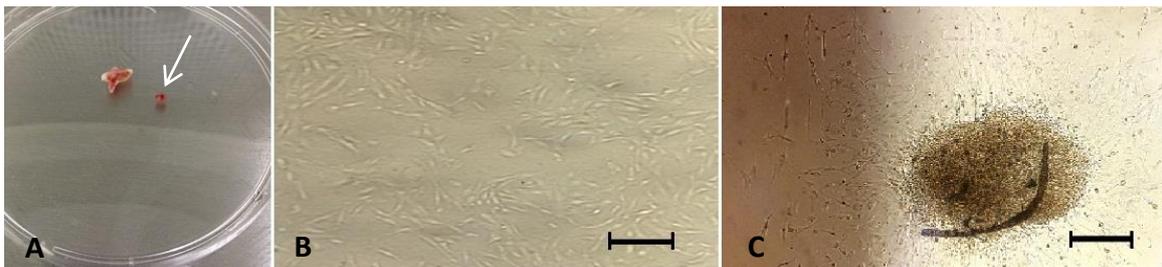


Fig.1. (A) Dente pré-molar sobre a placa de *Petri* e polpa de dente removida (seta); (B) Fotomicrografia de células em formato fibroblastóide, com confluência celular de 70%. Objetiva 100x; (C) Fotomicrografia do explante de polpa de dente após isolamento com crescimento celular a partir do explante, células em formato fibroblastóide. Objetiva 100x. Barras de 100 μ m.

As culturas originaram uma monocamada uniforme com 80% de confluência, a cada sete dias, quando eram tripsinizadas e repicadas em taxa de 1:2. A viabilidade celular média observada foi acima de 80% e as culturas foram expandidas até a sexta passagem.

3.2. Unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F)

Durante o ensaio de UFC-F, identificaram-se, em média 38 colônias, formadas a partir das células que se desprenderam do explante isolado, totalizando um valor superior a 2.000 células progenitoras mesenquimais. As células mantiveram sua característica fibroblastóide (“fibroblast like-cell”) e exibiram crescimento radial, tendendo à coalescência entre as colônias e formação de monocamada celular (Fig. 2).

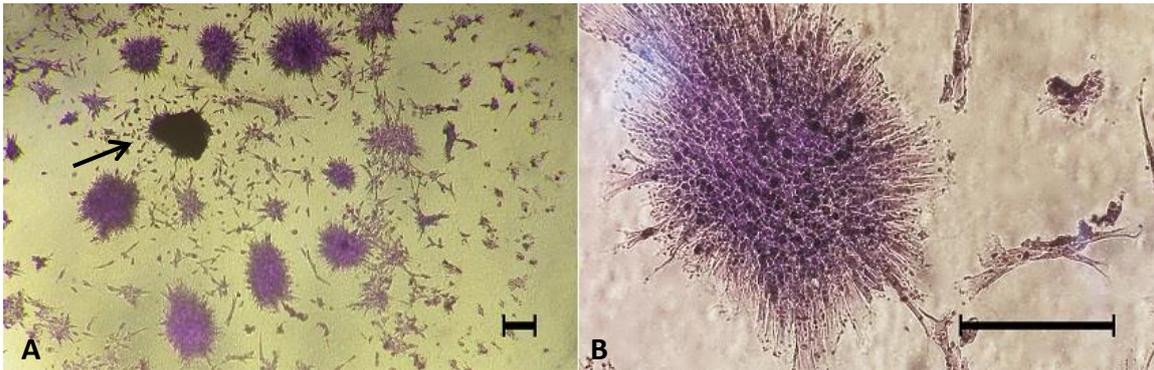


Fig. 2. Fotomicrografia de luz. Ensaio da unidade formadora de colônias fibroblastóides de CTMPD-ic. (A) Colônias de CTMPD-ic coradas com Giemsa, ao redor do explante da polpa dentária (seta), objetiva 40x; (B) Colônia de CTMPD-ic e intensa interação celular produzindo uma imagem em 3D, sendo possível observar o núcleo das células na UFC, objetiva 400x. Barras de 100 μ m.

3.3. Cinética celular

As curvas de crescimento apresentaram, em média, ao longo de sete dias, $7,50 \times 10^4 \pm 0,35$ células/mL por poço. A cultura exibiu comportamento ascendente até o décimo dia de observação, com único ponto de inflexão, no oitavo dia de cultivo, acompanhado por elevação abrupta do desvio padrão, quando comparado à série de dados até o sétimo dia e a partir do oitavo. Analogamente ao comportamento ascendente da concentração celular, a viabilidade média do cultivo, ao longo de dez dias, foi de $91,52 \pm 3,45$ %, num total de $30 \pm 1,06$ células contadas em hemacitômetro, perfazendo uma concentração média de $13,50 \pm 0,35$ células/mL (Fig. 3).

