

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

COMPORTAMENTO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS
EXPOSTAS AO TGF β 1 E AO aFGF EM CULTURA

Simone Bonato Luisi

TESE APRESENTADA COMO PARTE DOS REQUISITOS
OBRIGATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM PATOLOGIA BUCAL

Prof. João Jorge Diniz Barbachan
Orientador

Prof. José Artur Bogo Chies
Co-Orientador

Porto Alegre (RS), julho de 2006.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

L953c Luisi, Simone Bonato
 Comportamento de células pulpares humanas expostas ao TGFβ1
 e ao aFGF em cultura / Simone Bonato Luisi. – 2006.
 69 f. : il.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
 Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia –
 Patologia Bucal, Porto Alegre, 2006.
 Orientador: Dr. João Jorge Diniz Barbachan.
 Co-Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

 1. Cultura de células 2. Fator de crescimento transformador beta
 3. Diferenciação celular 4. Odontoblastos 5. Fator de crescimento de
 fibroblastos 6. Morfologia 7. Fosfatase alcalina 8. Osteocalcina
 9. Sialoproteína óssea (BSP) 10. Sialofosfoproteína de dentina (DSPP)
 I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia
 II. Título.

CDU 616.31

DEDICATÓRIA

*À minha família, em especial ao meu esposo Paulo,
ao nosso filho Guilherme
e aos meus pais Milton e Valquíria*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelo livre arbítrio e pela benção que é o Guilherme.

Ao Paulo Elias da Silva Filho, meu esposo, pela sua paciência, carinho, incentivo e dedicação incondicional.

Ao professor João Jorge Diniz Barbachan por confiar a mim a ilustre tarefa de ser sua orientada, pelo seu precioso tempo e atenção sendo um exemplo de dedicação à causa do ensino e pesquisa.

Ao professor José Artur Bogo Chies, co-orientador, pelos seus conhecimentos científicos, experiência, paciência, dedicação irrestrita e pela sua colaboração imprescindível e inestimável.

Ao professor Manoel Sant'Ana, idealizador do projeto, pelo grande incentivo e pelo apoio incondicional.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde completo onze anos de aprendizado e agradável convivência (graduação, extensão, mestrado e doutorado) na pessoa de seu diretor Rui Vicente Oppermann e ao seu vice-diretor Pantelis Varvaki Rados.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFRGS em especial aos seus coordenadores Manoel Sant'Ana Filho e Pantelis Varvaki Rados pelo ambiente fraterno e científico e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunogenética da UFRGS em especial ao professor José Artur Bogo Chies, à professora Nance Beyer Nardi e aos colegas Pedro César Chagastelles, Andrés Delgado Cañedo, Lindolfo da Silva Meirelles e Flávia Helena da Silva pela fraterna acolhida, pelo ambiente científico e de amizade e pelo incomensurável apoio na realização da parte experimental deste trabalho, bem como à funcionária Dilma Mattos Guimarães por sua inestimável colaboração.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde com muito orgulho e satisfação, desenvolvo atividade docente, em especial ao diretor da Faculdade de Odontologia Marcos Túlio Mazzini Carvalho e à vice-diretora Angélica Maria Genehr Fritscher pelo incentivo e apoio.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, em especial ao Dr. Raphael Onorino Carlos Loro (in memorian) e ao professor João Miguel Messina da Cruz pelo apoio e incentivo para a realização deste sonho.

À Dra Edela Puricelli pelo apoio, incentivo e carinho recebidos durante a escolha do modelo experimental.

Aos professores Pantelis Varvaki Rados, Maria Cristina Munerato e Anna Cecília Moraes Chaves pelas sugestões e colaborações realizadas na defesa do projeto.

À Isabel da Silva Lauxen pelo carinho, constante incentivo e sobretudo pela amizade.

Aos colegas da disciplina de Cirurgia V da FOPUCRS, professores Claiton Heitz e Roberto Fernandes de Carvalho e Silva e funcionárias Maria Luiza Braga Kurowski e Carla Maria de Medina Coeli de Souza pelo apoio irrestrito para o desenvolvimento deste projeto.

Aos Professores da Cirurgia da FOUFRGS João Batista Burzloff e Deise Ponzoni pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

À Dra Denise Cantarelli Machado por ter contribuído com sua experiência em cultura de células.

À professora Anna Christina Medeiros Fossatti pelo auxílio, incentivo e pela sua participação na minha prova de qualificação do doutorado.

Aos colegas de doutorado Berenice Barbachan e Silva, Márcia Gaiger de Oliveira, Marilene Issa Fernandez e João Batista Burzloff pelo companheirismo, apoio mútuo e amizade construídos durante o curso.

*Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFRGS
Adriana Féres de Aguiar e Leandro Cardoso da Silva Nunes pela atenção e colaboração.*

À Jane Edy Capelão da Silva, minha sogra, pelo auxílio com a língua inglesa.

*Aos colegas Angélica Maria Genehr Fritscher, Alexandre Correa Ghisi, Andréa
Cabral de Mello Vanzin, Ivori Dutra da Silveira, Márcio Luis Fonseca Menin, Maristela
Gutiérrez de Borba, Maria Cecília Gomes Beltrão, Patrícia Kooper Poli, Sandra Delgado
Pagnoncelli, Simone Marafon Pagnoncelli, pelo apoio e sobretudo pela amizade.*

À Liliane Inês Massoni Sachet pelo material bibliográfico e constante incentivo.

*À bibliotecária Eloisa Futuro Pfitscher da Faculdade de Odontologia da UFRGS,
pelas colaborações prestadas.*

*E a todos que, de uma forma ou de outra, auxiliaram na concretização deste
trabalho, meu sincero agradecimento.*

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar o comportamento de células pulpares humanas expostas ao TGF β 1 e ao aFGF, em cultura, nas seguintes concentrações: TGF β 1 a 1ng/mL, TGF β 1 a 5ng/mL, TGF β 1 a 1ng/mL + aFGF a 5ng/mL, TGF β 1 a 5ng/mL + aFGF a 5ng/mL e aFGF a 5ng/mL. Foi avaliada a morfologia celular, a atividade da fosfatase alcalina, através de ensaio com pNPP como substrato e a expressão das proteínas osteocalcina, sialoproteína óssea e sialofosfoproteína de dentina, através de RT-PCR. Após quatro dias, verificou-se que a média do número de nucléolos no grupo tratado com TGF β 1 a 1ng/mL foi significativamente maior que no grupo tratado com aFGF a 5ng/mL. A média da atividade da fosfatase alcalina no grupo tratado com TGF β 1 a 1ng/mL foi significativamente maior que no grupo tratado com TGF β 1 a 5ng/mL + aFGF a 5ng/mL. Foi observada a expressão de osteocalcina em todas as células pulpares humanas que proliferaram em cultura. Entretanto, no grupo em que foi utilizado o aFGF a 5ng/mL houve diminuição da expressão da osteocalcina. A exposição dos fatores não induziu a expressão de componentes da matriz de dentina tais como BSP e DSPP. Sugere-se que as células expostas ao TGF β 1 1ng/mL foram estimuladas, apresentando uma maior atividade celular e as células expostas ao aFGF 5ng/mL foram inibidas, apresentando uma menor atividade celular.

PALAVRAS CHAVE: Cultura de células, fator de crescimento transformador beta, fator de crescimento de fibroblastos, diferenciação celular, odontoblastos, morfologia, fosfatase alcalina, osteocalcina, sialoproteína óssea (BSP), sialofosfoproteína de dentina (DSPP).

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the behavior of human dental pulp cells exposed to TGF β 1 and aFGF in culture, at the following concentrations: TGF β 1 1ng/mL, TGF β 1 5ng/mL, TGF β 1 1ng/mL + aFGF 5ng/mL, TGF β 1 5ng/mL + aFGF 5ng/mL e aFGF 5ng/mL. We assessed the cellular morphology, alkaline phosphatase activity, using pNPP as substrate, and expression of osteocalcin, bone sialoprotein, dentin sialophosphoprotein proteins by RT-PCR. After four days, the nucleolus media in the group treated with TGF β 1 1ng/mL was significantly higher than the group treated with aFGF 5ng/mL. The alkaline phosphatase activity in the TGF β 1 1ng/mL treated group was significantly higher than the media observed in TGF β 1 5ng/mL + aFGF 5ng/m treated group. Osteocalcin expression was observed in all human dental pulp cell cultures. However, in the aFGF 5ng/mL treated group the osteocalcin expression decreased. The exposure to growth factors did not induced the expression of dentin matrix components such as BSP or DSPP. Our data suggest that the cells exposed to TGF β 1 1ng/mL were stimulated and had a higher cell activity, and that cells exposed to aFGF 5ng/mL were inhibited having a cell activity decrease.

KEY WORDS: cell culture, dental pulp, transforming growth factor beta, fibroblast growth factor, cell differentiation, odontoblasts, morphology, alkaline phosphatase, osteocalcin, bone sialoprotein (BSP), dentin sialophosphoprotein (DSPP).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
INTRODUÇÃO	1
1º ARTIGO – “A CULTURA DE CÉLULAS COMO FERRAMENTA PARA ESTUDOS DO COMPORTAMENTO PULPAR”	3
RESUMO	4
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	22
2º ARTIGO – “USO DE ANFOTERICINA B COMO ANTIFÚNGICO NO MEIO DE CULTURA PARA CÉLULAS PULPARES HUMANAS”	25
RESUMO	26
SUMMARY	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODO	30
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
3º ARTIGO – “COMPORTAMENTO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS EXPOSTAS AO TGFβ1 E AO aFGF EM CULTURA”	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aFGF	fator ácido de crescimento para fibroblastos
β -actina	beta actina
bFGF	fator básico de crescimento para fibroblastos
β -GP	beta glicerofosfato
BGJb	meio de Biggers, Gwatkin e Judah modificado por Fitton-Jackson
BME	meio basal de Eagle
BMP2	proteína morfogênica óssea 2
BSP	sialoproteína óssea
°C	graus centígrados
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	dióxido de carbono
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilfacial
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMP-1	proteína da matriz de dentina 1
DNA.	ácido desoxirribonucleico
DPSC	células tronco humanas da polpa dental
DSPP	sialofosfoproteína de dentina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
Fem	feminino
FGF1	fator ácido de crescimento para fibroblastos
FIG	figura
FGF2	fator básico de crescimento para fibroblastos
g	força que exerce a gravidade
HEPES	N-2 Hidroxietil piperazine – N'-2 ácido sulfônico etano
HBSS	solução de sais de Hank's balanceadas
K ⁺	ion potássio
KCl,	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio
L929	linhagem contínua de fibroblastos originada do tecido conjuntivo do pulmão de camundongos
Mas	masculino
M	molar
<	menor
>	maior
MEM	meio essencial mínimo de Eagle
mg/L	miligrama por litro
mL	mililitro
mM	milimolar
mm ³	milímetro cúbico
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>

mmol/L	mmol por litro
MMP-8	metaloproteinase da matriz 8
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
-	negativo
N	normal
n°	número
NaCl,	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio mono-básico
ng	nanograma
NaOH	hidróxido de sódio
+	positivo
pNPP	p-nitrofenil-fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
OPTI-MEM I	meio MEM contendo tampão HEPES
P31	linhagem de células humanas de mesotelioma pulmonar
PBS	tampão fosfato salina
Ph	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
RPC-C2A	células clonais da polpa de incisivos de ratos
RPMI	meio de cultura de células do tipo RPMI
RPMI 1640	meio de cultura de células do tipo RPMI com glutamine e bicarbonato de sódio
RT-PCR	reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
%	por cento
TGFβ1	fator de crescimento transformador beta 1
UI	unidades internacionais
UV	ultravioleta
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

2º ARTIGO – “USO DE ANFOTERICINA B COMO ANTIFÚNGICO NO MEIO DE CULTURA PARA CÉLULAS PULPARES HUMANAS”

Figura 1 - Células cultivadas no meio A. (A) Formação inicial de núcleos de crescimento. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (B) Distribuição celular após os repiques. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (C) Células confluentes e formação de um grande tapete celular. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (D) Células afiladas e estreladas, com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 200X.

LISTA DE TABELAS

1º ARTIGO – “A CULTURA DE CÉLULAS COMO FERRAMENTA PARA ESTUDOS DO COMPORTAMENTO PULPAR”

Tabela 1	Metodologias empregadas para o estabelecimento de culturas de células da polpa dental e algumas aplicações experimentais desses sistemas.	19
----------	---	----

2º ARTIGO – “USO DE ANFOTERICINA B COMO ANTIFÚNGICO NO MEIO DE CULTURA PARA CÉLULAS PULPARES HUMANAS”

Tabela 1	Ordenação dos pacientes e dos resultados obtidos.	41
----------	---	----

3º ARTIGO – “COMPORTAMENTO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS EXPOSTAS AO TGFβ1 E AO aFGF EM CULTURA”

Tabela 1	Média das áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo e do número de nucléolos, no tempo zero, de quatro imagens aleatórias.	54
Tabela 2	Média das áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo e média do número de nucléolos, após quatro dias de aplicação dos fatores de crescimento, nos seis grupos.	55
Tabela 3	Média de absorvância para avaliação da atividade da fosfatase alcalina, nos seis grupos.	56

INTRODUÇÃO

Durante a dentinogênese primária existem moléculas (fatores de crescimento e diferenciação) que sinalizam a cascata de eventos que resulta na diferenciação dos odontoblastos. A possibilidade do uso destas moléculas em tratamentos conservadores da polpa dentária tem motivado inúmeras pesquisas.

A expressão de TGF β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) foi observada no processo de desenvolvimento dentário (D'SOUZA et al. 1990), em odontoblastos maduros (JEPSEN et al. 1992) e na dentina humana (JEPSEN et al. 1992 e CASSIDY et al. 1997) indicando um provável papel desse fator na indução da formação da dentina tubular.

No entanto, existem controvérsias a respeito do papel do TGF β 1 em relação a células da polpa dental. Segundo Nie et al. (2006) o TGF β 1 estimula a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina em células humanas da polpa dental, em cultura. Por outro lado, segundo Chan et al. (2005) o TGF β 1 inibe o crescimento de células humanas da polpa dental em cultura e, também, segundo Nakashima et al. (1994) este fator é capaz de inibir a regeneração pulpar quando aplicado em polpas amputadas de cães.

Além disso, foi demonstrado, por Unda et al. (2000), em cultura de células da papila dental de molares inferiores de camundongos, que há um efeito sinérgico entre o TGF β 1 e o aFGF (fator ácido de crescimento para fibroblastos). A associação destes dois fatores promove a diferenciação de células semelhantes a odontoblastos, com características histológicas e funcionais, com vesícula de secreção de matriz, formação mineral, positiva atividade da fosfatase alcalina e produção de colágeno tipo I.

No presente trabalho, com o objetivo de investigar o comportamento de células pulpares expostas ao TGF β 1 e ao aFGF optou-se pelo modelo experimental em cultura de

células. A cultura de células constitui excelente instrumento para investigações do comportamento celular sob inúmeros aspectos. Existem diversos modelos experimentais de cultura do complexo dentino-pulpar que contemplam estudos com os mais diferentes propósitos. Com vistas ao desenvolvimento de um modelo experimental de cultura que possibilitasse a avaliação do comportamento celular frente à exposição de fatores de crescimento, foi realizada uma revisão na literatura sobre técnicas de cultivo que são empregadas em estudos do comportamento pulpar.

O modelo de cultura de células pulpares humanas de terceiros molares recém extraídos é uma ferramenta que permite, entre outros, a realização de pesquisas que visam à aplicação de materiais biológicos para regeneração do complexo dentino-pulpar.

Para o desenvolvimento de um protocolo de cultura de células pulpares humanas, adotou-se como referência a metodologia empregada no estudo de Shirakawa et al. (1994). Foram feitas algumas adaptações à técnica e inclusive um experimento foi realizado com objetivo de avaliar o comportamento das células pulpares humanas na presença e na ausência de um antifúngico (anfotericina B).

A partir do estabelecimento de células pulpares humanas em cultura, estas foram expostas ao TGF β 1 e ao aFGF. O comportamento das células pulpares expostas aos fatores de crescimento foi avaliado através de observações da morfologia celular com mensuração do número de nucléolos e das áreas de citoplasma, núcleo e nucléolos. Também foram avaliadas a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de proteínas da matriz de dentina tais como DSPP (sialofosfoproteína de dentina), osteocalcina e BSP (sialoproteína óssea).

A CULTURA DE CÉLULAS COMO FERRAMENTA PARA ESTUDOS DO
COMPORTAMENTO PULPAR

CELL CULTURE AS A TOOL FOR DENTAL PULP BEHAVIOR STUDIES

SIMONE BONATO LUISI*¹
JOÃO JORGE DINIZ BARBACHAN**
JOSÉ ARTUR BOGO CHIES***
MANOEL SANT'ANA FILHO****

Artigo publicado na Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre, v. 45, no 1, p.3-8, jul. 2004. Este se encontra formatado segundo as normas de publicação da revista.

