

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS PULPARES HUMANOS

Daniela F. Maluf<sup>1</sup>, Sandro Germano<sup>2</sup>, Paulo Worfel<sup>3</sup>, William C. Da Silveira<sup>4</sup>, Yasmine M. Pupo<sup>5</sup>

### RESUMO

A evolução da Odontologia possibilita o surgimento de novos sistemas adesivos, os quais devem ser compatíveis com os tecidos dentais para que ocorra a adesão dos materiais envolvidos. Sendo assim, muitas empresas desenvolvem compostos mais hidrofílicos obtendo materiais que interagem melhor com a dentina, porém esta hidrofiliabilidade possibilita maior penetração, atingindo a região pulpar, podendo causar assim citotoxicidade local. O objetivo deste trabalho é desenvolver um método para obtenção da cultura de fibroblastos humanos pulpares para que a citotoxicidade de sistemas adesivos e outros materiais odontológicos possa ser testada *in vitro*. A polpa foi obtida de dentes extraídos com auxílio de com uma ponta diamantada, em alta rotação. Após fragmentada em pedaços menores com auxílio de uma lâmina de bisturi, o material pulpar foi imerso em solução de colagenase 2,5% e incubado a 37°C. Procedimentos de cultivo celular foram aplicados para proliferação e adesão das células às placas.

**Palavras-chave:** Adesivos dentinários. Citotoxicidade. Fibroblastos pulpares humanos.

### ABSTRACT

The evolution of dentistry allows the emergence of new adhesive systems and these systems must be compatible with the dental material for adhesion of materials involved. Therefore, many companies develop more hydrophilic compounds obtaining materials that interact better with dentin, however this hidrofiliabilidade enables greater penetration, reaching the pulp and region that can cause local cytotoxicity. The aim of this work is to develop a method for obtaining human pulp fibroblasts culture so that the cytotoxicity of adhesive systems and other dental materials can be tested *in vitro*. The pulp has been obtained from extracted teeth with diamond-tipped, in high-speed. After fragmented into smaller pieces with a scalpel blade, pulp material was immersed in collagenase solution 2% and incubated at 37°C. Cultivation procedures were applied to afford cell proliferation and adhesion into the plates.

**Keywords:** Adhesives. Cytotoxicity. Human pulp fibroblasts.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e aprimoramento dos materiais restauradores estéticos fazem dos sistemas adesivos elementos fundamentais em diversas aplicações clínicas, sendo responsáveis pela união do material restaurador às estruturas dentárias. Os procedimentos

<sup>1</sup> Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas pela UFPR. Professora Adjunta dos Cursos de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Farmacêutico, Doutor em Processos Biotecnológicos pela UFPR. Coordenador do Curso de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Educador Físico, Mestre em Bioquímica pela UFPR. Professor Adjunto dos Cursos de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup> Acadêmico de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>5</sup> Cirurgiã-Dentista, Doutora, Mestre e Especialista em Dentística Restauradora pela UEPG. Professora Adjunta de Dentística, Materiais Dentários e Clínica Integrada - Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

adesivos consistem na aplicação de substâncias (ácidos, solventes e monômeros) que modificam a morfologia e fisiologia do esmalte e da dentina (CARVALHO *et al.* 2004).

A biocompatibilidade de materiais resinosos e de ácidos de aplicação direta na polpa ainda é assunto controverso. Apesar de diversos estudos sobre culturas de células terem demonstrado serem esses materiais citotóxicos (BOUILLAGUET *et al.* 1993; 1996; ADAMS *et al.* 1994; HANKS *et al.* 1991), outros experimentos demonstraram que existe reparação do material pulpar e formação de ponte dentinária quando do emprego de materiais resinosos ou ácidos diretamente sobre a polpa (COX *et al.* 1987; KASHIWADA; TAKAGI, 1991; SNUGGS *et al.* 1993; INOUE *et al.* 1996; COX *et al.* 1996; AKIMOTO *et al.* 1997). A presença de bactérias na interface dente/material restaurador tem sido apontada como principal fonte de alterações da polpa, seguindo restaurações com diferentes materiais (BRÄNNSTRÖM; NYBORG, 1971; COX *et al.* 1987).

