

A cultura de células como ferramenta para estudos do comportamento pulpar

Cell culture as a tool for dental pulp behavior studies

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

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 extra-celular, 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.

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 extra celular 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 cientí-

fico 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 Unda¹ et al., (2000), 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 para dissociação dos tecidos. Cada papila dental foi embebida em 10µl de meio de cultura semi-sólido contendo BGJβ (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 celular, 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), TGFβ1 (fator de crescimento transformante beta 1), FGF1 + FGF2, FGF1 + TGFβ1 e FGF2 + TGFβ1).

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 seções transversais de 2mm de espessura. Em ambos os casos os tecidos foram embebidos em meio DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Minimum Essential 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 em ar, 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

* 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.

¹ 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).

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 dentes 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 *slíces* foram mantidos em culturas de *Trowel-type* por 7 dias. Após a cultura, os *slíces* 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 vantajoso, visto que a dentina tem origem a partir de células pulpares 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 anti-micótico 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 núcleo polarizado 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 ressuspenso 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 5X10⁴ 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 sub-cultivadas 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 - N²- 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, atapeando 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 linha 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/estreptomomicina). 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; 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, estreptomomicina e colagenase bacteriana. A suspensão de células foi centrifugada 800g por 10 minutos e o material resultante foi ressuspenso em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomomicina 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 x 10⁵ 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, estreptomomicina, 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 seções 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 CO₂. 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 TGFβ1.

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 diplóides 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 180g. 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 ressuspenso 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 x 10⁵ células. O pH do meio

foi estabelecido em 7,4 com NaHCO_3 e as células foram mantidas sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2 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 46ª subcultura. A densidade de inoculação celular foi de $0,6-1 \times 10^4/\text{cm}^2$. Após a 52ª 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 de fosfatase alcalina foi usado para os 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 diplóides 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 $\text{TGF}\beta$ 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 me-

canismos 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 supra-numerários 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 CO_2 a 37°C. As células foram tripsinizadas e sub-cultivadas a 1×10^6 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 culturas 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 5ª passagem.

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 *slíces* 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 pulpares 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 pulpares em cultura é importante para o desenvolvimento de metodologias que objetivam a regeneração dentária e tecidual.

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, extracellular 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.

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

AUTORES	ORIGEM	DENTES	MATERIAL EMPREGADO	MEIOS UTILIZADOS E EMPREGO
Begue-Kirm et al., apud Unda et al., 2000	Camundongos Swiss (17 dias)	1 ^o Molares inferiores	Papila dental	Meio semi-sólido contendo BGJ β e 5% de Agar; Estudo da dentinogênese primária
Unda et al., 2000	Camundongos Swiss (17 dias)	1 ^o Molar inferiores	Papila dental	Meio semi-sólido contendo BGJ β e 5% de Agar; Estudo do FGF1, FGF2 e TGF β 1
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 TGF β 1, 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 ^o 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 TGF β e seus receptores
Tjäderhane et al. 1998	Humanos (18-25 anos)	3 ^o Molares	Polpa; Odontoblastos da coroa	Meio líquido OPTI-MEM I; Agarose + OPTI-MEM I; Estudo dos odontoblastos maduros.
Palosaari et al. 2000	Humanos	3 ^o 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 ^o Molares	Odontoblastos da coroa	Meio líquido DMEM; Observar odontoblastos após preparo cavitário
Shirakawa et al. 1994	Humanos	3 ^o Molares	Polpa dissociada	Meio líquido DMEM para estudo dos efeitos do TGF β 1 sobre a polpa.
Magloire; Joffre; Bleicher, 1996	Humanos (12-22 anos)	3 ^o Molares	<i>Slices</i>	Meio líquido BME Analisar o comportamento pulpar após preparo cavitário.
Melin et al., 2000	Humanos	3 ^o Molares	<i>Slices</i>	Meio líquido BME; Estudo da influência do TGF β 1 no reparo pulpar.
Feigal et al., 1985	Humanos (19-24 anos)	3 ^o Molares	Polpa Linhagem L929	Meio líquido Dulbecco 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 TGF β .
Nishikawa et al., 2000	Ratos Wistar machos	Incisivos Superiores	linhagem RPC-C2A	Meio Líquido MEM, TGF β e análise dos constituintes glicosaminoglicanos e o efeito do TGF β em sua síntese.
Tsukamoto et al., 1992	Humanos	Dentes decíduos e supra-numericos	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 ^o Molares	Polpa	Meio líquido RPMI. Estudo sobre a formação de nódulos mineralizados.

REFERÊNCIAS

- ALLIOT-LICHT, B. ; HURTREL, D. ; GREGOIRE, M. Characterization of a-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 Cytotoxic 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.

Recebido: 19 de maio/2004
Aceito: 25 de junho/2004

Endereço para correspondência:

Profa. Simone Bonato Luisi
Faculdade de Odontologia da PUC-RS
Av. Ipiranga, n° 6681
- Prédio 6 CEP90619 900
Porto Alegre, RS, Brasil
e-mail:
simoneluisi@terra.com.br