* Mestre em Odontologia/ UFRGS. Doutoranda em Patologia Bucal pelo Programa de Pós-Graduação da UFRGS. Professora das Disciplinas de Endodontia da PUCRS.

** Professor titular da Disciplina de Patologia Bucal da UFRGS.

***PhD em Ciências da Vida/ Imunologia – Université de Paris VI. MSc em Genética e Biologia Molecular – UFRGS

****Doutor Estomatologia/PUCRS. Professor de Patologia Bucal da UFRGS e PUCRS. Coordenador do curso de especialização em CTBMF da PUCRS.

Endereço para correspondência:

Profa. Simone Bonato Luisi

Faculdade de Odontologia da PUC-RS

Av. Ipiranga, nº 6681 – Prédio 6 CEP 90619 900

Porto Alegre, RS, Brasil e-mail: simoneluisi@terra.com.br

RESUMO

A cultura de células constitui um instrumento altamente valioso para investigações do funcionamento celular sob inúmeros aspectos. Existem diversos sistemas orgânicos de cultura do complexo dentino-pulpar, seja a partir de modelos animais ou humanos. Esses sistemas possibilitam o desenvolvimento de estudos *in vitro* sobre diferenciação celular, dentinogênese primária e terciária, calcificação pulpar, componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento, etc que podem ser extrapolados e aplicados à dentinogênese *in vivo*. Esse artigo tem como objetivo realizar uma revisão na literatura sobre as técnicas de cultivo que são empregadas para o estudo do comportamento pulpar.

PALAVRAS CHAVE: Polpa dentária, cultura de células, odontogênese.

ABSTRACT

The cell culture is a valuable tool for the investigation of the cell functioning. There are many organic systems for the culture of the dentine-pulp complex, using human or animal models. These systems are useful for studies *in vitro* over cell differentiation, primary and reparative dentin formation, calcification of pulp tissues, extra cellular matrix components, growth factors, etc that may be extended and used to dentinogenesis *in vivo*. This article goal is to review the literature about the culture techniques used in pulp behavior studies.

KEY WORDS: Dental pulp, cell culture, odontogenesis.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A cultura celular consiste na manutenção e multiplicação *in vitro* de células vivas. Essa metodologia possibilita a análise do metabolismo e do comportamento celular. É possível conhecer os mecanismos envolvidos na regulação, síntese e destino de produtos celulares como proteínas, componentes da matriz extracelular além da influência de agentes externos na biologia das células (fatores de crescimento, substâncias tóxicas, etc), o papel da informação genética nas atividades celulares, enfim múltiplos aspectos do funcionamento celular.

A cultura de células constitui um instrumento valioso para investigações da biologia celular. Esse artigo tem como objetivo realizar uma revisão das técnicas de cultivo que são utilizadas para o estudo do comportamento das células da polpa dentária.

O desenvolvimento de sistemas orgânicos de cultura do complexo dentino-pulpar a partir de tecidos dentários seja a partir de modelos animais ou a partir de humanos representa um avanço científico para investigações de aspectos relacionados com a dentinogênese (SLOAN et al. 1994; SLOAN; SMITH, 1999). A tabela 1 apresenta um resumo das diferentes metodologias empregadas até o momento para o estabelecimento de culturas de células da polpa dental e algumas aplicações experimentais desses sistemas.

Begue-Kirn et al., apud Unda et al., (2000)², estabeleceram um modelo para o estudo da dentinogênese (primária). Os primeiros molares inferiores de camundongos Swiss de 17 dias foram dissecados e tratados com 1% de tripsina, por 50 minutos, a 4°C

² BEGUE-KIRN, C. et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. **Int. J. Dev. Biol.** v. 36, no 4, p. 491-503, Dec. 1992, apud Unda et al. (2000).

para dissociação dos tecidos. Cada papila dental foi embebida em 10 μ l de meio de cultura semi-sólido contendo BGJb (Meio Fitton-Jackson Modificado), 20% de soro fetal bovino, ácido ascórbico, L-glutamina, kanamicina e agar. Usando esse modelo, Unda et al. (2000) avaliaram através da microscopia eletrônica a citodiferenciação, cultivando a papila dental de primeiros molares inferiores de camundongos em presença da combinação de diferentes fatores de crescimento (FGF1 (fator de crescimento para fibroblastos ácido), FGF2 (fator de crescimento para fibroblastos básico), TGF β 1 (fator de crescimento transformante beta 1), FGF1 + FGF2, FGF1 + TGF β 1 e FGF2 + TGF β 1).

Sloan et al. em 1994 desenvolveram um método de cultura do complexo dentino-pulpar de dentes maduros de ratos possibilitando o estudo da dentinogênese terciária. Os incisivos de ratos com 28 dias de vida foram dissecados e processados de duas maneiras distintas: os dentes foram cultivados após um corte no sentido longitudinal, que os autores chamaram de cultura de dentes intactos e também foram cultivados em finos *slices* (fatias), a partir de secções transversais de 2mm de espessura. Em ambos os casos os tecidos foram embebidos em meio DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Minimum Essencial Medium) contendo soro fetal de bovino, vitamina C, glutamina, antibióticos e ágar. Os tecidos foram cultivados a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂, por um período de 2 a 5 dias em culturas *Trowel-type* em 3mL de meio contendo os mesmos componentes usados para embeber os tecidos a exceção do ágar. A morte celular foi observada, nas culturas de dentes intactos, após 2 dias e nas culturas de secções, após 2 a 5 dias. A viabilidade do complexo dentino-pulpar das secções foi superior ao dente intacto e preservou a morfologia dos tecidos e das células. Os autores concluíram que o método de cultura de secções de

dentos de ratos oferece condições satisfatórias para o estudo do complexo dentino-pulpar e da dentinogênese terciária.

Assim, Sloan e Smith (1999) usaram o modelo de cultura descrito por Sloan et al. em 1994 para examinar os efeitos do TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 na resposta do complexo dentino-pulpar. Os *slices* foram mantidos em culturas de *Trowel-type* por 7 dias. Após a cultura, os *slices* foram fixados em formalina neutra 10% por 24 horas e desmineralizados com ácido fórmico 10% por 48 horas. O material assim preparado foi desidratado e embebido em parafina, cortado e corado com hematoxilina e eosina. A manutenção do conjunto dentino-pulpar em cultura é vantajosa, visto que a dentina tem origem a partir de células pulpare e existe um prolongamento citoplasmático do odontoblasto no interior dos túbulos dentinários. A cultura do complexo dentino-pulpar favorece a manutenção da morfologia original do tecido e das células sendo possível inclusive o exame sob microscopia óptica deste complexo.

Heywood e Appleton (1984) avaliaram a integridade ultraestrutural dos odontoblastos em um modelo de cultura também a partir de incisivos de ratos. Entretanto, nesse modelo a polpa é removida e os odontoblastos são cultivados aderidos à superfície da dentina. Ratos de diferentes linhagens, de duas semanas de vida, foram usados no experimento. Os dentes foram clivados através de uma incisão longitudinal e a polpa foi raspada cuidadosamente deixando-se apenas a camada de odontoblastos aderidos à dentina. Os dentes foram colocados em placas de cultura contendo 5mL de MEM (Eagle's minimum essential medium), suplementado com glutamina, glicose, solução de antibiótico e antimicótico e 10% de soro fetal bovino. Um tampão bicarbonato foi empregado para obter-se um pH final de 7,4. As placas foram mantidas em uma incubadora umidificada a

uma atmosfera de 5% de CO₂ em ar por 24 horas. Após, os dentes foram processados e a camada de odontoblastos foi avaliada por microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados indicaram que a camada de odontoblastos permanece homogênea aderida à superfície da dentina. Além disso, os odontoblastos apresentaram estrutura normal, com núcleos polarizados similar ao que é observado *in vivo*.

Células bovinas também são utilizadas em culturas para estudos do comportamento pulpar. Em 1991, Nakashima estabeleceu um método de cultura primária para polpa dental de bovinos. Para tanto, o autor testou quatro métodos de separação enzimática (tripsina, colagenase com e sem pré-tratamento com tripsina e a associação de tripsina e colagenase) e cinco meios de cultura (DMEM, DMEM/Ham's F12, F12, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) e meio 199). O método de separação enzimática mais eficiente e menos lesivo que resultou em alto número de células isoladas, satisfatória adesão e bom crescimento foi o que utilizou colagenase com pré-tratamento com tripsina. Com relação ao meio de cultura o DMEM e o DMEM/Ham's F-12 apresentaram os melhores resultados de crescimento celular, adesão e número de células confluentes. A metodologia de Nakashima (1991) utiliza a polpa de primeiros incisivos permanentes extraídos de vacas de três anos de idade. A polpa é cortada em pedaços e lavada com HBSS (Hank's balanced salt solution) livre de cálcio, pH 7,0 e incubada a 37°C em 0,2% de tripsina e 0,02% de EDTA em HBSS livre de cálcio por trinta minutos. A solução é então colocada em 0,2% de colagenase em HBSS contendo 5mM de cálcio. Após trinta minutos, a solução enzimática é centrifugada por 1 minuto a 50g, 4°C e o sobrenadante é novamente colocado em igual quantidade de solução enzimática. O sobrenadante, contendo as células em suspensão, é centrifugado por quatro minutos a 120g, 4°C. O material é lavado com HBSS e ressuspendido em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina/estreptomicina). O

procedimento é repetido quatro vezes até ficar um mínimo resíduo de polpa dental. As células isoladas são semeadas em placas de 35mm de diâmetro na densidade de 5×10^4 células por mL. O meio de cultura DMEM é trocado a cada dois dias e as culturas são observadas em microscópio de contraste de fase.

Toyono et al. (1997) também utilizaram culturas de células pulpares de incisivos de bovinos adultos, obtidas a partir da metodologia acima citada para avaliar as mudanças temporais na expressão dos membros da superfamília do TGF β e de seus receptores durante a diferenciação de pré-odontoblastos.

No que diz respeito à utilização de culturas primárias ou subculturas os autores discordam quanto às vantagens. Nakashima (1992) por exemplo, prefere a cultura de célula primária, pois acredita que assim se mantém melhor as características fenotípicas das células pulpares originais à cultura de células subcultivadas ou clonadas.

Tjäderhane et al. (1998) acreditam que métodos de cultura a partir da papila dental de camundongos e das células da polpa de bovinos, que induzem a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos não são aconselháveis para o estudo de odontoblastos maduros. O uso desses modelos é principalmente indicado para estudos de diferenciação de células precursoras. Os autores, considerando que o odontoblasto é uma célula que apresenta um prolongamento citoplasmático na dentina, criaram um modelo de cultura de odontoblastos humanos respeitando essa característica. São usados terceiros molares intactos recém extraídos, de pacientes jovens. Imediatamente após a extração os dentes são colocados em PBS (Phosphate-Buffered Saline). A separação coroa/raiz é obtida a partir de um sulco realizado 5mm abaixo da junção cimento esmalte. O tecido pulpar é curetado e colocado em cultura, porém em placas de 96 poços contendo OPTI-MEM I (uma

modificação do MEM contendo: tampão HEPES (N-2 Hidroxietil piperazine – N'- 2 ácido sulfônico etano pH 7,4), hipoxantina, timina, piruvato de sódio, L-glutamina, elementos traço, fatores de crescimento e fenol vermelho reduzido) suplementado com penicilina G, estreptomicina e anfotericina B. As coroas contendo a camada de odontoblastos que permaneceu aderida, atapetando a câmara pulpar, são embebidas parcialmente em agarose com a superfície oclusal para baixo e são colocadas em placas de 24 poços. As câmaras pulpares são gentilmente lavadas três vezes por dez minutos com o meio de cultura acima citado para remover o fluido tecidual pulpar. Aproximadamente 200 a 300 μ L de meio de cultura são colocados no interior da coroa e ao redor do gel de agarose para minimizar a desidratação. É colocada uma cobertura de vidro sobre as coroas para prevenir a evaporação. As coroas são cultivadas em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O meio de cultura é trocado diariamente e as células permanecem em cultura por até 10 dias.

O método de Tjäderhane et al. (1998) contempla a cultura de odontoblastos humanos maduros com atividade secretora definida. Esse método foi utilizado por Palosaari et al. (2000), para investigar a expressão e localização da MMP-8 (metaloproteinase da matriz 8) em odontoblastos humanos e no tecido pulpar. Foram feitas culturas de três diferentes tipos celulares: células do tecido pulpar, odontoblastos e fibroblastos da polpa. Para a obtenção das culturas de fibroblastos, após a curetagem da polpa, essa foi cortada em fragmentos e estes colocados em uma placa que ficou sem meio de cultura durante 30 minutos para possibilitar a adesão dos fragmentos. Após este período, o meio de cultura foi adicionado à placa e quando observado um grande número de fibroblastos, os fragmentos de tecido pulpar foram removidos. Após os fibroblastos tornarem-se confluentes, uma

linhagem dessas células foi estabelecida para subsequente tripsinização e cultura através de várias passagens.

Holt et al. (2001) usou uma modificação da técnica de Tjäderhane et al. (1998) para observar os odontoblastos após um preparo cavitário com e sem refrigeração. Nesse experimento os autores utilizaram como meio de cultura uma mistura de DMEM/F-12, 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina/estreptomicina). A cultura de odontoblastos foi incubada em uma atmosfera umidificada a 37°C, 5% de CO₂ por um período de dois a quatro dias.

Cabe ressaltar que outros autores também têm utilizado culturas de células humanas de terceiros molares recém extraídos, porém com diferentes metodologias (SHIRAKAWA et al., 1994; MAGLOIRE, JOFFRE e BLEICHER, 1996; PALOSAARI et al., 2000; MELIN et al., 2000).

Shirakawa et al. (1994) utilizaram células pulpares (nomeadas P1, P2, P3 e P4) obtidas de quatro terceiros molares que foram mantidos em culturas monocamada separados para investigar os efeitos de TGFβ1 sobre a atividade da fosfatase alcalina, o nível de mRNA e o conteúdo de DNA. As polpas foram picadas em fragmentos. Esses fragmentos foram incubados a 37° C por 60 minutos em um tampão contendo HEPES (pH 7,4), NaH₂PO₄, NaCl, KH₂PO₄, CaCl₂, KCl, glicose, manitol, albumina de soro bovino, penicilina, estreptomicina e colagenase bacteriana. A suspensão de células foi centrifugada 800g por 10 minutos e o material resultante foi ressuspensão em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e fungizona (meio A). As células foram semeadas em placas de cultura de 60mm de diâmetro e incubadas em 5% de CO₂/95% de ar a 37°C. Quando as células tornaram-se confluentes, elas foram colhidas com

tripsina e transferidas para subculturas de 8×10^5 células por 10 cm de placa, em presença do meio A.

Magloire, Joffre e Bleicher (1996) recomendam o uso de células humanas em culturas de *slices* de terceiros molares, pois assim é possível manter tanto as interações normais célula-célula, quanto a integridade micro-vascular. Os autores, afirmam que esse modelo de cultura possibilita o estudo de fenômenos relacionados com o processo de cura do complexo dentino-pulpar, tais como a indução molecular, a neovascularização, a proliferação, a migração e a diferenciação de células precursoras em células tipo odontoblastos. Nesse estudo os autores analisaram o comportamento do tecido pulpar após um preparo cavitário. Trinta terceiros molares recém extraídos foram cuidadosamente perfurados sob refrigeração criando uma cavidade oclusal. Estes foram posicionados em meio de cultura BME (Basal Medium Eagle) suplementado com ácido ascórbico, estreptomicina, penicilina e 10% de soro fetal de bovino sendo rapidamente transportados para o laboratório. Os dentes foram então cuidadosamente seccionados sob um fluxo de meio de cultura, em uma serra equipada com disco de diamante, em secções de aproximadamente 750 μm de espessura. Geralmente 3 ou 4 *slices*, incluindo a cavidade e tecido pulpar intacto foram selecionados por dente e lavados com PBS. Os *slices* (com e sem cavidades) foram cuidadosamente transferidos para placas de Petri (35mm de diâmetro), sendo cultivados em meio de cultura BME suplementado como descrito e incubados por 3 a 30 dias em uma atmosfera com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias.

A metodologia de Magloire, Joffre e Bleicher (1996) foi utilizada por Melin et al. (2000) com o objetivo de demonstrar que os três principais eventos para o reparo da polpa

dentária em humanos, isto é, proliferação celular, migração celular e síntese de colágeno tipo I (uma característica funcional de odontoblasto) são influenciados pelo TGF β 1.

