

## TOLERÂNCIA DAS CÉLULAS TRONCO PULPARES DE DENTES PERMANENTE E DECÍDUOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

**CAMILA PERELLÓ FERRÚA<sup>1</sup>; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO<sup>1</sup>; FERNANDA NEDEL<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – camila\_perello@hotmail.com*

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Católica de Pelotas – fernanda.nedel@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

O Estresse Oxidativo (EO), desequilíbrio entre produção e remoção de Radicais Livres (RLs) através do sistema antioxidante (HALLIWELL et al., 2004) pode afetar significativamente moléculas biológicas essenciais como o DNA, as proteínas e os lipídios levando à sua modificação e frequentemente à inutilização, inibindo sua função normal (VALKO et al., 2007). O excesso de RLs está intimamente relacionado com mutações, envelhecimento e morte celular (DIZDAROGLU et al., 2002), podendo desencadear vários tipos de cânceres, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do fôro neurológico (VALKO et al., 2007).

Dessa forma, faz-se imprescindível o controle da concentração de RLs, por um sistema antioxidante, o qual é composto por duas vias, enzimática e não enzimática (VALKO et al., 2007), cujo objetivo é impedir que possíveis danos oxidativos se amplifiquem e culminem em danos sistêmicos irreparáveis (SHAMI et al., 2004). O sistema enzimático encontra-se espalhado por todo o organismo, no meio intra e extracelular, incluindo enzimas como a catalase, superóxido desmutase e glutatona peroxidase. O sistema não enzimático, por sua vez, é constituído por substâncias de origem endógena e da dieta.

É sabido que o corpo humano é capaz de regular a produção de RLs de modo controlado. Entretanto, sabe-se que esse mecanismo de defesa natural nem sempre consegue desempenhar sua função de forma eficaz (VALKO et al., 2007). Nesse contexto, tornou-se imprescindível a busca por métodos capazes de coibir de forma eficaz o EO. Dessa forma, uma nova alternativa proposta para combater o EO é o uso de células tronco mesenquimais (CTMs).

Recentemente, as CTMs têm sido consideradas como uma possível estratégia terapêutica em indivíduos com doenças relacionadas ao EO, como o infarto agudo do miocárdio, a isquemia cerebral e a diabetes. As CTMs possuem atividade antioxidante e adaptação a um ambiente de EO muito mais elevadas se comparadas a outros tipos celulares. Estas células apresentam altos níveis intracelulares de enzimas requeridas para o reparo do DNA (VALLE-PRIETO et al., 2010) e ainda poderiam combater o EO, por atividade parácrina (LIU et al., 2012).

Inserido nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido estudos nessa área. Dessa forma esse estudo preliminar teve o objetivo de, através de um ensaio dose-resposta, determinar a concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o tempo de contato com as células tronco pulpares de dentes permanentes (DPSCs) e as células tronco pulpares de dentes decíduos (SHEDs) necessários para alterar a viabilidade celular.

### 2. METODOLOGIA

## 2.1. Ensaio dose-resposta do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A viabilidade das DPSCs e SHEDs foi avaliada, após insulto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através do ensaio colorimétrico de MTT. As células nas passagens 3 e 10, foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço e volume de 100 µL/poço. Subsequentemente, após 24 horas de incubação foram acrescentados 100 µL de uma solução composta de meio de cultivo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 600, 700, 800 e 900 µM nas células da passagem 3. Ao passo que as células da passagem 10, foram submetidas às concentrações de 50, 100, 250 e 500 µM.

Após 2, 6 e 12 horas de contato, foram adicionados ao meio de cultivo 20 µL de MTT (5 mg de MTT/mL de meio de cultivo) por poço e incubado por 3 horas. Desprezou-se o líquido contido nos poços, adicionou-se 200 µL de DMSO e colocou-se as placas em um shaker por 5 min a 150 rpm. A leitura da absorbância foi realizada em espectofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em um comprimento de onda de 450 nm. A avaliação dos dados foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de  $p < 0,05$ . Para a elaboração dos gráficos foi utilizado o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado nas Figuras 1 e 3, inicialmente optou-se em avaliar a viabilidade de DPSCs e SHEDs, na passagem 3, após o contato com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 600, 700, 800 e 900 µM. Contudo, após análise dos achados, percebeu-se que a partir da concentração de 500 até 900 µM, as células mostram uma tendência linear de perda de viabilidade. Dessa forma, ao analisar a viabilidade celular na passagem 10 (Figuras 2 e 4), optou-se por pelas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

