

GUSTAVO DOS SANTOS COURA

**PROTOCOLO PRELIMINAR DA CULTURA DE
FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA. AVALIAÇÃO DA
VIABILIDADE CELULAR E DOS POSSÍVEIS DANOS
CAUSADOS AO DNA.**

Florianópolis
2004

GUSTAVO DOS SANTOS COURA

**PROTOCOLO PRELIMINAR DA CULTURA DE FIBROBLASTOS DE
GENGIVA HUMANA. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E
DOS POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS AO DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título em Mestre em Odontologia, área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientadora: Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2004

GUSTAVO DOS SANTOS COURA

**PROTOCOLO PRELIMINAR DA CULTURA DE FIBROBLASTOS DE
GENGIVA HUMANA. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E
DOS POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS AO DNA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, opção Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2004.

Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente

Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior
Membro

Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Membro

FICHA CATALOGRÁFICA

C858p Coura, Gustavo dos Santos
Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana.
Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao
DNA / Gustavo dos Santos Coura; orientador Ricardo de Souza Magini.
– Florianópolis, 2003.
92f. : il.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, 2003.

Inclui bibliografia.

1. Fibroblasto gengival. 2. Ensaio em cometa. 3. DNA. 4. Cultura
de tecidos. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III.
Título.

CDU 616.314-089.843

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

DEDICATÓRIA

À **Danielle**, Dani.
Presente sempre ao meu lado,
estimulando e tranquilizando.
Compreendeu, de coração aberto,
minha busca pela sabedoria.
Seu amor é inigualável.
Dividiu os momentos doces e amargos.
Você é contagiante.
Te amo.

Certa vez, li:
“Aos filhos, damos asas e raízes”
Obrigado, **MÃE**.

Honestidade e caráter.
Garra, muita garra. Dedicção.
Obrigado, **PAI**.

Aos meus pais, Cecília e João,
por fazerem de meus sonhos
os seus.

Às minhas irmãs, **Fernanda e Marina**.
“Quando escolhi as pessoas que me cercariam,
nos muitos momentos de nossa jornada,
não tive dúvidas
que vocês seriam, exatamente,
como revelaram ser: **AMÁVEIS**.”
Fico muito feliz pelo encontro de nossos caminhos.
Muito me orgulham, minhas irmãs.

Aos meus **amigos e familiares**.
Pela aprendizagem constante que tenho
no convívio com vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, pela orientação e confiança depositada em meu trabalho. Pela oportunidade de realizar o sonho da Pós-Graduação.

À **Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões**, co-orientadora, pelos ensinamentos sobre cultura celular. Pela abertura de seu laboratório para a realização de um trabalho conjunto.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, por aguçar meu senso crítico e pela orientação quanto aos recursos audiovisuais.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Freitas**, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela metodologia empregada para a avaliação dos dados. Ao **Prof. Dr. Camilo Rennó**, do INPE - São José dos Campos, pela realização da estatística em momento tão oportuno.

À minha irmã, **Fernanda dos Santos Coura**, escritora nas horas vagas, pelas sugestões na escrita desse trabalho. À **Michelle Soares de Andrade**, brasiliense, pela revisão realizada em um período tão curto.

À minha tia, **Terezinha**, secretária eficiente, pelo pronto atendimento (socorro) em muitos momentos durante a confecção desse trabalho.

Ao amigo **Nélson Dias**, pela preocupação e rapidez na revisão do abstract.

Ao amigo doutorando **Prof. Alberto João Zortéa Jr.**, pesquisador ativo neste trabalho. Sua contribuição foi de extrema valia. Agradeço por segurar as pontas, num momento decisivo, para a conclusão deste trabalho.

Ao amigo **Dr. Ronaldo Célio Mariano**, professor da disciplina de cirurgia da Escola e Farmácia de Odontologia de Alfenas – EFOA, grande incentivador da minha carreira acadêmica. Pela orientação à distância.

Ao doutorando **José Nilo de Oliveira Freire**, pela hospitalidade inicial e trabalho profissional.

Aos colegas do Mestrado e do Doutorado, **Adriana, Cimara, Dirce, Kávio, Otávio, Bianchini, Pontual**, pelo ambiente de amizade.

Ao mestrando **Kávio Castro**, amigo que tenho desde a Residência no HRAC-USP de Bauru, pela tranqüilidade compartilhada durante muitos momentos desse curso de Pós-Graduação.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, **Alexandre, Aline, Carla, Dani, Javier, Karina, Larissa e Márcia** pelo auxílio na logística para a realização dos experimentos. As trocas contínuas de idéias foram muito valiosas. Em especial, a mestranda de Biotecnologia, **Luciane Anita Savi**, pela constante participação, não medindo esforços para a concretização deste trabalho. A sua dedicação e paciência ajudaram a me harmonizar com o ambiente laboratorial de cultura celular.

Ao **Prof. Dr. José Scarso Filho**, pelo auxílio nos recursos fotográficos dessa dissertação.

Ao amigo, **Danilo Teixeira**, mestrando em Dentística, pela moradia tranqüila (lá no Canto dos Araçás), indispensável para a realização deste trabalho.

Ao amigo **André Sakima**, por me ajudar na obtenção de artigos e periódicos.

Às funcionárias do CEPID, **Rose, Dolores, Gisela e Miriam**, pelo trabalho diário.

Aos funcionários da Biblioteca Setorial, em especial, a **Sra. Vera Sovernigo**, pela presteza.

À funcionária **Ana Maria**, secretária da Pós-Graduação, pela eficiência.

Aos **pacientes**, voluntários, também ansiosos pela concretização deste trabalho.

Meus agradecimentos sinceros a todos que participaram da realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

COURA, Gustavo dos Santos. **Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA.** 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram estabelecer um protocolo preliminar de isolamento e cultivo primário de fibroblastos gengivais humanos e conseqüentemente, estabelecer uma linhagem celular; avaliar a viabilidade celular e os danos potenciais que os procedimentos precedentes poderiam causar na molécula de DNA. Uma biópsia de 20mm² (4x5mm) de mucosa ceratinizada foi obtida da região retromolar de um paciente saudável, lavada com PBS (solução salina de fosfato tamponada) e fragmentada em 15 partes menores. Após, este material foi dividido em 5 (cinco) garrafas de cultura. A proliferação e o crescimento dos fibroblastos foram verificados através de microscópio invertido. Após subconfluência de 70%, as células foram tripsinizadas e as novas subculturas foram obtidas. Para os experimentos, foram usadas as células da 6^a passagem. A viabilidade celular foi determinada através do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os possíveis danos que os procedimentos causariam nos DNA celulares foram avaliados pelo Ensaio do Cometa. Uma das garrafas (controle positivo) foi tratada com o agente genotóxico peróxido de hidrogênio (200µM). A viabilidade celular dos grupos-teste foi maior que 90%. Os DNAs dos fibroblastos não-tratados (grupos-teste) não apresentaram danos significativos, quando comparados com o controle positivo (teste de Tukey, p<0,01). Foi possível, com o protocolo inicial proposto, estabelecer uma linhagem celular de fibroblastos viáveis de gengiva humana e sem alterações significantes no seu DNA. Os achados permitem o uso destas células em futuras pesquisas.

Palavras-chave: Fibroblasto gengival. Ensaio em cometa. DNA. Cultura de tecidos.

COURA, Gustavo dos Santos. **Preliminar protocol of human gingival fibroblast culture. Evaluation of cell viability and potential DNA damage.** 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The objectives of this study include establishing a protocol of isolation and primary culture of *in vitro* human gingival fibroblasts and, consequently, establish a cell lineage to evaluate cell viability and the potential DNA damage that those procedures could cause in the molecule. A 20 mm² (4x5mm) gingiva biopsy was obtained from the retromolar region of a patient and stored for transport in a culture flask containing DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics. The biopsy was rinsed three times with PBS, sectioned in 15 smaller pieces further divided in 5 flasks using the same culture medium, which was changed twice a week. The proliferation and growth of fibroblasts was verified through microscopy. After 70% confluence, these cells were disaggregated through trypsin 0.25% and new subcultures were obtained. Cells from the sixth passage were used. Trypan Blue exclusion test was used for the evaluation of cell viability. Comet Assay was used to evaluate the damage of these procedures in the DNA fibroblasts. One of the flasks was treated with hydrogen peroxide (200µM). The cell viability of the test groups was above 90%. The DNA of non-treated fibroblasts did not show significant damage when compared with positive control (Tukey test, $p < 0,01$). The proposed protocol permitted to establish a human fibroblasts cell lineage with compatible cell viability similar to other results found in the literature and without significant DNA damage. The results obtained in this study indicate that it is possible to use these cells for future research.

Key words: Gingival fibroblast. Comet assay. DNA. Tissue engineering

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biópsia (explante) de aproximadamente 20mm ² (4x5mm), obtida da região retromolar.	44
Figura 2 – Lavagem da amostra com PBS, com o auxílio de uma micropipeta.....	48
Figura 3 – Fragmentação da amostra, aproximadamente 1mm ² cada explante.....	48
Figura 4 – Colocação de um explante numa garrafa de cultura. Cada uma das cinco garrafas recebeu 3 explantes.....	49
Figura 5 – Utilização da Câmara de Neubauer, com o auxílio de micropipetas, para a avaliação da viabilidade celular.....	55
Figura 6 – Visualização em microscopia de fase invertida da Câmara de Neubauer. A contagem de células coradas e não-coradas fornece o índice de viabilidade celular.	55
Figura 7 – Classificação das classes de cometa, segundo Kobayashi et al. (1995), com modificações Miyamae et al. (1998a).....	62
Figura 8 – Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 17 dias, em microscópio de fase invertida. 400X.....	64
Figura 9 – Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 23 dias, em microscópio de fase invertida. 400X.....	65
Figura 10 – Linhagem celular de fibroblastos, obtida após a 6 ^a passagem, com subconfluência de 70%, observada em microscopia de fase invertida. 400X.....	65
Figura 11 – Análise da viabilidade celular em câmaras de Neubauer (400X). As células não coradas são viáveis, enquanto que as coradas, são células mortas (não viáveis). Amostra do Grupo-Teste onde verificou maior quantidade de células viáveis.....	67
Figura 12 – Fotografia dos fibroblastos gengivais humanos submetidos ao Ensaio do Cometa, aumento de 200X, mostrando cometas sem cauda, classificados como classe 1, indicando a ausência de danos celulares. (Fonte: autor).	69

Figura 13 – Fotografia dos fibroblastos gengivais humanos tratados com 200 μ M de peróxido de hidrogênio, submetidos ao Ensaio do Cometa, aumento de 400X, mostrando cometas mal definidos e com caudas longas, classificados como classes 4 e 5, indicando presença de danos celulares. (Fonte: autor)..... 69

Figura 14 – Resultados da aplicação do Teste de Tukey a 1% para a separação das médias dos escores dos danos causados ao DNA dos fibroblastos gengivais humanos sem tratamento algum (1^a a 4^a garrafas) e tratados com 200 μ M de peróxido de hidrogênio (5^a garrafa), através do Ensaio do Cometa. (letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias)..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	-	graus Celsius
cm ²	-	centímetro quadrado
μM	-	micromolar
μl	-	microlitro
ml	-	mililitro
SFB	-	soro fetal bovino
PSA	-	antibióticos/antifúngico
pH	-	potencial hidrogeniônico
rpm	-	rotações por minuto
CO ₂	-	gás carbônico
O ₂	-	oxigênio
DMEM	-	meio de Eagle modificado por Dulbecco
CEPID	-	Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários
UFSC	-	Universidade Federal de Santa Catarina
min	-	minutos
h	-	horas
PBS	-	solução salina de fosfato tamponada
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
NaHCO ₃	-	bicarbonato de sódio
HCl	-	ácido clorídrico
EDTA	-	ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico
DMSO	-	dimetilsulfóxido
H ₂ O ₂	-	peróxido de hidrogênio
NaCl	-	cloreto de sódio
NaOH	-	hidróxido de sódio
g	-	grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	CULTURA CELULAR.....	19
2.2	ENGENHARIA TECIDUAL	23
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE CITOTOXICIDADE	27
2.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE GENOTOXICIDADE	29
2.5	ESTUDOS REALIZADOS <i>IN VITRO</i> COM FIBROBLASTOS	33
2.6	ORIGEM DOS FIBROBLASTOS.....	37
3	PROPOSIÇÃO	39
3.1	OBJETIVOS GERAIS	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	MEIO DE CULTURA E REAGENTES	40
4.1.1	Meio de cultura	40
4.1.2	Soro fetal bovino	41
4.1.3	Antibióticos e antifúngico	41
4.1.4	Tripsina	42
4.1.5	Solução salina de fosfato tamponada	42
4.2	CULTIVO CELULAR	43
4.2.1	Obtenção da amostra	43
4.2.2	Desenho proposto do experimento	45
4.2.3	Desenho do experimento realizado	46
4.2.4	Cultura primária	47
4.2.5	Linhagem celular	50
4.2.5.1	Escolha da 6 ^a passagem.....	50
4.2.6	Congelamento e descongelamento celular.....	51
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	53
4.3.1	Avaliação microscópica das alterações celulares.....	53
4.3.2	Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de Trypan	54
4.4	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA ..	56
4.4.1	Preparação da suspensão celular	56
4.4.2	Preparação dos controles	57

4.4.3	Preparação das lâminas	58
4.4.3.1	Primeira camada	59
4.4.3.2	Segunda camada	59
4.4.4	Lise celular	59
4.4.5	Tratamento alcalino e eletroforese.....	60
4.4.6	Neutralização e coloração	60
4.4.7	Análise dos cometas	61
4.5	AVALIAÇÃO DOS DADOS.....	63
5	RESULTADOS	64
5.1	ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA E DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS.....	64
5.2	AVALIAÇÃO microscópica das alterações CELULARES.....	66
5.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	66
5.4	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE	68
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO.....	91

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de tecidos gengivais e periimplantares harmônicos com as necessidades estéticas, funcionais e higiênicas dos indivíduos é o objetivo do tratamento odontológico. Várias técnicas de cirurgias plásticas periodontais e periimplantares são utilizadas para aumentar a quantidade e a qualidade de mucosa ceratinizada, aprofundar vestíbulos, recobrir raízes e/ou implantes ou conexões, criar papilas e aumentar o rebordo edêntulo. Enxertos gengivais livres ou subepiteliais são utilizados nessas terapias, contudo, necessitam-se de tecido doador (palato, túber e áreas edêntulas). A limitação de tecido doador disponível, a possibilidade de processos algícos, a ocorrência de cicatrizes residuais, o risco de processos hemorrágicos, além da morbidade e desconforto pós-operatórios causados pela necessidade de manipulação cirúrgica de outra região bucal, resultaram na busca por substitutos, através do uso de material alógeno (Alloderm[®], LifeCell, EUA) e da engenharia tecidual.