Feigal et al. (1985) compararam uma linhagem de células transformadas comumente usada em testes de citotoxicidade (L929, linhagem contínua de fibroblastos originada do tecido conjuntivo do pulmão de camundongos – American Type Culture Collection) com células humanas diplóides (presumivelmente fibroblastos) de origem pulpar, em resposta a testes de citotoxicidade e a alterações no soro adicionado ao meio de cultura. As células da polpa foram obtidas de terceiros molares extraídos de pacientes entre 19 e 24 anos. A polpa foi colocada em placas de Petri com meio de cultura contendo 25% de soro fetal bovino. Após, foi cortada em fragmentos e esses foram colocados em um frasco de 25cm², sendo adicionado sobre cada fragmento de tecido uma a duas gotas do meio. Os frascos foram cuidadosamente colocados em uma estufa a 37°C em uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ umidificada. Após uma a duas horas de adaptação à atmosfera da estufa, os frascos foram selados e mantidos sob estas condições por mais 48 horas. Após esse período, relativo à adesão celular, 6-7mL de meio com 25% de soro fetal bovino foram cuidadosamente adicionados ao frasco. Quatro semanas após, as células foram subcultivadas pela primeira vez. Após essa etapa, várias subculturas foram realizadas usando-se meio standard Dulbecco, sendo os procedimentos iguais tanto para as células humanas quanto para as células L929. Nas células humanas da polpa foi evidenciado que o soro fetal bovino ofereceu o melhor suplemento para a divisão celular quando comparado com a associação soro fetal bovino/soro humano. As células diplóides humanas apresentaram uma maior sensibilidade que as células L929 nos testes de citotoxicidade, sendo assim mais apropriadas para esse fim. Os autores afirmam que as células humanas

diploides apresentam características morfológicas de fibroblastos, porém como não foram realizados testes para caracterizá-las presume-se que sejam fibroblastos originários da polpa dental. Essas células mantêm o cariótipo humano normal e apresentam senescência após a 15^a ou 18^a passagem.

Kasugai, Adachi e Ogura (1988) acreditam que o estabelecimento de culturas primárias de células da polpa dental consome tempo e o resultado pode ser variável, sendo preferível estabelecer uma linhagem de células com características de tecido pulpar a partir de células clonais da polpa de incisivos de ratos. O propósito do estudo citado foi estabelecer uma linha de células clonais da polpa de incisivos de ratos, usando a fosfatase alcalina como uma enzima marcadora da clonagem. Foram usados ratos Wistar machos, de 7 semanas, com um peso de 180 gramas. Os ratos foram sacrificados por decapitação sob anestesia e a polpa dental dos incisivos superiores foi assepticamente dissecada, picada e incubada em 20ml de PBS contendo 0,5% de tripsina e 0,02% de EGTA (*ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) a 37° C por 60 minutos. As células que se soltaram foram filtradas através de uma delgada malha de aço inoxidável e centrifugadas (400g por 10 minutos, 4°C). O material foi ressuspendido em meio de cultura MEM (Meio Essencial Mínimo de Eagle) suplementado. As células pulpares foram colocadas em placas de cultura de 60mm em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células. O pH do meio foi estabelecido em 7,4 com NaHCO₃ e as células foram mantidas sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi mudado após 24 horas e subsequentemente em intervalos de 48 horas. As células se tornaram confluentes após 14 dias e subculturas foram feitas usando PBS contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EGTA. A concentração do soro foi alterada para 10% na 46^a subcultura. A densidade de inoculação celular foi de $0,6-1 \times 10^4/\text{cm}^2$. Após a 52^a subcultura foi realizada clonagem. As células que apresentavam alta

atividade de fosfatase alcalina foram novamente clonadas. O clone RPC-C2A que apresentou a mais alta atividade fosfatase alcalina foi usado nos experimentos subsequentes. Os autores usaram a fosfatase alcalina como marcadora, pois esta é uma enzima expressa *in vivo* em células pulpares e em odontoblastos de cuja bioquímica tem sido bem estudada. Além disso, a fosfatase alcalina pode estar funcionalmente envolvida com o processo de mineralização. A atividade da fosfatase alcalina nas células RPC-C2A foi a mesma quando comparada a células isoladas da polpa dentária. Os autores concordam com Feigal et al. (1985), que as células humanas são mais apropriadas para testes de citotoxicidade, entretanto, ressaltam que a cultura primária da polpa dental humana é difícil e o crescimento dessas células é lento. Para Kasugai, Adachi e Ogura (1988) as linhagens de células de rato também são apropriadas para testes de citotoxicidade, especialmente para testes iniciais de avaliação de uma grande diversidade de drogas.

As células RPC-C2A (KASUGAI; ADACHI; OGURA, 1988) foram usadas em estudos com diferentes propósitos. Liang, Nishimura e Sato (1992) investigaram o efeito da insulina sobre estas células e a influência do fator de crescimento epidérmico e do fator de crescimento transformante beta sobre o efeito da insulina. Nishikawa et al. (2000) avaliaram os constituintes de glicosaminoglicanos sintetizados por estas células e o efeito de TGF β na síntese de glicosaminoglicanos através da medida de sulfato radioativo incorporado.

MacDougall (1995) também acredita que pesquisas em culturas de células não imortalizadas são difíceis devido ao pequeno número de células, a dificuldade de isolamento de uma população pura e o fato de odontoblastos serem células pós-mitóticas. Dessa forma, o autor estabeleceu, a partir de primeiros molares inferiores de camundongos

Swiss Webster, uma linha de odontoblastos imortalizados como modelo para investigações de mecanismos da diferenciação dos odontoblastos em nível molecular.

A partir de germes dentários de primeiros e segundos molares de ratos Sprague-Dawley de 3 a 5 dias de vida, Hao et al. (2002) desenvolveram uma linha de odontoblastos imortalizados capaz de produzir tecido mineralizado *in vitro* e *in vivo*. Os autores afirmam que esse modelo pode ser uma valiosa ferramenta tanto para estudo da diferenciação de odontoblastos, quanto para estudo dos eventos moleculares envolvidos na formação da dentina.

O sistema de cultura de células da polpa dental é um modelo útil para o estudo da calcificação pulpar. Nódulos mineralizados podem ser formados a partir de culturas de células pulpares (TSUKAMOTO et al., 1992; KASUGAI, et al., 1993; ALLIOT-LICHT; HURTREL; GREGOIRE, 2001). Tsukamoto et al. (1992) cultivando fibroblastos da polpa de dentes humanos decíduos e supranumerários desenvolveram um modelo para o estudo das calcificações pulpares. O tecido pulpar foi removido e colocado em frascos de cultura com DMEM suplementado com ácido ascórbico e soro fetal bovino em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. As células foram tripsinizadas e subcultivadas a 1X10⁶ células/10mL com DMEM em frascos de cultura de 75cm² sendo o meio substituído em períodos de 5 a 7 dias. Das 200 culturas de fibroblastos pulpares, seis formaram nódulos após 10 a 15 dias de cultura. Através de microscopia eletrônica os autores constataram que os nódulos apresentavam vesículas de matriz e cristais em forma de agulha associados a uma densa rede de fibras colágenas.

Por sua vez, Kasugai, et al. (1993) utilizaram células pulpares de ratos para estabelecer um modelo experimental que formasse tecido mineralizado em cultura. As células de incisivos superiores de ratos machos Wistar (7 semanas de vida) foram,

inicialmente processadas segundo Kasugai, Adachi e Ogura (1988) e cultivadas com 10nM de dexametasona ou em sua ausência, usando o meio essencial mínimo de Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino e ácido ascórbico. As células confluentes foram subcultivadas e o meio foi suplementado com β -GP (β -glicerofosfato). Os resultados indicaram que a Dexametasona em cultura primária e/ou secundária acentua a formação de tecido mineralizado e que $>5\text{mM}$ de β -GP são necessários para a indução de mineralização. Os resultados indicaram que algumas células da polpa dental do rato, em cultura, expressam um fenótipo tipo odontoblasto.

Alliot-Licht, Hurtrel e Gregoire (2001) desenvolveram e reproduziram um modelo de cultura de células pulpares humanas na qual houve a formação de nódulos mineralizados, na ausência de dexametasona ou β -glicerofosfato. Os autores utilizaram a polpa coronária de terceiros molares humanos. As polpas foram cortadas em pequenos fragmentos ($<1\text{mm}^3$) e colocadas em placas contendo meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina, penicilina/estreptomicina, anfotericina B e 10% de soro fetal bovino em uma atmosfera úmida com 95% de ar e 5% de CO_2 a 37°C . Os fragmentos foram apenas cobertos com o meio de cultura para facilitar sua adesão. O meio foi trocado a cada 2 dias. Após 4 semanas algumas células foram colhidas com tripsina-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e subcultivadas em meio RPMI completo até a quinta passagem. As células remanescentes foram mantidas em cultura primária, por dois meses, em RPMI suplementado com dexametasona (10^{-8}M). Fibroblastos pulpares foram usados como controle. Essas células foram obtidas pelo mesmo procedimento, sendo rapidamente subcultivadas em meio mínimo essencial completo sendo analisadas após sua vigésima passagem. Através da microscopia eletrônica de varredura foi confirmada a presença de

cálcio e fósforo em ambas culturas: primária de longo tempo e na subcultura na 5^a passagem.

AUTORES	ORIGEM	DENTES	MATERIAL EMPREGADO	MEIOS UTILIZADOS E EMPREGO
Begue-Kirn et al., apud Unda et al., 2000	Camundongos Swiss (17 dias)	1 ^{os} Molares inferiores	Papila dental	Meio semi-sólido contendo BGJb e 5% de Agar; Estudo da dentinogênese primária
Unda et al., 2000	Camundongos Swiss (17 dias)	1 ^{os} Molar inferiores	Papila dental	Meio semi-sólido contendo BGJb e 5% de Agar; Estudo do FGF1, FGF2 e TGFβ1
Sloan et al. 1994	Ratos (28 dias)	Incisivos	Dente intacto e <i>slices</i> (secções transversais)	Meio líquido DMEM; Estudo da dentinogênese terciária.
Sloan; Smith, 1999	Ratos (28 dias)	Incisivos	<i>slices</i>	Meio líquido DMEM; Estudo do TGFβ1, 2 e 3.
Heywood; Appleton, 1984	Ratos (2 semanas)	Incisivos	Odontoblastos da coroa	Meio líquido MEM; Avaliação da integridade ultraestrutural dos odontoblastos.
Nakashima, 1991	Bovinos (3 anos)	1 ^{os} Incisivos permanentes	Polpa (dissociada)	Testou 5 meios líquidos e 4 métodos de separação enzimática.
Toyono et al., 1997	Bovinos (3 anos)	Incisivos permanentes	Polpa (dissociada)	Meio líquido DMEM. Avaliação da expressão da superfamília TGFβ e seus receptores
Tjäderhane et al. 1998	Humanos (18-25 anos)	3 ^{os} Molares	Polpa; Odontoblastos da coroa	Meio líquido OPTI-MEM I; Agarose + OPTI-MEM I; Estudo dos odontoblastos maduros.
Palosaari et al. 2000	Humanos	3 ^{os} Molar	Polpa;Fibroblastos e Odontoblastos da coroa	Meio líquido DMEM Agarose + OPTI-MEM I; Investigar a expressão e localização da MMP-8
Holt et al. 2001	Humanos	3 ^{os} Molares	Odontoblastos da coroa	Meio líquido DMEM; Observar odontoblastos após preparo cavitário
Shirakawa et al. 1994	Humanos	3 ^{os} Molares	Polpa dissociada	Meio líquido DMEM para estudo dos efeitos do TGFβ1 sobre a polpa.
Magloire; Joffre; Bleicher, 1996	Humanos (12-22 anos)	3 ^{os} Molares	<i>Slices</i>	Meio líquido BME Analisar o comportamento pulpar após preparo cavitário.
Melin et al., 2000	Humanos	3 ^{os} Molares	<i>Slices</i>	Meio líquido BME; Estudo da influência do TGFβ1 no reparo pulpar.
Feigal et al., 1985	Humanos (19-24 anos)	3 ^{os} Molares	Polpa Linhagem L929	Meio líquido Dulbeccos com variações no soro utilizado; Compararam as respostas a testes de citotoxicidade.
Kasugai; Adachi; Ogura, 1988	Ratos Wistar machos (7 semanas)	Incisivos Superiores	Polpa (dissociada)	Meio líquido MEM; Estabelecimento de linhagem RPC-C2A
Liang; Nishimura; Sato, 1992	Ratos Wistar machos	Incisivos Superiores	linhagem RPC-C2A	Meio líquido MEM. Análise do efeito da insulina, EGF e TGFβ
Nishikawa et al., 2000	Ratos Wistar machos	Incisivos Superiores	linhagem RPC-C2A	Meio líquido MEM. TGFβ e análise dos constituintes glicosaminoglicanos e o efeito do TGFβ em sua síntese.
Tsukamoto et al., 1992	Humanos	Dentes deciduos e supra-numerários	Polpa	Meio líquido DMEM; Desenvolvimento de um modelo de estudo para a calcificação pulpar
Kasugai, et al., 1993	Ratos Wistar machos de 7 semanas	Incisivos	Polpa (dissociada)	Meio Líquido MEM; Desenvolvimento de um modelo que forma tecido mineralizado induzido por Dexametasona e β-glicerofosfato
Alliot-Licht; Hurtrel; Gregoire, 2001	Humanos	3 ^{os} Molares	Polpa	Meio líquido RPMI. Estudo sobre a formação de nódulos mineralizados.

Tabela 1: Metodologias empregadas para o estabelecimento de culturas de células da polpa dental e algumas aplicações experimentais desses sistemas.

CONCLUSÕES

A presente revisão de literatura mostra a existência de uma grande variedade de técnicas de cultura para o estudo do comportamento pulpar. Para a escolha de uma técnica é importante, primeiramente a definição dos objetivos da pesquisa e da metodologia de avaliação dos resultados.

Em relação aos estudos sobre a diferenciação de células pulpares maduras, o modelo de estudo mais indicado é o que utiliza as próprias células humanas da polpa de terceiros molares recém extraídos. Nesse modelo, a obtenção das células para cultura não é um obstáculo, pois terceiros molares são extraídos com muita frequência. Além das vantagens de se trabalhar com células humanas que não sofreram qualquer alteração (imortalização, etc) este processo não é tão dispendioso quanto um modelo animal. Entretanto, nesse modelo de estudo é importante definir detalhadamente os critérios de exclusão, pois o uso de medicações por parte do paciente, doenças sistêmicas, ou outros fatores, podem alterar o comportamento das células em cultura.

O uso de finos *slices* de dentes humanos cultivados *in vitro* mantém as interações normais célula-célula, além de permitir uma metodologia de avaliação com o uso de microscopia óptica com colorações de rotina como hematoxilina e eosina. Entretanto, convém ressaltar que esse complexo permanece viável em cultura pelo período máximo de 30 dias. Outros modelos humanos não priorizam a manutenção do complexo dentino-pulpar em cultura e utilizam ou odontoblastos aderidos à coroa ou células pulpares dissociadas, sendo que o último permite um período de cultura maior, porém um dos inconvenientes apresentados é que o crescimento das células é lento e limitado, já que não se trata de uma linhagem, e o pesquisador deve ter tempo e paciência para estabelecer as culturas.

Os estudos em cultura de células pulpareas humanas são muito promissores, pois além das perspectivas que surgem na Odontologia como pesquisas de técnicas e recursos que proporcionam terapias cada vez menos invasivas e mais conservadoras das estruturas dentárias, novos horizontes se abrem, já que células tronco foram isoladas na polpa dental (GRONTHOS et al. 2000; GRONTHOS et al. 2002). Gronthos et al. (2000) demonstraram que a polpa dental pós-natal contém células clonogênicas, altamente proliferativas e capazes de regenerar tecidos, propriedades que efetivamente definem células tronco. Em 2002, Gronthos et al. aprofundaram os estudos sobre as propriedades das DPSCs (células tronco da polpa dental) e os resultados demonstraram que essas células possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em multi-linhagens.

Portanto, a utilização de células pulpareas em cultura é importante para o desenvolvimento de metodologias que objetivam a regeneração dentária e tecidual.

REFERÊNCIAS

- ALLIOT-LICHT, B. ; HURTREL, D. ; GREGOIRE, M. Characterization of α -Smooth Muscle Actin Positive Cells in Mineralized Human Dental Pulp Cultures. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 46, no 3, p. 221-228, Mar. 2001.
- FEIGAL, R. J. et al. Differential Sensitivity of Normal Human Pulp and Transformed Mouse Fibroblasts to Citotoxic Challenge. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 30, no 8, p. 609-613, Aug. 1985.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) *in Vitro* and *in Vivo*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, Washington, v. 97, no 25, p. 13625-13630, Dec. 2000.
- GRONTHOS, S. et al. Stem Cells Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.81, no 8, p. 531-535, Aug. 2002.
- HAO, J. et al. Odontoblast Cells Immortalized by Telomerase Produce Mineralized Dentin-like Tissue both *in Vitro* and *in Vivo*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, no 22, p. 19976-19981, May 2001.
- HEYWOOD, B. R. ; APPLETON, J. The Ultrastructure of the Rat Incisor Odontoblast in Organ Culture. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, no 4, p. 327-329, Apr. 1984.
- HOLT, K. G. et al. Wet and Dry Deep Cavity Preparations Compared by a Novel Odontoblast Culture Technique. **J. Endod.**, Baltimore, v. 27, no 2, p. 103-106, Feb. 2001.
- KASUGAI, S. ; ADACHI, M. ; OGURA, H. Establishment and Characterization of Clonal Cell Line (RPC-C2A) from Dental Pulp of the Rat Incisor. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 33, no 12, p. 887-891, Dec. 1988.
- KASUGAI, S. et al., Characterization of System of Mineralized-Tissue Formation by Rat Dental Pulp Cells in Culture. **Arch. oral Biol.**, Oxford, v. 38, no 9, p. 769-777, Sept. 1993.