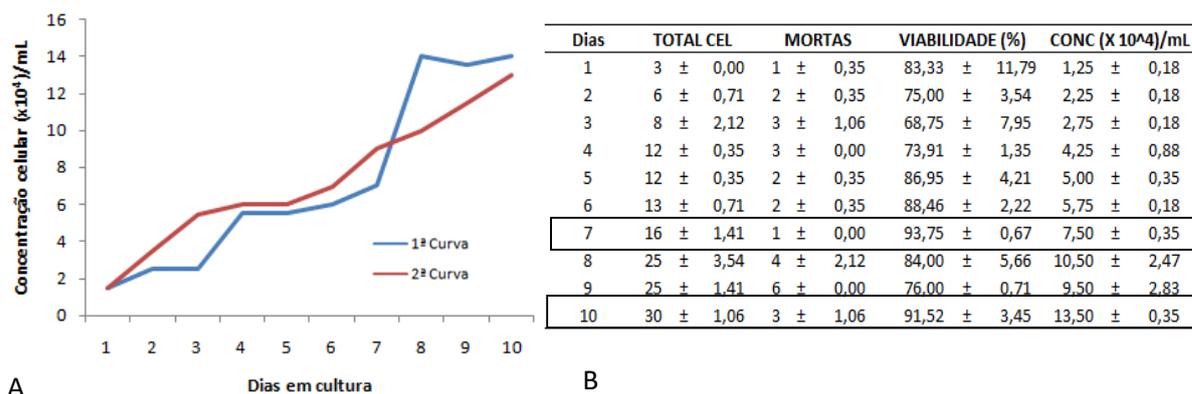


Fig. 3. Representação gráfica da cinética de crescimento celular de uma cultura de células-tronco mesenquimais caninas obtidas de dentes decíduos, correlacionada com as taxas de viabilidade e concentração celulares. (A) Gráfico da curva de crescimento, representando a concentração média por poço de cultivo ao longo de 10 dias, em duplicata. (B) Parâmetros médios e estatísticos descritivos das variáveis dependentes ‘total de células contadas’, ‘total de células mortas’, ‘viabilidade celular’ e ‘concentração celular’ ao longo de dez dias.

A viabilidade celular das CTMPD-ic manteve-se sempre acima de 70%, apresentando, na primeira passagem, viabilidade acima de 80% e na décima, e última, passagem, acima de 90% (Fig. 4).

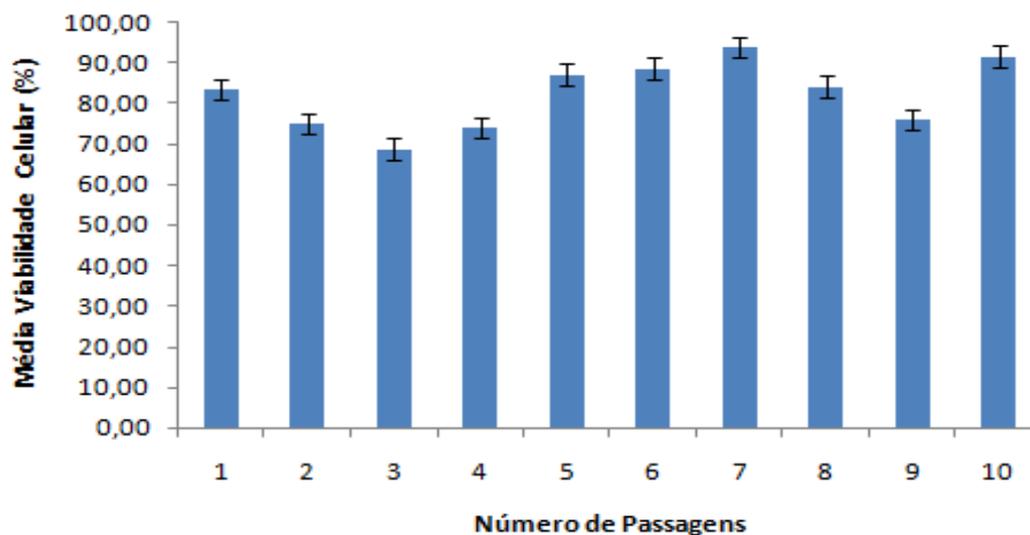


Fig. 4. Representação gráfica da viabilidade celular (%) com seus respectivos desvios padrão de acordo com a contagem diária das células durante dez passagens de CTMPD-ic.

Na variável número total de células podemos notar o aumento do número de células do primeiro até o décimo dia, na variável número de células mortas há variação diária desse parâmetro, podendo ser observado um número maior de células mortas no nono dia de avaliação. As variáveis viabilidade e concentração como são baseadas no número total de células e no número de células mortas apresentaram variações, mas sempre se mantendo maior no último dia de avaliação, como também foi observado no gráfico da curva de crescimento contendo um gráfico em crescimento, com uma queda do crescimento nos últimos dias de avaliação.

3.4. Citometria de fluxo

Na caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo, a população celular não expressou (coloração vermelha) os marcadores CD45, CD 14 e CD90 e baixa expressão (coloração verde) no marcador CD105 (Fig.5).

