

EFEITO DA HIPÓXIA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS

Bianca Chamorro Darde¹ e Luciano Casagrande²

¹ Laboratório de Hematologia e Células-Tronco – Faculdade de Farmácia (UFRGS)

² Faculdade de Odontologia (UFRGS)

INTRODUÇÃO

A capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares e a facilidade na obtenção com o mínimo de dano invasivo ao doador tornam as células-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados uma promessa para a engenharia tecidual. No entanto, a pequena quantidade de células isoladas da polpa é um dos principais obstáculos para terapias celulares, em que um alto número celular é crucial. A tentativa de aprimorar o microambiente da cultura celular para promover uma expansão e diferenciação que comportem a aplicabilidade clínica é um passo importante para a pesquisa e para o futuro da engenharia tecidual. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da hipóxia na capacidade de proliferação de células-tronco mesenquimais provenientes da polpa de dentes decíduos (SHED).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 5 dentes decíduos hígidos em estágio avançado de rizólise (Fig 1) de pacientes saudáveis atendidos na Clínica Odontológica Infanto-Juvenil, localizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Imediatamente após a exodontia, o dente foi imerso em falcon contendo meio de cultura (1mL DMEM/HEPES; 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, 10% de soro fetal bovino) à 4°C e transportados ao laboratório. Em capela de fluxo laminar, o dente foi removido do falcon e depositado em gaze estéril embebida em clorexidina 0,12% para limpeza da superfície do dente (Fig 2). O tecido pulpar foi removido cuidadosamente da câmara pulpar através da utilização de colheres de dentina e limas endodônticas (Fig 3) e imerso em solução enzimática contendo 0,2% de colagenase tipo I por 60 minutos a 37°C (Fig 4). Após, foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 800xg a 4°C.

As suspensões celulares obtidas foram semeadas em placas de 12 poços (Fig 5). O meio de cultura foi trocado após 48 horas do plaqueamento inicial (Fig 6) e, posteriormente, a cada 2-3 dias. Após atingirem confluência de aproximadamente 90% (Fig 7) as células foram removidas com tripsina-EDTA, 0,25% (5 minutos) e plaqueadas novamente na proporção de 5.000 células/cm² até a quinta passagem (P5).

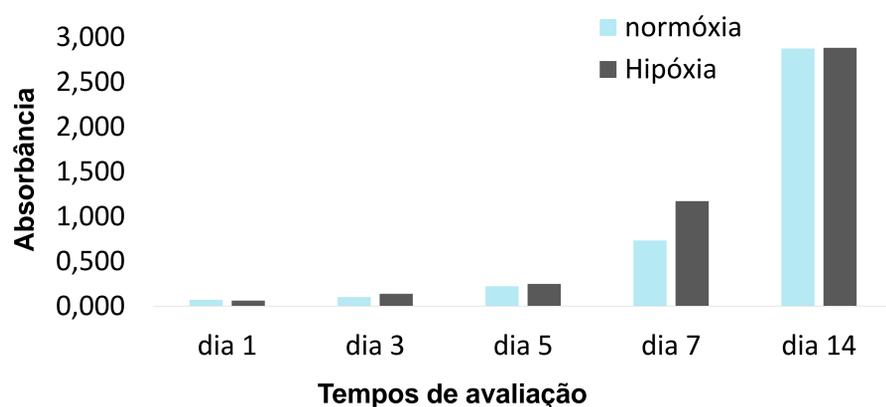


Para avaliar a proliferação, as SHED foram semeadas em placas de 24 poços e cultivadas conforme o nível de concentração de oxigênio: hipóxia (3% O₂) ou normóxia (21% O₂). Para o cultivo em hipóxia, uma mistura de gás (3% O₂, 5% CO₂ e 92% N) foi inserida na câmara de hipóxia (Fig 8) a cada 24 horas. Após 1, 3, 5, 7 e 14 dias de cultivo, o reagente WST-8 foi adicionado à cultura celular na diluição final de 1:10. Depois de uma hora de incubação, 100µL do sobrenadante da cultura foi transferido para poços de uma placa de 96-poços de cultura para a leitura do nível de absorvância em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm. Para controle, um poço sem células foi testado da mesma forma. O teste ANOVA de medidas repetidas foi aplicado para analisar os dados, com um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Avaliação da proliferação por WST-8 para os grupos normóxia e hipóxia. Médias das absorvâncias nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14.

Os valores de absorvância indicam o aumento da atividade metabólica, relative ao número de células viáveis. Não há diferença significativa entre os grupos nos dias de análise (p>0,05).



CONCLUSÃO

Ambos os grupos apresentaram similar aumento do número celular após 21 dias do experimento, não sendo observada diferença estatística entre eles. Dessa forma, a hipóxia parece não ter um efeito significativo na capacidade de proliferação das SHEDs.