A engenharia tecidual, termo definido em 1987 durante o Congresso de Bioengenharia de Washington, estabeleceu um campo multidisciplinar de estudos, que engloba principalmente conhecimentos de engenharia de materiais e ciências biomédicas. Essa engenharia caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos, utilizada para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas. Os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos,

células-tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços, “scaffolds” ou carreadores) confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como, fatores de crescimento e adesinas (UEDA et al., 2000). As estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica, estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos, componentes cardiovasculares e pele. (FRESHNEY, 1999; MALEKZADEH et al., 1998).

Na odontologia, Pini Prato et al. (2000) relataram o caso de uma paciente que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para reposição de mucosa ceratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz carreadora, uma membrana de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, confirmado através de análises macroscópica e histológica. Portanto, a possibilidade de obtenção de tecido através da cultura de células, *in vitro*, com utilização de carreadores pode diminuir o trauma e o tempo cirúrgico. Em 2003, Pini Prato et al. divulgaram o sucesso da técnica em 6 pacientes tratados através da engenharia de tecidos.

A aplicação da engenharia tecidual na periodontia e implantodontia com a finalidade de substituir o uso de tecido removido de áreas doadoras intrabuciais pela produção, *in vitro*, de um tecido com características similares, envolve, inicialmente, o estabelecimento de protocolo de cultivo de células humanas. Nesse contexto, os fibroblastos, células residentes e predominantes nos tecidos moles periodontais e periimplantares, são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (TEN CATE, 1989). Portanto, o primeiro passo para a aplicação futura da engenharia de tecidos envolvendo tecidos moles é o cultivo, *in vitro*, de fibroblastos gengivais humanos.

A segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de protocolos de cultivo celular (FRESHNEY, 1990). Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade fornecem, respectivamente, informações sobre viabilidade celular e possível alteração no DNA celular, pertinentes aos estágios iniciais de desenvolvimento de protocolos de cultura.

Em resumo, a obtenção de tecido mole para restaurar a função, forma e estética de sítios periodontais e periimplantares é necessidade clínica e sócio-econômica. Torna-se relevante científica e socialmente a presente pesquisa, tendo em vista que a mesma buscou iniciar um protocolo de cultura, *in vitro*, de fibroblastos humanos e, posteriormente, obter uma linhagem celular, utilizando os meios e recursos laboratoriais disponíveis na Universidade Federal de Santa Catarina. Após o desenvolvimento do referido protocolo e obtenção da linhagem celular, foi necessário que os mesmos fossem testados, avaliando a viabilidade celular e a presença de possíveis alterações do DNA. Os testes propostos, para verificação destas variáveis, são referendados cientificamente e possíveis de serem aplicados no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, onde esta pesquisa foi desenvolvida.

2 REVISÃO DA LITERATURA¹

Essa pesquisa abordou o desenvolvimento de um protocolo preliminar de cultura de fibroblastos humanos com o objetivo de aplicação futura da engenharia tecidual. Nesse contexto, a segurança é um parâmetro de grande importância; portanto, os testes de citotoxicidade e genotoxicidade, que fornecem, respectivamente, informações sobre a viabilidade celular e as possíveis alterações no DNA celular são justificados. Assim, didaticamente, a revisão da literatura foi dividida em cultura celular, engenharia tecidual, considerações sobre citotoxicidade e genotoxicidade e estudos envolvendo fibroblastos.

2.1 CULTURA CELULAR

A cultura de tecidos foi desenvolvida no início do século passado (HARRISON, 1907; CARREL, 1912) como um método para estudo do comportamento das células animais, eliminando as possibilidades de variações sistêmicas que podem acontecer em um estado fisiológico normal ou em condições de estresse, oriundas de um experimento. A técnica foi

¹ Baseado na NBR 10520: 2002 da ABNT.

elaborada inicialmente através da fragmentação de tecidos, crescimento e migração celular ao redor dos fragmentos por meio de mitoses celulares.

O termo cultura de tecidos foi usado de uma maneira abrangente, no entanto, a cultura de tecidos inclui a cultura de órgãos e de células. A cultura de órgãos implica em uma cultura tridimensional de tecidos desagregados que permanece com algumas ou todas as características histológicas daquele tecido, *in vivo*. A cultura celular refere-se às culturas derivadas pela dispersão de células retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular, pela desagregação enzimática, mecânica ou química. O termo cultura histotípica refere-se às células associadas em uma estrutura tridimensional, ou seja, o crescimento de uma monocamada celular, a agregação em suspensão ou a infiltração em uma matriz tridimensional, como o gel de colágeno. O termo organotípico implica nesses mesmos procedimentos, porém, utiliza células recombinantes de diferentes linhagens.

Harrison (1907) escolheu os sapos como fonte de tecidos, provavelmente por apresentarem sangue frio, assim, a incubação não seria um requisito necessário. Adicionalmente, a regeneração tecidual é mais comum em pequenos vertebrados e isso poderia ser vantajoso em estudos, *in vitro*. Embora essa técnica pudesse reluzir uma nova perspectiva de interesse nos estudos de cultura de tecidos, *in vitro*, poucos pesquisadores seguiram esse exemplo na seleção de espécies. A ciência médica interessava-se por animais de sangue-quente, pois, o desenvolvimento de processos fisiológicos e patológicos estaria mais próximo do ser humano. A acessibilidade de diferentes tecidos, que se comportavam bem em culturas, fez com que o embrião de galinha fosse o material de escolha, porém, o desenvolvimento de animais experimentais, em especial os roedores geneticamente puros, levou essa espécie à vanguarda da cultura de tecidos. Enquanto os embriões de galinhas poderiam prover uma diversidade de tipos celulares em culturas primárias, os tecidos de roedores possuíam a vantagem de fornecer linhagens celulares contínuas (EARLE, 1943). O

desenvolvimento da tecnologia transgênica de ratos (PEAT et al., 1992), concomitante a uma experiência genética bem estabelecida, difundiu o uso de roedores geneticamente puros. A demonstração de que tumores humanos poderiam também dar origem a linhagens celulares contínuas, como as linhagens do tipo celular HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952), aumentou o interesse em cultura de tecidos humanos. O desenvolvimento da cultura de tecidos humanos ocorreu devido a necessidade de dois ramos extremamente importantes na pesquisa médica: a produção de vacinas antivirais e o entendimento de neoplasias.

O estudo, *in vitro*, com cultura de células é utilizado devido a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a pressão osmótica, a tensão de CO₂ e O₂ podem ser controlados de maneira precisa. A caracterização e homogeneidade da amostra com culturas celulares idênticas, além da economia no custo de reagentes que são utilizados em menor quantidade, são vantagens desse tipo de estudo. As desvantagens são a necessidade de um ambiente de trabalho asséptico e de treinamento do pesquisador (FRESHNEY, 1990).

A tecnologia de cultura de tecidos foi adotada em muitas situações rotineiras, por exemplo: a análise cromossômica de células derivadas do útero pode revelar desordens genéticas na criança que ainda está por nascer, infecções virais podem ser avaliadas quantitativamente e qualitativamente em cultura de células apropriadas do hospedeiro, efeitos tóxicos de fármacos e poluentes ambientais podem ser avaliados, etc. Desse modo, a cultura celular é uma tecnologia indispensável nos ramos das ciências biológicas, pois, fornece as bases para o estudo da proliferação celular, diferenciação e formação de produtos em condições cuidadosamente controladas. A técnica de cultura celular contribuiu significativamente na pesquisa do genoma humano e nas vias de sinalização intra e intercelular, que regulam a expressão gênica. A cultura celular é utilizada em grande escala para o crescimento de vírus, a produção de vacinas, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, a produção de substâncias farmacêuticas, como hormônios, enzimas, fatores de

crescimento e coagulação, manipulada por técnicas de DNA recombinante (MACDONALD, 1990). Além disso, os ensaios, *in vitro*, realizados através do cultivo celular em laboratórios, podem substituir experimentos em animais, pois, o sacrifício de animais é visto atualmente com certa inquietação. A opinião pública e os grupos defensores dos direitos dos animais questionam os aspectos éticos dessas pesquisas (FRESHNEY, 1999).

Outras aplicações da cultura de tecidos incluem a cultura de células da epiderme (GREEN; KEHINDE; THOMAS, 1979) e células endoteliais formadoras de capilares (FOLKMAN; HAUDENSCHILD, 1980), além do uso de enxertos autógenos e cirurgias reconstrutivas utilizando as células do próprio paciente (BURT et al., 1989; DENNIS, 1992). Indica-se, em alguns casos de queimaduras, realizar uma biópsia da derme do paciente, propagar essas células em uma cultura primária e enxertar essas células cultivadas em matrizes tridimensionais nas áreas mais afetadas pelas queimaduras (BOYCE; HANSBROUGH, 1988).

Na área odontológica, um grande número de estudos experimentais sobre efeitos adversos extraídos dos materiais dentários foi publicado nas décadas de 50, 60 e 70. Nesse período, duas principais correntes na literatura podem ser distinguidas, uma conduzia estudos animais, em que os materiais eram aplicados da forma como seriam utilizados em pacientes e as reações teciduais eram observadas através de técnicas histológicas. As técnicas experimentais envolvendo modelos animais, principalmente primatas não-humanos, foram melhoradas pela padronização das técnicas histológicas e procedimentos de avaliação (LANGELAND et al., 1966; BAUME; HOLZ; FIORE DONNO, 1972). A segunda corrente concentrou-se em técnicas de cultura celular. Esses métodos tornaram-se disponíveis para a pesquisa odontológica durante a década de 1950, no Japão, e um dos pioneiros neste campo foi H. Kawahara (KAWAHARA; SHIOTA; YAMAKAWA, 1955). Tang et al. (1999) e

Huang et al. (2002) avaliaram a citotoxicidade de cimentos adesivos ortodônticos em culturas, *in vitro*, de fibroblastos humanos obtidos da cavidade bucal.

Nota-se que desde o desenvolvimento dessa modalidade de estudo, essa disciplina destaca-se como um instrumento imprescindível e integrante em diversas áreas, como a genética molecular, a biotecnologia, a imunologia, a cirurgia, a bioengenharia e a fabricação de produtos farmacêuticos (LEON, 1993; MASTERS, 2000).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas. Atualmente, concomitante aos avanços associados na medicina de transplantes, genética, engenharia biomédica e na engenharia de órgãos, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de regeneração verdadeira, essencial para as estruturas humanas danificadas (ASSAEL, 2003). Dessa forma, as estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica, estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos, componentes cardiovasculares e pele. (MALEKZADEH et al., 1998).

Segundo Ueda et al. (2000), os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços ou

“scaffolds”) confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento e adesinas. As matrizes podem ter várias origens, como os polihidroxialcanoatos, tais como o ácido polilático, ácido poliglicólico, polycaprolactona (PEGO et al., 2003), hidrogéis à base de colágeno, polissacarídeos, ou ambos, tais como o alginato e a quitosana (LEE et al., 2000; PIEPER et al., 1999). As matrizes devem apresentar integridade estrutural para que novos tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000; STAMMEN et al., 2001). A engenharia tecidual aponta para o reparo de tecidos e órgãos danificados, porém, não causa respostas imunológicas ou infecções, não necessita do uso de cadáveres e, principalmente, não mutila outras regiões do paciente.

O cultivo de células é normalmente realizado em placas ou garrafas contendo meios de cultura que fornecem nutrientes para a viabilidade celular, *in vitro*. A dificuldade de transporte das células para um sítio receptor de um ser humano baseia-se no aspecto bidimensional que caracteriza a cultura, devido as células propagadas formarem uma monocamada nas placas ou garrafas de culturas. Os carreadores, que fornecem um aspecto tridimensional para cultura e proliferação celular, têm sido utilizados para apoio e invasão dos fibroblastos (ZACCHI et al., 1998).

O cultivo de fibroblastos em matrizes biocompatíveis pode ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares, que necessitam de aumento de tecido gengival. Grande parte dos procedimentos cirúrgicos periodontais e perimplantares reconstrutivos necessita de áreas doadoras intrabuciais de tecido mole, com a remoção de tecido doador do palato, áreas edêntulas, túber, ou ambas. Tais procedimentos resultam em um pós-operatório doloroso e aumento do tempo cirúrgico (PINI PRATO et al., 2000).

A reposição do aparato periodontal através do cultivo celular mostra-se promissora. Pini Prato et al. (2000) relataram o caso de uma paciente que necessitou de procedimento

cirúrgico periodontal para reposição de mucosa ceratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz, uma membrana de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, confirmado através de análise macroscópica e histológica. Portanto, a possibilidade de obtenção de tecido através da cultura de células, *in vitro*, com utilização de carreadores pode diminuir o trauma e o tempo cirúrgico. Pini Prato et al. (2003) relataram o sucesso da técnica em 6 pacientes tratados através da engenharia de tecidos.

Lauer e Schimming (2001) apresentaram em seu trabalho a utilização de enxertos de mucosa oral através da engenharia de tecidos, utilizando-se células provenientes do palato duro. O estudo apresentou os resultados clínicos dos procedimentos cirúrgicos de enxertia de mucosa oral em vestíbulo após ressecção tumoral em 6 pacientes. Concluíram, a partir de evidências clínicas e imuno-histológicas, que o enxerto autógeno de mucosa oral, obtido por meio de engenharia de tecidos, pode ser utilizado para a cobertura de feridas na cavidade oral. Cicatrização tecidual completa e diferenciação epitelial normal puderam ser observadas na área enxertada em um período pós-cirúrgico de 6 meses.

Bordner e Grossman (2003) relataram o sucesso do uso de enxertos de mucosa em 11 pacientes, por meio de culturas autólogas de células da mucosa oral. Após 3 (três) semanas da colocação dos enxertos de mucosa cultivada, os sítios apresentaram-se ceratinizados e sem sinais de infecção. Foi encontrada uma mucosa saudável depois de 3 (três) meses. Os autores concluíram que os enxertos de mucosa cultivada são úteis em grandes defeitos da mucosa oral, principalmente após as patologias.

A aplicação de enxertos de mucosa oral gerada, *in vitro*, em defeitos da cavidade oral (LANGDON et al., 1991), em cirurgias periimplantares (UEDA et al., 1998), em procedimentos protéticos (BORDNER; GROSSMAN, 2001) e em vestibuloplastias (RAGHOEBAR et al., 1995) tem sido utilizada com sucesso.

A obtenção de novo osso para restaurar a função de ossos danificados, traumatizados ou perdidos é uma necessidade clínica e sócio-econômica. A engenharia tecidual óssea representa uma estratégia alternativa para a regeneração óssea. Em essência, visa a combinação de células maduras ou progenitoras com materiais, matrizes biocompatíveis, ou ambas, com ou sem apropriados fatores de crescimento, para dar início ao reparo e regeneração (BROWN; PORTER, 2000).