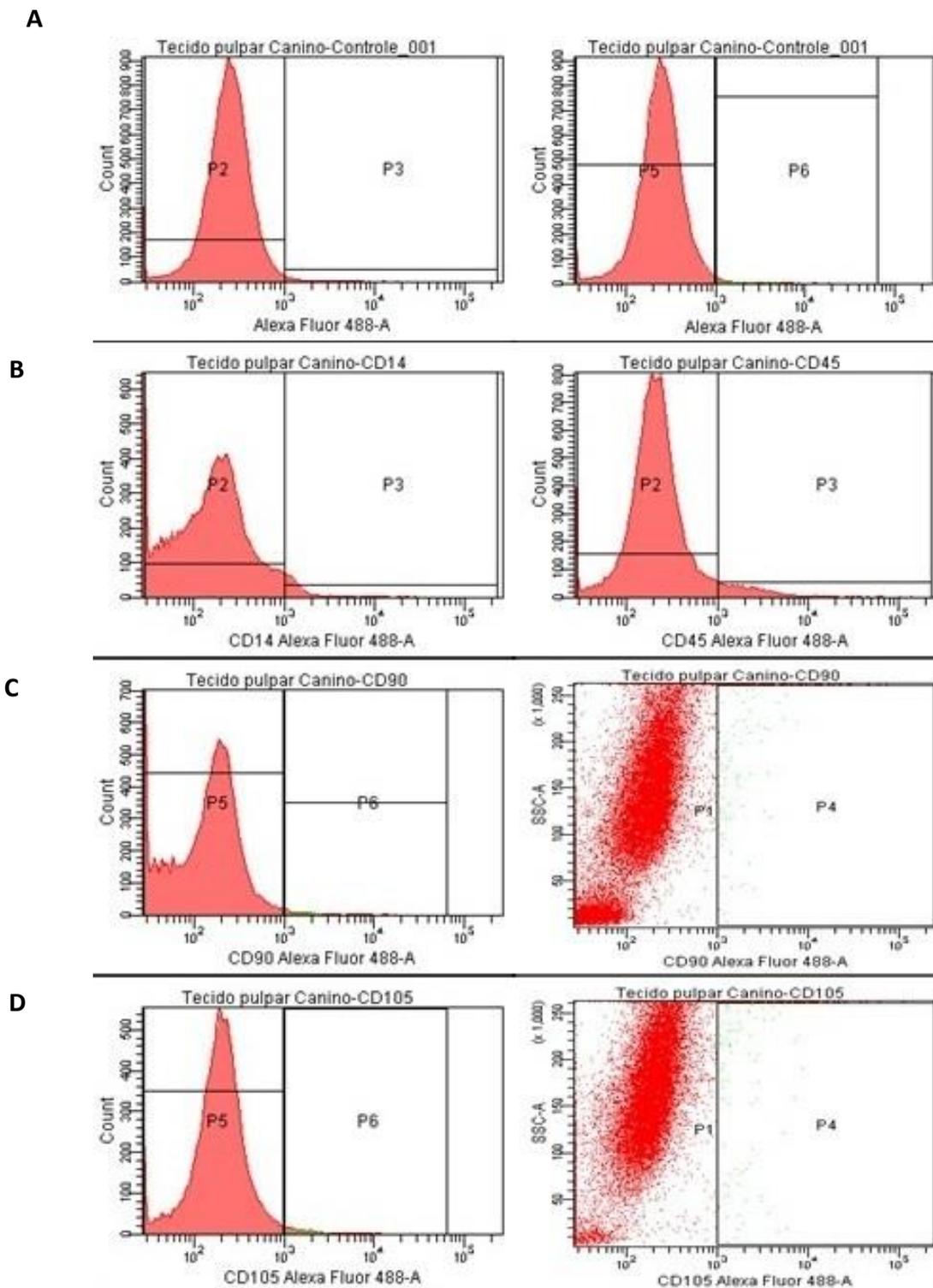


Fig. 5. Caracterização imunofenotípica da população de CTMPD-ic por citometria de fluxo - gráfcos representativos da expressão de moléculas de superfície de membrana por fluorescência. (A) Controle negativo; (B) Ausência de expressão dos CD14 e CD45; (C) Ausência de expressão do CD90; (D) Baixo nível de expressão do CD105.

3.5. *Diferenciação celular*

Nas culturas submetidas à diferenciação osteogênica, foram observadas alterações morfológicas progressivas a partir do 10º dia em cultivo, como o aumento da relação núcleo:citoplasma, células de formato cuboide e núcleo esférico central. Após quinze dias de cultivo, as células adquiriram morfologia similar a osteoblastos, com limites citoplasmáticos irregulares, formação de prolongamentos celulares e aspecto achatado. Após a coloração com Alizarin Red, o núcleo apresentou-se com a tonalidade de vermelho bordô e o citoplasma, mais basofílico e bem definido, com presença de depósitos de cálcio no interior das células, também, corado em vermelho (Fig. 6A & B).

