

Comparação de dois diferentes métodos colorimétricos, SRB e WST-1, na avaliação da proliferação de células-tronco pulpare

NEDEL, Fernanda¹; SOKI, Fabiana Naomi²; CONDE, Marcus Cristian Muniz³; ZEITLIN, Benjamin D⁴; TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves⁵; NOR, Jacques Eduardo⁶; DEMARCO, Flávio Fernando⁷.

¹ Acadêmica da Faculdade de Odontologia – UFPel

² Doutoranda, Escola de Odontologia - Universidade de Michigan

³ Mestrando, Faculdade de Odontologia – UFPel

⁴ Professor PhD, Laboratório de Angiogenese da Escola de odontologia – Universidade de Michigan

⁵ Professora PhD, Departamento de Semiologia e Clínica da Faculdade de Odontologia – UFPel

⁶ Professor PhD, Cariologia, Ciência Restauradora e Endodontia da Escola de Odontologia – Universidade de Michigan

⁷ Professor PhD, Departamento de Odontologia Restauradora - UFPel
Faculdade de Odontologia – Rua Gonçalves Chaves n°457 – CEP 96015-560.

fernanda.nedel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A determinação da viabilidade e proliferação celular se tornou uma tecnologia essencial nas ciências da vida. Ensaio colorimétricos modernos tem sido otimizados para o uso em micro placas, permitindo que muitas amostras sejam analisadas rapidamente e simultaneamente (Weyermann et al., 2005).

A sulforrodamina B (SRB) tem sido amplamente empregada para a avaliação da citotoxicidade e proliferação celular em ensaios em microplacas (Lin et al. 1999). A SRB é um corante arroxeado que, em condições moderadamente ácidas, se liga a aminoácidos básicos da proteína celular, e se dissocia em condições básicas. A ligação da SRB é estequiométrica, e a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é diretamente proporcional a massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células (Papazisis et al. 1997, Vichai & Kirtikara 2006).

O sal de tetrazólio é à base de outro teste colorimétrico representado amplamente pelo MTT, XTT e WST-1. Em contraste com a SRB, o ensaio com o sal de tetrazólio é baseado na redução metabólica do sal em um produto final pigmentado chamado formazan (Berridge, 1996). Este ensaio colorimétrico é utilizado extensivamente em procedimentos histoquímico, análises de citotoxicidade e proliferação celular, análise enzimática e rastreamento bacteriológico (Berridge 1996). Mais especificamente o WST-1 tem sido usado em células-tronco embrionárias (Dvorak et al. 2005), células tronco mesenquimais (Dang et al. 2006) e células-tronco de polpa dental.

Até o presente momento, nenhum estudo realizou uma comparação entre os dois ensaios colorimétricos para a avaliação de células-tronco pulpare (DPSCs). Essa comparação é de fundamental importância no estudo das DPSC para engenhar tecidual voltada à odontologia. Assim, este estudo objetivou comparar dois ensaios colorimétricos (SRB e WST-1) na avaliação da

proliferação de duas linhagens celulares: células-tronco pulpares (DPSC) e fibroblastos humanos da polpa dental (HDPF).

2. MATERIAL E MÉTODOS

As células- tronco pulpares (DPSC), fornecidas pelo Dr. Songtao Shi da Unidade de Biologia Dental NIH, e os fibroblastos humanos da polpa dental (HDPF) foram cultivadas com Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com baixo teor de glicose (DPSC) ou alto teor de glicose (HDPF) - (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), sendo incubadas a 37°C com 5% CO₂. Durante o experimento foram usadas células da 4-6 passagem.

Quando chegaram a subconfluência (80%) as DPSC e HDPF foram destacadas com tripsina/EDTA 0,25% (Invitrogen). A suspensão de cada linhagem celular foi distribuída em placas de cultivo celular (ELISA) de 96 poços, com uma densidade celular de 0.25 x 10⁴ em 200 µl de meio específico e incubadas (37°C in 5% CO₂). A densidade celular relativa foi então determinada após 24, 48 e 72 h usando os dois ensaios colorimétricos (SRB e WST-1). Então, a absorbância a 450 nm foi medida por um espectrofotômetro.