Borke e Mailhot (1998) isolaram células ósseas intra-orais humanas durante a preparação de sítios para a instalação de implantes osseointegrados. Os autores demonstraram a técnica de obtenção dos osteoblastos e discutiram os procedimentos para a manutenção da cultura primária dessas células. Estabeleceram protocolos de caracterização e concluíram que a utilização de tecidos intra-orais pode ser útil para a pesquisa no campo da engenharia tecidual.

O uso de células-tronco osteogênicas ou osteoprogenitoras para a reconstrução de tecidos ósseos é uma área de intensa pesquisa com alto potencial para o sucesso. A migração de células-tronco, derivadas da medula para sítios ósseos, a proliferação e a diferenciação nesses sítios teciduais locais evidenciam as possibilidades da utilização de células humanas osteoprogenitoras no tratamento de deficiências ósseas (UEDA; TOHNAI; NAKAI, 2001).

Vacanti et al. (2003) isolaram células-tronco mesenquimais da medula óssea de 3 (três) miniporcões Yucatan. Durante a manipulação laboratorial, suplementos osteogênicos foram adicionados. Uma matriz de polímero biodegradável com formato de côndilo

mandibular foi construída. Foi possível verificar, após o cultivo por células osteoblásticas, espessura óssea média de 0,3mm no interior dessas matrizes. Neste estudo preliminar, a engenharia tecidual óssea autógena foi realizada pela combinação de polímeros biodegradáveis e células-tronco mesenquimais, eliminando a morbidade pós-operatória decorrente de um acesso ao leito doador.

O presente e o futuro pertencem ao estudo e pesquisa das células-tronco (células indiferenciadas), que permitirão a engenharia tecidual de estruturas orgânicas complexas, como dentes, ossos alveolares e estruturas mucogengivais. Esse será um passo importante para a promessa da engenharia tecidual nas reconstruções verdadeiramente funcionais.

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas.

Os teste de citotoxicidade, *in vitro*, são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto causar alterações e morte celular, como conseqüências de dano das funções celulares básicas (EISENBRAND et al., 2002).

Os ensaios freqüentemente usados para avaliar a citotoxicidade baseiam-se nas alterações da permeabilidade celular (ex. uso de corantes vitais, tais como azul de Trypan, preto de naftaleno, eosina, etc.), nas funções mitocondriais (ex. ensaio do MTT, XTT, etc.) e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular (ex. ensaios de proliferação celular, ensaios clonogênicos, etc.). Esses ensaios já estão estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; EISENBRAND et al., 2002).

O primeiro e o mais fácil efeito observado é a avaliação microscópica das alterações morfológicas ocorridas na monocamada de células, traduzidas pela desorganização do tapete celular, pelo aspecto granuloso, arredondado e/ou vacuolizado das células (STREISSLE; SCHWOBEL; HEWLETT, 1981).

Outra técnica para avaliar a citotoxicidade é a mensuração da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de Trypan, que permite determinar a integridade das membranas (WILSON, 2000). Esse corante penetra nas células mortas, pois suas membranas não podem mais excluí-lo.

Helbig; Speit (1997) recomendam se trabalhar com amostras com viabilidade celular acima de 90%, pois abaixo desse valor a citotoxicidade constitui um efeito deletério. Para a realização do Ensaio do Cometa, idealmente, a viabilidade deve permanecer acima de 90%, pois a genotoxicidade tem um significado importante quando ocorre em células viáveis, que foram capazes de sobreviver ao agente citotóxico.

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE GENOTOXICIDADE

Funcionalmente, os agentes genotóxicos possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Dessa forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

Os ensaios de genotoxicidade, *in vitro*, são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos (MCGREGOR; CASCIANO; MÜLLER, 2000; TICE et al., 2000; EISENBRAND et al., 2002), podendo ser avaliadas pelos seguintes ensaios: teste de Ames (TRAORE et al., 2000; FERRER et al., 2002), teste de micronúcleos (MCGREGOR; CASCIANO; MÜLLER, 2000; SILVA et al., 2002), Ensaio do Cometa (TICE et al., 1990; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; SNYDER; GREEN, 2001), entre outros.

O Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA em células individuais, usando microscopia (SINGH et al., 1988; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995).

Rydeberg e Johanson (1978, *apud* ÖSTILING; JOHANSON, 1984) foram os primeiros a quantificar diretamente o dano no DNA de células individuais. Posteriormente, Östiling e Johanson (1984) melhoraram a sensibilidade da detecção de danos no DNA ao desenvolverem uma técnica de eletroforese em microgel, na qual as células eram lisadas, misturadas com agarose e submetidas à eletroforese em condições neutras, permitindo a detecção de quebras das fitas duplas do DNA celular. O nome pelo qual o ensaio tornou-se conhecido na literatura científica deve-se ao fato de que as células com dano aumentado no

DNA demonstram uma migração aumentada do DNA cromossômico do núcleo celular em direção ao ânodo, o que resulta no formato de um cometa; a quantidade de migração do DNA, a intensidade da fluorescência e o comprimento da cauda dos cometas indicam a quantidade de dano ao DNA celular, induzido pelo agente testado (McKELVEY-MARTIN et al., 1993; ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998). Singh et al. (1988) modificaram a técnica de Östling e Johanson, utilizando uma eletroforese alcalina ($\text{pH} \geq 13$), capaz de detectar quebras das fitas simples do DNA em sítios álcali-lábeis (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induz mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (SPEIT et al., 1999; SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000). Adicionalmente, Olive; Banath; Durang (1990) desenvolveram um processo de lise celular, também em condições alcalinas, seguido de eletroforese em $\text{pH} \sim 12,3$. Os métodos de Singh et al. (1988) e de Olive; Banath; Durang (1990) são idênticos no princípio e similares na prática, mas o protocolo que utiliza $\text{pH} \geq 13$ mostrou-se ser mais sensível, por possibilitar a expressão máxima dos danos em fitas simples e em sítios álcali-lábeis, sendo o método de escolha para a identificação de agentes genotóxicos, segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

O Ensaio do Cometa é um teste de genotoxicidade que se desenvolveu rapidamente nos últimos anos, representando um papel importante em muitas áreas (WATERS; STACK; JACKSON, 1999; COLLINS, 2002). O número de pesquisadores que utiliza esse teste e o alcance de suas aplicações está aumentando exponencialmente, podendo o Ensaio do Cometa ser aplicado na avaliação dos efeitos genotóxicos de vários agentes sobre células somáticas e germinativas *in vitro* e *in vivo* (HARTMANN; SPEIT, 1997; SNYDER; GREEN, 2001), nos estudos de reparo do DNA (LAFFON; PÁSARO; MÉNDEZ, 2002), nas aplicações clínicas

(SARDAS et al., 1998), no monitoramento humano (COLLINS et al., 1997; KAN et al., 2002) e no biomonitoramento ambiental (STEINERT et al., 1998).

As vantagens dessa técnica incluem: 1) sensibilidade para detecção de baixos níveis de dano ao DNA; 2) simplicidade e baixo custo; 3) uso de pequeno número de células por amostra; 4) coleta de dados de células individuais, permitindo análises estatísticas mais precisas; 5) virtualmente, qualquer população de células eucarióticas pode ser analisada; 6) uso de pequenas quantidades do material teste, fácil aplicação e curto período de tempo para concluir o experimento; 7) capacidade para avaliar o dano ao DNA de células não proliferativas e, por ser um ensaio de células individuais, possibilidade de detectar respostas não uniformes numa população mista de células; 8) capacidade para avaliar genotoxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo* (COLLINS et al., 1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; TICE et al., 2000). A população de células mais adequada dependerá das características da exposição, da amostra, do acesso e do objetivo do estudo (ALBERTINI et al., 2000). Segundo Tice et al. (1990), as únicas desvantagens são a necessidade de suspensões celulares individuais e o fato de que pequenas amostras celulares podem não ser representativas da população celular total.

Devido à grande diversidade de aplicações dessa técnica, surgiu a necessidade da validação internacional dos seus procedimentos, a fim de que diferentes laboratórios pudessem comparar seus resultados (OLIVE, 2002). Algumas padronizações já estão disponíveis no *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000) e no *International Programme on Chemical Safety* (ALBERTINI et al., 2000), os quais recomendam alguns procedimentos para que o Ensaio do Cometa possa ser utilizado nos estudos de genotoxicidade.

A sensibilidade do ensaio permite utilizá-lo como uma potente ferramenta para o estudo de genotoxicidade, tendo em vista que aproximadamente 85% dos estudos realizados nessa área encontraram resultados positivos. Entretanto, são necessários estudos complementares para investigar a persistência, o reparo dos danos observados e suas correlações com aberrações cromossômicas, mutações ou indução da formação de micronúcleos. E, mais importante, para a determinação do significado biológico do dano ao DNA observado pela técnica (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

A avaliação paralela dos danos causados ao DNA, realizada através da análise visual e do programa analisador de imagens computadorizado, mostrou uma clara correlação entre os escores visuais e os computadorizados, comprovando que, embora o programa analisador de imagens seja uma ferramenta interessante, o escore visual também fornece informações confiáveis e úteis para a análise estatística dos experimentos (COLLINS et al., 1997).

A análise estatística do Ensaio do Cometa deve ser realizada levando-se em consideração a importância biológica dos dados obtidos, identificando-se o tamanho do efeito, que poderá ser considerado biologicamente importante, e relacionando-o com o poder estatístico do estudo (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

Para a utilização do Ensaio do Cometa objetivando a avaliação de genotoxicidade, sugere-se que sejam utilizadas, no mínimo, 4 (quatro) concentrações do material-teste, controles negativos e positivos, sendo realizado 2 (dois) experimentos independentes (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993). Normalmente, utiliza-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como controle positivo. Duas hipóteses são sugeridas para explicar o dano induzido pelo H_2O_2 : a primeira é a formação de radicais hidroxila (OH), através do processo de catálise por metais de transição, tipicamente Fe^{+2} , sendo esta reação denominada reação de Fenton (DREHER; JUNOD, 1996); a segunda hipótese seria a habilidade dos radicais (OH \cdot) e outras

espécies reativas de oxigênio, que provocam estresse oxidativo, de causar danos no DNA, através da ativação de uma série de eventos metabólicos celulares, permitindo a atividade de enzimas nucleases, as quais clivam a cadeia de DNA. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente (HALLIWELL; ARUOMA, 1991).

Concomitante ao Ensaio do Cometa é enfaticamente recomendada uma medida de citotoxicidade (SPEIT; HARTMANN, 1999). O método freqüentemente utilizado é o teste de exclusão pelo corante Azul de Trypan (TICE et al., 1990; SINGH et al., 1991; MIYAMAE et al., 1998b), que segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* deve resultar em uma viabilidade celular acima de 70%, a fim de evitar resultados falso-positivos (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; TICE et al., 2000). Helbig e Speit (1997) recomendam efetuar o Ensaio do Cometa, se possível, em amostras com viabilidade celular acima de 90%, pois a genotoxicidade tem um significado importante quando ocorre em células viáveis, que foram capazes de sobreviverem ao agente citotóxico.

2.5 ESTUDOS REALIZADOS *IN VITRO* COM FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células encontradas com alta predominância no tecido conjuntivo. Na obtenção de uma cultura celular, a partir de explantes de tecido conjuntivo, por desagregação enzimática ou mecânica, e mantida em meios de cultura suplementados com soro, os fibroblastos proliferam-se rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Após algumas passagens, geralmente, apenas os fibroblastos são as células proliferativas

sobreviventes. Uma das razões é que a maioria dos meios de cultura disponíveis otimiza e favorece as linhagens celulares fibroblásticas (SATO et al., 1994).

Kent et al. (1996) avaliaram os efeitos, *in vitro*, do número de passagens de uma cultura de fibroblastos humanos gengivais sobre a morfologia celular, viabilidade celular e expressão de citocinas. A análise compreendeu células da primeira até a décima passagem. A viabilidade celular permaneceu acima de 90% até a 7ª passagem. Os valores obtidos na 8ª, 9ª e 10ª passagens foram 86%, 93% e 87%, respectivamente. Foi observado um aumento do volume celular (tamanho celular) e um decréscimo na quantidade celular com o aumento da idade da cultura. O estudo demonstrou a expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-8 na cultura de fibroblastos humanos gengivais e a ausência de expressão IL-1 α e TNF- α .

Essa mudança de volume (tamanho) celular também foi relatada por Pendergrass; Angello; Norwood (1989), que avaliaram aproximadamente 70 passagens das culturas de fibroblastos; os autores observaram volumes originais celulares de aproximadamente 2000 μm^3 , enquanto 5000 μm^3 foram os volumes de células em senescência. Além disso, verificaram perda da capacidade proliferativa em decorrência da idade da cultura. Isso não foi verificado por Kent et al. (1996), no entanto, esses últimos autores trabalharam somente até a décima passagem.

Almeida-Lopes (1999) desenvolveu uma linhagem de fibroblastos de gengiva humana, propondo dois modelos de estudo *in vitro* um com meio de cultivo e SFB a 5% e o outro com 10% de SFB. Analisou a proliferação celular através da contagem do número de células existentes antes e depois de receberem irradiação com diodos lasers, operando em diferentes comprimentos de onda. Verificou-se que quando as células receberam irradiação com mesma irradiância e fluência, o comprimento de onda que induziu maior proliferação celular foi aquele situado na região do visível. No caso onde se manteve mesma fluência, mas diferente

irradiância, o melhor resultado foi obtido com radiação no infravermelho. Em ambos os casos, os grupos irradiados apresentaram proliferação significativamente maior nos grupos irradiados quando comparados ao controle.

Woollons et al. (1997) avaliaram os danos aos DNA celulares de fibroblastos humanos causados por câmaras de bronzamento (UVA e UVB) e pela exposição solar, pois a indução de mutações ao DNA é um pré-requisito para o desenvolvimento de cânceres de pele. Utilizando-se enzimas específicas de reparo de DNA (endonuclease T4 e endonuclease III) e o Ensaio do Cometa, avaliou-se a ação de duas diferentes câmaras de bronzamento disponíveis comercialmente. Ficou estabelecido que esses aparelhos produzem diferentes tipos de dano ao DNA, associados à fotocarcinogênese de células humanas, e as evidências epidemiológicas existentes confirmam o risco potencial do uso desses aparelhos de bronzamento artificial.

Sant'Anna et al. (2002) estabeleceram e caracterizaram uma linhagem contínua de células derivadas de ligamento periodontal (LP) humano. Essas células foram obtidas através da técnica do explante de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de terceiros molares extraídos de 3 (três) pacientes saudáveis. Posteriormente, as células foram caracterizadas através de microscopia óptica, padrão de crescimento, testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anti-citoqueratina (AE1/AE3), actina de músculo liso e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados, *in vitro*, pelas células foi confirmada pelo teste de Von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas de LP e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos, *in vitro*.

