

ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO DO TECIDO PULPAR DE DENTES PERMANENTES

CAMILA PERELLÓ FERRÚA¹; SANDRA BEATRIZ CHAVES TARQUÍNIO²;
FLÁVIO FERNANDO DEMARCO²; FERNANDA NEDEL³

¹ Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – camila_perello@hotmail.com

² Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – sbtarquinio@gmail.com

² Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com

³ Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – fernanda.nedel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as células tronco têm sido utilizadas nos estudos envolvendo terapia celular, engenharia tecidual e biologia molecular (NEDEL, 2009). As células tronco têm sido obtidas de diferentes fontes tais como: medula óssea, pele, tecido nervoso, retina, pâncreas e intestino (HARADA, et al. 1999). Apesar das inúmeras fontes, as células tronco da polpa dental humana mostram-se vantajosas quando comparadas as células tronco de outras fontes, pois possuem um método de isolamento não invasivo, são facilmente obtidas, haja vista a perda por motivos ortodônticos, periodontais e cárie (CHEN, et al. 2012) e além disso, as células são de rápida expansão *in vitro* (DE MENDONÇA COSTA, 2008).

As DPSCs tem mostrado a capacidade de prover a regeneração do complexo dentino pulpar. Ainda, devido ao seu alto potencial osteogênico, as DPSCs vêm sendo vislumbradas na utilização clínica, no intuito de neoformar tecido ósseo ao redor de implantes dentários (ITO et al., 2011), tratar reabsorções ósseas (D'AQUINO et al., 2009), e ressecções decorrentes de cirurgias para remoção de tumores (YELICK e VACANTI, 2006). Além da capacidade de diferenciação em tecido ósseo as DPSCs podem diferenciar-se em tecido muscular, adipogênico (MIKAMI et al., 2011), neuronal, condrogênico, bem como em células vasculares endoteliais (KARAOZ et al., 2011).

Dada à relevância clínica do desenvolvimento de pesquisas abordando células tronco em engenharia tecidual e áreas afins, associada à necessidade dessas células para o enriquecimento dos estudos de engenharia tecidual na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, este trabalho objetivou estabelecer a metodologia de isolamento das células tronco de origem pulpar, na nossa Instituição, para posterior utilização em experimentações.

2. METODOLOGIA

Isolamento Celular

O referido trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel). Foram coletados 17 terceiros molares, recém-extraídos. Os dentes foram armazenados em falcons com 15 mL de meio de eagle modificado por Dulbecco acrescido de antibiótico (DMEM; Cultilab), com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco) e mantidos em baixa temperatura para serem transportados ao laboratório.

No laboratório, foi realizada uma linha de fratura nos dentes extraídos com auxílio de um cinzel. A polpa foi removida da câmara pulpar com curetas de dentina e fragmentada em explantes, os quais foram assentados em placas de 6 poços, acrescido de meio DMEM/Ham F 12 com 15% de SFB (Hyclone), 1% de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco). As placas foram

incubadas em estufa, por 14 dias, sob temperatura de 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Após duas semanas, as placas foram analisadas em microscópio invertido. Quando as células atingiram 80% de confluência as células foram repicadas utilizando-se uma solução 0,25% Tripsina-EDTA (Cultilab).

Ensaio de Proliferação Celular

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) no momento em que células encontravam-se em P3, P4, P6 e P7 (BERNARDI, et al. 2011). As células foram plaqueadas em uma densidade de 2500 células/cm² e 1000 células/cm², perfazendo 5 repetições por densidade. Após 1, 3, 5 e 7 dias de cultivo, foram adicionados ao meio de cultivo 20 uL de MTT (5 mg de MTT/mL de meio de cultivo) por poço e incubado por 4h. Desprezou-se o líquido contido nos poços, adicionou-se 200 uL de DMSO e colocou-se as placas em um *shaker* por 5 min a 150 rpm. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em um comprimento de onda de 450 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, a obtenção de células tronco deu-se através do isolamento celular a partir do tecido pulpar dental de 3° molares recém extraídos. A escolha desse tipo celular deu-se em função dos 3° molares serem os últimos dentes a se desenvolverem plenamente, o que atribui maior taxa de proliferação celular quando comparado com dentes desenvolvidos em períodos anteriores (GRONTHOS, et al. 2000).

O explante foi o tipo de metodologia utilizada para dissociação das células tronco da matriz extracelular e dos outros tipos celulares. Acredita-se que os cortes na polpa atuam como se o tecido estivesse passando por um momento de agressão, respondendo à injúria, assim levando a migração contínua e seletiva das células do interior do explante para a placa de Petri, proporcionando células com maior grau de pureza (LIZIER, et al. 2012). O cultivo celular foi realizado com meio DMEM/ Ham F12, baseando-se num estudo de KERKIS et al. (2006), onde mais de 80% das células tronco da polpa dental de decíduos obtidas, responderam positivamente à coloração dos anticorpos para os marcadores de células pluripotentes (células tronco embrionárias), Oct-4 e Nanog.

