

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMATOSAS DA POLPA DENTÁRIA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA – MODELO EXPERIMENTAL OVINO

JM Campos^{a,b,c,*§}, AR Caseiro^{b,c,d*}, PO Pinto^{a,b,c}, C Mendonça^{c,b}, JD Santos^d, LM Atayde^{b,c}, T Pereira^{b,c}, AC Maurício^{b,c}

Introdução: Tratamentos inovadores em Medicina Veterinária e Medicina Humana recorrem cada vez mais ao emprego de terapias celulares à base de células mesenquimatosas (MSC - *mesenchymal stem cells*). O efeito terapêutico das MSCs não reside simplesmente na sua capacidade para substituir as células originais de tecidos danificados por meio de diferenciação, mas também, e talvez principalmente, na sua capacidade de produzir e secretar factores bioactivos para o ambiente envolvente, que actuam na modulação da resposta inflamatória local e sistémica, na re-vascularização da zona afectada e na re-organização geral do tecido. As MSCs têm a capacidade de migrar para locais específicos de lesão/regeneração, e contribuem ainda para a mobilização dos reservatórios celulares intrínsecos^{1,2}. As terapias celulares à base de MSC recorrem a populações bem caracterizadas, cuja eficácia e segurança são testados *in vivo* em modelos animais apropriados, antes de ensaios clínicos e na rotina clínica. Na especialidade particular de ortopedia há um número crescente de estudos translacionais que utilizam a ovelha como modelo animal *in vivo* devido às suas semelhanças com o Homem, no que diz respeito ao tamanho e ao sistema músculo-esquelético³.

No entanto, métodos sólidos e reprodutíveis para o isolamento, expansão, manipulação e caracterização de células mesenquimatosas extraídas a partir da polpa dentária de ovinos e humanos ainda não foram padronizados. No tecido da polpa dentária é possível isolar populações com elevado potencial de crescimento e capacidade de diferenciação, as quais foram designados DPSC (*dental pulp stem cells*)⁴. No presente estudo, as DPSC foram caracterizadas e expandidas para aplicação *in vivo* em ensaios pré-clínicos.

Materiais e Métodos: 1. Isolamento e caracterização *In vitro*: Em primeira instância, foram isoladas DPSCs de dentes de indivíduos humanos jovens adultos, por método de cultura de explantes. Estas populações foram expandidas, passadas e criopreservadas, e posteriormente caracterizadas. Numa segunda fase os procedimentos foram repetidos em dentes de ovinos adultos. As populações isoladas foram então caracterizadas. Estes estudos incluíram citometria de fluxo, análise imunocitoquímica (para a avaliação da identidade 'MSCs' das populações isoladas em termos de marcadores de superfícies celular¹), análise do cariótipo (para conferir a estabilidade cromossómica e ausência de potencial neoplásico antes da aplicação das terapias), perfil metabólico e análise do secretoma (para estudar a capacidade de produção de factores bioactivos)² durante a expansão e a diferenciação em pelo menos três linhas celulares: linhas osteogénicas, condrogénicas e adipogénicas, mediante a utilização de meios de diferenciação definidos e avaliadas com recurso a técnicas histológicas (Von Kossa, Azul de Alciano e Oil Red O, respectivamente); 2. Estudo *In vivo*: O potencial osteogénico das DPSC, foi associado a um substituto ósseo à base de hidroxiapatite modificada, e foi aplicado *in vivo* num modelo de lesão óssea monocortical em ovinos. Este procedimento consiste em executar 5 defeitos não críticos (5 mm Ø), na diáfise lateral do fémur³, os quais foram preenchidos com DPSCs de origem humana e biomaterial, incluindo controlos adequados (defeito sem preenchimento e apenas preenchido com o biomaterial). A regeneração óssea foi avaliada macro- e microscopicamente após 1, 2 e 3 meses de regeneração.

Resultados: Populações celulares com características condicentes com MSCs foram isoladas e manipuladas com sucesso a partir da polpa dentária de indivíduos adultos de ambas as espécies. A caracterização preliminar de células de origem ovina sugere resultados condicentes. O perfil de secreção de DPSCs revela a presença de variados e abundantes factores de crescimento e imunomoduladoras com conhecido impacto na regeneração tecidual geral e, particularmente, no tecido ósseo.

Os ensaios *in vivo* revelaram a ausência de efeitos adversos sistémicos e/ou locais à associação de células humanas neste modelo animal, reforçando o seu carácter imunoprivilegiado. Em termos de regeneração óssea, as observações macroscópicas revelaram o preenchimento completo de todos os defeitos, incluindo os controlos, com aparentes diferenças a nível da consistência do tecido de preenchimento. A confirmação microscópica revela indícios preliminares de uma superior deposição mineral nos defeitos tratados com biomaterial.

Conclusões: A combinação de biomateriais com sistemas celulares mesenquimatosos tem o potencial de impulsionar ainda mais os benefícios associados à aplicação isolada dos primeiros. Este estudo experimental destaca a importância da inclusão de uma equipa multidisciplinar no desenvolvimento de novos biomateriais e terapias celulares, permitindo que exista uma partilha de conhecimento entre a engenharia de biomateriais, o desenvolvimento de terapias celulares e as necessidades dos cirurgiões. O papel do médico veterinário é crucial, ao assegurar o bem-estar animal em conformidade com os *guidelines* internacionais e na translação destas terapias para a realidade clínica veterinária.

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8(4):315-317.

2. Caseiro AR, Pereira T, Bártoło PJ, Santos JD, Luís AL, Maurício AC (2015). Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems – Perspectives for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *Procedia Engineering - 4th International Conference on Tissue Engineering, ICTE2015*, doi: 10.1016/j.proeng.2015.07.014

3. Maurício, M. A., Lopes and J. D. Santos (2005). "Assessment of the potential of Bonelike® graft for bone regeneration by using an animal model." *Key Eng Mat* 17: 877-880.

4. Huang G.T. J., Gronthos S., Shi S. (2009). "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine". *J Dent Res* 88(9):792-806.

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMATOSAS DA POLPA DENTÁRIA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA – MODELO EXPERIMENTAL OVINO

JM Campos^{a,b,c,*§}, AR Caseiro^{b,c,d*}, PO Pinto^{a,b,c}, C Mendonça^{c,b}, JD Santos^d, LM Atayde^{b,c}, T Pereira^{b,c}, AC Maurício^{b,c}

^a Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

^b Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Porto, Portugal.

^c Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto (ICETA), Porto, Portugal.

^d CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Universidade do Porto (UP), Porto, Portugal.

* Both authors equally collaborated

† Corresponding author:

Dr. José Miguel Franco Esteves de Campos

Hospital Veterinário Universitário de Coimbra - Avenida José R. Sousa Fernandes, 19 Lordemão 3020-210 Coimbra (Portugal)

Mobile: +351 914 917 436; Email: miguelestevesdecampos@hotmail.com