LIANG, R. F. ; NISHIMURA, S. ; SATO, S. Effects of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- β on Insulin-Induced Differentiation in Rat Dental Pulp Cells.

Arch. Oral Biol., Oxford, v. 37, no 10, p. 789-95, Oct. 1992.

MACDOUGALL, M. Odontoblast Citodifferentiation in Monolayer Cell Cultures: Establishment of immortalized Odontoblast Cell Lines. Dentin/Pulp Complex. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995 and International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex. Tokyo: Quintessence Publishing, 1996, p. 116-123.

MAGLOIRE, H. ; JOFFRE, A. ; BLEICHER, F. An *in Vitro* Model of Human Dental Pulp Repair. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.75, no 12, p. 1971-1978, Dec. 1996.

MELIN, M. et al. Effects of TGF- β 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth Slices. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, no 9, p. 1689-1696, Sept. 2000.

NAKASHIMA, M. Establishment of Primary Cultures of Dental Pulp Cells from Bovine Permanent Incisors. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 36, no 9, p. 655-663, Sept. 1991.

NAKASHIMA, M. The Effects of Growth Factors on DNA Synthesis, Proteoglycan Synthesis and Alkaline Phosphatase Activity in Bovine Dental Pulp Cells. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, no 3, p. 231-236, Mar. 1992.

NISHIKAWA, H. et al. Sulfated Glycosaminoglycan Synthesis and its Regulation by Transforming Growth Factor- β in Rat Clonal Dental Pulp Cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 26, no 3, p. 169-171, Mar. 2000.

PALOSAARI, H. et al. The Expression of MMP-8 in Human Odontoblasts and Dental Pulp Cells is Down-Regulated by TGF β 1. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, no 1, p. 77-84, Jan. 2000.

SHIRAKAWA, M. et al. Transforming Growth Factor- β 1 Reduces Alkaline Phosphatase mRNA and Activity and Stimulates Cell Proliferation in Cultures of Human Pulp Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.73, no 9, p. 1509-1514, Sep. 1994.

SLOAN, A. J. ; SMITH, A. J. Stimulation of the Dentine-Pulp Complex of Rat Incisor Teeth by Transforming Growth Factor- β Isoforms 1-3 *in Vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 44, no 2, p. 149-156, Feb. 1999.

SLOAN, A. J. et al. Culture of the Dentine-Pulp Complex of Rat Incisor Teeth. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.73, no 4, p. 838, Apr. 1994.

TJÄDERHANE, L. et al. A Novel Organ Culture Method to Study the Function of Human Odontoblasts *in Vitro*: Gelatinase Expression by Odontoblasts is Differentially Regulated by TGF- β 1. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, no 7, p. 1486-1496, July 1998.

TOYONO, T. et al. Temporal Changes in Expression of Transforming Growth Factor- β Superfamily Members and their Receptors During Bovine Preodontoblast Differentiation *in Vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 42, no 7, p. 481-488, July 1997.

TSUKAMOTO, Y. et al. Mineralized Nodule Formation by Cultures of Human Dental Pulp-Derived Fibroblasts. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, no 12, p. 1045-1055, Dec. 1992.

UNDA, F. J. et al. Dissection of the Odontoblast Differentiation Process *in Vitro* by a Combination FGF1, FGF2 e TGF-Beta 1. **Dev. Dyn.**, New York, v. 218, no 3, July 2000.

USO DE ANFOTERICINA B COMO ANTIFÚNGICO NO MEIO DE CULTURA PARA
CÉLULAS PULPARES HUMANAS

USING OF AMPHOTERICIN B AS ANTIFUNGAL
AGENTS IN A HUMAN DENTAL PULP CELL CULTURE
MEDIUM

Luisi, Simone Bonato *³
Barbachan, João Jorge Diniz **
Chies, José Artur Bogo ***
Sant'ana Filho, Manoel ****

Artigo encaminhado para Revista Odonto Ciência em janeiro de 2006. Este se encontra formatado segundo as normas de publicação da revista.

* Mestre em Odontologia/ UFRGS. Doutoranda em Patologia Bucal pelo Programa de Pós-Graduação da UFRGS. Professora das Disciplinas de Endodontia da PUCRS.

** Professor titular da Disciplina de Patologia Bucal da UFRGS.

***PhD em Ciências da Vida/ Imunologia – Université de Paris VI. MSc em Genética e Biologia Molecular – UFRGS

****Doutor Estomatologia/PUCRS. Professor de Patologia Bucal da UFRGS e PUCRS. Coordenador do PPGO da UFRGS.

RESUMO

O meio de cultura e seus suplementos são aspectos importantes a serem definidos no desenvolvimento de sistemas de cultura de células humanas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de células da polpa, de terceiros molares humanos, cultivadas na presença ou ausência de um antifúngico (anfotericina B). As células pulpares foram obtidas de seis terceiros molares inclusos, após extração por motivos ortodônticos. Os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. A coroa foi separada mecanicamente da raiz e a polpa foi cortada em fragmentos que foram incubados a 37°C, por 60 minutos, em tampão contendo 0,2% de colagenase. A suspensão de células foi dividida em 2 tubos e centrifugada, sendo um *pellet* ressuspensão em meio - DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina 100µg/mL de estreptomicina, 0,45µg/mL de gentamicina e 3,7mg/L HEPES e o outro ressuspensão no mesmo meio, porém contendo 2,5µg/mL de anfotericina B. As células foram semeadas em placas de cultura plásticas e incubadas em atmosfera 5% de CO₂/ 95% de ar a 37°C. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias. Dos seis dentes testados, em dois, as células pulpares não apresentaram crescimento em qualquer dos meios testados. Nos demais quatro dentes, houve crescimento das células pulpares em ambos meios, sendo este mais proeminente no meio sem anfotericina B. Apesar da anfotericina B ser importante para a prevenção de contaminações por fungos, concluiu-se que esta dificulta o estabelecimento de células pulpares humanas em cultura.

UNITERMOS: Anfotericina B, cultura de células, polpa dentária.

SUMMARY

The culture medium and his supplements are important aspects on human cells culture development. The aim of the present work is to evaluate the behavior (survival and proliferation) of human third molar pulp cells cultivated in the presence or absence of amphotericin B. The cells were obtained from six impacted third molars extracted for ortodontic reasons. The procedures were made in a laminar flow under sterile conditions. The crown was separated from the root and the pulp was minced into pieces which were incubated at 37°C for 60 minutes in a buffer containing 0.2% collagenase. The cell suspension was divided into two tubes, centrifuged, and resuspended in DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 0.45µg/mL gentamincin and 3.7mg/L HEPES with or without 2.5µg/mL of amphotericin B. The cells were plated in plastic culture dishes and incubated with 5% CO₂/95% air at 37°C. The culture medium was changed every three days. From the sample of six teeth pulp cells, two did not growth at any of the tested medium. The other four samples growth in both medium. The growth was more effective at the medium without amphotericin B. Although can be important to prevent fungic contamination it was concluded that amphotericin B makes it difficult to culture of human pulp cells.

UNITERMS: Amphotericin B, cell culture, dental pulp.

INTRODUÇÃO

Entre os principais tipos microbianos que contaminam as culturas celulares encontram-se bactérias, fungos, micoplasmas e vírus. Para evitar contaminações são adicionados antimicrobianos aos meios de cultura, tais como anfotericina B, penicilina, estreptomicina e gentamicina. A adição de antimicrobianos aos meios de cultura deve ser criteriosamente realizada, pois estes devem apresentar simultaneamente um amplo espectro de ação e um mínimo efeito nocivo para o cultivo.

Para o estabelecimento de um sistema de cultura de células pulpares de terceiros molares humanos deve-se ainda evitar a contaminação pela microbiota bucal indígena, no momento da coleta do material. A boca é um ambiente naturalmente séptico onde se encontram mais de 350 espécies bacterianas, além de fungos, protozoários e vírus (Bamann et al.¹ (1999)).

Shirakawa et al.¹⁵ (1994) e Tjäderhane et al.¹⁶ (1998), para obterem uma ação antifúngica e antimicrobiana, adicionaram ao meio de cultura de células pulpares humanas 2,5µg/mL de fungizona (anfotericina B), 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Por sua vez, Palosaari et al.¹³ (2000) não só adicionaram ao meio de cultura 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina como também dois antifúngicos (0,25µg/mL de anfotericina B e 50UI/mL de nistatina). Por outro lado, Gronthos et al.⁶ (2000 e 2002), Batouli et al.² (2003) e Saito et al.¹⁴ (2004) não adicionaram antifúngicos ao meio de cultura. Os autores adicionaram 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Assim é possível perceber que diferentes estratégias de uso de antimicrobianos são empregadas em sistemas de cultivo de células pulpares humanas.

Com relação à contaminação por fungos, a anfotericina B é um dos antifúngicos mais antigos e é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas (Hoeprich⁹ (1992) e Fica⁴ (2004)). Seu efeito antifúngico se dá mediante a interação direta com o ergosterol da membrana celular fúngica (Fica⁴ (2004)). A anfotericina B não interfere na síntese da membrana, mas sim a desestabiliza, facilitando a formação de fendas que permitem a perda de íons e componentes celulares (Hsu et al.¹⁰ (1997) e Fica⁴ (2004)).

Convém salientar que a anfotericina B é capaz de se ligar ao colesterol da membrana das células humanas (Hoeprich⁹ 1992) e induzir efluxo de potássio (K^+) (Marklund et al.¹² (2000) e Marklund et al.¹¹ (2001)) e também apoptose em células eucarióticas (Marklund et al.¹² (2000)). Marklund et al.¹¹ (2001) demonstraram que a anfotericina B aumenta significativamente o efluxo de K^+ em células P31 (linhagem de células humanas de mesotelioma pulmonar) em cultura. Dessa forma, justifica-se avaliar o comportamento (viabilidade e proliferação) das células da polpa, de terceiros molares humanos, cultivadas em meio na presença e ausência deste medicamento.

MATERIAL E MÉTODO

As células pulpares foram obtidas de seis terceiros molares humanos inclusos, com raiz completamente formada, após terem sido extraídos (sem odontosseção) por motivos ortodônticos, na Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Foram incluídos no estudo pacientes com idades entre 20 e 21 anos, que não apresentavam comprometimento de saúde de ordem sistêmica. As diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos foram seguidas de acordo com Goldim⁵ (1997). Os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos do presente estudo e assinaram um Termo de consentimento livre e esclarecido, doando os dentes extraídos para a realização do experimento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Imediatamente após a extração, os dentes foram colocados em frascos contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, Gibco/NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough/RJ) e 2,5µg/mL anfotericina B (fungizone, Gibco). Um sulco horizontal de 2mm de profundidade foi feito na superfície radicular, abaixo da junção cimento-esmalte, com uma ponta diamantada, em alta rotação e sob refrigeração, ao lado da chama de uma lamparina. Imediatamente após, o dente foi transportado para o Instituto de Genética da UFRGS. Os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. A coroa foi separada da raiz por meio de formão e martelo e a polpa foi cortada com uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos. Os fragmentos de tecido foram incubados a 37°C, por 60 minutos, em tampão contendo 25mmol/L HEPES (N-2 Hidroxietyl piperazine – N'-2 ácido sulfônico etano pH 7,4 (Gibco)), 10mmol/L NaH₂PO₄

(fosfato de sódio mono-básico (Nuclear/SP)), 100mmol/L NaCl (cloreto de sódio (Dinâmica/ São Paulo)), 3mmol/L KH_2PO_4 (fosfato de potássio (Reagen/RJ)), 1mmol/L CaCl_2 (cloreto de cálcio (Synth/SP)), 24mmol/L KCl (cloreto de potássio (Synth)), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich/ St Louis), 12mmol/L de manitol (Synth), 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Garamicina, Shering-Plought) e 0,2% de colagenase bacteriana (Gibco). A suspensão de células foi dividida igualmente em dois tubos e centrifugada a 800g por 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspenso nos seguintes meios: Meio A: 1,5mL de meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (Gibco), 0,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Garamicina, Shering-Plought) e 3,7mg/L HEPES (Gibco); e meio B: meio A acrescido de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (fungizone, Gibco).

A ressuspensão tanto para o meio A quanto para o meio B foi realizada em placas de cultura plásticas (TPP Trasadigen/Suíça) de 24 poços, e estas foram incubadas em atmosfera 5% de CO_2 a 37°C. As células de cada poço foram mantidas separadamente em culturas mono camada. Quando as células tornaram-se confluentes, estas foram colhidas com solução tripsina-EDTA (0,5%) (Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas, na razão 1:2, no respectivo meio de cultivo. Independente do meio em que as células estavam crescendo no segundo repique, as células novamente eram transferidas para dois novos poços, sendo um no meio A e outro no meio B, dando origem novamente a dois grupos teste. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias. A proliferação foi avaliada pela capacidade das células tornarem-se confluentes, permitindo um novo repique.

Tanto os meios utilizados no experimento quanto o tampão para dissociação celular foram preparados e filtrados em uma capela de fluxo laminar, ao lado da chama de uma lamparina e armazenados. Todos os dentes foram processados com os meios armazenados, não ocorrendo variação no lote do material ou no preparo dos meios. As células foram observadas ao microscópio de campo invertido AxioVert 25 (Zeiss, Germany).

RESULTADOS

A polpa coronária, de todos os seis dentes, apresentava-se rígida, resistente ao corte, com coloração rósea e superfície lisa.

No grupo teste o qual as células foram cultivadas no meio A (sem anfotericinaB), em dois casos não houve crescimento celular, em três casos havia poucas células e estas não proliferaram e em um caso as células se organizaram em pequenos núcleos de crescimento (FIG.1A) e tornaram-se confluentes. Após o primeiro repique, em dois novos poços as células não se organizaram em núcleos de crescimento, mas ficaram dispersas por toda a placa (FIG.1B). Estas se tornaram confluentes, formando um grande tapete celular (FIG.1C). Após sete dias foi realizado o segundo repique, porém, as células de cada poço foram repicadas em dois novos poços, sendo um no meio A e outro no meio B, dando origem novamente a dois grupos teste. Dos dois poços cultivados no meio B, um nitidamente apresentava-se, após uma semana, com o mesmo número de células que os poços cultivados no meio A (células confluentes com formação de tapete celular). No outro, porém, as células não se tornaram confluentes. Foi realizado novo repique em todos os poços mantendo os dois grupos teste. Após uma semana, as células cultivadas no meio A apresentavam-se em condições para um próximo repique e as células cultivadas no meio B, não se multiplicaram, inviabilizando futuros repiques.

Na 7^a passagem, foi possível observar uma diminuição na capacidade proliferativa das células cultivadas no meio A. A morfologia celular variou de células afiladas e estreladas. Observaram-se ainda muitas mitoses, células com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes e, também, a produção de grânulos no citoplasma que se desprendiam para o meio extracelular (FIG.1D).

No grupo teste o qual as células foram cultivadas no meio B (com anfotericina B), em dois casos não houve crescimento celular, em dois casos havia poucas células e estas não proliferaram e em dois casos as células inicialmente organizaram-se em pequenos núcleos de crescimento, porém após o primeiro repique, não proliferaram.

A ordenação dos pacientes e dos resultados obtidos está apresentada na Tabela 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar de Shirakawa et al.¹⁵ (1994) e Tjäderhane et al.¹⁶ (1998) terem obtido sucesso no estabelecimento de culturas de células pulpare humanas, utilizando 2,5µg/mL de anfotericina B isso não foi possível no presente experimento. Até mesmo as células que estavam proliferando no meio A (sem anfotericina B), quando repicadas no meio B apresentaram comportamento proliferativo menor.

A anfotericina B é citotóxica para células eucarióticas, segundo Hoeprich⁹ (1992), Marklund et al.¹² (2000) e Marklund et al.¹¹ (2001). Essa ação citotóxica pode explicar a dificuldade de crescimento das células da polpa de terceiros molares humanos nos meios de cultura com anfotericina B.

Não foi objetivo do trabalho avaliar a necessidade da anfotericina B no meio de cultura que foi utilizado como transporte, mas sim nos meios de cultura utilizados para incubação. Para todos os dentes, foram utilizados meios de transporte contendo anfotericina B, pois o sulco feito no dente, apesar de criteriosos cuidados de assepsia, foi realizado fora da capela de fluxo laminar, ao lado da chama de uma lamparina, em um laboratório odontológico. É lícito dizer que os laboratórios odontológicos são ambientes sépticos e o aerossol produzido pela caneta de alta rotação ao acioná-la é contaminado. No entanto, o fato do meio de transporte conter anfotericina B deve ser investigado, uma vez que em apenas um dente e no meio sem anfotericina B foi possível o estabelecimento da cultura das células pulpare.