Desse modo, quando da exclusão bacteriana, uma série de materiais poderiam proporcionar o reparo pulpar. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado diversas atividades citotóxicas, com a presença de resposta inflamatória crônica (PEREIRA *et al.* 1997; LANZA, 1997), degeneração (PASCON *et al.* 1996) ou necrose do órgão pulpar (COSTA *et al.* 1997; STANLEY; PAMEIJER, 1997) na aplicação de materiais resinosos adesivos sobre a polpa, mesmo na ausência de bactérias. Outros autores acreditam que a presença de partículas resinosas liberadas para o interior do tecido pulpar poderia ser a causa do fracasso dos capeamentos adesivos (LANZA, 1997), e que a toxicidade desses materiais poderia ser responsável pelos casos de necrose (COSTA *et al.* 1997). Além disso, como esses materiais utilizam ácidos como condicionadores, essa poderia ser outra fonte de irritação do órgão pulpar (RETIEF *et al.* 1974; STANLEY *et al.* 1975).

Varias pesquisas *in vitro* tem sido feitas no sentido de avaliar a citotoxicidade dos materiais resinosos utilizados na restauração de cavidades dentárias (PUPO *et al.* 2013; HANKS *et al.* 1992). Nessas pesquisas, os materiais experimentais, seus diferentes componentes isolados ou em combinação, ou ainda alíquotas desses componentes solubilizados em diferentes soluções foram colocados sobre células cultivadas em laboratório. A maioria dessas pesquisas relatou que os componentes solúveis liberados pelos materiais resinosos experimentais, particularmente os diluentes de baixo peso molecular, são os principais responsáveis pela citotoxicidade *in vitro* (KAGA M *et al.* 2001).

Este trabalho tem o objetivo de desenvolver o cultivo primário de células obtidas da polpa de dentes extraídos rotineiramente. Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias (FIOCRUZ, 2008). Essa

forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de uma linhagem celular *in vitro* devido à presença de suas características genotípicas e fenotípicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

*Equipamentos:* Centrífuga MPW high speed brushless centrifuge MPW-350R, Vortex Quimis Q-220A, Balança analítica Boeco Germany max 210g d=0,1mg, Banho-maria Fanem mod 100, Microscópio de fase invertido Medilux N.A. 0.3, Estufa de CO<sub>2</sub> Shel lab mod 5115, Fluxo laminar VECO Bio seg 09, Microscópios Taimin TM 212 e Bioval L1100A, Micropipetas Labmate 20-200uL e Peguepet 100-1000uL. *Insumos:* Garrafas de cultivo estéreis, placas de 24 poços estéreis, placas de petri estéreis e pipetas estéreis.

### 2.1 Extração da Polpa

Foram utilizados como critérios de inclusão 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 Goldim (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 Universidade Estadual de Ponta Grossa, com parecer consubstanciado de n. 1.085.346.

As amostras foram obtidas a partir de seis terceiros molares humanos inclusos, com raiz completamente formada, após terem sido extraídos (sem odontosseção) por motivos ortodônticos, na Disciplina de Clínica Integrada da Universidade Tuiuti do Paraná. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido autorizando a utilização dos seus terceiros molares para a realização da pesquisa.

Imediatamente após a extração, os dentes foram colocados, próximos à uma lamparina, em frascos estéreis de transporte contendo meio com antibióticos: RPMI-1640 tamponado (Vitrocell Embriolife/SP); penicilina/estreptomicina 100 U.I./100 µg/mL (Vitrocell Embriolife/SP); sulfato de gentamicina 0,60 µg/mL (Garamicina, Shering Plought/RJ) e fungizona 2,5 µg/mL (Vitrocell Embriolife/SP).

Em uma câmara de fluxo laminar, os dentes foram retirados da solução de transporte onde foi feito um sulco horizontal de aproximadamente 2 mm de profundidade na superfície radicular de cada dente, abaixo da junção cimento-esmalte, com uma ponta diamantada, em alta rotação, onde a coroa foi separada da raiz com auxílio de um fórceps tornando possível a remoção da polpa intacta.

