

AValiação DA MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTAL HUMANA MEDIANTE A SUPLEMENTAÇÃO COM SORO HUMANO

RAFAELY FERREIRA SEVERO¹; CAMILA PERELLÓ FERRÚA²; FERNANDA NEDEL³; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas - rafaelysevero@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camila_perello@hotmail.com

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

⁴Universidade Federal de Pelotas- ffdemarco@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As células tronco (CT) não ficam dispersas nos tecidos onde se localizam, situam-se em locais específicos, no interior de nichos ou microambientes,. Os nichos são constituídos por diferentes tipos celulares, matriz extracelular e fatores solúveis, onde ocorrem interações moleculares complexas a fim de que a CT mantenha a capacidade de auto-renovação, continue em seu estado indiferenciado, ou ainda que se diferencie em uma determinada linhagem celular, de acordo com a necessidade do organismo (MACHADO, 2013). Haja vista o caráter decisivo dos nichos para a manutenção das CT, bem como o fato de que em adultos as CT estão presentes em pequenas quantidades, torna-se indubitavelmente relevante a tentativa de recriar os nichos *in vitro*, podendo, assim, gerar quantidade suficiente de células a fim de realizar estudos e proporcionar avanços práticos na área da saúde (CAPLAN, 2009).

Dessa forma, na tentativa de recriar *in vitro* o microambiente das CT, sabe-se que é deveras relevante a suplementação do meio de cultivo com soro. O soro fornece elementos importantes, como fatores de crescimento, vitaminas, fatores de fixação, fatores de transporte e nutrientes (FERRO, 2012). Um estudo de 2009 mostrou à comunidade científica que ao associar o Soro Fetal de Bezerro (SFC), insulina, transferina e selenito de sódio (ITS) ao meio de cultivo, aumenta-se consideravelmente a atividade proliferativa de células tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs) (SCHUKANEN, 2009). Entretanto, torna-se interessante o uso de soro de origem humana, pois o mesmo induz *in vitro* elevada taxa de proliferação celular e melhora a capacidade de diferenciação osteogênica das DPSCs (PISCIOTTA, 2012). O soro fetal bovino (SFB) desempenha uma importante função quando incorporado ao meio de cultivo. É conhecido por conter uma grande quantidade de fatores de crescimento e, assim, contribui para promover a fixação, expansão e diferenciação celular (PISCIOTTA, 2012). No entanto, acredita-se que o soro de origem animal pode acarretar infecções e reações imunológicas, assim uma nova vertente de pesquisadores têm procurado um substituto. A equipe de Ferro e colaboradores constatou que um meio de cultivo com baixa porcentagem de soro de origem humana é um substituto válido aos meios com alta concentração de SFB (FERRO, 2012). Nesse contexto, este estudo teve por objetivo analisar a morfologia e a capacidade de proliferação de células tronco oriundas da polpa de terceiro molares humanos após 24, 48 e 72 horas de contato com soro humano.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo Celular

CT oriundas da polpa de terceiros molares recém-extraídos, isoladas pela técnica de explante, foram obtidas através de trabalho prévio, com aprovação do

Comitê de Ética em Pesquisa sob o número de protocolo 16/2012, realizado no laboratório de cultivo celular da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas. As CTs foram mantidas em garrafas com meio de cultivo DMEM/Ham F12 com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Hyclone), 1% de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais (AINE) (Gibco). As garrafas de cultivo foram incubadas em estufa de CO₂, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂.

2.2 Ensaio de Proliferação Celular

A viabilidade celular das CTs foi determinada através de um ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), onde este composto solúvel é reduzido a cristais insolúveis de formazan (NEDEL 2012). O ensaio de proliferação celular foi realizado no momento em que as células encontravam-se na sexta passagem. Plaqueou-se 15 poços de uma placa de 96 poços, numa densidade celular de 2×10^4 células por poço. Depois de 24 horas, quando as células já estavam aderidas a parede de fundo da placa, o meio de cultivo foi substituído por 200 μ L de meio com diferentes suplementações de soro. Os meios eram suplementados da seguinte forma: 15% de SFB, concentração e tipo de suplemento padrão utilizado no cultivo das DPSCs correspondendo, portanto, ao grupo controle; 15% de Soro Humano (SH); 7,5% de SFB e 7,5% de SH. Os três grupos testes foram suplementados com 1% de antibióticos e 1% de AINE. O contato do meio com as células se deu em quintuplicata. Após 24, 48 e 72 horas de contato entre as células e o meio com diferentes suplementações de soro, foram adicionados aos 200 μ L de meio de cultivo preexistentes 20 μ L de MTT (5 mg de MTT/mL de meio de cultivo) por poço, o qual foi mantido em contato com as células por 4 h. Em seguida, desprezou-se o líquido contido nos poços, adicionou-se 200 μ L de DMSO e colocou-se as placas em um *shaker* por 5 min a 150 rpm. Realizou-se então a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em um comprimento de onda de 450 nm.