As células induzidas à diferenciação condrogênica apresentaram alterações morfológicas progressivas a partir do 3º dia de indução condrogênica, com células em formato cubóide. Após a coloração com Alcian Blue, foi observado células coradas em azul, devido a presença de glicosaminoglicanos presentes nas células condroblásticas (Fig. 6C & D).

As culturas submetidas à diferenciação adipogênica, apresentaram-se grandes, hexagonais, irregulares e com grânulos citoplasmáticos birrefringentes a partir da terceira semana de cultivo. Quando coradas com Oil Red, identificou-se que os grânulos citoplasmáticos eram pequenos vacúolos de gordura dispersamente distribuídos e corados em vermelho-acastanhado (marrom) (Fig. 6E & F).

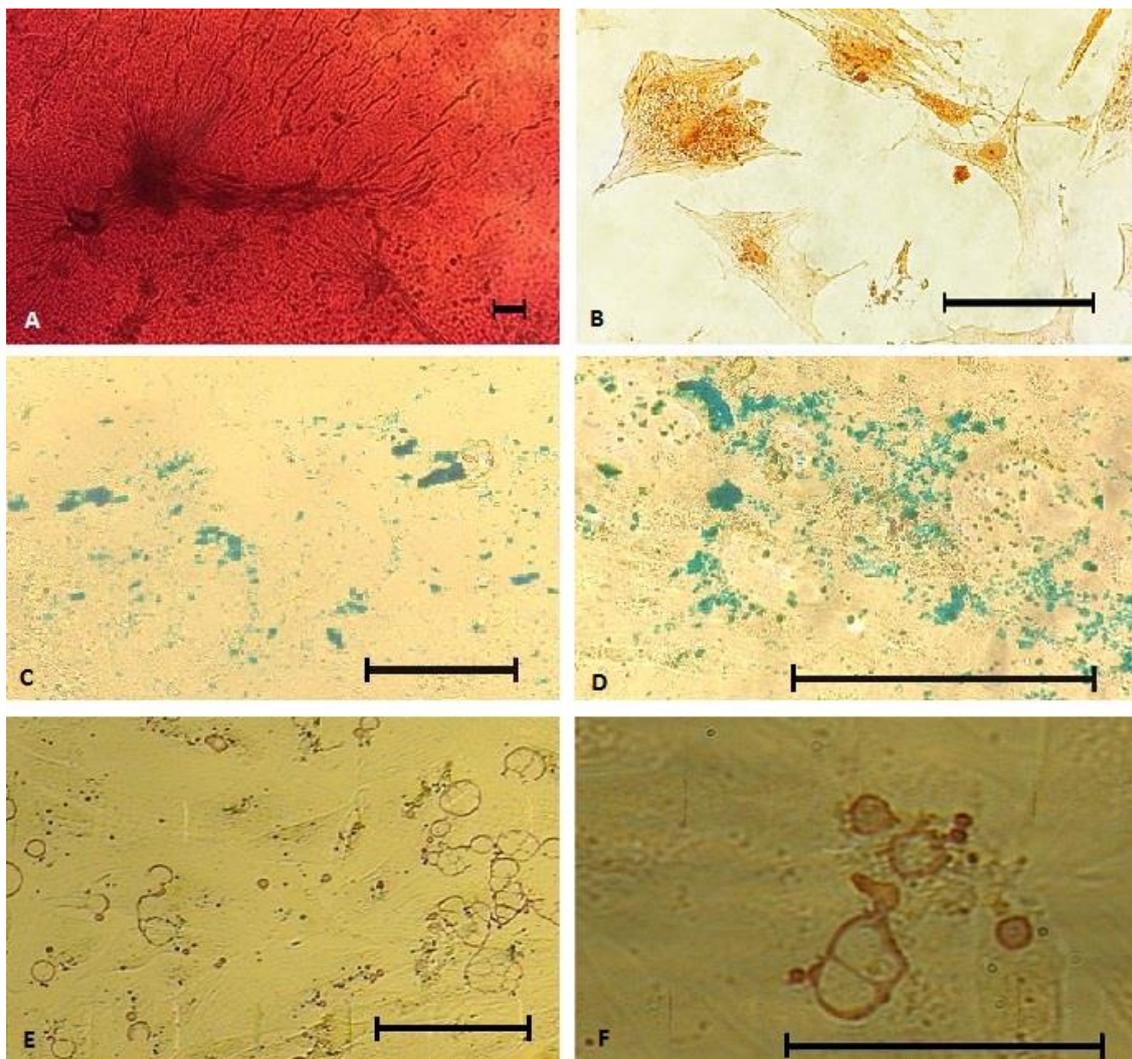


Fig. 6. Fotomicrografia de luz das células da polpa de dente imatura de cão. A e B: Células coradas com Alizarin Red. (A) Evidenciam-se as células no centro, com coloração vermelha, tonalidade escura, a matriz celular e suas ramificações por toda a imagem. Objetiva 4x10; (B) Verificam-se, células em formato fibroblastóide, com núcleo e nucléolo corados com vermelho em tonalidade mais escura e citoplasma celular com granulações, Aumento de 20x10. (C e D) Notam-se regiões com células coradas em azul (corante Alcian Blue). Aumento de 20x10 e 40x10, respectivamente. E e F: Células coradas com Oil Red. (E e F) Evidenciam-se vacúolos de gordura dispersamente distribuídos e corados em vermelho-acastanhado. Aumento de 20x10 e 40x10, respectivamente. Barras de 100µm.