O estabelecimento da cultura, nesse experimento, foi obtido na presença de 100 unidades/mL de penicilina/ 100µg/mL de estreptomicina e 45µg/mL de gentamicina ao meio de cultura. A penicilina e a estreptomicina exercem ação antibacteriana tanto para

bactérias Gram+ quanto Gram- e a gentamicina exerce sua ação sobre micoplasmas (Hannan⁸ (1995)). A detecção da contaminação da cultura por micoplasma é difícil e exige a utilização de técnicas específicas. Além disso, os efeitos da contaminação por micoplasma incluem redução nas taxas de crescimento, alterações morfológicas, aberrações cromossômicas e alterações no metabolismo dos aminoácidos e dos ácidos nucléicos. Entretanto, convém ressaltar que a freqüente inclusão dos aminoglicosídeos aos meios de cultura para combater a contaminação de bactérias e micoplasmas pode explicar, segundo Hannan⁸ (1995), a emergência de *Mycoplasma fermentans* resistente. Segundo Cumino³ et al. (1998) o uso indiscriminado de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de cepas de micoplasmas resistentes.

No presente experimento, para evitar mudanças bruscas de pH foram adicionados 3,7mg/L de HEPES no meio de cultura, pois esta é uma solução com elevada capacidade tamponadora.

No estudo realizado por Shirakawa et al.¹⁵ (1994) foram utilizadas placas de seis poços. Neste experimento foram utilizadas placas de 24 poços. Estas placas apresentam poços menores e foram selecionadas, pois como as células da polpa do mesmo dente deveriam dar origem a duas culturas iniciais, o número de células seria muito reduzido para ser cultivado em poços que requerem grandes volumes. As células necessitam para se estabelecerem, além das condições de cultura de sinalizações intercelulares. A baixa densidade celular (pobre sinalização) pode ser uma razão para a ausência de estabelecimento celular em algumas polpas testadas. Uma vez que a metodologia foi repetida criteriosamente em todas as amostras a variável pode estar na própria amostra. Não foi possível correlacionar qualquer fator como sexo, idade, aspecto visual da polpa coronária, grau de formação da raiz e se o dente era um 3º molar superior ou inferior com o

estabelecimento das células pulpares em cultura. É de se destacar que o estudo de Shirakawa et al.¹⁵ (1994) foi realizado a partir de células de quatro terceiros molares. O tamanho de sua amostra nos sugere que os autores também possam ter encontrado dificuldades no estabelecimento das células pulpares em cultura. Na metodologia utilizada por Shirakawa et al.¹⁵ (1994) não está descrita a temperatura de centrifugação, após a utilização do tampão com colagenase. Nesse experimento as condições ideais para a realização desta centrifugação foram obtidas na temperatura de 4°C. Como as células cultivadas são aderentes, a baixa temperatura impede que se percam células por aderência das mesmas às paredes do tubo. É possível sugerir, frente aos achados que, a anfotericina B dificulta o estabelecimento de células pulpares humanas em cultura. Novos estudos devem dar continuidade ao estabelecimento das células da polpa de humanos em cultura, uma vez que esse modelo permite a realização de inúmeras investigações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bammann LL, Estrela C. Aspectos microbiológicos em Endodontia in Estrela; Figueiredo – Endodontia princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999, p.167-189.
2. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos P. et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. J. Dent. Res. 2003; 82(12): 976-981.
3. Cumino AC, Córdoba P, Zapata TM. Presencia de micoplasmas em cultivos celulares em laboratórios de la ciudad de Córdoba, Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 1998; 30: 147-153.
4. Fica A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. III parte: anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. Rev. Chil. Infect. 2004; 21(4): 317-326.
5. Goldim JR. (Org.) Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes. 3.ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.
6. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2000; 97(25): 13625-13630.
7. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J. Dent. Res. 2002; 81(8): 531-535.
8. Hannan PCT. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycosides *in vitro*. J. Med. Microbiol. 1995; 42(8): 421-428,.

9. Hoeprich P. D. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14(Suppl 1): S114-119.
10. Hsu S, Burnette RR. Characterization of the effects of Amphotericin B on ion channels in MDCK cells using the patch-clamp technique. *Bioch. et Bioph. Acta* 1997; 1329: 26-38.
11. Marklund L, Behnam-Motlagh P, Henriksson R, Grankvist K. Bumetanide annihilation of Amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is due to its effect on cellular K⁺ flux. *J. Antim. Chem.* 2001; 48: 781-786.
12. Marklund L, Henriksson R, Grankvist K. Amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is prevented by the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport blocker bumetanide. *Life Sci.* 2000; 66(23): 319-324.
13. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönka H, Sorsa T, Salo T. et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J. Dent. Res.* 2000; 79(1): 77-84.
14. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho, K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J. Endod.* 2004; 30(4): 205-208.
15. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K. et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J. Dent. Res.* 1994; 73(9): 1509-1514.
16. Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts *in vitro*: Gelatinase expression by

odontoblasts is differentially regulated by TGF- β 1. J. Dent. Res. 1998; 77(7): 1486-1496.

Endereço para correspondência:

Profa. Simone Bonato Luisi

Faculdade de Odontologia da PUC-RS

Av. Ipiranga, nº 6681 – Prédio 6 CEP 90619 900

Porto Alegre, RS, Brasil e-mail: simoneluisi@terra.com.br

Tabela 1: Ordenação dos pacientes e dos resultados obtidos:

Pacien te	Dente	Idade (anos)	Sexo	Formação radicular	Comportamento celular nos meios de cultura		
					Meio A sem anfotericina B	Meio B com anfotericina B	
1	3° inferior	molar	20	Fem	Completa	Sem crescimento	Sem crescimento
2	3° superior	molar	21	Mas	Completa	Poucas células, e não houve proliferação	Após o primeiro repique, não houve proliferação.
3	3° superior	molar	20	Fem	Completa	Poucas células, e não houve proliferação	Após o primeiro repique, não houve proliferação.
4	3° superior	molar	21	Fem	Completa	Sem crescimento	Sem crescimento
5	3° superior	molar	21	Fem	Completa	Poucas células, e não houve proliferação	Poucas células, e não houve proliferação
6	3° superior	molar	20	Mas	Completa	As células proliferaram, tornaram-se confluentes e vários repiques foram feitos ⁴ . Na 7 ^a passagem, foi possível observar uma diminuição na capacidade proliferativa celular.	Poucas células, e não houve proliferação

Porto Alegre, 2006

⁴ Houve na segunda passagem, divisão da cultura em meio A e meio B, com crescimento celular importante apenas no meio A.

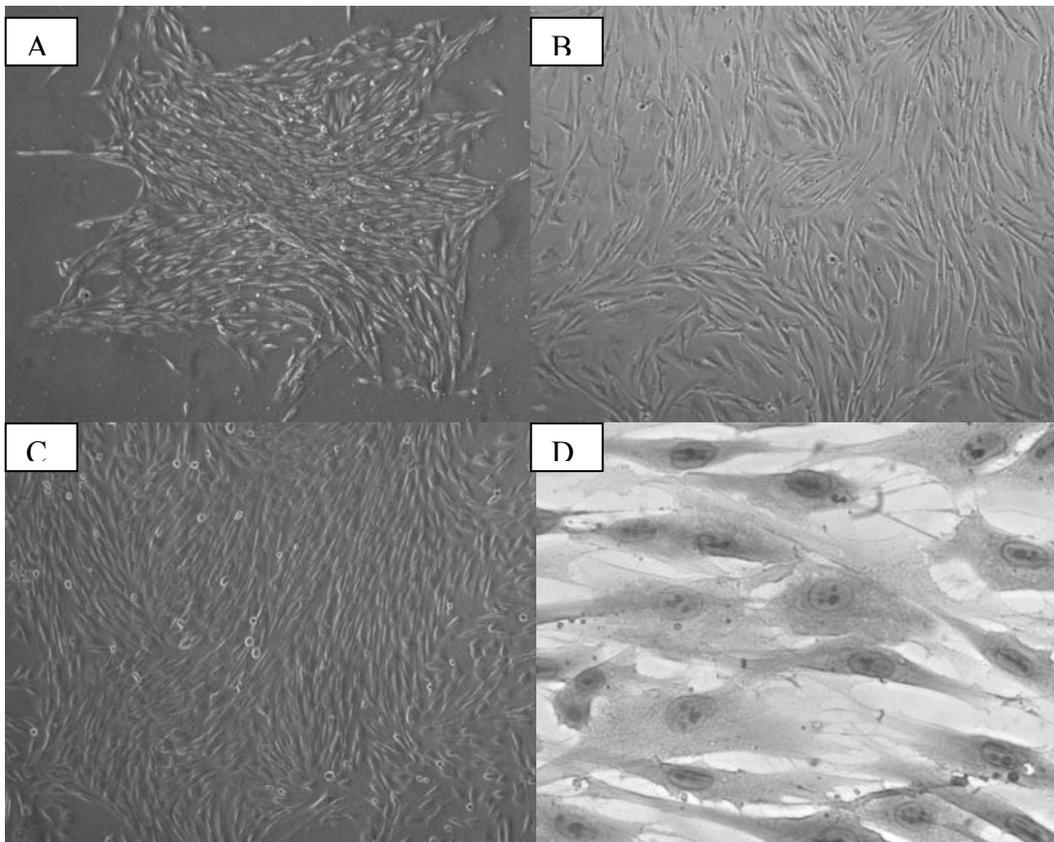


FIG.1 : Células cultivadas no meio A. (A) Formação inicial de núcleos de crescimento. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (B) Distribuição celular após os repiques. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (C) Células confluentes e formação de um grande tapete celular. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (D) Células afiladas e estreladas, com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 200X.

COMPORTAMENTO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS EXPOSTAS AO
TGFβ1 E AO aFGF EM CULTURA

BEHAVIOR OF HUMAN DENTAL PULP CELLS
EXPOSED TO TGFβ1 AND aFGF IN CULTURE

SIMONE BONATO LUISI*⁵
JOÃO JORGE DINIZ BARBACHAN**
JOSÉ ARTUR BOGO CHIES***
MANOEL SANT'ANA FILHO****

O artigo, após a tradução para o inglês, será encaminhado para *Journal of Endodontics*.
Este se encontra formatado segundo as normas de publicação da revista.

* Mestre em Odontologia/ UFRGS. Doutoranda em Patologia Bucal pelo Programa de Pós-Graduação da UFRGS. Professora das Disciplinas de Endodontia da PUCRS.

** Professor titular da Disciplina de Patologia Bucal da UFRGS.

***PhD em Ciências da Vida/ Imunologia – Université de Paris VI. MSc em Genética e Biologia Molecular – UFRGS

****Doutor Estomatologia/PUCRS. Professor de Patologia Bucal da UFRGS e PUCRS. Coordenador do PPGO da FOUFRGS.

Endereço para correspondência:

Profa. Simone Bonato Luisi

Faculdade de Odontologia da PUC-RS

Av. Ipiranga, nº 6681 – Prédio 6 CEP90619 900

Porto Alegre, RS, Brasil e-mail: simoneluisi@terra.com.br

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar o comportamento de células pulpares humanas expostas ao TGF β 1 e ao aFGF, em cultura. Foram avaliadas a morfologia celular, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de proteínas osteocalcina, sialoproteína óssea (BSP) e sialofosfoproteína de dentina (DSPP). A média do número de nucléolos no grupo tratado com TGF β 1 a 1ng/mL foi significativamente maior que no grupo tratado com aFGF a 5ng/mL. A média da atividade da fosfatase alcalina no grupo tratado com TGF β 1 a 1ng/mL foi significativamente maior que no grupo tratado com TGF β 1 a 5ng/mL + aFGF a 5ng/mL. A exposição dos fatores não induziu a expressão de componentes da matriz de dentina tais como BSP e DSPP. Foi observada a expressão da osteocalcina em todas as células pulpares humanas que proliferaram em cultura. Sugere-se que as células expostas ao TGF β 1 1ng/mL foram estimuladas apresentando uma maior atividade celular e as células expostas ao aFGF 5ng/mL foram inibidas

PALAVRAS CHAVE: Cultura de células, fator de crescimento transformador beta, fator de crescimento de fibroblastos, diferenciação celular, odontoblastos, morfologia, fosfatase alcalina, osteocalcina, sialoproteína óssea (BSP), sialofosfoproteína de dentina (DSPP).

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the behavior of human dental pulp cells obtained from a third molar exposed to TGF β 1 and aFGF in culture. Cellular morphology, alkaline phosphatase activity and expression of osteocalcin, bone sialoprotein (BSP), dentin sialophosphoprotein (DSPP) were assessed respectively by microscopy, pNPP assay and RT-PCR. The nucleolus media in the group treated with TGF β 1 1ng/mL was significantly higher than the group treated with aFGF 5ng/mL. The alkaline phosphatase activity in the TGF β 1 1ng/mL treated group was significantly higher than the media observed in TGF β 1 5ng/mL + aFGF 5ng/m treated group. The exposure to growth factors did not induced the expression of dentin matrix components such as BSP or DSPP. Osteocalcin expression was observed in all human dental pulp cell cultures. Our data suggest that TGF β 1 at 1ng/mL can stimulate human dental pulp cells in culture and that the exposure of these same cells to aFGF at 5ng/mL leads to inhibition.

KEY WORDS: cell culture, dental pulp, transforming growth factor beta, fibroblast growth factor, cell differentiation, odontoblasts, morphology, alkaline phosphatase, osteocalcin, bone sialoprotein (BSP), dentin sialophosphoprotein (DSPP).

INTRODUÇÃO

Durante a formação do dente, a diferenciação dos odontoblastos a partir de células ectomesenquimais derivadas da crista neural é resultante da interação entre o epitélio e o mesênquima, a qual é mediada pela membrana basal (Avery et al. 2001). A membrana basal pode agir como um substrato sólido, capaz de interagir com receptores plasmáticos das células ectomesenquimais da papila dental. Injúrias, tais como cáries e procedimentos restauradores, provocam a destruição de odontoblastos primários e a substituição desta camada de células diferenciadas durante a dentinogênese reparadora, ocorre apesar da ausência do epitélio e da membrana basal, demonstrando que células da polpa dental madura ainda possuem o potencial de se diferenciarem em odontoblastos em condições adequadas (Magloire et al. 2001).

Vários fatores de crescimento têm sido associados com a diferenciação dos odontoblastos, tais como: Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1) (Nakashima, 1992, Tziafas et al. 1998, Unda et al., 2000, Melin, et al., 2000 e Nie et al. 2006), proteína morfogênica óssea 2 (BMP2) (Iohara et al. 2004), fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF) (Nakashima, 1992, Unda et al., 2000), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (Nakashima, 1992), e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Nakashima, 1992).

Em particular, o TGF β 1 foi identificado no desenvolvimento dentário (D'souza et al. 1990) em odontoblastos maduros (Jepsen et al., 1992), e na dentina humana (Jepsen et al. 1992 e Cassidy et al. 1997), indicando um provável papel desse fator na indução da formação da dentina primária. O TGF β 1 liberado da dentina em degradação, por ação de bactérias ou agentes iatrogênicos, parece estar envolvido na reação imune da polpa dental

em resposta a injúrias (Farges et al. 2003). Especial atenção tem sido dada ao TGF β 1 pois ele é capaz de estimular a síntese de colágeno em células pulpares (Chan et al. 2005) e desempenha papel de imunossupressor pulpar (D'Souza et al. 1998).

Conseqüentemente, a influência deste fator na formação da dentina primária e terciária tem sido investigada em diferentes modelos: *in vivo*, usando cães (Tziafas et al., 1998) e ratos (Hu et al., 1998) e *in vitro*, usando cultura da papila dental de molares de camundongos (Unda et al. 2000), *slices* de incisivos de ratos em cultura (Sloan; Smith, 1999), cultura primária de células da polpa dental de vacas (Nakashima, 1992), linhagem de células da polpa de incisivos de ratos (RPC-C2A) (Liang et al. 1992), cultura de células pulpares humanas (Shirakawa et al 1994) ou *slices* de dentes humanos em cultura (Melin, et al., 2000).

Os estudos acima citados sugerem que o TGF- β 1 pode agir como um sinal epitelial induzindo proliferação, migração e diferenciação de odontoblastos além de induzir a produção de matriz extracelular em polpas dentárias. Além disso, foi demonstrado um efeito sinérgico entre o TGF β 1 e o aFGF em culturas de células da papila dental de molares inferiores de camundongos (Unda et al. 2000). A associação desses fatores promoveu a diferenciação de odontoblastos com características histológicas e funcionais, vesícula de secreção de matriz, formação mineral, atividade positiva da fosfatase alcalina e produção de colágeno tipo I.

Entretanto, o TGF β 1 apresentou um efeito inibidor do crescimento de células da polpa dental, em duas culturas primárias humanas (Chan et al. 2005). Além disso, houve efeito inibitório na regeneração pulpar também demonstrado em um estudo de Nakashima et al. 1994, quando o TGF β 1 foi aplicado em polpas amputadas de cães.