Rossa Júnior; Martinez; Silvério (2002) avaliaram, *in vitro*, o efeito da nicotina sobre a viabilidade e a morfologia celular utilizando-se uma linhagem contínua de fibroblastos. Para tal, foram formados dois grupos experimentais segundo a dose (0 - controle, 10µg, 100µg, 0,5mg, 1mg de nicotina) e o tempo de condicionamento (1h e 24h). Cada um dos 12 orifícios de uma placa para cultura celular recebeu 2ml de meio de Eagle e 1ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1×10^5 células/ml. Foi, então, acrescentada a solução de nicotina nas diferentes concentrações. Após o acondicionamento com o fármaco, nos dois períodos testados, as células foram coradas com Azul de Trypan a 0,4% e observadas em microscópio de observação direta. Quanto à morfologia, os resultados obtidos demonstraram, no grupo acondicionado por 1h, que os controles apresentaram diferenças estatisticamente significantes apenas em relação à maior dose de nicotina; no entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o controle e todas as concentrações, após 24h de condicionamento. Quanto a viabilidade celular, um maior número de células não viáveis foi observado nas diferentes concentrações de nicotina em comparação aos controles, tanto após 1h quanto 24h de condicionamento ($p < 0,05$). Em ambos os períodos, houve uma tendência significativa de aumento do número de células não viáveis com o aumento da dose de nicotina ($p = 0,0053$; $p = 0,00001$ após 1h e 24h, respectivamente). Portanto, concluiu-se que a nicotina pode alterar *in vitro* a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

Andrighetti-Frohner (2003) avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade da violaceína, metabólito da bactéria *Chromobacterium violaceum*, sobre culturas de células VERO (fibroblastos de rins do macaco verde da África), células FRhK-4 (células fetais de rins de macacos *rhesus*), células Hep-2 (células de carcinoma de orofaringe humana) e células MA104 (fibroblastos obtidos a partir de rins embrionários do macaco *rhesus*). A viabilidade celular de seus controles negativos (onde a violaceína não foi empregada) permaneceu acima

de 90% para todas as linhagens celulares. Os danos aos DNA celulares, determinados através do Ensaio do Cometa, encontrados com o uso do peróxido de hidrogênio a 200 μ m, foram de $153,33 \pm 12,81$, $145,17 \pm 3,03$, $142,83 \pm 5,06$ e $131,33 \pm 4,63$ para as células VERO, FRhK-4, MA104 e Hep-2, respectivamente. Os danos encontrados em seus controles negativos foram de $12,67 \pm 1,30$, $20,50 \pm 0,58$, $33,33 \pm 3,76$ e $23,67 \pm 6,84$ para as mesmas linhagens celulares. O estudo verificou que a violaceína teve efeito citotóxico e genotóxico, concentração-dependente, nas diferentes linhagens celulares.

2.6 ORIGEM DOS FIBROBLASTOS

O periodonto é um tecido altamente complexo e especializado composto de tecidos duros e moles. Os fibroblastos, células residentes e predominantes nos tecidos moles periodontais, são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (TEN CATE, 1989).

Alguns estudos sugerem a heterogeneidade dos fibroblastos presentes nesses tecidos com fenótipo único e atividade funcional distinta (FRIES, 1994). Enquanto os fibroblastos gengivais garantem a síntese e integridade do tecido conjuntivo gengival, os fibroblastos dos ligamentos periodontais com funções especializadas são responsáveis pela formação e manutenção do ligamento periodontal, além do reparo, remodelamento e regeneração do cemento e osso alveolar adjacente, *in vivo* (NYMAN et al., 1982).

Em nossa dissertação, a escolha do cultivo de fibroblastos gengivais eliminando os ceratinócitos reside no fato demonstrado por Løe et al. (1971 e 1974) de que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial. Dessa forma a cultura de fibroblastos existentes no tecido conjuntivo da mucosa ceratinizada foi nossa primeira opção de cultivo.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Estabelecer um protocolo preliminar de cultura de fibroblastos de gengiva humana, oriunda de um sítio bucal clinicamente saudável (ausência de sangramento à profundidade de sondagem).
- Estabelecer uma linhagem celular a partir do cultivo primário de fibroblastos de gengiva humana, proveniente de um sítio clinicamente saudável.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos fibroblastos, após seu isolamento e cultivo *in vitro*:

- a viabilidade celular, através do método de exclusão pelo Azul de Trypan;
- as possíveis alterações no DNA celular, através do Ensaio do Cometas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse item foi dividido em capítulos para a maior compreensão do leitor. O item 4.1 aborda os meios de cultura e reagentes frequentemente utilizados em todas as fases do experimento. O item 4.2 engloba desde a obtenção da amostra até o estabelecimento de uma cultura primária e linhagem celular, além de apresentar uma visão global do experimento (itens 4.2.2 e 4.2.3). Os itens 4.3 e 4.4 detalham os testes de citotoxicidade (viabilidade celular) e genotoxicidade (danos aos DNA celulares), respectivamente.

4.1 MEIO DE CULTURA E REAGENTES

4.1.1 Meio de cultura

O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) foi utilizado para crescimento e manutenção das células. O meio de cultura é constituído de nutrientes (vitaminas, proteínas, fatores de crescimento, etc.) necessários para o crescimento celular e mantém o pH e a osmolaridade compatíveis com a

viabilidade celular. A regulagem da temperatura e dos níveis de O₂ e CO₂ da estufa deve ser realizada (37°C e 5% de CO₂), pois o CO₂ influencia também na proliferação celular através da participação na biossíntese das bases púricas e pirimídicas. A atmosfera dentro da estufa deve ser saturada com vapores d'água a fim de prevenir a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio. O pH do meio permaneceu entre 7,2 - 7,4; caso necessário, seria ajustado com NaHCO₃ (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) ou HCl (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA).

4.1.2 Soro fetal bovino

O soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 10% para permitir a manutenção e proliferação das células em cultura. Para cada 100ml de meio, 10ml de SFB foi acrescentado.

4.1.3 Antibióticos e antifúngico

Antibióticos e antifúngico (PSA) (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) foram adicionados ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1%, ou seja, para cada 100ml de meio, foi acrescentado 1ml de penicilina/estreptomicina/anfoterecina B (10000U penicilina, 10000µg estreptomicina e 25µg anfoterecina B).

4.1.4 Tripsina

A tripsina (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) é uma enzima do grupo das proteases, que catalisam reações de quebra da cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos. Esta enzima não requer a presença de co-fatores e é muito utilizada em culturas celulares, que necessitam de um suporte para se fixarem e proliferarem. Ela age, então, sobre as proteínas que permitem a fixação das células no suporte, liberando-as. A tripsina deve ter sua ação proteolítica inibida, após o descolamento das células, para evitar a citólise. Esta inibição é feita através da adição de SFB às células. Nos experimentos, no momento da formação de subculturas de culturas confluentes foi utilizada tripsina de pâncreas de porco a 0,25% (tripsina: EDTA 1: 250). Volume por garrafa: 0,5ml.

4.1.5 Solução salina de fosfato tamponada

A solução salina de fosfato tamponada (PBS) é uma mistura de sais que promove a remoção de restos orgânicos e celulares. É utilizado para a lavagem das células. Possui pH em torno de 7,0. É composto de 8,0g de NaCl (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA), 0,2g de KCl (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA), 1,44g de Na₂HPO₄ (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA), 0,24g de KH₂PO₄ (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) em q.s.p. para 1l de água Milli-Q (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil).

4.2 CULTIVO CELULAR

4.2.1 Obtenção da amostra

O material para o cultivo celular foi obtido de gengiva humana. Foi selecionado um indivíduo, sexo masculino, não fumante, 37 anos, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. O indivíduo não relatou o uso de qualquer tipo de medicamento. O voluntário foi submetido a uma biópsia (explante) de aproximadamente 20mm² (4x5mm) de mucosa ceratinizada (epitélio e tecido conjuntivo) da região retromolar (FIG. 1), através de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica nº 15C, sob anestesia local, em condições de assepsia e antissepsia compatíveis ao ambiente ambulatorial. Foi indicado um procedimento periodontal cirúrgico de cunha distal neste sítio doador, de modo a favorecer a higienização do indivíduo. Antes da realização da cirurgia, o indivíduo foi informado sobre o projeto e optou por participar do mesmo por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (Projeto de Pesquisa nº 200/03 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) (ANEXOS).

Após coleta da amostra (explante), a mesma foi lavada em soro fisiológico 2x, colocada em uma garrafa de cultura de 25cm² contendo meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA, mantido a 37°C e transferida para o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

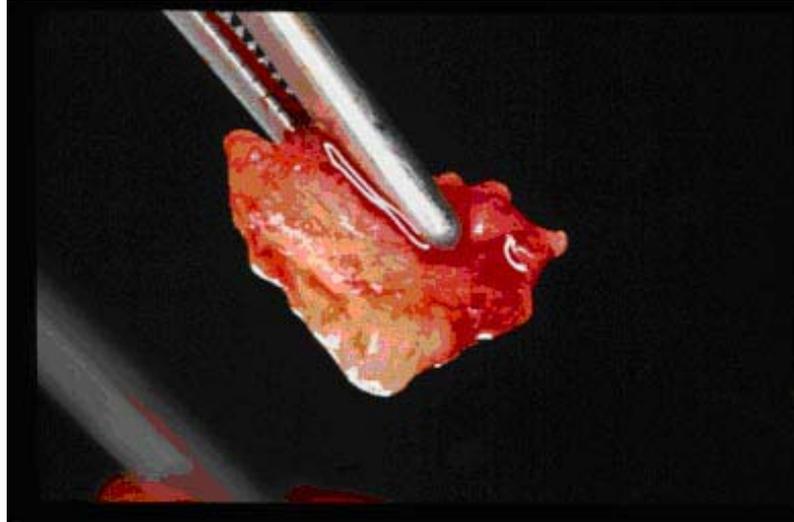
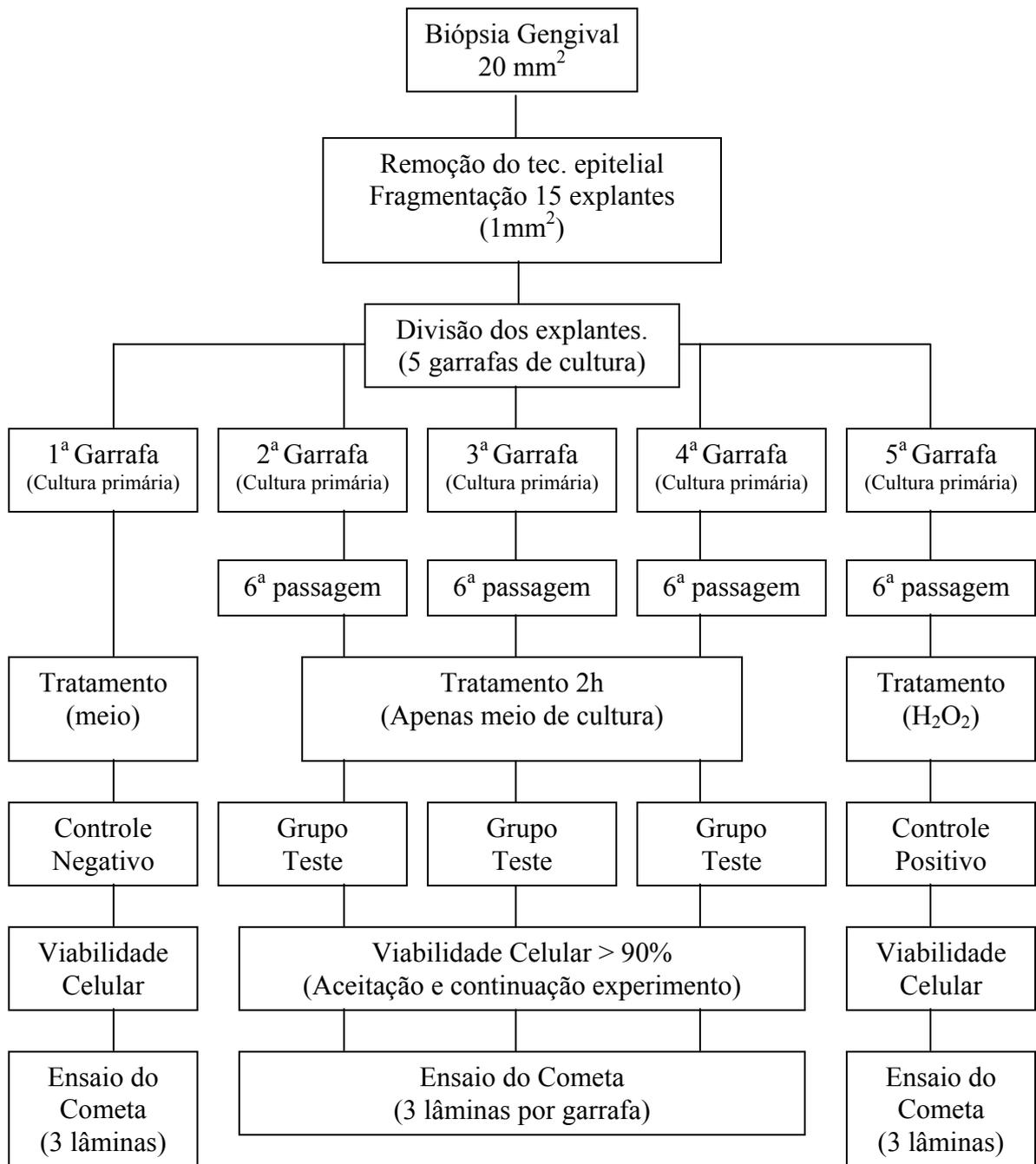


Figura 1 – Biópsia (explante) de aproximadamente 20mm² (4x5mm), obtida da região retromolar.