Os dados foram submetidos à análise utilizando teste Student's (comparação entre as linhagens celulares), ANOVA e teste Tukey (intervalos de tempo) e o teste de correlação de Pearson' para comprar os dois testes com dois tipos celulares. A análise estatística foi realizada utilizando o software Sigmastat 2.0 (SSPS, Chicago, IL, USA), com nível de significância de p<0.05. Para cada condição/tempo foram realizadas triplicatas e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o ensaio com SRB, quando comparado a proliferação celular (densidades celulares) entre as linhagens celulares, em cada tempo (24, 48 e 72 horas), as médias da densidade celular foram maiores para as DPSC do que para as HDPF (p<0.05) (Figura 1). Os mesmos resultados foram observados com os ensaios com WST-1, com as HDPF mostrando uma densidade celular mais baixa que as DPSC (p<0.05) (Figura 2).

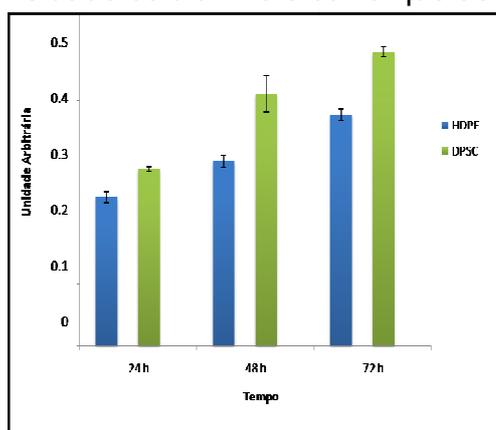


Figure 1- Proliferação das linhagens celulares (HDPF e DPSC) através do tempo utilizando a **SRB** como método colorimétrico.

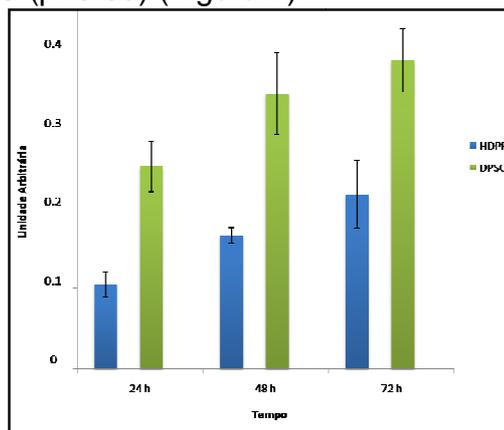


Figure 2- Proliferação das linhagens celulares (HDPF e DPSC) através do tempo utilizando a **WST-1** como método colorimétrico.

As DPSCs têm sido caracterizadas como células-tronco clonogências e com grande capacidade proliferativa (Gronthos et al. 2000), enquanto que as

HDPF são mais diferenciadas e, portanto, mais suscetíveis a terem uma menor capacidade proliferativa, fato que pode explicar as diferenças de densidade celular encontrada neste estudo entre as linhagens celulares.

Além disso, os diferentes intervalos de tempo apresentaram um aumento significativo na densidade celular, para ambas as linhagens, entre 24 e 72 horas como mostra a Figura 1 para o ensaio com SRB ($p < 0.05$) e para WST-1 na Figura 2 ($p < 0.05$).

As tendências de proliferação foram às mesmas em ambos os métodos colorimétricos, onde uma correlação positiva foi estabelecida para DPSC (Coeficiente de Correlação = 0.847, $p < 0.05$) (Figura 3). Em relação às HDPF também houve uma correlação (Coeficiente de Correlação = 0.775, $p < 0.05$) (Figura 4).

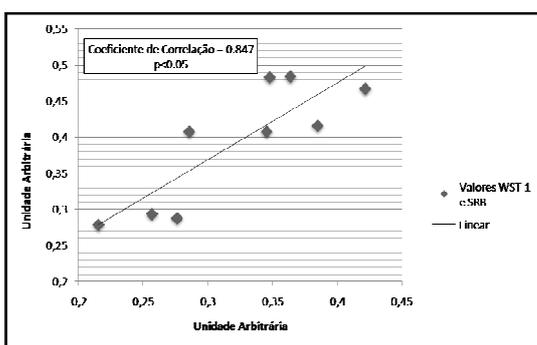


Figure 3- Correlação gráfica entre os dois ensaios colorimétricos, WST-1 e SRB para DPSC (Correlação Coeficiente = 0,847, $p < 0.05$).