Assim, considerando a existência de dados controversos, o propósito do presente estudo foi avaliar o comportamento de células pulpaes de terceiros molares humanos expostas ao TGF β 1 e ao aFGF, em cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células:

As células pulpares foram obtidas de um terceiro molar humano incluso, com raiz completamente formada, após ter sido extraído (sem odontosecção) por motivos ortodônticos. O paciente de 21 anos de idade não apresentava comprometimento de saúde de ordem sistêmica. O mesmo foi esclarecido sobre os objetivos do presente estudo e assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, doando o dente extraído para a realização do experimento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Imediatamente após a extração, o dente foi colocado em um frasco contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, Gibco/NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 2,5µg/mL anfotericina B (fungizone, Gibco). Um sulco horizontal de 2mm de profundidade foi feito na superfície radicular, abaixo da junção cimento-esmalte, com uma ponta diamantada, em alta rotação e sob refrigeração, ao lado da chama de uma lamparina. Os procedimentos seguintes foram realizados em uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. A coroa foi separada da raiz por meio de formão e martelo e a polpa foi cortada com uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos. Os fragmentos de tecido foram incubados a 37°C, por 60 minutos, em tampão contendo 0,2% de colagenase tipo I (Gibco), 25mmol/L HEPES (N-2 Hidroxietyl piperazine – N²- 2 ácido sulfônico etano pH 7,4 (Gibco)), 10mmol/L de fosfato de sódio mono-básico (Nuclear/SP), 100mmol/L de cloreto de sódio (Dinâmica/ São Paulo), 3mmol/L de fosfato de potássio (Reagen/RJ), 1mmol/L de cloreto de cálcio (Synth/SP), 24mmol/L de cloreto de potássio (Synth), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich/ St Louis), 12mmol/L de manitol (Synth), 0,2%

de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), 45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough). A suspensão de células foi centrifugada a 800g por 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspensão em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), 0,45µg/mL de gentamicina (Shering-Plough) e 3,7mg/L HEPES (Gibco).

A ressuspensão foi realizada em placas de cultura plásticas (TPP Trasadigen/Suíça) de 6 poços, e estas foram incubadas em atmosfera 5% de CO₂/ 95% de ar a 37°C. As células de cada poço foram mantidas em culturas mono camada. O meio de cultura foi trocado a cada quatro dias. Quando as células tornaram-se confluentes, estas foram colhidas com solução tripsina-EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas, na razão 1:3, no respectivo meio de cultivo. Após nova confluência, as células foram repicadas assim. Foram realizadas sete passagens na mesma razão.

Aplicação dos fatores de crescimento:

O TGFβ1 (Sigma-Aldrich) utilizado no presente estudo é oriundo de plaquetas humanas e o aFGF (Sigma-Aldrich) é recombinante humano.

Na sétima passagem os fatores de crescimento foram aplicados, em triplicatas, nas seguintes concentrações: TGFβ1 1ng/mL, TGFβ1 5ng/mL, TGFβ1 1ng/mL + aFGF 5ng/mL, TGFβ1 5ng/mL + aFGF 5ng/m e aFGF 5ng/mL. Os fatores de crescimento foram aplicados quatro vezes, com um intervalo de dois dias entre cada aplicação. Foi realizado, também em triplicata, um controle negativo, cultura de células sem a adição dos fatores de diferenciação.

Avaliação da morfologia celular:

As células humanas da polpa dental foram observadas em microscópio de campo invertido AxioVert 25 (Zeiss, Germany). Fotografias foram realizadas aleatoriamente de cada grupo com câmera digital (AxioCam MRC/ Zeiss, Germany) acoplada ao microscópio invertido, usando programa de computador Axion Vision 3.1 (Zeiss). As fotografias foram tomadas nos tempos: zero, quatro e oito dias após a aplicação dos fatores de crescimento.

Foram quantificados, através do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics/ Silver Spring – USA) o número de nucléolos e as áreas (em micrômetros quadrados) de núcleo, citoplasma e nucléolo de todos os grupos. Quatro campos aleatórios foram utilizados para avaliação no tempo zero, que corresponde ao início do experimento, e um campo aleatório foi utilizado para cada grupo, no tempo quatro. As células que se apresentavam sem sobreposição, com um único núcleo, citoplasma evidente, sendo este contido em toda sua extensão no campo, foram mensuradas. As mensurações foram feitas por um único examinador e repetidas 3 vezes.

Avaliação da atividade da fosfatase alcalina:

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada usando pNPP (p-nitrofenil-fosfato) (Sigma-Aldrich) como substrato, incubado a 37°C por 30 min no oitavo dia do experimento, quando as células se encontravam em confluência. Uma triplicata com 50µL de células em suspensão e 50µL de substrato, foi feita para cada um dos três poços de cada grupo, em uma placa de 96 poços. A reação foi interrompida pela adição de 50µL 3N de NaOH. Usando espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Pharmacia/Biotech, Cambridge, Inglaterra) a absorvância⁶ foi medida a 405nm.

Análise estatística:

⁶ Absorvância é uma forma de medir a absorção de luz.

Foi realizada a Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, para as médias: de absorvância (atividade da fosfatase alcalina), de número de nucléolos e de áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo (morfologia celular).

RT-PCR:

A expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) para as proteínas osteocalcina, sialoproteína óssea (BSP), sialofosfoproteína de dentina (DSPP) e β -actina foi detectada pela extração do ácido ribonucléico total (RNA) seguida de uma reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das proteínas. O RNA foi extraído usando Trizol (Invitrogen/USA) de acordo com orientações do fabricante. A síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi realizada usando kit M-MLV de transcriptase reversa (Invitrogen), de acordo com orientações do fabricante.

Para a realização da PCR foram usados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: BSP direto 5'-CTATGGAGAGGACGCCACGCCTGG-3'; reverso, 5'-CATAGCCATCGTAGCCTTGTCCT-3'; osteocalcina direto, 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3'; reverso, 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3', DSPP direto 5'-GGCAGTGACTCAAAGGAGC-3'; reverso, 5'-TGCTGTCACTGTCACTGCTG-3', segundo Gronthos et al. 2000 e beta actina direto 5'-ACGGCTCCG GCATGTGCAAG-3' e reverso 5'-TGACGATGCCGTGCTGCATG-3' segundo Schulze et al. 1995. Beta actina foi usada como um controle positivo interno. O controle negativo foi uma reação sem cDNA.

A reação da PCR foi pré-incubada em um termociclador Thermo Hybaid – PCR express a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos. Foi realizado um ciclo final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (Promega, Madison, USA) com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

RESULTADOS

Avaliação da morfologia celular

Em todos os grupos, logo após os repiques, quando havia baixa densidade celular as células apresentavam nítidos prolongamentos citoplasmáticos, que por vezes, iam de uma célula a outra. Quando estavam confluentes, as células apresentavam-se afiladas com arranjo em feixes em diferentes direções. Observaram-se ainda muitas mitoses, células com núcleos avolumados e binucleadas, nucléolos bem evidentes e, também, a produção de grânulos no citoplasma que se desprendiam para o meio extracelular.

A média das áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo e a média do número de nucléolos, no tempo zero, estão na tabela 1.

TABELA 1: Média das áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo em micrômetros quadrados e do número de nucléolos, no tempo zero, de quatro imagens aleatórias.

	Imagem								p
	3		5		8		12		
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
Área núcleo	74681,07	27224,89	61411,08	42474,84	60588,93	18091,91	64859,86	18161,76	0,769
Área citoplasma	2007743	1256690	1609019	1992508	1090120	486701	777805	271219	0,184
Nº de nucléolos	3,14	2,34	2,13	0,83	2,14	1,07	2,50	1,08	0,490
Área nucléolos	14488,92	6373,36	12109,67	7993,29	9751,46	6211,05	8206,38	3555,32	0,199

p= nível mínimo de significância da Análise de Variância

No tempo zero, para todas as variáveis, verificou-se através da Análise de Variância, ao nível de significância de 5%, que não houve diferença significativa na média em relação as diferentes imagens.

Por outro lado, no tempo 4 dias, verificou-se através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, que na variável número de nucléolos a média do grupo TGF β 1 1ng/mL foi significativamente maior que a do grupo aFGF 5ng/mL. Nas demais variáveis não foi

detectada diferença na média em relação aos diferentes grupos (Tabela 2). No tempo oito, não foi possível diferenciar os limites de uma célula para outra, devida à acentuada proliferação celular, o que impediu a mensuração.

TABELA 2: Média das áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo em micrômetros quadrados e média do número de nucléolos, após quatro dias de aplicação dos fatores de crescimento, nos seis grupos.

Grupo	Variáveis							
	Núcleo		Citoplasma		Nº de nucléolos		Área nucléolos	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
TGFβ1 1ng/mL	79942,76 ^A	31043,57	1850214 ^A	1308494	2,80 ^A	1,48	13130,21 ^A	5272,10
TGFβ1 5ng/mL	71290,30 ^A	25418,60	1268608 ^A	956001	1,78 ^{AB}	0,67	10595,82 ^A	4319,60
TGFβ1 1ng/mL + aFGF 5ng/mL	71158,03 ^A	24884,03	1642070 ^A	1002332	2,29 ^{AB}	0,95	12516,98 ^A	2653,95
TGFβ1 5ng/mL + aFGF 5ng/m	59659,81 ^A	12160,27	1474930 ^A	385109	2,73 ^{AB}	1,10	9993,04 ^A	1874,92
Controle	60095,95 ^A	22952,10	1420153 ^A	1111528	1,67 ^{AB}	0,52	11194,34 ^A	4037,96
aFGF 5ng/mL	63546,84 ^A	30961,55	1231041 ^A	779247	1,25 ^B	0,50	8669,30 ^A	4551,82
p	0,593		0,864		0,039		0,379	

p= nível mínimo de significância da Análise de Variância

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%

Atividade da fosfatase alcalina:

Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, verificou-se que a média de absorvância no grupo TGFβ1 1ng/mL foi significativamente maior do que no grupo TGFβ1 5ng/mL + aFGF 5ng/m (Tabela 3).

TABELA 3: Média de absorvância para avaliação da atividade da fosfatase alcalina, nos seis grupos.

Grupo	Absorbância a 405nm			
	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
TGFβ1 1ng/mL	0.801 ^A	0.023	0.776	0.851
TGFβ1 5ng/mL	0.784 ^{AB}	0.034	0.750	0.853
TGFβ1 1ng/mL + aFGF 5ng/mL	0.760 ^{AB}	0.034	0.714	0.811
TGFβ1 5ng/mL + aFGF 5ng/m	0.740 ^B	0.031	0.683	0.789
Controle	0.774 ^{AB}	0.043	0.684	0.833
aFGF 5ng/mL	0.755 ^{AB}	0.050	0.691	0.834

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%

RT-PCR:

β-actina e osteocalcina foram expressas em todos os grupos. No grupo em que foi utilizado aFGF 5ng/mL houve diminuição da expressão da osteocalcina. Por outro lado, a expressão de BSP e DSPP não foi detectada em qualquer grupo.

DISCUSSÃO

No presente experimento, não foram observados em quaisquer dos grupos alterações estatisticamente significativas nas médias das áreas de citoplasma, núcleo e nucléolo, sendo que as concentrações utilizadas de TGF β 1 foram de 1ng/mL e 5ng/mL. Por outro lado, Chan et al. 2005 observaram alterações morfológicas em células da polpa dental humana expostas ao TGF β 1 10ng/mL, a citar: diminuição na densidade celular, aumento do tamanho celular e presença de espaços intercelulares. O TGF β 1 inibiu o crescimento de células da polpa dental, em concentrações entre 0.5 e 10ng/mL, em duas culturas primárias humanas (Chan et al. 2005). Segundo Nakashima et al. 1994 o TGF β 1 (2 μ g) demonstrou um efeito inibitório na regeneração pulpar quando aplicado em polpas amputadas de cães. Esses dados sugerem que altas concentrações de TGF β 1 podem apresentar um efeito inibitório na regeneração pulpar.

Na variável número de nucléolos, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e os grupos teste. O acentuado número de nucléolos pode predizer uma acentuada atividade proliferativa celular. Porém, a média do número de nucléolos no grupo aFGF 5ng/mL foi significativamente menor que a do grupo TGF β 1 1ng/mL. No grupo aFGF 5ng/mL a média de absorbância, na avaliação da atividade da fosfatase alcalina foi menor que a do controle, onde não foram aplicados fatores de crescimento. O grupo teste aFGF 5ng/mL apresentou uma menor expressão de osteocalcina quando comparado com os demais grupos. Esses dados, considerados em conjunto, sugerem que houve uma diminuição na atividade celular no grupo aFGF 5ng/mL, quando comparado com os demais grupos. Além disso, tanto no grupo onde o aFGF 5ng/mL foi associado ao TGF β 1 1ng/mL quanto no grupo onde o aFGF 5ng/mL foi associado ao TGF β 1 5ng/ml as médias de

absorbância, relativas à avaliação da fosfatase alcalina, foram menores que a do controle. Entretanto, no presente experimento foi utilizada apenas uma concentração de aFGF e portanto mais estudos são necessários para avaliar o comportamento das células pulpares humanas em cultura frente a diferentes concentrações de aFGF. Unda et al. 2000 demonstraram um efeito sinérgico entre o TGF β 1 e o aFGF em culturas de células da papila dental de molares inferiores de camundongos.

Odontoblastos e osteoblastos expressam as mesmas proteínas da matriz mineralizada, tais como colágeno tipo I, osteonectina, BSP (sialoproteína óssea) (Garcia et al, 2003). É relatado por Qin et al. 2002 que o gene da DSPP não é apenas expresso em dentina, mas também no osso em baixos níveis. Assim, como não existem marcadores com absoluta especificidade para odontoblastos, foi utilizado um painel de marcadores incluindo: BSP, DSPP e osteocalcina. Segundo Thyagarajan et al. 2001, TGF β 1 medeia a expressão da DSPP e é fundamental para a mineralização da dentina.

Nas condições do presente experimento, a exposição dos fatores de crescimento (TGF β 1 e aFGF) não induziu a expressão de componentes da matriz de dentina tais como BSP e DSPP. Diferentes foram os achados de Nie et al. 2006, onde o TGF β 1 (5ng/mL) aplicado em células humanas da polpa dental induziu a diferenciação de células semelhantes a odontoblastos com indução de expressão de DSPP e de proteína da matriz de dentina 1 (DMP-1). A diferença nos achados pode ser devido ao tempo do experimento. Enquanto no presente experimento a expressão das proteínas foi avaliada após oito dias, no estudo de Nie et al. 2006, foi avaliada após duas semanas. Segundo Couble et al. 2000 a DSPP é um marcador tardio da diferenciação dos odontoblastos.

Já a expressão da osteocalcina foi observada no grupo controle e em todos os grupos teste. Gronthos et al. 2000 observou a expressão da osteocalcina em células tronco humanas da polpa dental (DPSC) e em células diferenciadas semelhantes a odontoblastos a partir de transplantes de DPSC em camundongos imunodeprimidos.

No presente experimento, não foram constatados alterações significativas entre os grupos testes e o controle no que concerne à atividade da fosfatase alcalina. Porém, no grupo TGF β 1 1ng/mL a média de absorbância na avaliação da atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior que no grupo TGF β 1 5ng/mL + aFGF 5ng/mL. O grupo TGF β 1 1ng/mL apresentou os maiores valores médios de áreas de núcleo, citoplasma e nucléolo e de número de nucléolos quando comparado com os demais grupos. Além disso, a média do número de nucléolos no grupo TGF β 1 1ng/mL foi significativamente maior que a do grupo aFGF 5ng/mL, conforme citado anteriormente. Esses dados sugerem que apesar de não terem ocorrido alterações significativas entre o grupo TGF β 1 1ng/mL e o controle, houve uma maior atividade celular neste grupo.

Em culturas primárias de células pulpares humanas o TGF β 1 a 5ng/mL diminuiu a atividade da fosfatase alcalina e quando aplicado a 0,1ng/mL aumentou a atividade da fosfatase alcalina em apenas uma das quatro culturas primárias de células pulpares humanas (Shirakawa et al., 1994). Contrariamente, TGF β 1 (5ng/mL) aumentou significativamente a proliferação em células da polpa dental humana e a atividade da fosfatase alcalina (Nie et al 2006). Esses resultados contraditórios podem estar relacionados com diferenças individuais de cada cultura. Chan et al. 2005 demonstraram que de duas culturas iniciais de células da polpa dental humana, de dentes diferentes, apenas uma apresentava forte atividade de fosfatase alcalina.

Embora superficialmente todas as células humanas da polpa dental em cultura pareçam morfológicamente semelhantes, estas observações sugerem que elas representam uma população heterogênea. Portanto, o isolamento de culturas primárias da polpa dental pode favorecer uma considerável seleção no fenótipo celular, o qual pode influenciar na interpretação dos dados (Goldberg et al. 2004). A resposta celular varia de acordo com o fenótipo predominante em uma cultura, com as concentrações dos fatores de crescimento empregadas, com o tempo de exposição e outras condições experimentais. No presente experimento os fatores de crescimento foram expostos a células oriundas de um único dente e portanto é limitado sugerir que o TGF β 1 e o aFGF não induzem a diferenciação celular. Além disso, apesar de não ter sido caracterizada a diferenciação celular, pode-se sugerir baseado nas análises realizadas que as células expostas ao TGF β 1 1ng/mL foram estimuladas e apresentaram uma maior atividade celular e as células expostas ao aFGF 5ng/mL foram inibidas e apresentaram uma menor atividade celular. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o comportamento de células humanas em cultura expostas a esses fatores.