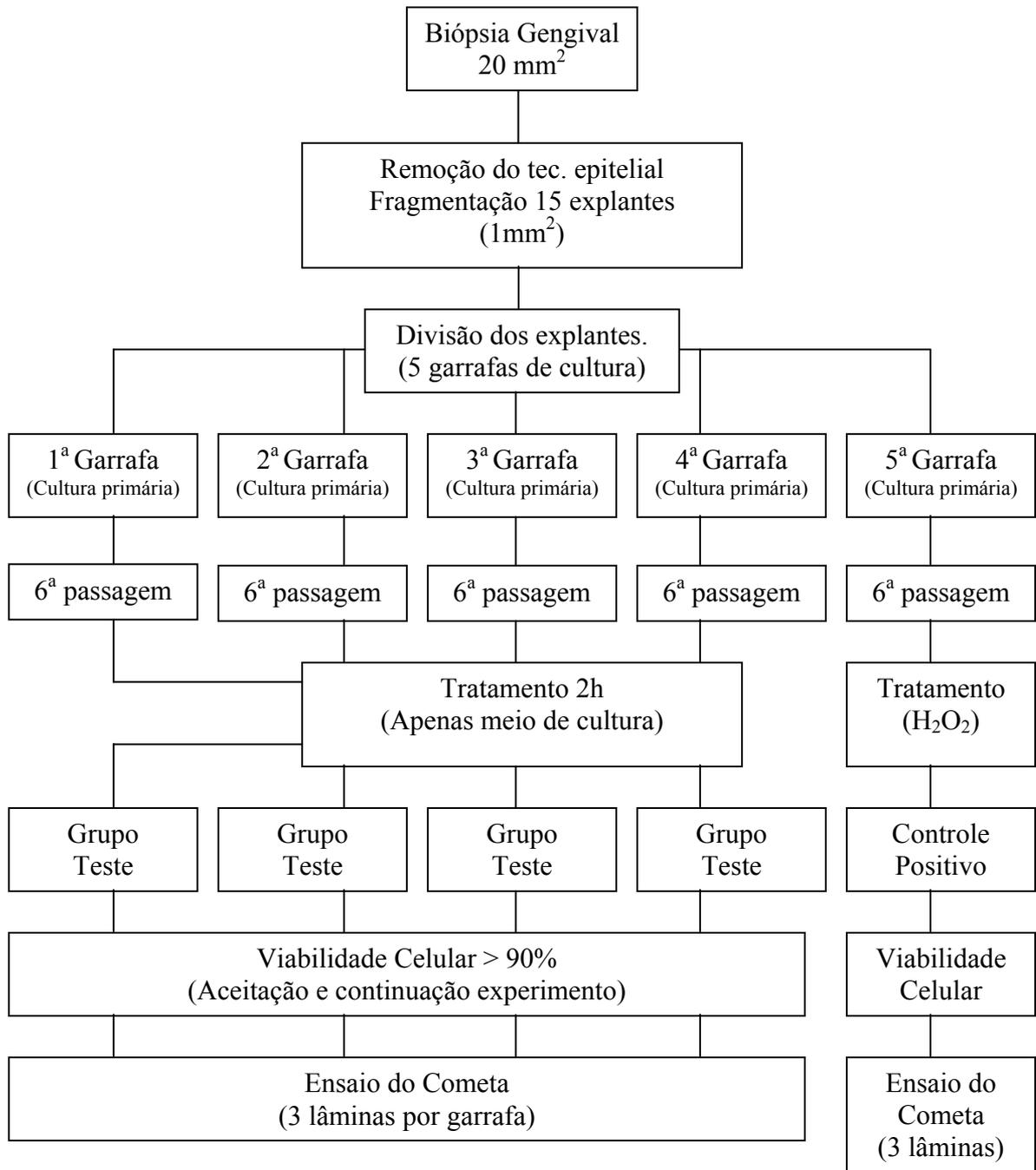
4.2.2 Desenho proposto do experimento

Inicialmente, o fluxograma proposto para a realização da pesquisa foi o seguinte:



4.2.3 Desenho do experimento realizado

Abaixo, segue o fluxograma do trabalho realizado.



OBS.: O grupo controle negativo foi excluído, pois a cultura primária, que não sofreu nenhuma passagem, não forneceu quantidade suficiente de células para a realização do Ensaio do Cometa.

4.2.4 Cultura primária

O protocolo de cultura utilizado foi aquele proposto por Kuru et al. (1998) com modificações. Estas foram realizadas durante o desenvolvimento do trabalho, de acordo com as necessidades, dificuldades e oportunidades de adoção de alterações pertinentes. Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos gengivais humanos foram realizados sob capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25 e 28°C, em um laboratório de segurança do tipo P2, preparado para a manipulação de microorganismos pertencentes ao grupo de risco 2 (risco individual moderado e risco coletivo limitado; microorganismos que podem provocar doenças no homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais do laboratório), assegurando maior proteção aos pesquisadores. Todas as substâncias líquidas foram quantificadas com o auxílio de micropipetas automáticas.

A amostra de 20mm² foi lavada (FIG. 2) por 2 vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e, posteriormente, o tecido epitelial foi removido com o auxílio de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica nº 15, em placas de Petri de 60mm de diâmetro, que continham 5ml do meio de cultura. A escolha do cultivo de fibroblastos gengivais eliminando os ceratinócitos reside no fato demonstrado por Løe et al. (1971 e 1974) de que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial. Após a desepitelização, a amostra foi fragmentada em 15 partes (explantes) de aproximadamente 1mm² (FIG. 3). Em cada uma das 5 (cinco) garrafas de cultura de 25cm², previamente pré-incubadas a 37°C, 5% de CO₂ (FIG. 8) com 2ml do meio de cultura devidamente suplementado, por 20min., para equilíbrio da fase gasosa, 3 (três) explantes foram adicionados concomitante a colocação de mais 2ml de meio de cultura (FIG. 4). As garrafas de cultura permaneceram invertidas por 2h na estufa a 37°C, 5% de CO₂ (NUAIRE™

US AUTOFLOW CO₂ Water Jacketed Incubator, EUA) para aderência dos explantes ao substrato. Após, as garrafas de cultura foram colocadas na sua posição original e checkou-se o crescimento celular, diariamente, através de um microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão).

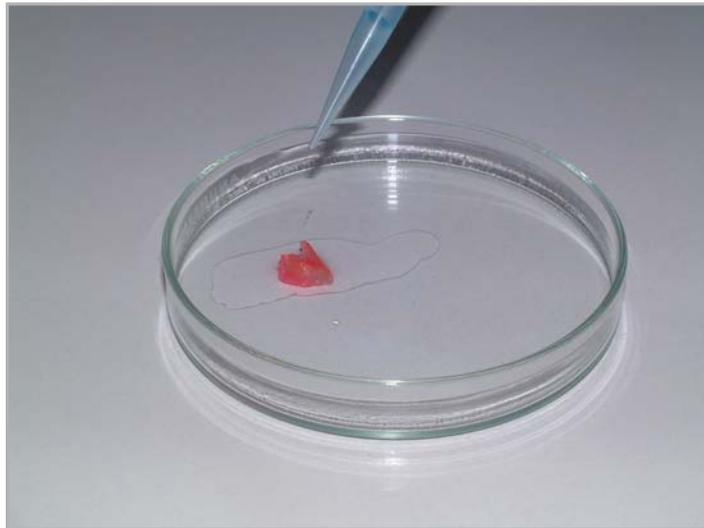


Figura 2 – Lavagem da amostra com PBS, com o auxílio de uma micropipeta.

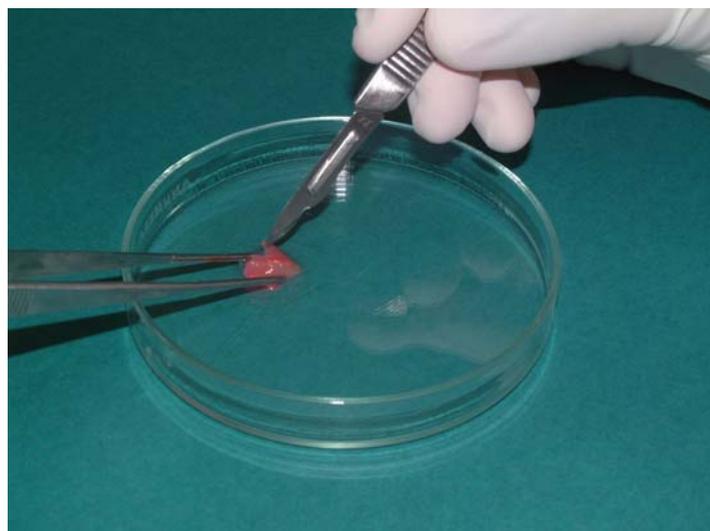


Figura 3 – Fragmentação da amostra, aproximadamente 1mm² cada explante.



Figura 4 – Colocação de um explante numa garrafa de cultura. Cada uma das cinco garrafas recebeu 3 explantes.

Quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas (para obter individualização celular) e essa cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1. Na primeira passagem, os explantes foram removidos. A subcultura, ou passagem de células de uma garrafa para outra, geralmente implica na subdivisão de uma população celular proliferativa capaz de perpetuação através de estabelecimento de uma linhagem celular. O número de passagem significa o número de vezes que uma cultura foi subcultivada.

O meio de cultura foi trocado a cada 4 (quatro) dias substituindo-se apenas metade do conteúdo das garrafas de cultura, ou seja, 2ml de meio de cultura novo. A alteração da coloração do meio de cultura, que indica atividade metabólica celular e alteração de pH, foi controlada diariamente.

4.2.5 Linhagem celular

A confluência celular foi verificada em microscópio invertido, indicando modulação da atividade mitótica celular. As células em cultivo sofrem um fenômeno que se conhece por inibição de contato, pois quando uma célula contata ao seu redor com outra célula e forma uma monocamada, inibe-se o processo mitótico (ALBERTS et al., 1989).

Para perpetuação dessa linhagem celular, o meio de cultura foi removido e essas células foram lavadas por 2 (duas) vezes com PBS (0,2ml/cm²) e retiradas de seu substrato pela ação da tripsina (500µl), durante 5min a 37°C (tripsinização). A inativação da tripsina foi realizada pela adição de 4ml de meio de cultura (DMEM/SFB/PSA). Posteriormente, as 5 (cinco) garrafas retornaram para a estufa de CO₂ onde permaneceram incubadas e monitoradas diariamente até que nova subconfluência fosse atingida.

Na 6^a passagem, as amostras celulares foram removidas das 5 (cinco) garrafas de cultura para análise da viabilidade celular e danos ao DNA e as células remanescentes foram congeladas para estocagem.

4.2.5.1 Escolha da 6^a passagem

De acordo com Freshney (1999), linhagens celulares com poucas passagens são instáveis e necessitam de um período de adaptação em culturas. No caso de fibroblastos humanos, estas culturas tornam-se estáveis e consistentes após a 5^a passagem e assim permanecem até a 35^a passagem. A utilização de células deve ser feita após o período de adaptação e previamente à senescência. Almeida-Lopes (1999) utilizou fibroblastos humanos na 6^a passagem em seus experimentos com o uso do laser. Huang et al. (2002) escolheram

células da 5^a a 7^a passagens para avaliar a citotoxicidade de cimentos adesivos ortodônticos sobre fibroblastos gengivais enquanto que para a mesma finalidade, Tang et al. (1999) usaram células da 6^a passagem.

4.2.6 Congelamento e descongelamento celular

Os protocolos de congelamento e descongelamento adotados foram aqueles elaborados por Juliane Araújo Greinert, revisados por Ryane L. Hess e Caroline Rigotto, modificados por Cibele Marina Gaido e aprovados pela Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, co-orientadora deste trabalho, em 23/05/2000, utilizados no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (Comunicação pessoal). Os passos foram os seguintes:

1) Congelamento de células

a) Preparar previamente o meio para congelamento em banho de gelo:

- 5ml de meio de crescimento
 - 4ml de SFB (40%)
 - 1ml de DMSO (10%)
- } USAR 1,8ml por criotubo

ATENÇÃO: Dimetilsulfóxido (DMSO) é tóxico e altamente inflamável.

b) lavar o tapete celular 3x com PBS;

c) tripsinizar as células, controlando o descolamento das células pelo microscópio;

- d) adicionar 10ml de meio de crescimento suplementado com 10% SFB + 1% PSA;
- e) transferir a suspensão celular para o tubo de centrifuga;
- f) centrifugar a 1000rpm por 3 a 5min;
- g) aspirar o meio (descarte), com muito cuidado para não aspirar as células do fundo do tubo;
- h) adicionar rapidamente no tubo de 15ml, 3,6ml de solução de congelamento, homogeneizar e transferir para um criotubo (1,8ml cada a ser realizado em banho de gelo);
- i) colocar os criotubos nos Mr. Frozen®, não esquecendo de checar o nível de álcool etílico 96°GL;
- j) colocar o Mr Frozen® no freezer (-80 °C), no mínimo, por 12h, e no máximo por 24h;
- k) Transferir para o container de nitrogênio líquido a -126 °C (MVE Inc., EUA).

2) Descongelamento de células

- a) Descongelar o criotubo em temperatura ambiente;
- b) centrifugar o criotubo em velocidade de 1000rpm (350Xg) por 2min. Desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em meio de crescimento suplementado + 10% SFB E 1% PSA;

- c) colocar todo o conteúdo do microtubo em uma garrafa pequena destinada ao cultivo das células;
- d) adicionar o mesmo meio de crescimento: meio de cultura/PSA 1% + 10% SFB;
- e) incubar a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por 1h;
- f) durante o tempo de incubação as células formarão tapete. Após esse período, retirar cuidadosamente o meio presente e adicionar uma nova quantidade do meio de crescimento;
- g) colocar novamente na estufa de CO₂.

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

4.3.1 Avaliação microscópica das alterações celulares

Qualquer adversidade da cultura celular, que compreende a desorganização do tapete celular, bem como o aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüentemente, o aparecimento de alterações morfológicas celulares, foi monitorada diariamente em microscópio de fase invertida (STREISSLE; SCHWOBEL; HEWLETT, 1981).

4.3.2 Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de Trypan

Diferentes técnicas de coloração (cristal violeta, eosina, vermelho neutro, azul de Trypan, etc.) são usualmente utilizadas para avaliar a citotoxicidade de substâncias. Neste trabalho foi utilizado o teste de exclusão com o azul de Trypan (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil), um corante marcador para células mortas. Este fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WILSON, 2000).

Após a confluência das garrafas de cultura que se encontravam na 5ª passagem, todo o meio de cultura (DMEM/SFB/PSA) foi removido e substituído apenas por 4ml meio de cultura DMEM, com exceção da garrafa do controle positivo, que recebeu novo meio de cultura DMEM associado com peróxido de hidrogênio (ver item 4.4.2). Após um período de incubação de 2h a 37°C, as células foram tripsinizadas, conforme já descrito anteriormente. A inativação da tripsina foi realizada com o acréscimo de 3ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Foi removida uma alíquota de 2ml dessa suspensão celular, de cada uma das 5 (cinco) garrafas, e acondicionada em microtubos de 2ml. Os microtubos foram centrifugados por 4min a 1000rpm/350Xg (Centrífuga 5410 Gerätebau. Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento (*pellet*) foi ressuspendido em 125µl de meio de cultura DMEM. Uma nova alíquota de 25µl dessa nova suspensão foi homogeneizada em um novo microtubo com mais 50µl do corante azul de Trypan (solução de 0,4% em PBS) e 25µl de meio de cultura. Os 100µl restantes da suspensão celular foram utilizados no Ensaio do Cometa (QUADRO 1). As contagens foram realizadas em câmaras de Neubauer (FIG. 5 e 6). As células coradas em azul representam as células mortas, enquanto que as células que não foram coradas representam as células viáveis. A viabilidade celular deveria permanecer acima

de 90% (HELBIG; SPEIT, 1997) para que o protocolo preliminar de cultura proposto fosse aceito e o experimento pudesse continuar.