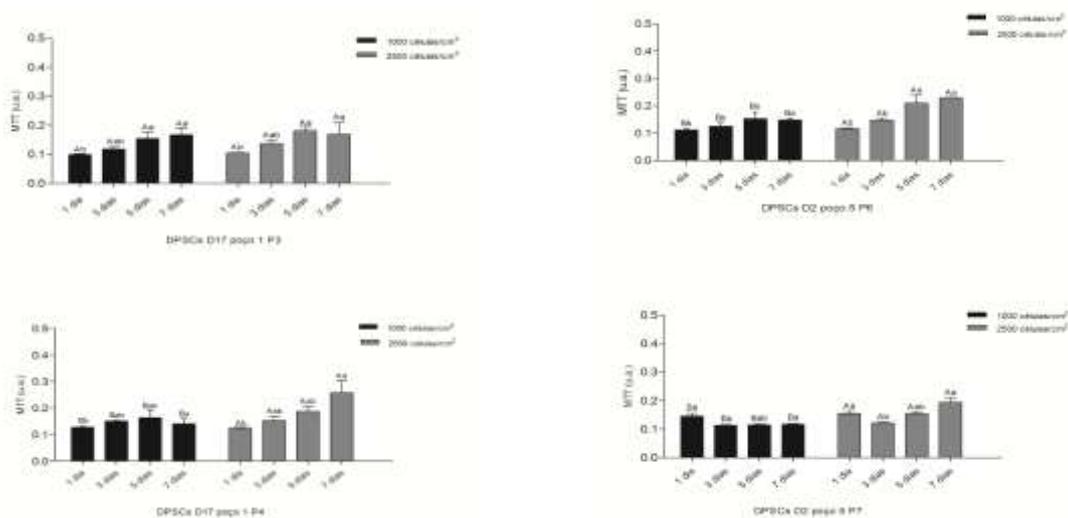
Sob essas condições, após 14 dias desde o procedimento de assentamento do explante na placa, foi possível observar a migração celular proveniente do explante (FIG 1.), onde as células mantinham morfologia fusiforme com citoplasmas afilados, caracterizando, possivelmente, um estado de alta atividade celular. No acompanhamento microscópico dos dias seguintes, observou-se que a confluência celular aumentava progressivamente, até atingir cerca de 80% e ser necessária utilização de tripsina/EDTA, para fazer o repique celular.

Figura 1: Análise microscópica da migração celular a partir de explante



O ensaio de proliferação celular possibilitou avaliar a viabilidade das DPSCs isoladas (FIG. 2). E os resultados reinteram o que Bernardi e sua equipe publicaram em 2011, onde constatam que, em geral, as culturas semeadas em densidade de 2500 células/cm² apresentam valores de absorbância substancialmente maior que as culturas semeadas com 1000 células/cm². Assim como, com o aumento do tempo de cultivo há uma tendência em aumentar os valores de absorbância obtidos (BERNARDI, et al. 2011).

FIGURA 2: Análise gráfica da proliferação celular



4. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que em torno de 14 dias após a aplicação da técnica do explante, houve a migração de células do mesmo, com a morfologia e a proliferação celular adequada. No entanto, faz-se ainda necessária a sua caracterização, no intuito de confirmar sua capacidade tronco.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDI, L.; LUISI, S. B.; FERNANDES, R.; DALBERTO, T. P.; VALENTIM, L.; BOGO CHIES, J. A.; MEDEIROS FOSSATI, A. C.; PRANKE, P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **J Endod**, v.37, n.7, p.973-9, 2011.

- CHANG, J.; ZHANG, C.; TANI-ISHII, N.; SHI, S. ; WANG, C. Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. **J Dent Res**, v.84, n.11, p.994-8, 2005.
- CHEN, B.; SUN, H.-H.; WANG, H.-G.; KONG, H.; CHEN, F.-M.; YU, Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. **Biomaterials**. v. 33, p. 5023 - 5035, 2012.
- DE MENDONCA COSTA, A.; BUENO, D. F.; MARTINS, M. T.; KERKIS, I.; KERKIS, A.; FANGANIELLO, R. D.; CERRUTI, H.; ALONSO, N. ; PASSOS-BUENO, M. R. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v.19, n.1, p.204-10, 2008.
- D'AQUINO, R.; DE ROSA, A.; LANZA, V.; TIRINO, V.; LAINO, L.; GRAZIANO, A.; DESIDERIO, V.; LAINO, G.; PAPACCIO, G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. **Eur Cell Mater**, v.18, p.75-83, 2009.
- 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 U S A**, v.97, n.25, p.13625-30, 2000.
- HARADA, H.; KETTUNEN, P.; JUNG, H. S.; MUSTONEN, T.; WANG, Y. A. ; THESLEFF, I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. **J Cell Biol**, v.147, n.1, p.105-20, 1999.
- ITO, K.; YAMADA, Y.; NAKAMURA, S. ; UEDA, M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.26, n.5, p.947-54, 2011.
- KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I. ; CERRUTI, H. F. 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, n.3-4, p.105-16, 2006.
- KARAOZ, E.; DEMIRCAN, P. C.; SAGLAM, O.; AKSOY, A.; KAYMAZ, F. ; DURUKSU, G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Histochem Cell Biol**, v.136, n.4, p.455-73, 2011.
- LIZIER, N. F.; KERKIS, A.; GOMES, C. M.; HEBLING, J.; OLIVEIRA, C. F.; CAPLAN, A. I. ; KERKIS, I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PLoS One**, v.7, n.6, p.e39885, 2012.
- MIKAMI, Y.; ISHII, Y.; WATANABE, N.; SHIRAKAWA, T.; SUZUKI, S.; IRIE, S.; ISOKAWA, K. ; HONDA, M. J. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. **Stem Cells Dev**, v.20, n.5, p.901-13, 2011.
- NEDEL, F.; ANDRE DDE, A.; DE OLIVEIRA, I. O.; CORDEIRO, M. M.; CASAGRANDE, L.; TARQUINIO, S. B.; NOR, J. E. ; DEMARCO, F. F. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v.10, n.4, p.90-6, 2009.
- YELICK, P. C. ; VACANTI, J. P. Bioengineered teeth from tooth bud cells. **Dent Clin North Am**, v.50, n.2, p.191-203, viii, 2006.