REFERÊNCIAS

- Avery JK, Steele PF. Fundamentos de histologia e embriologia bucal. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001.
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor β isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. Arch Oral Biol. 1997;42(3):219-23.
- Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, et al. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. Arch. Oral Biol. 2005;50:469-79.
- Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. Calcif Tissue Int. 2000; 66(2):129-38.
- D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- β 1 expression in developing rat molars. Arch. Oral Biol. 1990;35(12):957-65.
- D'Souza RN, Cavender A, Dickinson D, Roberts A, Letterio J. TGF- β 1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex. Eur J Oral Sci. 1998;106(Suppl 1):185-91.
- Farges JC, Romeas A, Melim M, Pin JJ, Lebecque S, Lucchini M, et al. TGF- β 1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. J Dent Res 2003;82(8):652-56.
- Goldberg M, Smith A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(1):13-27.
- Garcia JM, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. Int. Endod J. 2003;36:404-10.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron R, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(25):13625-30.
- Hu CC, Khang C, Qin Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. J. Endod. 1998;24(11):744-51.
- Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin Regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J. Dent. Res. 2004;83(8):590-95.

Jepsen S, Sciltz P, Strong DD, Scharla SH, Snead ML, Finkelman RD. Transforming growth factor- β 1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by *in situ* hybridization: potential role for the stratum intermedium. Arch Oral Biol. 1992;37(8): 645-53.

Liang RF, Nishimura S, Sato S. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-b on insulin-induced differentiation in rat dental pulp cells. Arch Oral Biol. 1992;37(10):789-95.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble L, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. Adv Dent Res. 2001; 15:46-50.

Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF β 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices J Dent Res. 2000;79(9):1689-96.

Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. Arch Oral Biol. 1992;37(3):231-36.

Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. Arch Oral Biol. 1994;39(12):1085-9.

Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. Cell Biol Int. 2006;30:295-300.

Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. J Dent Res. 2002;81(6):392-4.

Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto K, Nakashima, M, et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. J Dent Res. 1994;73(9):1509-14.

Schulze E, Krahl R, Thalmeier K, Helbig W. Detection of bcr-abl mRNA in single progenitor colonies by PCR: Comparison with cytogenetics and PCR from uncultured cells. Exp Hematol. 1995;23(14):1649-1654.

Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. Arch Oral Biol. 1999;44(2):144-56.

Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, Wright T, Kulkarni AB. Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor- β 1 in teeth. J Biol Chem. 2001;276(14):11016-20.

Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol.* 1998;43(6):431-44.

Unda FJ, Martín A, Hilario E, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Aréchaga J. Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination FGF1, FGF2 e TGF β 1. *Dev Dyn.* 2000;218(3):480-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura de células é um instrumento valioso que permite a realização de inúmeras investigações. Embora a adaptação de um modelo de cultura de células da polpa de terceiros molares humanos às condições locais seja um processo lento e gradual pode-se afirmar que o primeiro passo já foi dado. A caracterização do fenótipo celular, a determinação de possíveis níveis de diferenciação ao longo do tempo em cultura, entre outros, são aspectos que ainda devem ser investigados.

Com relação ao comportamento das células humanas da polpa dental em cultura expostas ao TGF β 1 e ao aFGF, sugere-se que as células expostas ao TGF β 1 1ng/mL foram estimuladas e apresentaram uma maior atividade celular e as células expostas ao aFGF 5ng/mL foram inibidas e apresentaram uma menor atividade celular. Entretanto se utilizou apenas uma concentração de aFGF e apenas uma cultura primária. Portanto, para que conclusões mais efetivas sejam alcançadas, é imperioso que se faça um experimento expondo células humanas da polpa de diferentes culturas primárias aos fatores de crescimento TGF β 1 e aFGF ambos a 1ng/mL e a 5ng/mL.

REFERÊNCIAS

- AVERY, J.K. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 200 p.
- ALLIOT-LICHT, B. ; HURTREL, D. ; GREGOIRE, M. Characterization of α -Smooth Muscle Actin Positive Cells in Mineralized Human Dental Pulp Cultures. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 46, no 3, p. 221-228, Mar. 2001.
- BAMMANN,L.L; ESTRELA,C. (1999): Aspectos Microbiológicos em Endodontia in Estrela; Figueiredo – **Endodontia Princípios Biológicos e Mecânicos**. São Paulo : Ed. Artes Médicas, 1999. 819p. p.167-189.
- BATOULI, S.; MIURA, M.; BRAHIM, J.et al. Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 82, no.12, p.976-981, Dec. 2003.
- CASSIDY, N. et al. Comparative Analysis of Transforming Growth Factor- β Isoforms 1-3 in Human and Rabbit Dentine Matrices. **Archs oral Biol.**, Oxford, v. 42, no. 3, p. 219-223, Mar. 1997.
- CHAN, C.P. et al. Effects of TGF- β s on the Growth, Collagen Synthesis and Collagen Lattice Contraction of Human Dental Pulp Fibroblasts In Vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 50, no. 5, p. 469-479, May 2005.
- COUBLE, M.L. et al. Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in Explant Cultures. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 66, no. 2, p. 129-138, Feb. 2000.
- CUMINO, A.C.; CORDOBA, P.; ZAPATA, T.M. Presencia de Micoplasmas em Cultivos Celulares em Laboratórios de la Ciudad de Córdoba, Argentina. **Rev. Arg. Microbiol.**, Buenos Aires, v. 30, no. 3, p. 147-153, jul./sept. 1998.
- D'SOUZA, R.N. et al. Temporal and Spatial Patterns of Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Developing Rat Molars. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 35, no. 12, p. 957-965, Dec.,1990.
- D'SOUZA, R.N. et al. TGF- β 1 is Essential for the Homeostasis of the Dentin-Pulp Complex. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, suppl. 1, p. 185-191, Jan. 1998.
- FARGES, J.C. et al. TGF- β 1 Induces Accumulation of Dendritic Cells in the Odontoblast Layer. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 82, no. 8, p. 652-656, Aug. 2003.
- FEIGAL, R. J. et al. Differential Sensitivity of Normal Human Pulp and Transformed Mouse Fibroblasts to Citotoxic Challenge. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 30, no 8, p. 609-613, Aug. 1985.

- FICA, C.A. Tratamiento de Infecciones Fúngicas Sistêmicas. III Parte: Anfotericina B, Aspectos Farmacoeconómicos y Decisiones Terapéuticas. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v. 21, no. 4, p. 317-326, dic. 2004.
- GARCIA, J.M. et al. Immunolocalization of Bone Extracellular Matrix Proteins (Type I Collagen, Osteonectin and Bone Sialoprotein) in Human Dental Pulp and Cultured Pulp Cells. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, no. 6, p. 404-410, June 2003.
- GOLDBERG, M.; SMITH, A. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, VA, v. 15, no. 1, p. 13-27, 2004.
- GOLDIM, J.R. (Org.) **Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes**. 3.ed. Porto Alegre: HCPA, 1997. 156 p.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) *in Vitro* and *in Vivo*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, Washington, v. 97, no 25, p. 13625-13630, Dec. 2000.
- GRONTHOS, S. et al. Stem Cells Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.81, no 8, p. 531-535, Aug. 2002.
- HANNAN, P.C. Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma fermentans* Strains from Various Sources and the Development of Resistance to Aminoglycosides *In Vitro*. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 42, no. 6, p. 421-428, June 1995.
- HAO, J. et al. Odontoblast Cells Immortalized by Telomerase Produce Mineralized Dentin-like Tissue both *in Vitro* and *in Vivo*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, no 22, p. 19976-19981, May 2001.
- HEYWOOD, B. R. ; APPLETON, J. The Ultrastructure of the Rat Incisor Odontoblast in Organ Culture. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, no 4, p. 327-329, Apr. 1984.
- HOEPRICH, P.D. Clinical Use of Amphotericin B and Derivatives: Lore, Mystique, and Fact. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v.14, Suppl 1, p.114-119, Mar. 1992.
- HOLT, K. G. et al. Wet and Dry Deep Cavity Preparations Compared by a Novel Odontoblast Culture Technique. **J. Endod.**, Baltimore, v. 27, no 2, p. 103-106, Feb. 2001.
- HSU, S.; BURNETTE, R.R. Characterization of the Effects of Amphotericin B on Ion Channels in MDCK Cells Using the Patch-Clamp Technique. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1329, no. 1, p. 26-38, Oct. 1997.
- HU, C. C. et al. Reparative Dentin Formation in Rat Molars after Direct Pulp Capping with Growth Factors. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, no. 11, Nov. 1998.

IOHARA, K. et al. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 83, no. 8, p. 590-595, Aug. 2004.

JEPSEN, S. et al. Transforming growth factor-beta 1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization: potential role for the stratum intermedium. **Arch. Oral Biol.** v. 37, n. 8, p. 645-653, Aug., 1992.

KASUGAI, S. ; ADACHI, M. ; OGIURA, H. Establishment and Characterization of Clonal Cell Line (RPC-C2A) from Dental Pulp of the Rat Incisor. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 33, no 12, p. 887-891, Dec. 1988.

KASUGAI, S. et al., Characterization of System of Mineralized-Tissue Formation by Rat Dental Pulp Cells in Culture. **Arch. oral Biol.**, Oxford, v. 38, no 9, p. 769-777, Sept. 1993.

LIANG, R. F. ; NISHIMURA, S. ; SATO, S. Effects of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- β on Insulin-Induced Differentiation in Rat Dental Pulp Cells. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, no 10, p. 789-95, Oct. 1992.

MACDOUGALL, M. Odontoblast Citodifferentiation in Monolayer Cell Cultures: Establishment of Immortalized Odontoblast Cell Lines. Dentin/Pup Complex. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995 and International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex. Tokyo: Quintessence Publishing, 1996, p. 116-123.

MAGLOIRE, H. et al. Molecular Regulation of Odontoblast Activity Under Dentin Injury. **Adv. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 15, p. 46-50, Aug. 2001.

MAGLOIRE, H. ; JOFFRE, A. ; BLEICHER, F. An *in Vitro* Model of Human Dental Pulp Repair. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.75, no 12, p. 1971-1978, Dec. 1996.

MARKLUND, L.; HENRIKSSON, R.; GRANKVIST, K. Amphotericin B-Induced Apoptosis and Cytotoxicity is Prevented by the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻: Cotransport Blocker Bumetanide. **Life Sci.**, Oxford, v. 66, no. 23, p. PL319-PL324, Apr. 2000.

MARKLUND, L. et al. Bumetanide Annihilation of Amphotericin B-Induced Apoptosis and Cytotoxicity is Due to its Effect on Cellular K⁺ Flux. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 48, no. 9, p. 781-786, Dec. 2001.

MELIN, M. et al. Effects of TGF- β 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth Slices. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, no 9, p. 1689-1696, Sept. 2000.

NAKASHIMA, M. Establishment of Primary Cultures of Dental Pulp Cells from Bovine Permanent Incisors. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 36, no 9, p. 655-663, Sept. 1991.

NAKASHIMA, M. The Effects of Growth Factors on DNA Synthesis, Proteoglycan Synthesis and Alkaline Phosphatase Activity in Bovine Dental Pulp Cells. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, no 3, p. 231-236, Mar. 1992.

NAKASHIMA, M. Induction of Dentine in Amputated Pulp of Dogs by Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins-2 and -4 with Collagen Matrix. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, no. 12, p. 1085-1089, Dec. 1994.

NIE, X. et al. Induction of Transforming Growth Factor-Beta 1 on Dentine Pulp Cells in Different Culture Patterns. **Cell Biol. Int.**, London, v. 30, no. 4, p. 295-300, Apr. 2006.

NISHIKAWA, H. et al. Sulfated Glycosaminoglycan Synthesis and its Regulation by Transforming Growth Factor- β in Rat Clonal Dental Pulp Cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 26, no 3, p. 169-171, Mar. 2000.

PALOSAARI, H. et al. The Expression of MMP-8 in Human Odontoblasts and Dental Pulp Cells is Down-Regulated by TGF β 1. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, no 1, p. 77-84, Jan. 2000.

QIN, C. et al. The Expression of Dentin Sialophosphoprotein Gene in Bone. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 81, no. 6, p. 392-394, June 2002.

SAITO,T; OGAWA,M.; HATA,Y. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. **J. Endod.**, Baltimore, v.30, no.4, p.205-208, Apr. 2004.

SCHULZE, E. et al. Detection of bcr-abl mRNA in Single Progenitor Colonies by PCR: Comparison with Cytogenetics and PCR from Uncultured Cells. **Exp. Hematol.** Oak Ridge, v. 23, no. 14, p. 1649-1654, 1995.

SHIRAKAWA, M. et al. Transforming Growth Factor- β 1 Reduces Alkaline Phosphatase mRNA and Activity and Stimulates Cell Proliferation in Cultures of Human Pulp Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.73, no 9, p. 1509-1514, Sep. 1994.

SLOAN, A. J. ; SMITH, A. J. Stimulation of the Dentine-Pulp Complex of Rat Incisor Teeth by Transforming Growth Factor- β Isoforms 1-3 *in Vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 44, no 2, p. 149-156, Feb. 1999.

SLOAN, A. J. et al. Culture of the Dentine-Pulp Complex of Rat Incisor Teeth. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.73, no 4, p. 838, Apr. 1994.

THYAGARAJAN, T. et al. Reduced Expression of Dentin Sialophosphoprotein is Associated with Dysplastic Dentin in Mice Over Expressing Transforming Growth Factor- β 1 in Teeth. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, no. 14, p. 11016-11020, Apr. 2001.

TJÄDERHANE, L. et al. A Novel Organ Culture Method to Study the Function of Human Odontoblasts In Vitro: Gelatinase Expression by Odontoblasts is Differentially Regulated by TGF- β 1. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 77, no. 7, p. 1486-1496, July 1998.

TOYONO, T. et al. Temporal Changes in Expression of Transforming Growth Factor- β Superfamily Members and their Receptors During Bovine Preodontoblast Differentiation *in Vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 42, no 7, p. 481-488, July 1997.

TSUKAMOTO, Y. et al. Mineralized Nodule Formation by Cultures of Human Dental Pulp-Derived Fibroblasts. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, no 12, p. 1045-1055, Dec. 1992.

TZIAFAS, D. et al. Effects of Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor, Insuline-like Growth Factor-II and Transforming Growth Factor-b1 on Dog Dental Pulp Cells in Vivo. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 431-44, June ,1998.

UNDA, F. J. et al. Dissection of the Odontoblast Differentiation Process in Vitro by a Combination FGF1, FGF2 e TGF-Beta 1. **Dev. Dyn.**, New York, v. 218, no 3, July 2000.

ANEXO 1:LEITURAS COMPLEMENTARES

- Cultura de células:

PERES, C.M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PERLMAN, D. Use of Antibiotics in Cell Culture Media. **Methods Enzymol.**, New York, v. 58, p. 110-116, 1979.

- Anfotericina B:

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Suscetibilidade a Antifúngicos de Cepas de *Candida albicans* Isoladas de Pacientes com Estomatite Protética. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, Bauru, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

NEIBART, E.; GUMPRECHT, J. Antifungal Agents and the Treatment of Fungal Infections of the Head and Neck. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 26, no. 6, p. 1123-1131, Dec. 1993

- Dentinogênese primária e terciária:

ESTRELA, C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. 1050 p.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal**: Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439 p.

TZIAFAS, D. Mechanisms Controlling Secondary Initiation of Dentinogenesis: A Review. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 27, no. 2, p. 61-74, Mar. 1994.

TZIAFAS, D. The Future Role of a Molecular Approach to Pulp-Dentinal Regeneration. **Caries Res.**, Basel, v. 38, no. 3, p. 314-320, May/June 2004.

- Fatores de crescimento: TGF β e aFGF:

MARTÍN, A. et al. Effects of aFGF, bFGF, TGF β 1 and IGF-I on Odontoblast Differentiation In Vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, suppl. 1, p. 117-121, Jan. 1998.

MASSAGUÉ, J. The TGF β Family of Growth and Differentiation Factors. **Cell.**, Cambridge, v. 49, no. 4, p. 437-438, May 1987.

NAKASHIMA, M. et al. Transforming Growth Factor- β Superfamily Members Expressed in Rat Incisor Pulp. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, no. 9, p. 745-751, Sept. 1998.

SPORN, M.B. et al. Transforming Growth Factor- β : Biological Function and Chemical Structure. **Science**, Washington, DC, v. 233, no. 4763, p. 532-534, Aug. 1986.

TOYONO, T. et al. Expression of TGF β Superfamily Receptors in Dental Pulp. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 76, no. 9, p. 1555-1560, Sept. 1997.