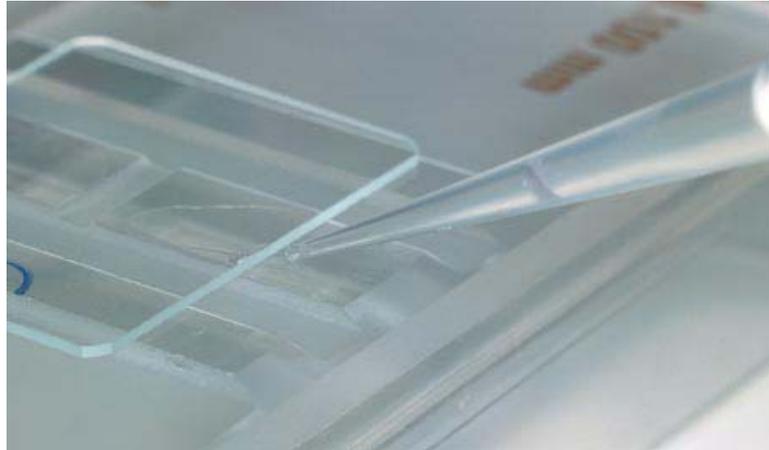


Figura 5 – Utilização da Câmara de Neubauer, com o auxílio de micropipetas, para a avaliação da viabilidade celular.

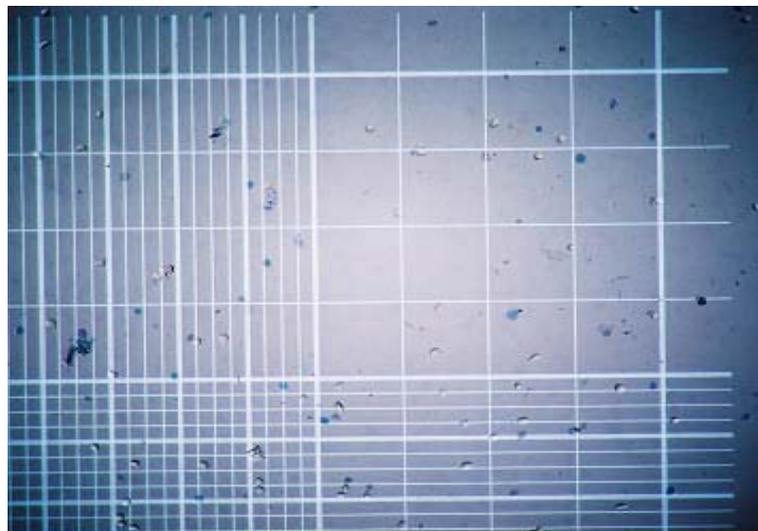


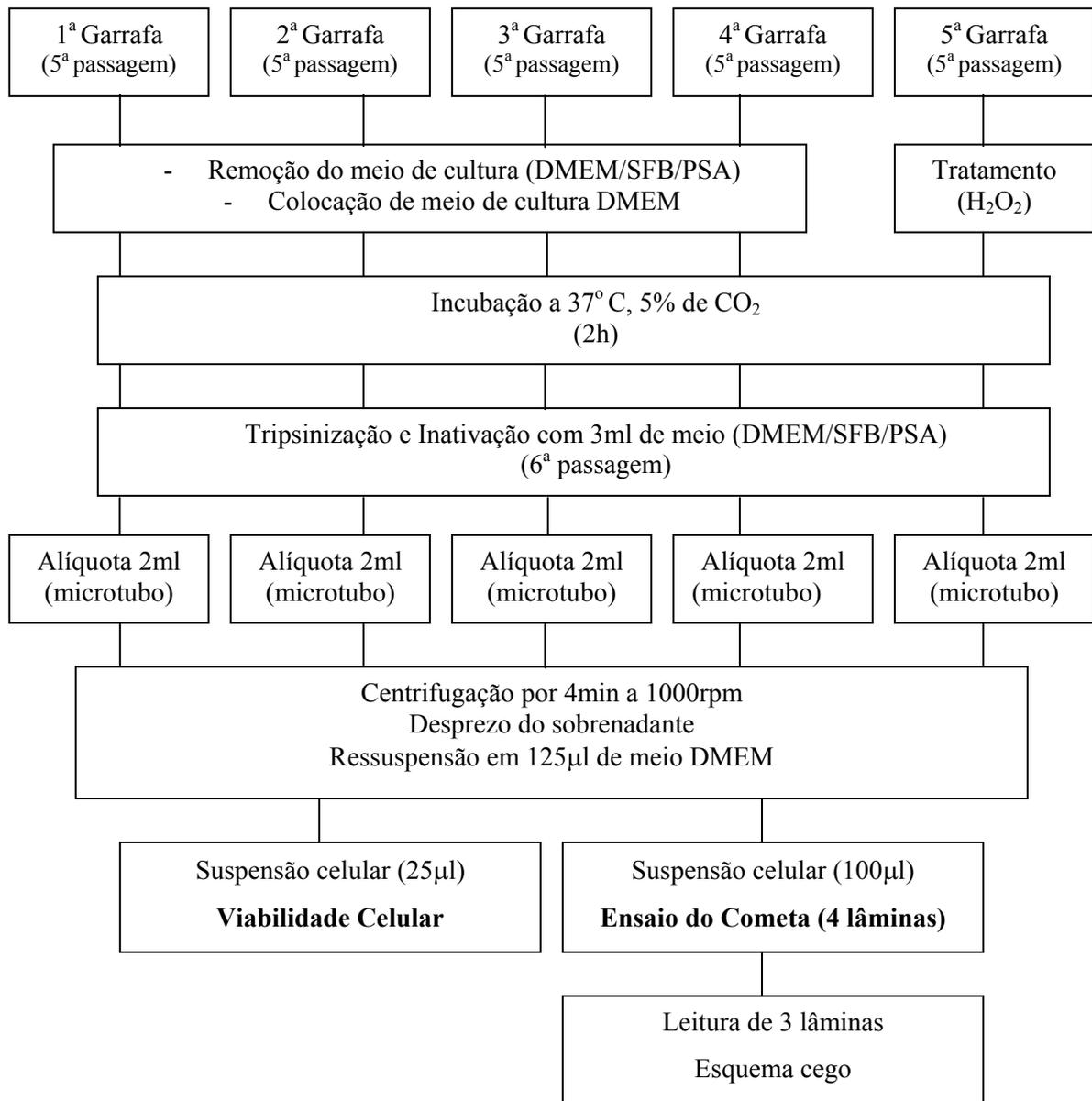
Figura 6 – Visualização em microscopia de fase invertida da Câmara de Neubauer. A contagem de células coradas e não-coradas fornece o índice de viabilidade celular.

4.4 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA

Neste trabalho, foi utilizada o Ensaio do Cometa/SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), proposta por Singh et al. (1988), com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al. (1996) e Segundo as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

4.4.1 Preparação da suspensão celular

Após a verificação da viabilidade celular, os restantes 100µl daquela suspensão foram adicionados a 200µl de agarose (Gibco) de baixo ponto de fusão para formar a segunda camada sobre as lâminas de microscópio (ver item 4.4.3.2). Foram preparadas 4 (quatro) lâminas com 75µl cada, para cada garrafa de cultura, das quais, apenas três foram usadas para análise (QUADRO 1).



Quadro 1 – Fluxograma das etapas propostas para a determinação da viabilidade celular e a realização do Ensaio do Cometa.

4.4.2 Preparação dos controles

Os controles positivo e negativo, além de auxiliarem na verificação das condições experimentais, funcionam como padrões no estabelecimento da classificação dos danos no DNA.

Como controle positivo foi utilizado o peróxido de hidrogênio (Nuclear, Diadema, Brasil), que é conhecido por causar danos no DNA através da geração de radicais de oxigênio (ANDERSON et al., 1994). O controle positivo (H_2O_2) foi preparado na concentração de $200\mu M$ a partir de uma solução a 30% de H_2O_2 (Nuclear), que foi então incubada com células de uma das garrafas de cultura, a $37^\circ C$, durante 2h.

O controle negativo deveria ser uma garrafa de cultura que sofresse o menor estresse possível, ou seja, o frasco da cultura primária. Porém o frasco escolhido não ofereceu uma quantidade de células suficientes para realizar o ensaio.

4.4.3 Preparação das lâminas

Segundo a técnica original de Singh et al. (1988), as lâminas deveriam ser preparadas como um sanduíche de 3 (três) camadas de agarose sobre lâminas de microscópio completamente foscas. Conforme as modificações propostas por Klaude et al. (1996), foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades. A vantagem da utilização de lâminas lisas, como descrito acima, é de que não há formação de *background*, tão comum quando se utilizam lâminas foscas, além do que, após a eletroforese, as lâminas poderão ser secas e fixadas em metanol, o que permite a estocagem das mesmas até a análise. Após coloração e análise, as lâminas podem ainda ser secas novamente e guardadas sem que haja perda importante de material ou alteração na aparência dos cometas.

4.4.3.1 Primeira camada

Lâminas de microscópio, foscas apenas em uma extremidade, limpas com etanol antes do uso, foram mergulhadas numa solução de agarose a 1,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, com ponto de fusão normal (Normal Melting Agarose, NMA, Gibco) a 56°C. Após, o lado inferior das lâminas foi limpo e as mesmas foram armazenadas a 4°C. As lâminas foram codificadas na extremidade fosca.

4.4.3.2 Segunda camada

A suspensão celular (100µl) previamente preparada foi dispersa em 200µl de uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting Agarose, LMA, Gibco) a 0,5% em PBS, mantida a 37°C. Imediatamente após a mistura, essa suspensão foi disposta sobre uma lâmina previamente preparada (pré-cobertura) e, então, coberta com uma lamínula de 24x60mm. As lâminas foram deixadas sob refrigeração (4°C) por 15min para a solidificação da agarose. A partir deste momento, as lâminas foram protegidas da luz com papel alumínio, para prevenção de danos adicionais ao DNA.

4.4.4 Lise celular

Após, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submersas numa solução de lise recém-preparada e mantida a 4°C, por um período não inferior a 1h. A solução de lise é composta por NaCl (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) 2,5M, EDTA (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) 100 mM, Tris-HCl (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) 10mM. Uma solução de NaOH (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) foi adicionada em q.s.p. para obter pH 10. No

momento do uso, acrescentou-se 10% de DMSO (Nuclear, Diadema, Brasil) e 1% de Triton X-100 (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA). As lâminas podem ser mantidas na solução de lise por até 30 dias.

A solução de lise é uma solução detergente com altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares.

4.4.5 Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise celular, as lâminas foram submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM de NaOH e 1mM de EDTA), previamente refrigerada, em banho de gelo, por 30min. A corrida de eletroforese foi efetuada numa cuba horizontal disposta em um banho de gelo, com voltagem e amperagem constantes, a 25V e 280-300 mA, por 30min.

Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespirilização dos sítios de rompimento da molécula de DNA (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

4.4.6 Neutralização e coloração

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas com uma solução de neutralização (0,4M de Tris-HCl, pH 7,5) por 5min, repetindo-se o procedimento 3 (três) vezes.

Em seguida, as lâminas foram coradas com 30µl de uma solução aquosa de brometo de etídeo (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) a 20µg/ml (um agente intercalante de DNA que

emite fluorescência quando exposto à radiação UV) e observadas ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX 400), aumento de 400x, com filtro de excitação de 515-560nm, com filtro de barreira de 590nm.

4.4.7 Análise dos cometas

A análise dos cometas foi realizada visualmente em esquema cego, conforme a classificação proposta por Kobayashi et al. (1995), seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae et al. (1998b).

No microscópio de epifluorescência foram examinadas ao acaso 50 células, na região central de cada lâmina codificada e os danos foram classificados em função da forma e do comprimento das caudas dos cometas: **classe 1**, sem cauda; **classe 2**, cometas com pequenas caudas (caudas com comprimento <25% do diâmetro da cabeça); **classe 3**, cometas com caudas médias (caudas com comprimento entre 25% e 100% do diâmetro da cabeça); **classe 4**, cometas com caudas longas (comprimento da cauda > diâmetro da cabeça); e **classe 5**, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas (FIG. 7).

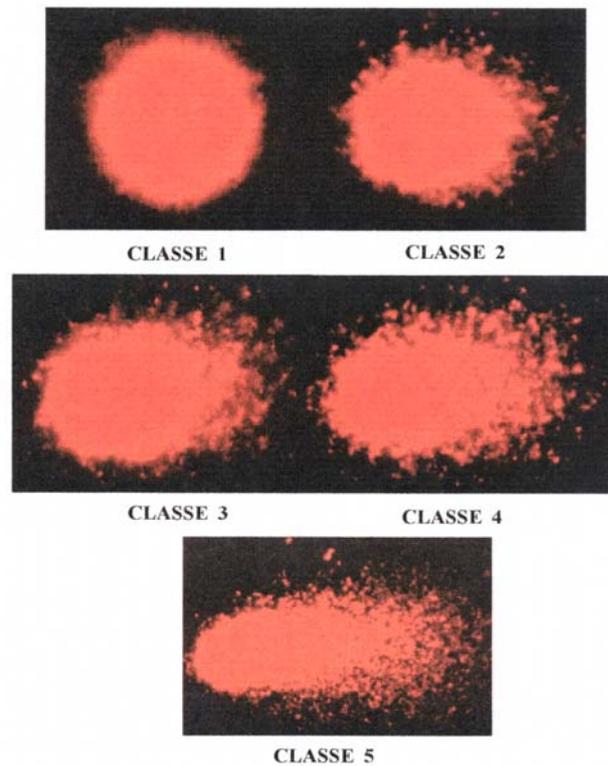


Figura 7 – Classificação das classes de cometa, segundo Kobayashi et al. (1995), com modificações Miyamae et al. (1998a).

Após a classificação das células, cada uma pertencendo a uma das cinco classes, foi realizado um escore visual (MIYAMAE et al., 1998a), no qual foram atribuídos valores de 0 (zero), que significava ausência de dano referente ao cometa classe 1 para núcleos intactos, a 4 (quatro), que consistia de dano máximo referente ao cometa classe 5. Dessa forma, o escore total de 50 (cinquenta) células variou de zero (totalmente sem danos) a 200 (totalmente danificadas).