4. Discussão

A metodologia proposta, no presente estudo, para isolamento de células-tronco mesenquimais a partir de polpa de dente decíduo canino, mostrou-se exequível e de baixa complexidade. Ao contrário do dente humano, que necessita ser fraturado e desgastado para exposição da polpa dentária (Soares, 2015), os dentes decíduos caninos utilizados permitiram o acesso à polpa dentária através do canal radicular utilizando-se uma agulha

de 25/8, sem necessidade de desgaste das estruturas dentárias. Contudo, baseado num estudo piloto prévio, obteve-se maior viabilidade da polpa dentária quando os dentes caninos permaneceram em uma solução de meio de cultivo celular completo e suplementado com 4% de antibiótico. Embora a flora bacteriana canina bucal e sua interação com as estruturas dentárias comporte-se como uma variável interveniente, a mesma não foi investigada no presente estudo, o que suscita a necessidade de futuras pesquisas para delineamento desta relação e, por seguinte, propor alternativas que reduzam os custos experimentais com meios e suplementos.

As polpas dentárias isoladas, quando fracionadas mecanicamente, exibiram profusa liberação de células em até cinco dias de incubação, corroborando com as observações de Kadar et al. (2009) e Yamada et al. (2011), os quais referem que, para este nicho anatômico, a simples dissecação mecânica permite a liberação celular de forma tão efetiva quanto a digestão enzimática com o uso da colagenase I, fato que reduz os riscos de morte celular e dos custos de reagentes nas pesquisas.

O ensaio de UFC-F permitiu a identificação de colônias celulares aderentes de morfologia fibroblastóide, inferindo que a amostra de tecido exibe potencial para possuir células-tronco mesenquimais, conforme observado previamente por Meirelles e Nardi (2003) quanto à empregabilidade deste ensaio. Os dados obtidos foram semelhantes aos observados por Carvalho et al. (2015) e Rocha (2015), porém com um número menor de células. Provavelmente o tamanho da amostra do tecido coletado exerça influência sobre a concentração celular presente no mesmo, visto que a polpa dentária de dente decíduo canino é inferior a um centímetro de comprimento. Ademais, pode-se considerar o fato de que em outras pesquisas, não foram utilizados explantes, nessa etapa (Dissanayaka et al., 2011; Carvalho et al., 2015; Rocha, 2015).

Obteve-se viabilidade celular acima de 90%, no décimo dia de curva de crescimento, assim como verificado por Kerkis et al. (2006) e por Suchanek et al. (2009). O tempo de crescimento e expansão foi semelhante à CTM derivada da medula óssea de caprino (Costa, 2015) e das CTM da polpa de dente humana (Carvalho et al., 2015; Soares, 2015), apresentando um gráfico crescente.

As curvas de crescimento exibiram uma fase LAG curta, seguida de uma fase LOG de crescimento exponencial (Figura 3), sem observação de uma fase de PLATEAU típica. Este comportamento é discrepante da maioria das curvas de crescimento celular,

dada a ausência da fase estacionária. Contudo, os dados obtidos foram similares aos estudos com células-tronco mesenquimais contemporâneos de diversos sítios anatômicos (Luiz, 2013; Carvalho et al., 2015; Rocha, 2015). Estes dados permitem supor que células-tronco mesenquimais possam exibir uma manutenção prolongada da fase de citocinese celular, induzindo uma fase LOG prolongada até a confluência da superfície de cultivo e/ou exaustão do meio de cultivo, que precipita a fase de decaimento celular. Contudo, para elucidação dessa relevante questão faz-se mister estudos posteriores de cinética e proteômica celular para validar ou não estas hipóteses.

O ponto isolado de inflexão na curva de crescimento, por seu comportamento como dado “*outline*” em relação aos dados da dispersão, pode representar um erro de coleta de dados. Esta possibilidade é justificada pela elevação do desvio padrão no ponto de inflexão, de forma discrepante aos demais desvios padrão observados. Isto representa a obtenção de uma média num intervalo estatisticamente distante das demais médias obtidas, induzindo elevação factual do desvio padrão (Figura 3). Como o dado posterior ao de inflexão retorna ao desvio padrão obtido nos dados anteriores, pode-se propor que um erro de coleta de dados tenha induzido esta anomalia. Contudo, tal fato não compromete a interpretação da cinética celular, visto a série de dados apresentar progressão linear e uniforme ao longo de nove dias.

Na variável número total de células podemos notar o aumento do número de células do primeiro até o décimo dia, na variável número de células mortas há variação diária desse parâmetro, podendo ser observado um número maior de células mortas no nono dia de avaliação. As variáveis viabilidade e concentração como são baseadas no número total de células e no número de células mortas apresentaram variações, mas sempre se mantendo maior no último dia de avaliação, como também foi observado no gráfico da curva de crescimento contendo um gráfico em crescimento, com uma queda do crescimento nos últimos dias de avaliação.