## 2.2 Obtenção das células pulpares

A polpa foi lavada sucessivas vezes em meio contendo antibióticos e então fragmentada com lâmina de bisturi. Seus fragmentos foram incubados a 37°C por 90 minutos, em tampão Hepes (tabela 1) contendo colagenase tipo I (StemCell Technologies/CA), enzima responsável pela desagregação enzimática das células. A solução tampão preparada foi esterilizada por ultrafiltração, em filtro com diâmetro de poro de 0,22 µm.

**Tabela 1-** Composição do tampão HEPES pH 7,4 contendo colagenase

Reagente	Concentração
HEPES	25 mMol
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mMol
NaCl	10 mMol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mMol
CaCl <sub>2</sub>	1 mMol
KCl	24 mMol
Glucose	0,5%
Manitol	12 mMol
Sulfato de Gentamicina	0,60 µg/mL
Penicilina/ Estreptomicina	100 U.I./ 100µg/mL
Solução colagenase	0,25%

A suspensão de células foi dividida igualmente em dois tubos e centrifugada a 800 g por 10 minutos a 4°C, com a finalidade de auxiliar a separação das células pulpares.

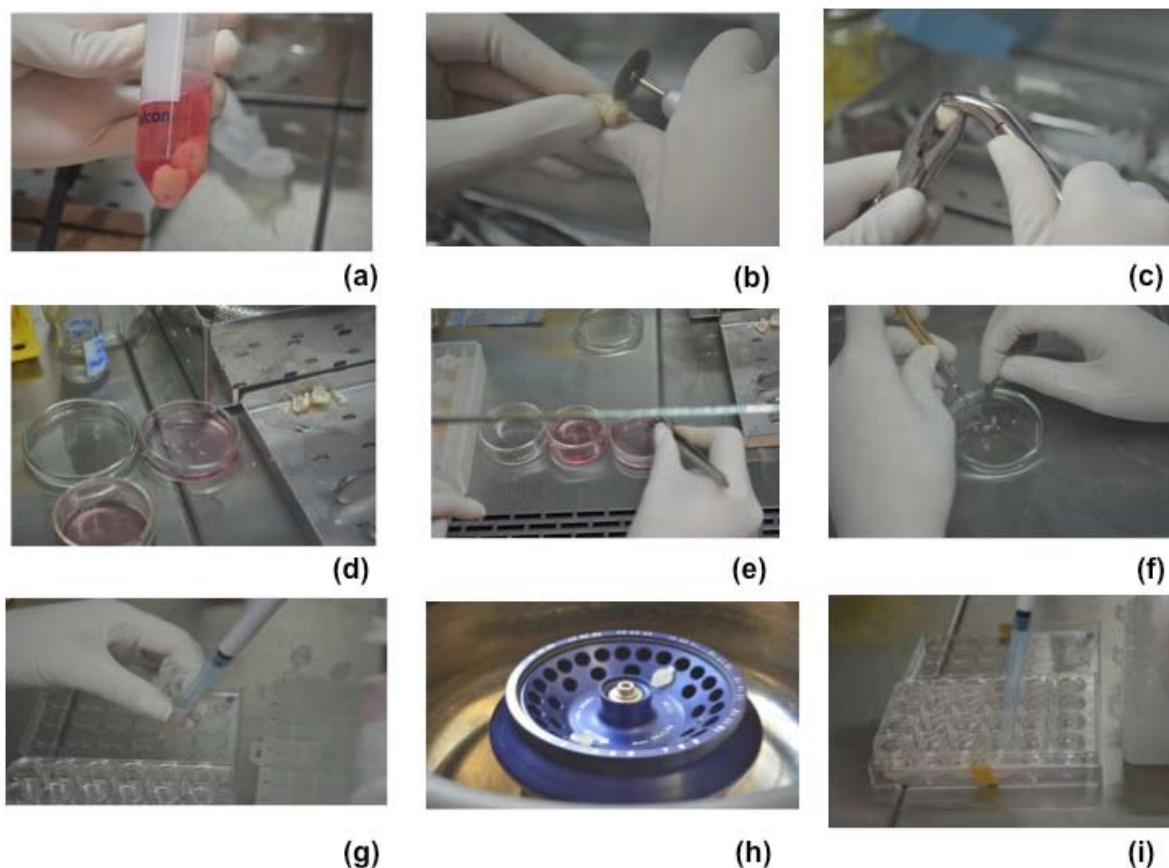
O material resultante foi ressuspenso em meio contendo: 1,5mL de meio RPMI-1640 (Vitrocell Embriolife/SP) suplementado com antibióticos: 100 µg/mL penicilina/ estreptomicina, 0,45 µg/mL de gentamicina e de soro fetal bovino na concentração de 20%, para auxiliar a inativação enzimática da colagenase e enriquecer o meio com o objetivo de favorecer a sobrevivência das células.