4.5 AVALIAÇÃO DOS DADOS

O protocolo de cultura de fibroblastos gengivais humanos foi realizado em quintuplicata na fase de cultivo primário. As 5 (cinco) garrafas de cultura primária sofreram 6 (seis) passagens assim que atingiram a subconfluência celular, dando origem a uma cultura celular contínua. Foi realizada a análise da viabilidade celular dessas culturas e o protocolo de cultura seria considerado exitoso quando a viabilidade celular estivesse acima de 90% nos 4 (quatro) frascos dos Grupos-Teste (exceção do controle positivo).

O efeito dos tratamentos das células em relação à intensidade e frequência da formação de cometas foi analisado utilizando a análise de variâncias (ANOVA), com nível de significância de 5% e 1%. Após, foi utilizado o teste de Tukey a 5% e 1% para identificar diferenças significantes ou não entre os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA E DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS.

A cultura primária nas 5 (cinco) garrafas de cultura foi obtida em 25 dias (FIG. 8 e 9). As subculturas, realizadas até a 6^a passagem o que estabeleceu uma linhagem celular, foram obtidas após um período de 10 dias, em média (FIG. 10).

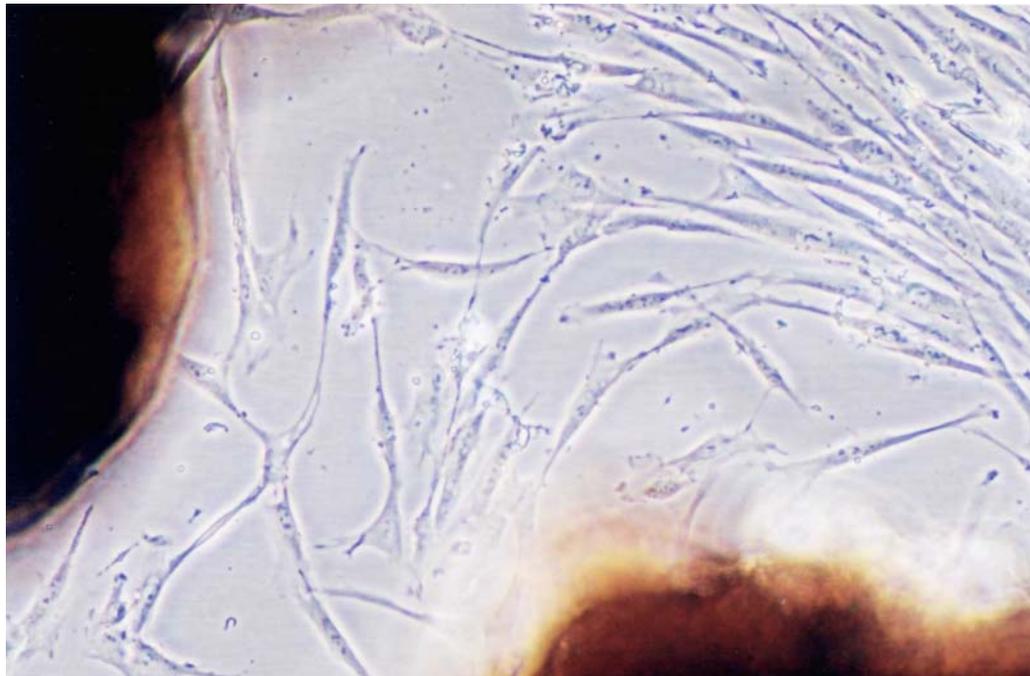


Figura 8 – Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 17 dias, em microscópio de fase invertida. 400X.

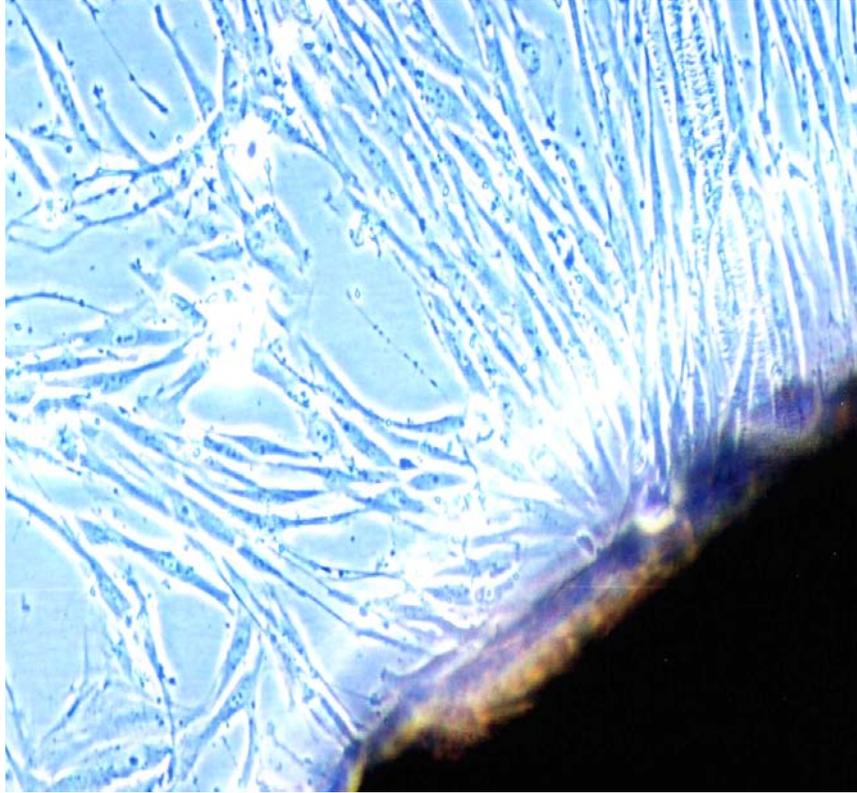


Figura 9 – Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 23 dias, em microscópio de fase invertida. 400X.

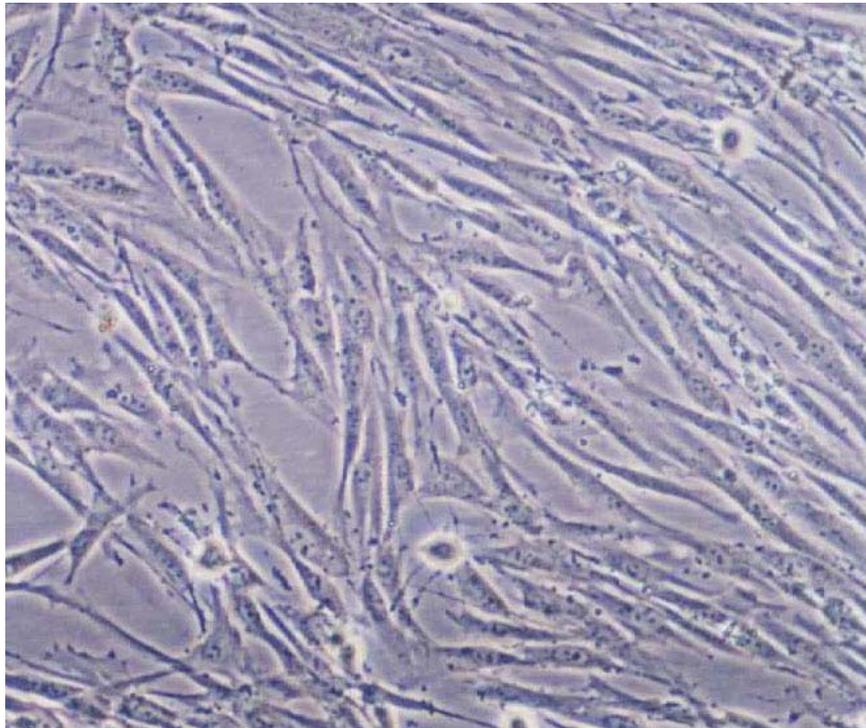


Figura 10 – Linhagem celular de fibroblastos, obtida após a 6ª passagem, com subconfluência de 70%, observada em microscopia de fase invertida. 400X.

5.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES CELULARES

Durante todo o período do experimento, ou seja, desde a cultura primária até a 6ª passagem, não foram observadas alterações morfológicas celulares nem desorganização do tapete celular (dados não mostrados).

5.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular obtida das suspensões celulares das 4 (quatro) garrafas dos Grupos-Teste e da garrafa Controle Positivo encontra-se na TAB. 1. A viabilidade celular das 4 (quatro) garrafas dos Grupos-Teste deveria ser acima de 90% para aceitação do protocolo de cultura. Como foi obtido um valor de 87,62% em uma das garrafas, realizou-se um teste de proporções ($p=90\%$) e demonstrou-se que esta diferença não era significativa a 1% (TAB. 1). Além disso, a média ponderada para os Grupos-Teste foi 91,54% (FIG. 11) e o desvio padrão foi 2,40. Dessa forma, o protocolo de cultura pôde ser considerado exitoso. Esse mesmo teste de proporções indicou que o valor obtido do Controle Positivo foi diferente estatisticamente de 90%.

Tabela 1 – Resultados da determinação da viabilidade celular de fibroblastos de gengiva humana sem tratamento algum (1ª a 4ª garrafas) e tratados com 200µM de peróxido de hidrogênio (5ª garrafa), através do método de exclusão do azul de Trypan.

Garrafas de cultura	Viabilidade celular (%)
Grupo Teste (1ª garrafa)	92,83
Grupo Teste (2ª garrafa)	91,24
Grupo Teste (3ª garrafa)	92,56
Grupo Teste (4ª garrafa)	87,62
Controle Positivo (5ª garrafa)	71,30*

* teste de proporções (p=90%) – significante a 1%.

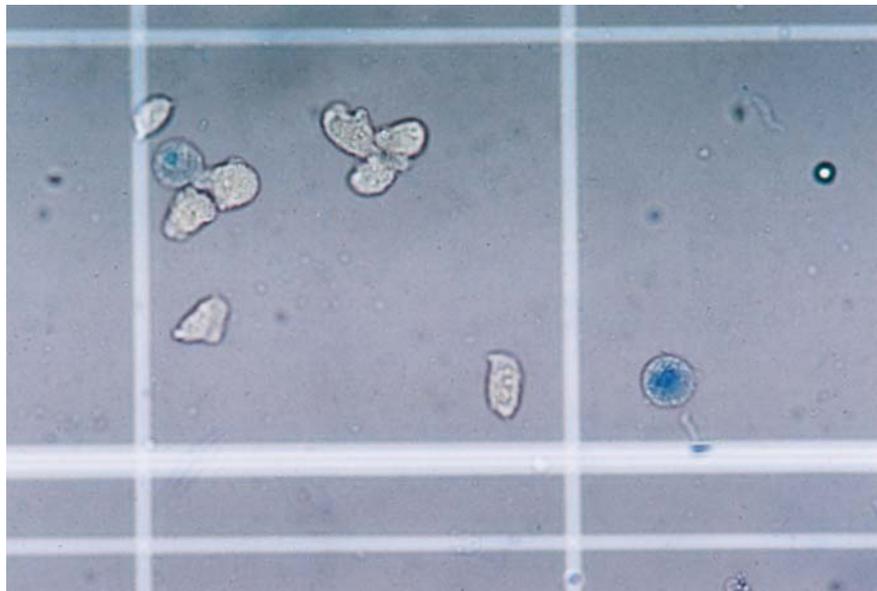


Figura 11 – Análise da viabilidade celular em câmaras de Neubauer (400X). As células não coradas são viáveis, enquanto que as coradas, são células mortas (não viáveis). Amostra do Grupo-Teste onde verificou maior quantidade de células viáveis.

5.4 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

A avaliação da genotoxicidade foi realizada através do Ensaio do Cometa. Os efeitos no DNA celular das amostras dos Grupos-Teste e do Controle Positivo estão representados na TAB. 2 e nas FIG. 12 e 13. A média ponderada de dano celular dos Grupos-Teste foi de 44,17.

Tabela 2 – Resultados obtidos através do Ensaio do Cometa dos escores dos danos celulares (0 a 200) computados nas garrafas do Grupo Teste e na garrafa do controle positivo (3 lâminas/garrafa de cultura).

Garrafas de cultura	Escore dos danos/lâmina (3 lâminas/ garrafa)	Escore médio dos danos (por garrafa)
Grupo Teste (1ª garrafa)		
1ª lâmina	25	31,67
2ª lâmina	0	
3ª lâmina	75	
Grupo Teste (2ª garrafa)		
1ª lâmina	50	53,67
2ª lâmina	68	
3ª lâmina	43	
Grupo Teste (3ª garrafa)		
1ª lâmina	34	41,67
2ª lâmina	60	
3ª lâmina	31	
Grupo Teste (4ª garrafa)		
1ª lâmina	59	49,67
2ª lâmina	21	
3ª lâmina	69	
Controle Positivo (5ª garrafa)		
1ª lâmina	200	193,67
2ª lâmina	195	
3ª lâmina	186	

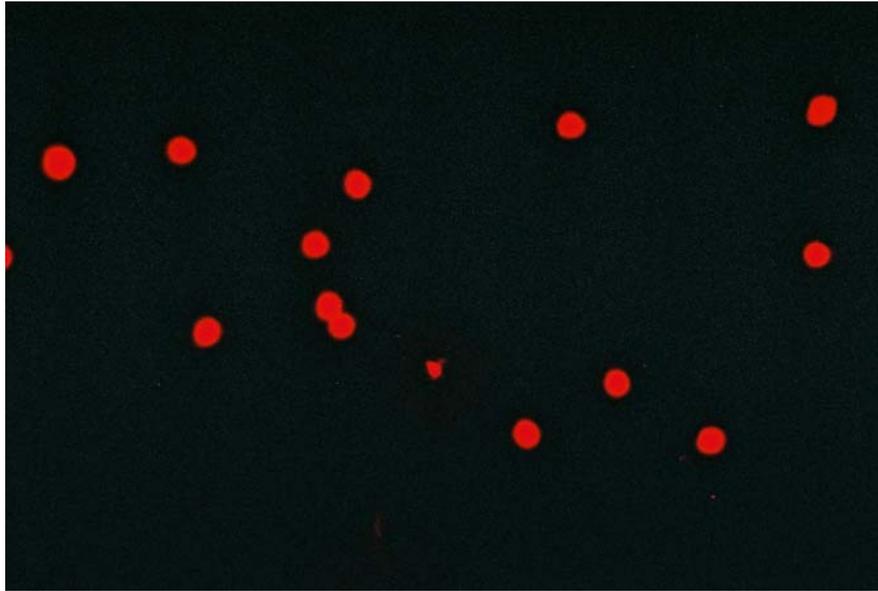


Figura 12 – Fotografia dos fibroblastos gengivais humanos submetidos ao Ensaio do Cometa, aumento de 200X, mostrando cometas sem cauda, classificados como classe 1, indicando a ausência de danos celulares. (Fonte: autor).