TZIAFAS, D.; PAPADIMITRIOU, S. Role of Exogenous TGF β in Induction of Reparative Dentinogenesis In Vivo. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, suppl. 1, p. 192-196, Jan. 1998.

- Morfologia celular e nucléolos:

AVERY, J.K. Structural Elements of the Young Normal Human Pulp. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 32, no. 1, p. 113-125, July 1971.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P. Regulators of Nucleolar Functions. **Prog. Cell Cycle Res.**, New York, v. 5, p. 301-308, 2003.

HORKY, M. et al. Nucleolus and Apoptosis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v. 973, p. 258-264, Nov. 2002.

MOSELEY, R. et al. The Influence of Fluoride on the Cellular Morphology and Synthetic Activity of the Rat Dentine-Pulp Complex In Vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 48, no. 1, p. 39-46, Jan. 2003.

VAN WYK, C.W.; OLIVIER, A.; MARITZ, J.S. Cultured Pulp Fibroblasts: Are they Suitable for In Vitro Cytotoxicity Testing? **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 30, no. 3, p. 168-177, Mar. 2001.

- Fosfatase Alcalina:

ANDERSON, H.C.; REYNOLDS, J.J. Pyrophosphate Stimulation of Calcium Uptake into Cultured Embryonic Bones. Fine Structure of Matrix Vesicles and their Role in Calcification. **Dev. Biol.**, New York, v. 34, no. 2, p. 211-227, Oct. 1973.

BEERTSEN, W.; VANDENBOS, T.; EVERTS, V. Root Development in Mice Lacking Functional Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Gene: Inhibition of Acellular Cementum Formation. **J. Dent. Res.**, Alexandria, VA, v. 78, no. 6, p. 1221-1229, June 1999.

KIGUEL, E. A Study of Tooth Development and the Possible Role of Alkaline Phosphatase. **Int. Dent. J.**, London, v. 20, no. 1, p. 1-49, Mar. 1970.

LOWRY, O.H. et al. The Quantitative Histochemistry of Brain. II. Enzyme Measurements. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 207, no. 1, p. 19-37, Mar. 1954.

SHIBA, H. et al. Enhancement of Alkaline Phosphatase Synthesis in Pulp Cells Co-Cultured with Epithelial Cells Derived from Lower Rabbit Incisors. **Cell Biol. Int.**, London, v. 27, no. 10, p. 815-823, 2003.

WEISS, M.J. et al. First Identification of a Gene Defect for Hypophosphatasia: Evidence that Alkaline-Phosphatase Acts in Skeletal Mineralization. **Connect. Tissue Res.**, Philadelphia, v. 21, no. 1/4, p. 99-104, 1989.

WHYTE, M.P. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline-Phosphatase in Skeletal Mineralization. **Endocr. Rev.**, Chevy Chase, MD, v. 15, no. 4, p. 439-461, Aug. 1994.

- DSPP, BSP, Osteocalcina:

BÈGUE-KIRN, C. et al. Comparative Analysis of Mouse DSP and DPP Expression in Odontoblasts, Preameloblasts, and Experimentally Induced Odontoblast-Like Cells. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, suppl. 1, p. 254-259, Jan. 1998.

BUTLER, W.T. Dentin Matrix Proteins. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, suppl. 1, p. 204-210, Jan. 1998

MIURA, M. et al. SHED: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, DC, v. 100, no. 10, p. 5807-5812, May 2003.

NARAYANAN, K. et al. Differentiation of Embryonic Mesenchymal Cells to Odontoblast-Like Cells by Overexpression of Dentin Matrix Protein 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, DC, v. 98, no. 8, p. 4516-4521, Apr. 2001.

ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM PATOLOGIA BUCAL
TERMO DE CONSENTIMENTO

Esta pesquisa tem como objetivo criar um modelo de cultivo de células do nervo de um dente que já foi extraído. Essas células em cultivo servirão para estudos de novos medicamentos que poderão ser utilizados, no futuro, para tratar um dente doente.

Não haverá nenhuma alteração no seu tratamento e não será necessária sua participação em nenhum momento da pesquisa a ser realizada.

O dente extraído será encaminhado para procedimentos de cultura na qual será realizada a testagem de dois possíveis medicamentos TGF β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) e o aFGF (fator ácido de crescimento para fibroblastos).

Os seus dados confidenciais têm a garantia de sigilo, o que assegura a sua privacidade. Você tem a liberdade de se recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo do seu tratamento.

Eu, _____, residente na rua _____
estou a par dos termos da pesquisa intitulada “Avaliação de células pulpares humanas cultivadas em presença de dois fatores de crescimento: TGF- β 1 (fator de crescimento transformante beta 1) e aFGF (fator de crescimento para fibroblastos ácido)” a cargo da cirurgiã-dentista Simone Bonato Luisi, dos quais estou informado, e autorizo a doação do dente cuja extração já havia sido previamente indicada e que vim hoje extrair.

Assinatura do paciente

Porto Alegre, ____ de _____ de 2005.

ANEXO 3: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFRGS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliou e aprovou seu Projeto de Pesquisa, em reunião nesta data.

Projeto: " AVALIAÇÃO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS CULTIVADAS EM PRESENÇA DE DOIS FATORES DE CRESCIMENTO: TGF- β 1 (FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA 1) e FGF (FATOR DE CRESCIMENTO PARA FIBROBLASTOS ÁCIDO)

**Autores: CD Simone Bonato Luisi e Prof. João Jorge Diniz Barbachan
Relator: Prof. Manoel Sant'Ana Filho**

Parecer: O objetivo deste Projeto é criar um modelo "in vitro" de Conjuntivo Pulpar com vistas a testes terapêuticos. A polpa será obtida de dentes extraídos (3^o molares-sisos) com indicações de rotina quando estes dentes não tem condições de erupção e usualmente são descartados. O Pesquisador não participa da indicação nem da cirurgia. O Consentimento Informado está claro permitindo a livre escolha do paciente em doar seu dente. O anonimato está garantido. Considerando o exposto, pela aprovação.

Porto Alegre, 19 de agosto de 2003.



Profa. Marisa Maltz
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 4: FOTOS DO 2º ARTIGO
“USO DE ANFOTERICINA B COMO ANTIFÚNGICO NO MEIO DE
CULTURA PARA CÉLULAS PULPARES HUMANAS”

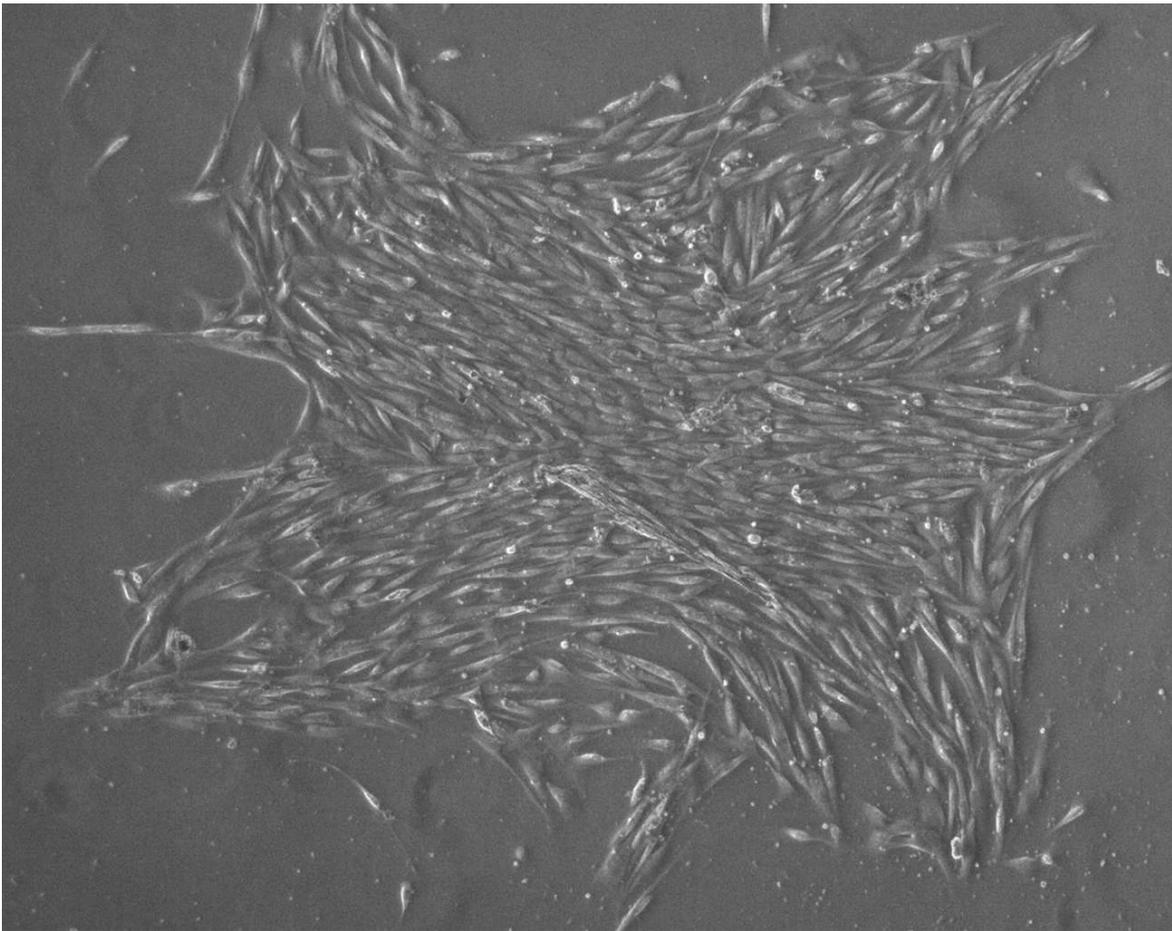


Figura 1A da página 42. Células cultivadas no meio A. Formação inicial de núcleos de crescimento. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X.

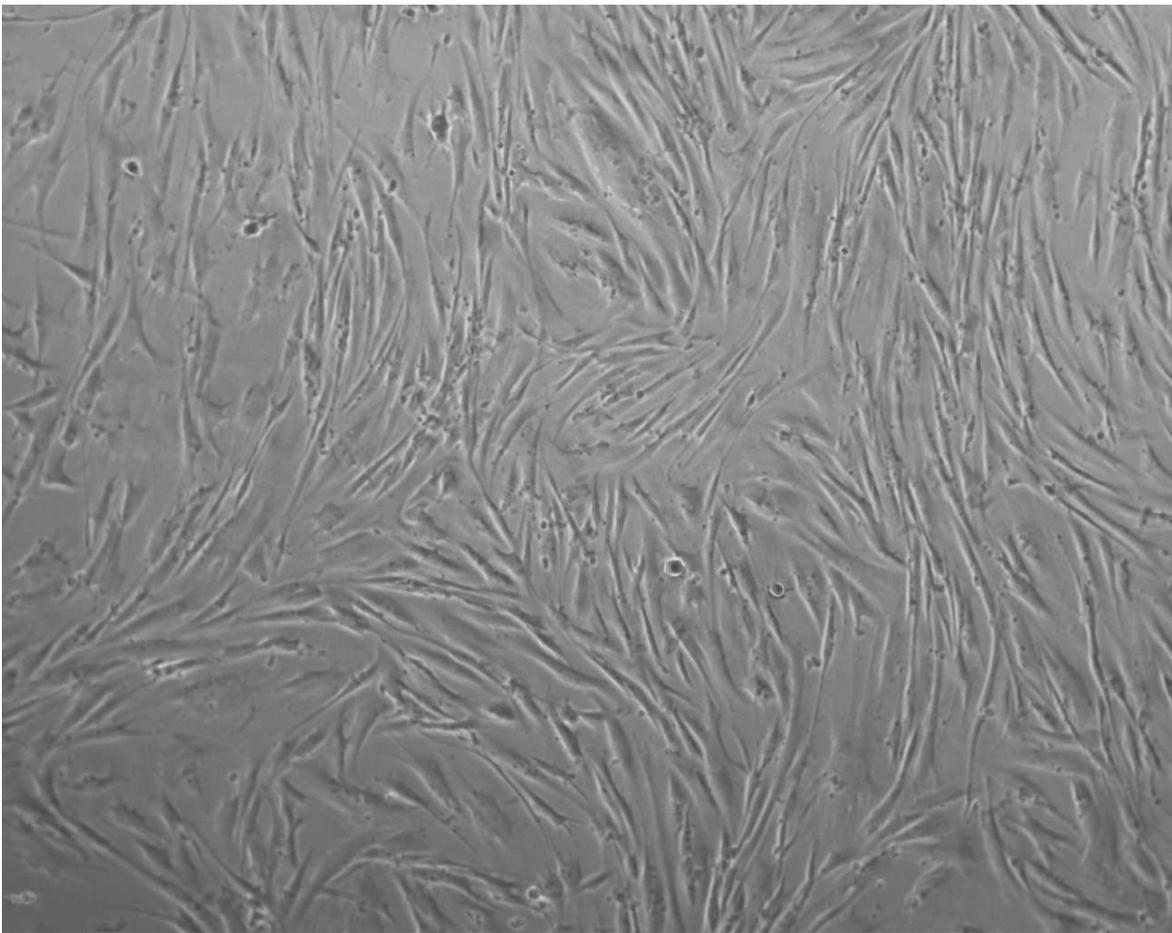


Figura 1B da página 42. Células cultivadas no meio A. Distribuição celular após os repiques. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X.

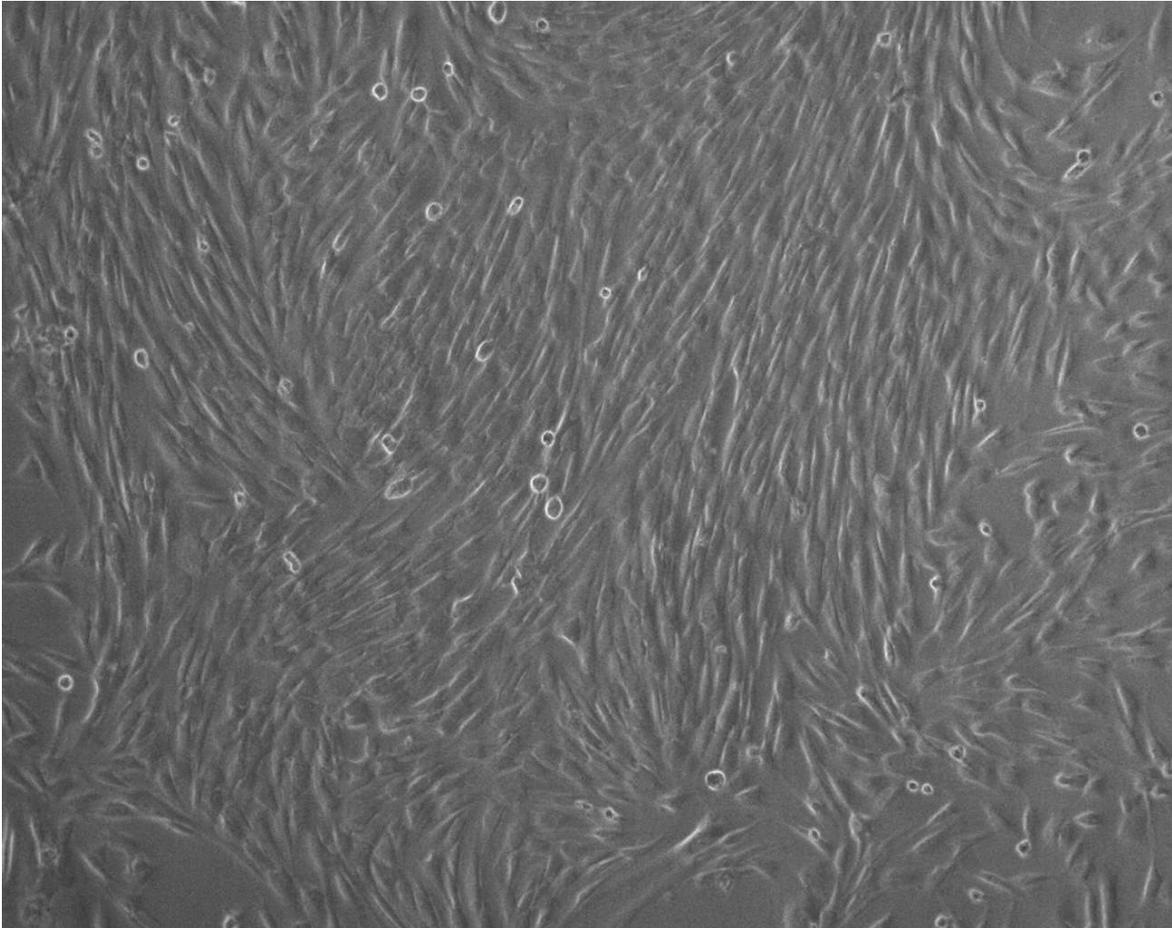


Figura 1C da página 42. Células cultivadas no meio A. Células confluentes e formação de um grande tapete celular. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X.



Figura 1D da página 42. Células cultivadas no meio A. Células afiladas e estreladas, com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 200X.