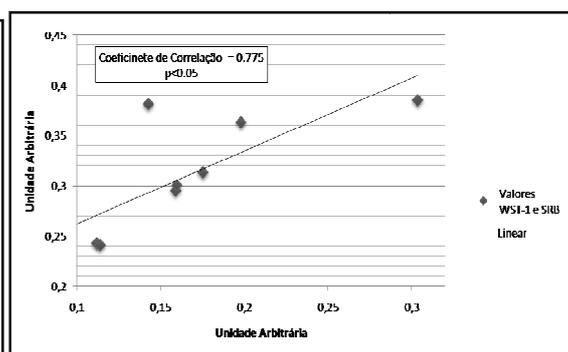


Figure 4- Correlação gráfica entre os dois ensaios colorimétricos, WST-1 e SRB para HDPF (Correlação Coeficiente = 0,847, $p < 0.05$).

Diferenças específicas entre as linhagens celulares têm sido observadas tanto para ensaios com SRB como com MTT (Keepers et al. 1991). Variações específicas nas linhagens celulares foram mais pronunciadas com a metodologia do MTT, devido à diferença maior na habilidade de reduzir o corante ao seu produto formazan do que variações no conteúdo de proteína entre as linhagens celulares (Keepers et al. 1991). Testes baseados na redução do sal de tetrazólio podem ter o seu mecanismo inibido por mudanças nos níveis celular de NADH, glicose e outros fatores intracelulares (Houghton et al. 2007). Portanto, para garantir a qualidade dos resultados, é importante testar a resposta das DPSC em relação aos ensaios colorimétricos que são comumente utilizados para avaliar a proliferação celular.

Ao avaliar o uso dos métodos colorimétricos no dia-a-dia do laboratório, alguns aspectos práticos devem ser enfatizados. O ensaio com a SRB é executado normalmente em mais de cinco horas, independente do tipo de célula. Em contrapartida, ensaios com o WST-1 requer aproximadamente uma hora em DPSC (dado baseado no presente estudo), sendo o intervalo sugerido pelos fabricantes de 0,5 – 4 horas dependendo do tipo de célula.

O ensaio com SRB é uma técnica que requer várias etapas, e um passo bastante crítico, sujeito a erro, é a adição inicial de ácido tricloroacético (TCA). O ácido deve ser acrescentado delicadamente para que as células não sejam desalojadas antes de serem fixadas, uma vez que as células são fixadas são extremamente resistentes a danos (Papazisis et al. 1997). Além disso, proteínas presentes no soro fetal bovino podem ser fixadas juntamente com as células. Isto pode levar a um aumento significativo dos valores de densidade

celular e aumentar o coeficiente de variação, contudo este fator pode ser controlado (Papazisis et al. 1997). Papazisis *et al.* (1997) relatou que a aspiração do meio de cultivo antes da fixação das células poderia oferecer um benefício significativo. Em contraste, o ensaio com o WST-1 requer menos atenção na metodologia. Uma vez que o WST-1 é aplicado às placas podem ser lidas em um espectrofotômetro e retornarem a incubadora para o desenvolvimento de uma pigmentação mais forte, procedimento que não pode ser executado com o SRB. Contudo após a fixação com TCA, placas coradas com SRB, fixadas e secas podem ser estocadas indefinidamente (Vichai & Kirtikara 2006).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, ambos os métodos colorimétricos, SRB e WST-1, podem ser utilizados eficientemente na avaliação da proliferação celular de células pulpares (DPSC e HDPS), apresentando dados com tendências similares. A escolha por um método ou outro deve estar baseado nas vantagens e facilidades de cada método, assim como nas condições e potenciais de cada laboratório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, 1996, 4, p. 14-9.
- DANG, J. M., SUN, D. D., SHIN-YA, Y., SIEBER, A. N., KOSTUIK, J. P., LEONG, K. W. Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells. **Biomaterials**, 2006, 27, p.406-18.
- DVORAK, P., DVORAKOVA, D., KOSKOVA, S., VODINSKA, M., NAJVIRTAVO, M., KREKAC, D., HAMPL, A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, 2005, 23, p. 1200-11.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G., SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, 97, p. 13625-30.
- HOUGHTON, P., FANG, R., TECHATANAWAT, I., STEVENTON, G., HYLANDS, P. J., LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, 2007, 42, p. 377-87.
- KEEPERS, Y. P., PIZAO, P. E., PETERS, G. J., VAN ARK-OTTE, J., WINOGRAD, B., PINEDO, H. M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer**, 1991, 27, p. 1717.
- LIN, Z. X., HOULT, J. R., RAMAN, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **Journal of ethnopharmacology**, 1999, 66, p. 141-50.
- PAPAZISIS, K. T., GEROMICHALOS, G. D., DIMITRIADIS, K. A., KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, 1997;208(2):151-8.

VICHAI, V., KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, 2006, 1, p. 1112-6.

WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, 2005, 288, p. 369-76.