As diferenciações em três linhagens celulares confirmam a multipotencialidade e o alto poder de diferenciação das CTMPD imatura (Kerkis e Caplan, 2012), também observado com CTMPD humana com o mesmo período de indução e mesmo protocolo de coloração (Kadar et al., 2009; Dissanayaka et al., 2011; Soares, 2015; Carvalho, 2015 e Sousa, 2015). Estes achados acrescentam nas CTMPD-ic características viáveis para mais estudos e investimento no seu cultivo, levando em consideração de início a sua

facilidade e baixo custo de obtenção com resultados de crescimento e expansão celular acelerados.

Os resultados de imunofenotipagem mostraram pouca expressão do marcador positivo esperado (CD 105), variação observada em outras espécies animais (Costa, 2015; Silva, 2016) e marcação negativa para CD90, CD 14 e CD 45. Em estudo com CTMPD humana foi observada expressão forte no marcador CD90 e ausência de marcação do marcador CD45 e CD14 (Suchanek et al. 2009; Soares, 2015). Pouca marcação imunofenotípica do CD90 foi relatada por Rocha (2015) em CTM obtidas do tecido adiposo de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) conforme ocorreu neste estudo. Este fato pode estar relacionado ao anticorpo não ser espécie-específico

5. Conclusões

A polpa dentária imatura de cães é uma fonte de obtenção de células-tronco mesenquimais e confirmar a facilidade de sua obtenção após troca natural em um animal de companhia. As CTMPD-ic submetidas a três protocolos de diferenciação de linhagens celulares apresentaram potencial de diferenciação osteogênico, condrogênico e adipogênico. As CTM mostraram um crescimento acelerado e proliferativo. E, sobretudo, esta pesquisa vem somar aos estudos com células-tronco de uma nova fonte de obtenção, oriunda de uma espécie doméstica ressaltando, ainda, sua caracterização e obtenção de diferentes linhagens celulares a partir da polpa dentária imatura canina, possibilitando a criação de um banco de células para futuras terapias celulares.

Referências

- Arthur, A.; Rychkov, G.; Shi, S.; Koblar, S.A.; Gronthos, S. 2008. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells*. 28, 1787-1795.
- Bezuidenhout, A.J. 2007. Anatomia e histologia bucal aplicada. In: SLATTER, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. Trad., Ed. São Paulo: Manole. 2, cap. 194, 2.630- 2.637.
- Caplan, A.; Bruder, S. P. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*. 7, 6, 259-264.
- Carvalho, Y.K. P.; Argôlo Neto, N.M.; Ambrósio, C.E.; Oliveira, L.J.; Rocha, A.R.; Silva, J.B.; Carvalho, A.A.M.; Alves, F.R. 2015. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). *Pesq. Vet. Bras.* 35, 6, 590-598.
- Costa, Clautina Ribeiro de Moraes. Ensaio clínico com células-tronco derivadas do tecido adiposo na reparação da glândula mamária de caprinos com mastite. Teresina, Piauí:

2015. (Tese de Doutorado em Biotecnologia RENORBIO). Universidade Federal do Piauí.
- Dissanayaka, W.L.; Zhu, X.; Zhang, C.; Jin, L. 2011. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *Basic Research, Biology: JOE*. 37, 8, 1074-1080.
- Di Scipio, F.; Sprio, A.E.; Folino, A.; Carere, M.E.; Salamone, P.; Yang, Z.; Berrone, M.; Prat, M.; Losano, G.; Rastaldo, R.; Berta, G.N. 2014. Injured cardiomyocytes promote dental pulp mesenchymal stem cell homing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840, 2152–2161.
- Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. 2000. Post natal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PAS*. 97, 25, 13625-13630.
- Iohara, K.; Muramaki, M.; Nakata, K.; Nakashima, M. 2014. Age-dependent decline in dental pulp regeneration after pulpectomy in dogs. *Experimental Gerontology*. 52, 39–45.
- Kadar, K.; Kiraly, M.; Porcsalmy, B.; Molnar, B.; Racz, G.Z.; Blazsek, J.; Kallo, K.; Szabo, E.L.; Gera, I.; Gerber, G.; Varga, G. 2009. Differentiation potential of stem cells from human dental origin: Promise for tissue engineering. *Journal of physiology and pharmacology*. 60, Suppl 7, 167-175.
- Kerkis, I.; Kerkis, A.; Dozortsev, D.; Stukart-Parsons, G.C.; Massironi, S.M.G.; Pereira, L.V.; Caplan, A.I.; Cerruti, H.F. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing Oct-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 184, 105-116.
- Krebsbach, P. H; Robey, P. G. 2002. Dental and skeletal stem cells: Potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *Journal of Dental Education: Transfer of advances in science into dental education*. 66, 6, 766-773.
- Lavarato, V.N.; Del Carlo, R.J.; Da Cunha, D.N.; Okano, B.S.; Belfort, F.G.; De Freitas, J.S.; Da Mota, G.F.A.; Quintão-Júnior, J.F.; Silame-Gomes, L.H.L.; Drumond, F.R.; Carneiro-Júnior, M.A.; De Oliveira, E.M.; Monteiro, B.S.; Prímola-Gomes, T.N.; Natali, A.J. 2016. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 90, 111-119.
- Luiz, Lucylene Migueta. Células-tronco mesenquimais: Isolamento e caracterização de populações derivadas de alvéolo dental humano e identificação e caracterização de populações de polpas dentais de camundongos. São Paulo: 2013, 160p. (Tese de Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
- Martin-Rendon, E.; Sweeney, D.; LU, F.; Girdlestone, J.; Navarrete, C.; Watt, S.M. 2008. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes *in vitro* at high frequencies. *VoxSanguinis*. 95, 137–148.
- Meirelles, L.S.; Nardi, N.B. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* cultivation, and characterization.. *British Journal of Haematology*. 123, 4, 702-711.
- Monteiro, B. S.; Argôlo Neto, N. M.; Del Carlo, R. J. 2009. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online: ISSN 0103-8478.
- Osmar Filho, F.S.; Argôlo Neto, N.M.N.; Carvalho, M.A.M.; Carvalho, Y.K.; Diniz, A.N.; Moura, L.S.; Ambrósio, C.E.; Monteiro, J.M.; Almeida, H.M.; Miglino, M.A.; Alves, J.J.R.P.; Macedo, K.V.; Rocha, A.R.; Feitosa, M.L.T.; Alves, F.R. 2014. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil, *Acta Cirúrgica Brasileira*. 29, 478-484.

