

## AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS TRANSFECTADAS COM UM VETOR CONTENDO VGF

**JÚLIO CÁ<sup>1</sup>; LUIZ ALEXANDRE CHISINI<sup>2</sup>; THAÍS GIODA NORONHA<sup>3</sup>; SARAH ARANGUREM KARAM<sup>4</sup>; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE<sup>5</sup>; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup>UFPel – Graduando em Odontologia – cajulio125@hotmail.com

<sup>2</sup>UFPel – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – luizalexandrechisini@hotmail.com

<sup>3</sup>UFPel – Graduanda em Odontologia – thaiss.gioda.noronha@gmail.com

<sup>4</sup>UFPel – Graduanda em Odontologia – sarahkaram\_7@hotmail.com

<sup>5</sup>UFPel – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – marcusconde82@gmail.com

<sup>6</sup>UFPel – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – ffdemarco@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (FERRARA, 1996). O Fator de crescimento vascular Endotelial (VEGF) é uma glicoproteína que desempenha papel central nesse processo (DVORAK, 2005), pois possui uma atividade mitogênica sobre células de origem endotelial (GONCALVES et al., 2007; MULLANE et al., 2008; JABBARZADEH et al., 2008). Estratégias utilizando VEGF recombinante (rhVEGF) para estimular a proliferação e migração de células endoteliais já obtiveram determinado sucesso (GALLER et al., 2012). Tal abordagem proporcionou em uma melhoria significativa do crescimento vascular, provando a hipótese de que o fornecimento de rhVEGF desencadeia a migração de células endoteliais hospedeiras (GALLER et al., 2012).

O conceito básico da terapia gênica (TG) compreende a habilidade de inserir material genético no núcleo celular para manipular as proteínas que são produzidas pelo maquinário endógeno de determinada célula (SCHELLER et al., 2012). Com a aplicação da TG, genes específicos, como o VEGF, podem ser transferidos para células alvo de um determinado organismo vivo – Terapia Gênica In Vivo em organismos humanos. Entretanto, este tipo de terapia não é comumente realizado devido à dificuldade em transfetar somente as células de interesse e o risco de reação adversa devido à introdução do vetor (CAVAZZANA-CALVO et al., 2000). Como alternativa pode ser aplicada a Terapia Gênica Ex-Vivo (TGEx), na qual células são cultivadas e modificadas com a utilização de um vetor contendo o gene de interesse in vitro. Depois de transfetadas as células são implantadas em um sítio específico de um organismo (JABBARZADEH et al., 2008). Na odontologia, a

combinação de TGEx com as técnicas de engenharia tecidual possui um grande potencial de aplicação nas estratégias de regeneração do órgão pulpar. A TGEx se mostrou eficiente na melhora da vascularização de constructs que foram semeados com células geneticamente alteradas para realizar a secreção de fatores pró-angiogênicos (IWAGURO et al., 2002; JABBARZADEH et al., 2008). Por isso o objetivo deste estudo foi transfectar e avaliar a viabilidade de células-tronco de dentes decíduo (CTDD) transfectadas com vetor plasmidial contendo Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).

## 2. METODOLOGIA

Células-tronco da polpa dental de dentes decíduos (CTDD), foram cultivadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> usando meio de Eagle Modificado por Dulbeco (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM) adicionado de nutriente HAM-F12 (1:1) (SIGMA) com baixo teor de glicose suplementado com 15% de soro fetal bovino HyClone e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco Penicillin-Streptomycin, Invitrogen) em frascos de cultivo de 75cm<sup>3</sup>, os quais foram incubado em uma atmosfera controlada - (37°C – CO<sub>2</sub> (5%)) até atingir estágio de subconfluência de 80% entre as passagens 3 e 7. Foi desenvolvido um vetor plasmidial (pIRES2-AcGFP1) contendo VEGF. Após expansão (*Escherichia coli* TOP10), purificação e isolamento (Nucleobond® Xtra Maxi) o DNA exógeno foi quantificado por espectroscopia (260nm/280nm). O processo de transformação para inserção do plasmídeo nas células bacterianas foi realizado através de choque-térmico. CTDD (1x10<sup>4</sup>) foram cultivadas (DMEM+Ham-F12 -85%- Hyclone -15%-, 37°C, CO<sub>2</sub>-5%) em placas de 96 poços (24h) para que atingissem a subconfluência nos poços. Em seguida, Foi adicionado 200 ng de DNA plasmidial, e 0,3 µL de reagente Lipofectamine® 3000 (LP3) por poço conforme protocolo estabelecido pelos fabricantes. Foram avaliados os seguintes grupos de tratamento: (1) Controle Negativo DMEM+HAM-F12; (2) pEGFP-N1; (3) pIRES2-AcGFP1; (4) pEGFP-N1 + Lipofectamine® 3000; (5) pIRES2-AcGFP1 + Lipofectamine® 3000; (6) Lipofectamine® 3000. Após 72h, foram adicionados a cada poço os fluoróforos DAPI ( $\lambda=358$  nm) e LIVE/DEAD® (Calceína AM - $\lambda=494/517$ nm- e *ethidium homodimer1* - $\lambda=517/617$ nm), para avaliação da viabilidade celular.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos experimentais, para avaliação do processo de transfecção das células-tronco foram divididos da maneira previamente para que pudéssemos observar, além da efetividade da transfecção das células do grupo experimental, a toxicidade ou capacidade de inibição do crescimento celular dos componentes utilizados no processo de inserção de material genético nas células-tronco. Neste contexto, pudemos observar que o processo de transfecção celular se mostrou efetivo somente para os grupos 4 e 5, nos quais o plasmídeos de interesse foi utilizado em conjunto com o agente transfectante. Apesar das células terem apresentado, visualmente uma baixa taxa de transfecção, o processo se mostrou efetivo.