2.3 Análise dos Dados

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células tronco isoladas da polpa de terceiro molar (DPSCs), apresentam características inerentes as CTs, como capacidade de auto-renovação, diferenciação e proliferação (GRONTHOS, 2000). Em relação à morfologia, as DPSCs apresentam aspecto semelhante à de fibroblastos, com característica fusiforme e citoplasmas afilados (PELEGRINO, 2009). Nossos resultados corroboram com os achados na literatura, onde as DPSC em contato com os grupos suplementados com 15% de Soro Humano (SH); 7,5% de SFB e 7,5% de SH mostraram-se morfologicamente semelhantes ao grupo controle (15% de SFB) (Fig.1). A morfologia das DPSCs também foi mantida no decorrer do período de exposição aos grupos teste e controle (24-72h) (Fig.1).

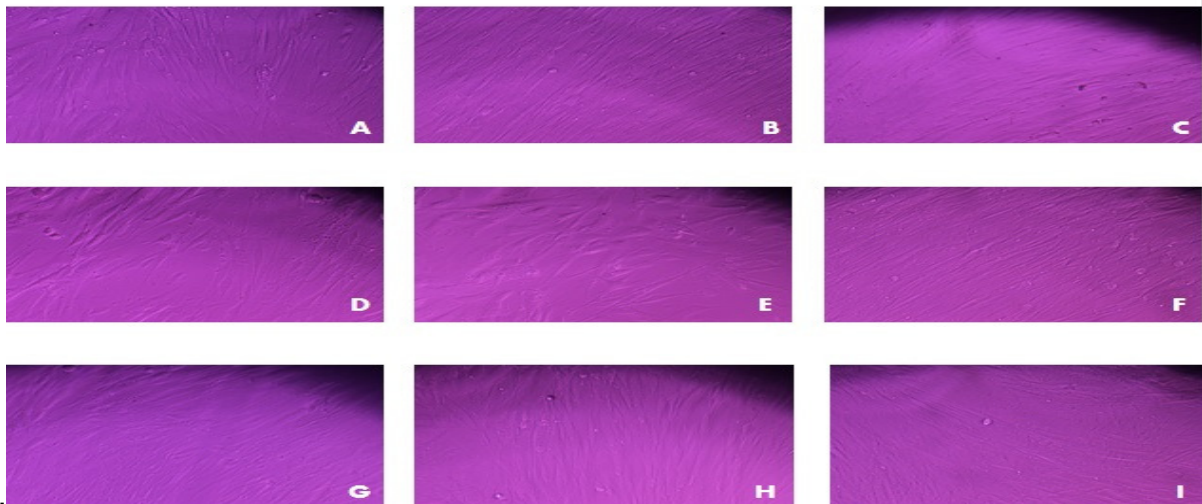
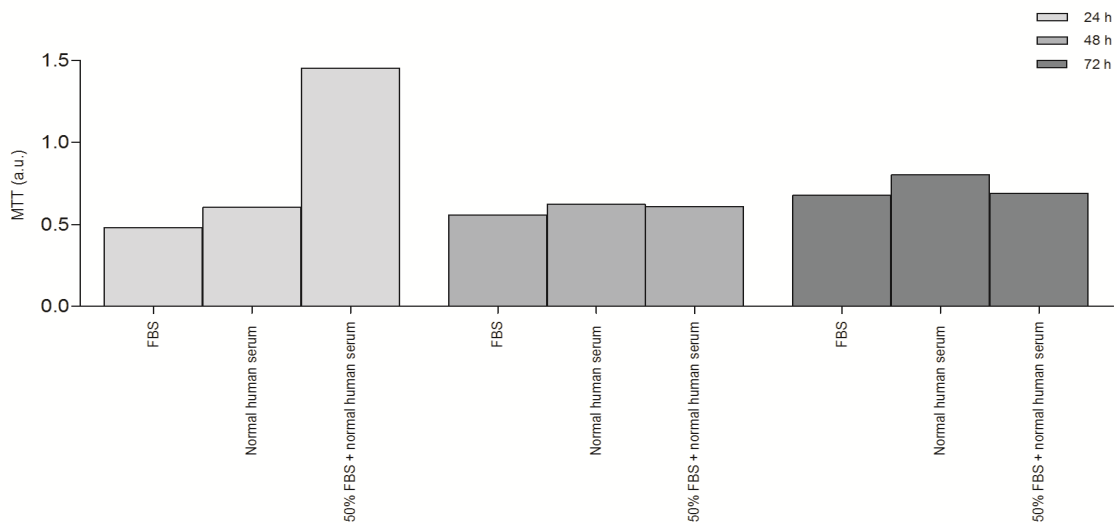