A suspensão celular foi distribuída em placa de 24 poços, que foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. As células de cada poço foram mantidas separadamente em culturas monocamada. Quando as células tornaram-se confluentes, estas foram colhidas com solução tripsina-EDTA 0,5% (Vitrocell Embriolife/SP) e transferidas para subculturas, na razão de 1:2, no respectivo meio de cultivo. A avaliação da adesão celular e possível contaminação foi visualizada em microscópio de fase invertido.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra o desenvolvimento do processo de obtenção e cultivo das células de fibroblastos pulpares humanas.





**Figura 1-** Processo de obtenção de células pulpares humanas: (a) dentes extraídos em meio de transporte; (b) sulco horizontal de aproximadamente 2 mm de profundidade feito na superfície radicular de cada dente; (c) coroa separada da raiz com auxílio de um alicate; (d) remoção da polpa íntegra; (e) lavagem da polpa em meio contendo antibióticos; (f) fragmentação mecânica da polpa com auxílio de bisturi; (g) fragmentação enzimática da polpa com incubação em tampão HEPES contendo colagenase; (h) centrifugação da suspensão; (i) cultivo das células em placa de 24 poços.

O método desenvolvido passou por várias etapas de otimização para definição das variáveis: a) tempo de incubação no tampão HEPES contendo colagenase; b) seleção de antibióticos e c) velocidade e tempo de centrifugação.

O tempo de incubação em que maior quantidade de células foi obtida foi de 90 minutos. A otimização da variável velocidade/tempo de centrifugação revelou que a centrifugação a 800g/10 minutos é eficaz sem comprometer a integridade das células. A etapa crítica do processo demonstrou ser a manutenção da esterilidade. Por repetidas vezes, a cultura celular foi comprometida pela contaminação por microrganismos. Considerando a flora microbiana da boca, diversas bactérias gram-positivas, gram-negativas e anaeróbias podem contaminar a amostra e inviabilizar a continuidade da cultura. Considerando este achado, a escolha dos antibióticos tanto para o meio de transporte, quanto para os meios de lavagem e de cultivo foi de extrema importância.

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o método proposto para obtenção de células pulpares humanas foi otimizado com sucesso, sendo avaliadas condições críticas para o experimento como tempo de incubação enzimática, velocidade/tempo de centrifugação e seleção de antibióticos. Estudos sobre citotoxicidade dos materiais dentários tornam-se possíveis e acessíveis pelo método empregado neste trabalho, proporcionando um melhor entendimento da biocompatibilidade desses materiais

A avaliação da citotoxicidade destes materiais utilizando técnicas de cultivo celular apresenta vantagens, como a simplicidade do método e baixo custo, sendo facilmente reprodutíveis, além disso, não envolve experimentos com animais *in vivo*.