- Pessoa, Gerson Tavares; Feitosa, M. L. T.; Argôlo Neto, N. M.; Rocha, A. R.; Costa, C. R. M.; Silva, G. C.; Bezerra, D. O.; Coelho, C. J. C.; Sousa, S. S.; Carvalho, M. A. M. 2014. Isolation, culture and differentiation potential of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42, 1, 1-10.
- Rocha, Andressa Rêgo. Roedor silvestre como fonte de células-tronco: caracterização e multipotencialidade de células-tronco mesenquimais estromais e adiposas de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). Teresina, Piauí: 2015, 88p. (Tese de Doutorado em Biotecnologia RENORBIO). Universidade Federal do Piauí.
- Silva, Gustavo Cardoso. Células-tronco da geléia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (*Capra hircus*): Protocolos de isolamento e caracterização. Teresina, Piauí: 2016, 49p. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Piauí.
- Sloan, A. J.; Smith, A. J. 2007. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases*. 13, 2, 151-157.
- Soares, Isadora Mello Vilarinho. Reparo ósseo em tíbia de ratos após implante de células tronco da polpa dentária humana e Aloe vera. Teresina, Piauí: 2015, 68p. (Mestrado em Odontologia) Universidade Federal do Piauí.
- Suchanek, J; Soukup, T.; Visek, B.; Ivancakova, R.; Kucerova, L.; Mokry, J. 2009. Dental pulp stem cell and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 153, 1, 31-36.
- Yamada, Y.; Fujimoto, A.; Ito, A.; Yoshimi, R.; Ueda, M. 2006. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials*. 27, 3766–3781.
- Yamada, Y.; Ito, K.; Nakamura, S.; Ueda, M.; Nagasaka, T. 2011. Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration Using Stem Cells From Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow. *Cell Transplantation*. 20, 1003-1013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células-tronco mesenquimais obtidas a partir da polpa dentária imatura de cães apresentaram semelhanças durante o cultivo com células mesenquimais da polpa dentária imatura humana. Os protocolos de isolamento expansão e diferenciação, utilizados mostraram-se viáveis. A utilização da polpa de dente imatura de cães tem grande importância na medicina regenerativa por evitar as reações cutâneas ou sistêmicas após xenotransplantes, utilizando, assim alotransplante (transplantes entre tecidos de uma mesma espécie animal), nos casos de futuras terapias celulares em lesões ósseas e articulares e a necessidade de deposição de tecido adiposo em pacientes caninos.

Destaca-se então que os resultados desse estudo caracterizou a polpa dentária imatura de cães como uma fonte para obtenção de CTM sem necessidade de anestésias ou cirúrgicas nos animais para a sua obtenção uma vez ter sido de forma natural e espontânea, durante a troca do dente decíduo para o permanente. Assim, sua utilização é viável e favorável na pesquisa, considerando o baixo custo e os resultados obtidos no isolamento e caracterização da polpa dentária imatura.

A continuidade das pesquisas nessa área favorece o desenvolvimento e aprimoramento de outros estudos com CTM possibilitando, assim, a criação de um banco de células-tronco no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), para futuros experimentos com terapia celular.

REFERÊNCIAS

ARGÔLO NETO, Napoleão Martins; *et al.* Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. **Clinical and Experimental Dermatology** (Print), v. 37, p. 544-553, 2012.