Figura 1. Análise e acompanhamento microscópico de DPSCs na passagem 6, após 24, 48 e 72 horas em contato com 15% de SFB, 15% de Soro Humano (SH) e 7,5% de SFB e 7,5% de SH, A - SFB, 24h; B - SFB, 48h; C – SFB, 72h; D – SH, 24h; E – SH, 48h; F – SH, 72h; G – SFB + SH, 24h; H - SFB + SH, 48h; I - SFB +SH, 72h.

Quando analisada a capacidade proliferativa (Fig.2) das células em contato com meio de cultivo suplementado com SFB, percebe-se discreto aumento na taxa de proliferação no período de 24h em relação as 48 e 72h . Observando, as células em contato com o SH, percebe-se uma tendência de maior proliferação com o passar do tempo, sugerindo que a utilização de SH pode induzir um maior potencial proliferativo nas DPSCs. Com base no contato das DPSCs no período de 24 horas, as células suplementadas com SH associado ao SFB apresentaram uma tendência proliferativa maior se comparado com o meio suplementado com SH e SFB isoladamente no período de 24 h, e com o SH associado ao SFB exposto a 48 e 72h. Sugerindo que a associação do soro de origem humana ao de origem animal, pode estimular a proliferação celular em curto prazo, mas pode não ser tolerável pelas DPSCs após longo tempo de contato. Após 72 horas, observa-se um discreto aumento proliferativo quando as células estiveram em contato com o meio acrescido de SH. Analisando a capacidade proliferativa das células em contato com meio suplementado com SFB e SH, constata-se uma tendência de aumento na taxa proliferativa ao passo que aumenta o tempo de contato das células com o referido meio.

Assim, é possível traçar comparações entre os resultados desse estudo com os encontrados por Ferro e colaboradores (FERRO, 2012). A respeito da morfologia celular nosso estudo constatou que não houve diferença morfológica nas DPSCs, sob quaisquer condições de tempo e de suplementação de soro, ao passo que o estudo de Ferro et al, 2012 observou que as células cultivadas apenas com SH eram mais homogêneas morfológicamente (FERRO, 2012). Além disso, em ambos os estudos houve maior proliferação das células que se encontravam em contato com o meio e SH, ainda que em nossos resultados esse aumento proliferativo tenha ocorrido de modo discreto em 48 horas e mais acentuado após 72 horas de contato.

Figura 2. Gráfico relativo ao ensaio de proliferação celular de DPSCs, na passagem seis, após contato com 15% de SFB, 15% de Soro Humano (SH) e 7,5% de SFB e 7,5% de SH por 24, 48 e 72 horas.



4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, quando em contato com SH, as DPSCs mantiveram a capacidade proliferativa e a morfologia símile às DPSCs que estiveram em contato com SFB. Sendo possível cogitar a utilização de SH como provável substituto ao soro animal em futuras pesquisas laboratoriais e aplicações clínicas com DPSCs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, Cleveland, v.217, n.2, p.318-24, 2009.
- FERRO, F.; SPELAT, R.; BELTRAMI, A.P; CESSSELLI, D.; CURCIO, F. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Derived Stem Cells by Using Media Containing Low Human Serum Percentage as Clinical Grade Substitutes for Bovine Serum. **PLoS One**, Udine, v.7, n.11, 2012.
- GRONTHOS, S; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.97, n.25, p. 13625-13630, 2000.
- MACHADO, C.V.; NASCIMENTO, I.L.O.; TELLES, T.D.S. Stem cells and their niches: importance in tissue engineering applied to dentistry. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.61, n.2, p. 263-268, 2013.
- PELEGRINO, K.O **Caracterização e diferenciação neural in vitro de células-tronco de polpa de dente decíduo humano**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- PISCIOTTA, A.; RICCIO, M.; CARNEVALE, G.; BERETTI, F.; GIBELLINI, L.; MARALDI, T.; CAVALLINI, G.M.; FERRARI, A.; BRUZZESI, G.; DE POL, A. Human Serum Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo. **PLoS One**, Modena, v. 7, n. 11, 2012.
- SUCHANEK, J.; SOUKUP, T.; VISEK, B.; IVANCAKOVA, R.; KUCEROVA, L.; MOKRY, J. Dental pulp stem cells and their characterization. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v.153, n.1, p.31-5, 2009.