## REFERENCIAS

- ADAMS, A. M.; SOAMES, J. V.; SEARLE, R. F. Citotoxicity studies of dental restorative materials using human periodontal ligament cells in vitro. *Int Endod J*, v. 27, n. 4, p. 171-177, July 1994.
- AKIMOTO, N.; MOMOI, Y.; KOHNO, A.; OTSUKI, M.; SUZUKI, S.; COX, C. F. Histologic observation of direct capped pulps with Liner Bond 2 Adhesive System. *J Dent Res*, v. 76, p. 78, 1997.
- BOUILLAGUET, S.; CIUCCHI, B.; HOLZ, J. Évaluation de lacytotoxicité de deux adhesifs dentinaires à l'aide de cellules pulpaires humaines en culture. *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, v. 103, n. 9, p. 1085-1091, Sept. 1993.
- BOUILLAGUET, S.; WATAHA, J. C.; HANKS, C. T.; CIUCCHI, B.; HOLZ, J. In vitro citotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*, v. 22, n. 5, p. 244-248, May 1996.
- BRÄNNSTRÖM, M.; NYBORG, H. The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composites resin materials. *Sven Tandlak Tidskr*, v. 64, n. 3, p. 149-155, Mar. 1971.
- CARVALHO, R.M. Sistemas Adesivos: fundamentos para aplicação clínica. *Biodonto.*, v.2, n.1, p.1-86, jan./ fev. 2004.
- COSTA, C.A.S.; MONTANO, T.C.P.; D'ABREU, M.C.F.; HEBLING, J.; GONZAGA, H.F.S. Avaliação histológica da capacidade de reparação do tecido conjuntivo pulpar de rato capeado com o sistema adesivo Scotchbond MP e o cimento de óxido de zinco e eugenol. *Rev Paul Odontol*, v. 19, n. 3, p. 26-32, maio/jun. 1997.
- COX, C. F.; KEALL, C.; KEALL, H. J.; OSTRO, E.; BERGEHOLTZ, G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent*, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1987.
- FALCONI, M.; TETI, G.; ZAGO, M.; PELOTTI, S.; BRESCHI, L.; MAZZOTTI, G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biology and Toxicology*, v.23, n.5, p.313-322, 2007.
- HANKS, C. T.; STRAWN, S. E.; WATAHA, J. C.; GRAIG, R. G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, v. 70, n. 11, p. 1450-1455, Nov. 1991.
- HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; PARSELL, R. R.; STRAWN, S. E.; FAT, J. C. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil*, v. 21, n. 12, p. 475-487, Dec. 1994.
- KAGA M, NODA M, FERRACANE JH, NAKAMURA W, OGUCHI H, SANO H. The in vivo cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effects on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater*. 17:333-9, 2001.

LANZA, L. D. Avaliação clínica e microscópica de um sistema adesivo aplicado em proteções pulpares diretas de dentes humanos. Bauru, 140 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1997.

Manutenção de linhagens de células animais. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

MIYAKI, C. *et al.* Micoplasma como contaminante de culturas mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. Rev. Saúde públ. S. Paulo, 23:39-44, 1989.

NAKASHIMA M Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. Arch Oral Biol 36:655-663, 1991.

PASCON, E. A.; ALMEIDA, A. W.; RODRIGUES, M. A. O.; ALVES, E.P.C. Resposta tecidual ao ataque ácido direto sobre exposições pulpares. In: reunião da sociedade brasileira de pesquisa odontológica, 1996, Águas de São Pedro. Anais. São Paulo : SBPqO, p. 57. [Resumo n. 44]. 1995.

PEREIRA, J. C.; SEGALA, A. D; COSTA, C. A. S. Human pulp response to direct capping with na adhesive system: histologic study. J Dent Res, v. 76, p. 180, [Resumo n. 1329]. 1997.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater, v. 15, p. 175-190, 1994.

PUPO, Y.M.; FARAGO, P.V.; NADAL, J.M.; ESMERINO, L.A.; MALUF, D.F.; ZAWADZKI, S.F.; MICHÉL, M.D.; SANTOS, F.A.; GOMES, O.M.M.; GOMES, J.C. An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition. DOI: 10.1080/09205063.2013.766784, 2013.

RETIEF, D. H.; AUSTIN, J. C.; FATTI, L. P. Pulpal response to phosphoric acid. J Oral Pathol, v. 3, n. 2, p. 114-122, Feb. 1974.

ROBINSON, L.B.; WICHELBRAUSEN, R.H.; RAZINAN, B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia organisms. Science, 124:1147-8, 1956.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. J Dent, v. 22, p. S21-S24. 1994. Suplemento 2.

STANLEY, H. R. Biological evaluation of dental materials. Int Dent J, v. 42, n. 1, p. 37-44, Feb. 1992.

STANLEY, H. R; PAMEIJER, C. H. Sequential death of exposed pulps with "Total-etch"/bonding treatments. J Dent Res, v. 76, p. 78, [Resumo n. 519]. 1997.

STANLEY, H. R.; GOING, R. E.; CHAUNCEY, H. H. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. J Am Dent Assoc, v. 91, n. 10, p. 817-825, Oct. 1975.