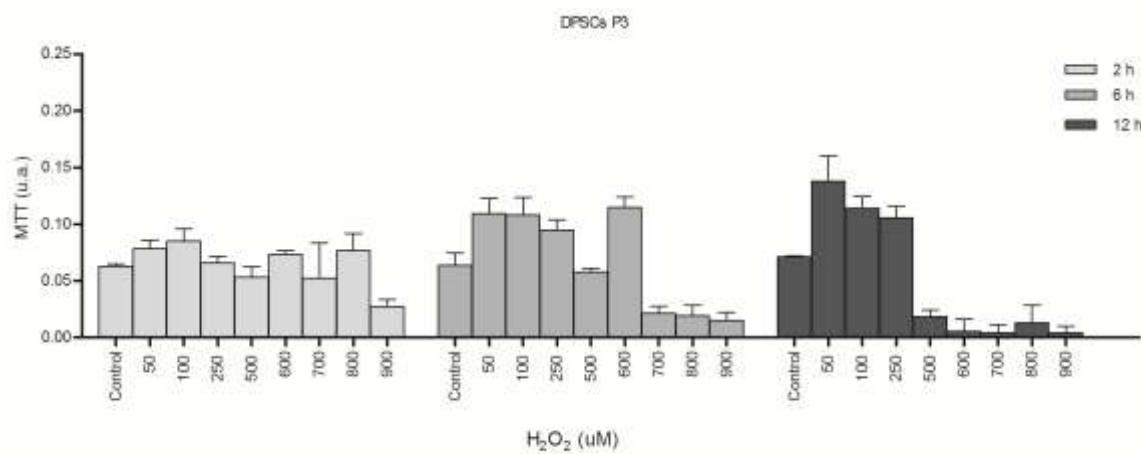


Figura 1: Viabilidade das DPSCs, na passagem 3, ao serem submetidas a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, 250, 500, 600, 700, 800 e 900 µM), por um período de tempo de 2, 6 e 12 horas.

Ao compararmos as passagens 3 (Figuras 1 e 3) e 10 (Figuras 2 e 4) em relação as DPSCs percebemos não haver grande diferenças na resposta celular. No entanto, quando avaliamos as SHEDs podemos observar que existe uma tendência de melhor adaptação ao insulto quando as células estavam na

passagem 10. Acredita-se que tal comportamento deva-se ao fato das células estarem em fases diferentes de desenvolvimento, uma presente em dente decíduo e o outro em dente permanente. Nesse sentido, poderia ser sugerido que ao pensarmos em utilizar as DPSCs em uma abordagem de terapia celular, a fim de tolerar altos níveis de EO no organismo humano, poderíamos pensar em ambas as passagens celulares, enquanto que para as SHEDs o mais apropriado seria a utilização das células na passagem 10.

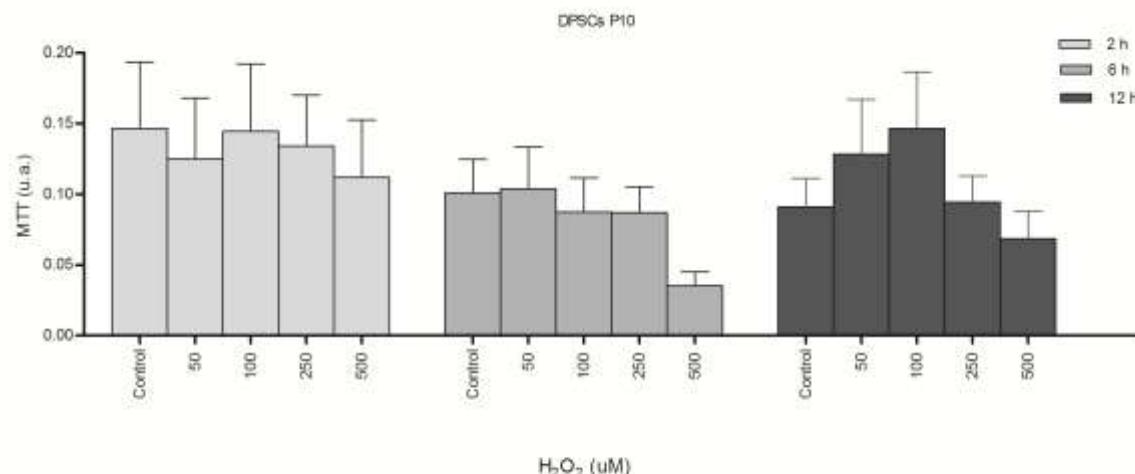


Figura 2: Viabilidade das DPSCs, na passagem 10, ao serem submetidas a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, 250 e 500 uM), por um período de tempo de 2, 6 e 12 horas.