ARGÔLO NETO, Napoleão Martins; *et al.* Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2016.

ARTHUR, Agnes; *et al.* Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. **Stem Cells**, v. 28, p. 1787-1795, 2008.

BHARTIYA, D.; *et al.* Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. **Stem Cells and Development**, v.21, n.1, p.1-6, 2012.

BEZUIDENHOUT, A.J. Anatomia e histologia bucal aplicada. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. Trad., Ed. São Paulo: Manole, 2007, vol. 2, cap.194, p. 2.630- 2.637.

CABRAL, Rosa Maria; *et al.* Kidney injury and cell therapy: Preclinical study. **Microscopy Research and Technique** (Print), v. 75, p.566-570, 2012.

CAPLAN, A.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, n. 6, p. 259-264, 2001.

CARVALHO, P. H. *et al.* Cardiogenic differentiation of somatic stem cells: Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 100, n. 1, p. 82-89, 2013.

DA COSTA, Clautina Ribeiro de Moraes. **Ensaio Clínico com células-tronco derivadas do tecido adiposo na reparação da glândula mamária de caprinos com mastite**. Teresina, Piauí: 2015, 107p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí.

ROCHA, Andressa Rêgo da. **Roedor silvestre como fonte de células-tronco: caracterização e multipotencialidade de células-tronco mesenquimais estromais e adiposas de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)**. Teresina, Piauí: 2015, 88p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.

SILVA, Gustavo Cardoso da. **Células-tronco da geléia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (*Capra hircus*): Protocolos de isolamento e caracterização**.

Teresina, Piauí: 2016, 49p. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí.

CARVALHO, Yulla Klinger Pereira; *et al.* Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesq. Vet. Bras.** v. 35, n.6, p. 590-598, 2015.

DISSANAYAKA, Waruna Lakmal *et al.* Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **Basic Research_ Biology: JOE.** v. 37, n. 8, p. 1074-1080, 2011.

DI SCIPIO, Frederica; *et al.* Injured cardiomyocytes promote dental pulp mesenchymal stem cell homing. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1840, p. 2152–2161, 2014.

GRONTHOS, Stan; *et al.* Post natal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **PAS**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

JIANG, Yuehua; *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature.** v. 418, p.41- 49, 2002.

KADAR, K. *et al.* Differentiation potential of stem cells from human dental origin: Promise for tissue engineering. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 60, Suppl 7, p. 167-175, 2009.

KERKIS, Irina; *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing Oct-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, p.105-116, 2006.

KREBSBACH, Paul. H; ROBEY, Pamela Gehron. Dental and skeletal stem cells: Potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. **Journal of Dental Education:Transfer of advances in science into dental education**, v. 66, n. 6, p. 766-773, 2002.

LAVORTATO, V. N. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 90, p. 111-119, 2016.

MAMBELLI, Lislely Inata; *et al.* Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering.** v. 15, n.1, p. 87-94, 2009.

MARTIN-RENDON, Enca; *et al.* 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sanguinis**, v. 95, p. 137–148, 2008.

MEIRELES, Lindolfo da Silva; CHANGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. USA, v.119, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELLES, Lindolfo da Silva; CAPLAN, Arnold I.; NARDI, Nance Beyer. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Porto Alegre, v.26, p.2287- 2299, 2008.

MONTEIRO, Betânia Souza; ARGÔLO-NETO, Napoleão Martins; DEL CARLO, Ricardo Junqueira. Células-tronco Mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 2010.

PESSOA, Gerson Tavares; *et al.* Isolation, culture and differentiation potential of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2014.

PIERANTOZZI, Enrico; *et al.* Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: Expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. **Stem Cells and Development**, v. 20, n.5, p. 915-923, 2011.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. **Journal of The American Heart Association: Circulation Research**, 2004.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Diseases**, v. 13,n.2, p. 151-157, 2007.

SILVA FILHO, Osmar Ferreira da; *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil, **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 29, p. 478-484, 2014.

SOARES, Isadora Mello Vilarinho. **Reparo ósseo em tíbia de ratos após implante de células tronco da polpa dentária humana e Aloe vera**. Teresina, Piauí: 2015, 68p. (Mestrado em Odontologia) Universidade Federal do Piauí.

TIRINO, V. *et al.* Methods for the Identification, Characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. **Stem Cell Rev and Rep**, p.8, 2011.

ULMER, Franzisca Laura; *et al.* **Stem Cells: prospects in dentistry**. Schweiz Monatsschr Zahnmed, v. 120, n. 10, p. 860-872, 2010.

YAMADA, Yoichi; *et al.* Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. **Biomaterials**, v. 27, p. 3766–3781, 2006.

YAMADA, Yoichi; *et al.* Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration Using Stem Cells From Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow. **Cell Transplantation**. v.20, p. 1003-1013, 2011.

ZUCCONI, Eder; *et al.* Mesenchymal Stem Cells Derived From Canine Umbilical Cord Vein: A Novel Source for Cell Therapy Studies. **Stem cells and Development**, v. 19, n. 3, p. 395-402, 2010.