Os grupos 2 e 3 serviram para avaliar se a quantidade de plasmídeo utilizada na reação era efetiva e ao mesmo tempo citotóxica. Tendo isso em consideração, nos utilizamos de grupos experimentais para ter controle sobre toxicidade dos reagentes utilizados durante o processo de transfecção para que o trabalho de ajuste da concentração dos reagentes fosse sistematizado. Para isso foram estabelecidos 2, 3 e 6, além dos grupos contendo todos os reagentes necessários para o processo de transfecção. A aglomeração de núcleos corados em azul (DAPI) demonstrou a integridade do núcleo das CTDD. Os filamentos de actina mantiveram suas características preservadas (LIVE/DEAD®) indicando uma grande quantidade de células viáveis.

#### 4. CONCLUSÕES

Desse resultado pudemos concluir que os plasmídeos quando adicionados sem o agente transfectante (Lipofectamine 3000®) não são efetivos no processo de inserção de material genético no interior do núcleo das células-tronco avaliadas nesse estudo (KERKIS et al., 2008).

Pudemos observar que, apesar de efetivo, o processo de transfecção apresentou um baixo rendimento após a visualização sob microscopia ótica de fluorescência. O fabricante do Lipofectamine 3000®, indica que o material é capaz de estimular a transfecção de 70 – 90% da população celular submetida à reação, o que não foi observado em nossos ensaios iniciais. O estabelecimento dos grupos com plasmídeo controle (pEGFP-N1 e pEGFP-N1+Lipofectamine 3000®) foi de grande valia para que pudéssemos estabelecer um padrão de comparação para o comportamento do pIRES2-AcGFP1, de uso estabelecido nos laboratórios do

PPGB-UFPel. Em nossos ensaios preliminares pudemos observar que as taxas de transfecção dos plasmídeos foram bastante semelhantes. Dessa constatamos que seria necessário ajustar as doses de plasmídeo e transfectante utilizadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVAZZANA-CALVO, M.; HACEIN-BEY, S.; DE SAINT BASILE, G.; GROSS, F.; YVON, E.; NUSBAUM, P.; SELZ, F.; HUE, C.; CERTAIN, S.; CASANOVA, J. L.; BOUSSO, P.; DEIST, F. L.; FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, v. 288, n. 5466, p. 669-672, Apr 28 2000.
- DVORAK, A. M. Mast cell-derived mediators of enhanced microvascular permeability, vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, histamine, and serotonin, cause leakage of macromolecules through a new endothelial cell permeability organelle, the vesiculo-vacuolar organelle. *Chemical Immunology and Allergy*, v. 85, p. 185-204, 2005.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer*, v. 32A, n. 14, p. 2413-2422, Dec 1996.
- GALLER, K. M.; HARTGERINK, J. D.; CAVENDER, A. C.; SCHMALZ, G.; D'SOUZA, R. N. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, v. 18, n. 1-2, p. 176-184, Jan 2012.
- GONCALVES, S. B.; DONG, Z.; BRAMANTE, C. M.; HOLLAND, G. R.; SMITH, A. J.; NOR, J. E. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 7, p. 811-814, Jul 2007.
- IWAGURO, H.; YAMAGUCHI, J.; KALKA, C.; MURASAWA, S.; MASUDA, H.; HAYASHI, S.; SILVER, M.; LI, T.; ISNER, J. M.; ASAHARA, T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, v. 105, n. 6, p. 732-738, Feb 12 2002.
- JABBARZADEH, E.; STARNES, T.; KHAN, Y. M.; JIANG, T.; WIRTEL, A. J.; DENG, M.; LV, Q.; NAIR, L. S.; DOTY, S. B.; LAURENCIN, C. T. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 32, p. 11099-11104, Aug 12 2008.
- MULLANE, E. M.; DONG, Z.; SEDGLEY, C. M.; HU, J. C.; BOTERO, T. M.; HOLLAND, G. R.; NOR, J. E. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 12, p. 1144-1148, Dec 2008.
- SCHELLER, E. L.; VILLA-DIAZ, L. G.; KREBSBACH, P. H. Gene therapy: implications for craniofacial regeneration. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 23, n. 1, p. 333-337, Jan 2012.