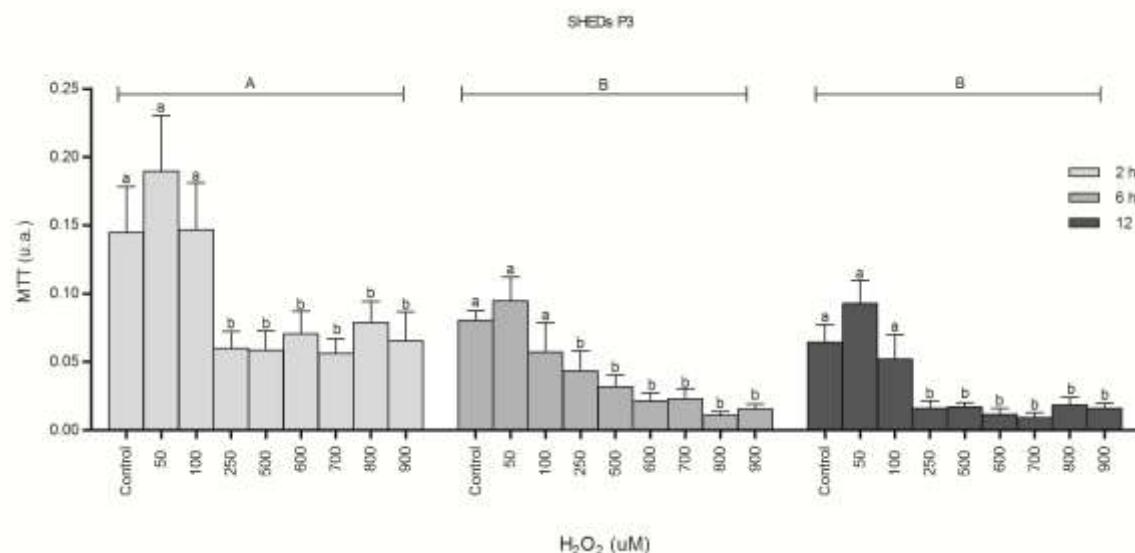


Figura 3: Viabilidade das SHEDs, na passagem 3, ao serem submetidas a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, 250, 500, 600, 700, 800 e 900 uM), por um período de tempo de 2, 6 e 12 horas. As letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre o tempo de exposição. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas. O valor de p <0,05 foi considerado significante (teste de Tukey).

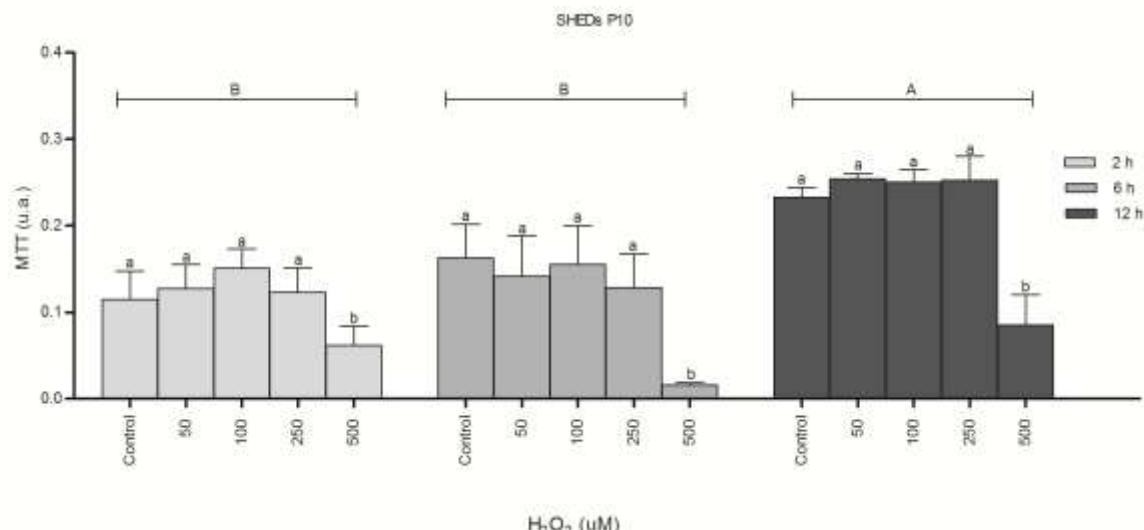


Figura 4: Viabilidade das SHEDs, na passagem 10, ao serem submetidas a diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ), por um período de tempo de 2, 6 e 12 horas. As letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significante entre o tempo de exposição. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações testadas. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significante (teste de Tukey).

Ao analisarmos o efeito das diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podemos sugerir que até a concentração de 250  $\mu\text{M}$  para as DPSCs independente da passagem, e para as SHEDs na passagem p10 e na concentração de 100 na passagem p3, seria tolerado pelas células tronco pulparas.

#### 4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que as DPSCs e as SHEDs possuem capacidade de adaptação a um insulto com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo concentração-dependente. Além disso, observou-se que a concentração de 50-250  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  parecem ser tolerados pelas células tronco pulparas. Ainda, parece que o insulto com  $\text{H}_2\text{O}_2$  é bem tolerado pelas DPSCs na passagem 3 e 10, enquanto que a reação das SHEDs parece ser diferente. Assim, embora se saiba da necessidade de aprofundar os conhecimentos nessa área, sugere-se que as DPSC na passagem 3 e 10 e as SHED na passagem 10 poderiam ser mais interessantes para a terapia celular.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v.142, n.2, p.231-55, 2004.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIOGLU, M. ; RODRIGUEZ, H. Free radicalinduced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radic Biol Med**, v.32, n.11, p.1102-15, 2002.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M. ; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.
- SHAMI, N. J. I. E. e MOREIRA, E. A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** v.17, n.2, p.227-236, 2004.
- VALLE-PRIETO, A.; CONGET, P. A. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. **Stem Cells Dev**, v.19, n.12, p.1885-93, 2010.
- LIU, H.; MCTAGGART, S. J.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Anti-oxidant pathways are stimulated by mesenchymal stromal cells in renal repair after ischemic injury. **Cytotherapy**, v.14, p.162–172, 2012.