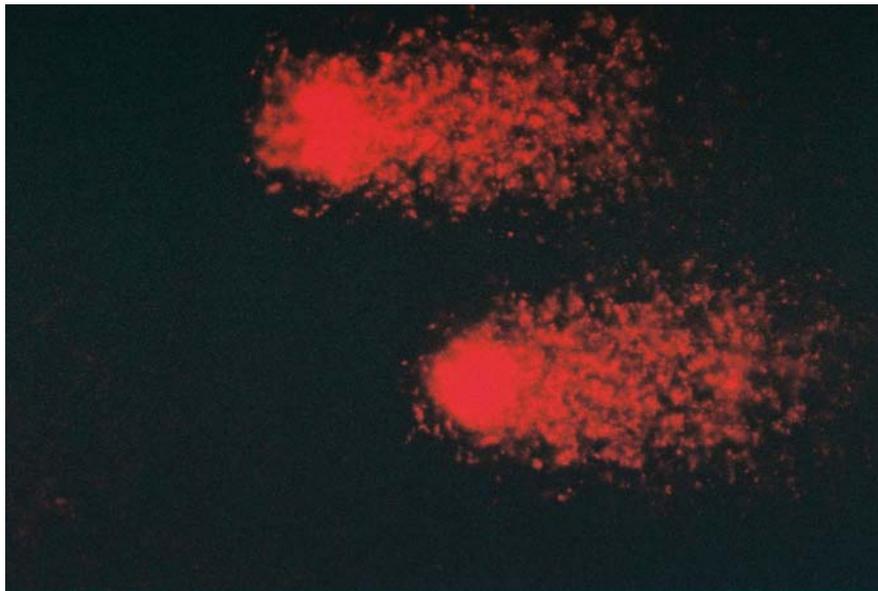


Figura 13 – Fotografia dos fibroblastos gengivais humanos tratados com 200µM de peróxido de hidrogênio, submetidos ao Ensaio do Cometa, aumento de 400X, mostrando cometas mal definidos e com caudas longas, classificados como classes 4 e 5, indicando presença de danos celulares. (Fonte: autor).

Para avaliar a frequência e intensidade da formação de cometas aplicou-se a análise de variâncias (ANOVA), com nível de significância de 5% e 1% (TAB. 3). Verificou-se diferença estatística em pelo menos uma das médias apresentadas na TAB. 2.

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) para os danos médios encontrados.

FV	GL	SQ	QM	F	Valor-P
Entre Garrafas	4	54489,6	13622,4	28,73	0,0000 (sig. a 5% e 1%)
Erro	10	4741,3	474,13		
Total	14				

FV – fontes de variação; GL – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio
F – estatística F; Valor-P – probabilidade associada à estatística F.

A TAB. 4 mostra, após a aplicação do Teste de Tukey a 5%, que as amostras dos Grupos-Teste apresentaram semelhança entre si e quando comparadas com o Controle Positivo, mostraram-se diferentes estatisticamente.

Tabela 4 – Resultados da aplicação do Teste de Tukey a 5% para a separação das médias dos escores dos danos causados ao DNA dos fibroblastos gengivais humanos sem tratamento algum (1^a a 4^a garrafas) e tratados com 200µM de peróxido de hidrogênio (5^a garrafa), através do Ensaio do Cometa.

Garrafas de cultura	Mediados escores de danos ao DNA	Teste de Tukey (p<0,05)
Grupo Teste (1 ^a garrafa)	31,67	A
Grupo Teste (2 ^a garrafa)	53,67	A
Grupo Teste (3 ^a garrafa)	41,67	A
Grupo Teste (4 ^a garrafa)	49,67	A
Controle Positivo (5 ^a garrafa)	193,67	B

OBS: letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

O Teste de Tukey a 1% também foi aplicado e os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores e são apresentados na FIG. 14.

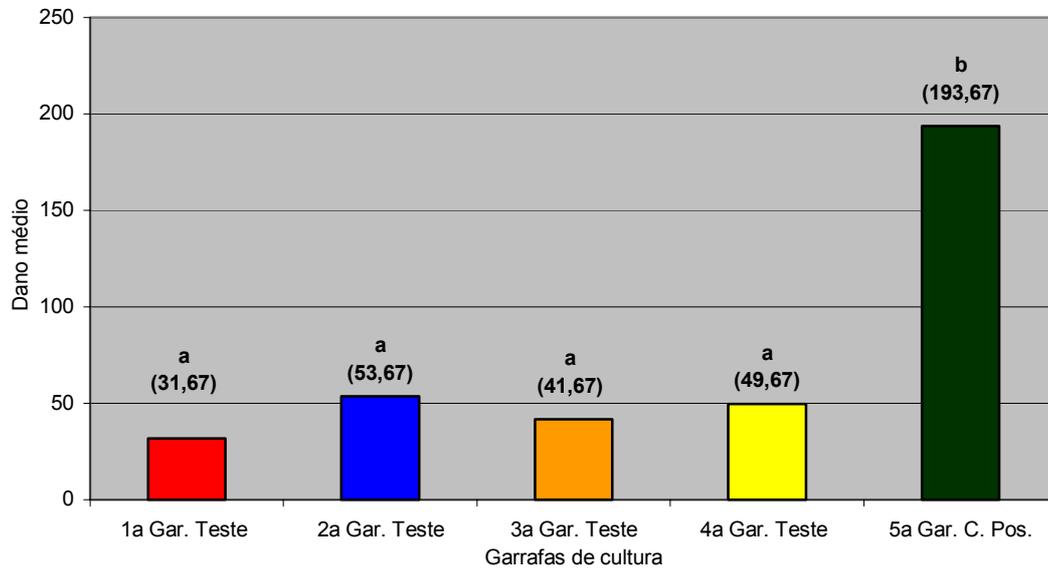


Figura 14 – Resultados da aplicação do Teste de Tukey a 1% para a separação das médias dos escores dos danos causados ao DNA dos fibroblastos gengivais humanos sem tratamento algum (1^a a 4^a garrafas) e tratados com 200 μ M de peróxido de hidrogênio (5^a garrafa), através do Ensaio do Cometa. (letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias).

6 DISCUSSÃO

A medicina reconstrutiva, baseada na terapia gênica com a utilização da clonagem, na pesquisa de células-tronco e na engenharia tecidual, representa a mais excitante área de investigação neste início de milênio. A engenharia tecidual caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas. Atualmente, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de regeneração verdadeira, essencial para as estruturas humanas danificadas (ASSAEL, 2003).

Na odontologia, Pini Prato et al. (2000) relataram o caso de uma paciente, que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para restabelecimento da mucosa ceratinizada, previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreendeu o cultivo primário de fibroblastos a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores obtiveram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, o que foi confirmado através de análise macroscópica e histológica. Recentemente, os mesmos autores relataram o sucesso da técnica em 6 pacientes tratados através da engenharia de tecidos (PINI PRATO et al., 2003). Adicionalmente, a aplicação de enxertos de mucosa oral gerada, *in vitro*, em defeitos da cavidade oral (LANGDON et al., 1991), em cirurgias

periimplantares (UEDA et al., 1998), em procedimentos protéticos (BORDNER; GROSSMAN, 2001) e em vestibuloplastias (RAGHOEBAR et al., 1995) têm sido utilizada com sucesso.

Sabe-se que os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras); (2) matrizes e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento e adesinas (UEDA et al., 2000). Dessa forma, o cultivo de fibroblastos em matrizes biocompatíveis pode ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares, que necessitam de aumento de tecido mole. Grande parte dos procedimentos cirúrgicos periodontais e perimplantares reconstrutivos necessita de áreas doadoras intrabuciais de tecido mole, com a remoção de tecido doador do palato, áreas edêntulas, túber, ou ambas, mas tais procedimentos resultam em um pós-operatório doloroso e num aumento do tempo cirúrgico (PINI PRATO et al., 2000).

Em relação as matrizes disponíveis para a transporte e proliferação celular, essas podem ter várias origens, como os polihidroxicanoatos, tais como ácido polilático, ácido poliglicólico, poli-caprolactona (PEGO et al., 2003), hidrogéis à base de colágeno, polissacarídeos, ou ambos, tais como o alginato e a quitosana (LEE et al., 2000; PIEPER et al., 1999) e devem apresentar integridade estrutural para que novos tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000; STAMMEN et al., 2001). No final do processo reconstrutivo, o biomaterial deve ser facilmente integrado no tecido neoformado, sem qualquer reação de corpo estranho e comportamento residual.

Além das matrizes, o desenvolvimento de protocolos de cultura de células humanas apropriadas faz-se necessário. Nesse contexto, os fibroblastos são as células encontradas com alta predominância nos tecidos conjuntivos periodontais e periimplantares e responsáveis pela

produção e manutenção da matriz extracelular (TEN CATE, 1989). Alguns estudos sugerem a heterogeneidade dos fibroblastos presentes nesses tecidos com fenótipo único e atividade funcional distinta (FRIES, 1994). Enquanto os fibroblastos gengivais garantem a síntese e integridade do tecido conjuntivo gengival, os fibroblastos dos ligamentos periodontais com funções especializadas são responsáveis pela formação e manutenção do ligamento periodontal, além do reparo, remodelamento e regeneração do cemento e osso alveolar adjacente, *in vivo* (NYMAN et al., 1982). Nesta dissertação, a escolha do cultivo de fibroblastos gengivais eliminando o tecido epitelial reside no fato, demonstrado por Løe et al. (1971 e 1974), de que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial. Dessa forma, a cultura de fibroblastos existentes no tecido conjuntivo da mucosa ceratinizada foi a primeira opção de cultivo.

Na obtenção de uma cultura celular primária, a partir de explantes de tecido conjuntivo, pela desagregação enzimática ou mecânica e mantida em meios de cultura suplementados com soro, os fibroblastos proliferam-se rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Após algumas passagens, geralmente, apenas os fibroblastos são as células proliferativas sobreviventes (SATO et al., 1994). Neste trabalho, foram utilizadas células da 6^a passagem, pois de acordo com Freshney (1999), as linhagens celulares com poucas passagens são instáveis e necessitam de um período de adaptação em culturas. No caso de fibroblastos humanos, estas culturas tornam-se estáveis e consistentes após a 5^a passagem. A utilização de células deve ser feita após o período de adaptação e previamente à senescência. Almeida-Lopes (1999) utilizou fibroblastos humanos na 6^a passagem em seus experimentos com o uso do laser. Huang et al. (2002) escolheram células da 5^a a 7^a passagens para avaliar a citotoxicidade de cimentos adesivos ortodônticos sobre fibroblastos gengivais, enquanto que para a mesma finalidade, Tang et al. (1999) usaram células da 6^a passagem.

Nesta pesquisa, após o cultivo primário, as células derivadas da gengiva humana mostraram, morfológicamente, aspecto fibroblástico, com fenótipo alongado ou estrelado e longos prolongamentos citoplasmáticos, compatíveis com os achados de outros pesquisadores (TEN CATE, 1989; SATO et al., 1994; BEERTSEEN; Mc CULLOCH; SODEK, 1997).

Kent et al. (1996) observaram uma subconfluência de 60% a 70% em culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos após 20-21 dias de cultivo e suas subculturas foram realizadas a cada 10 a 15 dias. Os explantes utilizados foram tecidos gengivais removidos, em cunha distal, de um dos molares sem envolvimento periodontal. Almeida-Lopes (1999) desenvolveu uma linhagem celular de fibroblastos humanos gengivais e sua cultura primária foi estabelecida 20 dias após a incubação dos explantes. Sant'Anna et al. (2002) verificaram subconfluência de 70% após 3 a 4 semanas de cultivo. Neste experimento, uma subconfluência de 70% foi verificada após 25 dias do cultivo dos explantes obtidos de uma região retromolar saudável, concordante com os trabalhos supra-citados.

As subculturas foram estabelecidas, em média, a cada 10 dias, inexistindo uma diminuição da capacidade proliferativa celular com as passagens realizadas. Kent et al. (1996) e Almeida-Lopes (1999) apresentaram resultados semelhantes. Sant'Anna et al. (2002) obtiveram uma taxa homogênea de proliferação das células até a 10^a passagem, no entanto, após essa passagem as células proliferaram mais lentamente, possivelmente, refletindo a perda das propriedades fisiológicas celulares *in vivo*. Pendergrass; Angello; Norwood (1989) observaram perda da capacidade proliferativa de suas culturas de fibroblastos, porém, seus estudos foram feitos em culturas que sofreram aproximadamente 70 passagens.

Neste trabalho, não foi observada desorganização da monocamada celular até a 6^a passagem. De acordo com Streissle; Schwobel; Hewlett (1981), o aparecimento de alterações morfológicas, tais como células com aspecto granuloso, arredondado e/ou vacuolizado, é

resultado de adversidades que comprometem o cultivo celular, como por exemplo, a idade da cultura ou a ação de agentes químicos citotóxicos. Kent et al. (1996) encontraram células contendo vacúolos nas 9^a e 10^a passagens, porém, em quantidades reduzidas quando comparadas ao número de células normais.

Ainda neste trabalho, a viabilidade celular obtida, determinante para o estabelecimento e aceitação do protocolo de cultura, foi $\geq 90\%$ (TAB. 1, teste de proporções, $p=90\%$). Kent et al. (1996) encontraram valores acima de 90% em cultura de fibroblastos gengivais humanos até a 7^a passagem, através do método de exclusão do corante azul de Trypan. Rossa Júnior; Martinez; Silvério (2002) também encontraram valores acima de 90% em linhagens contínuas de fibroblastos adquiridas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil), utilizando a mesma metodologia deste trabalho. Andrighetti-Frohner et al. (2003) relataram índices de viabilidade celular, através do método de exclusão pelo corante azul de Trypan, acima de 90% para linhagens contínuas de fibroblastos obtidos de rins embrionários do macaco *rhesus* e fibroblastos de rins do macaco verde da África. A viabilidade celular determinada através do referido teste indica a presença de células mortas com membranas desintegradas ao final dos tratamentos.

Além da citotoxicidade, a genotoxicidade tem um significado importante quando ocorre em células viáveis que foram capazes de sobreviverem ao agente citotóxico, portanto, recomenda-se a realização do Ensaio do Cometa em amostras com viabilidade celular acima de 70% (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; TICE et al., 2000), pois a migração do DNA de células mortas é detectada por este ensaio, podendo influenciar na estimativa dos danos provocados. Os Grupos-Teste desse experimento apresentaram valores iguais ou acima de 90% (teste de proporções, $p=90\%$) enquanto que o Controle Positivo apresentou-se superior a 70%.

Os escores dos danos ao DNA dos fibroblastos dos Grupos-Teste foram 31,67; 53,67; 41,67 e 49,67. Esses valores, relativos às 4 (quatro) garrafas de cultura, não apresentaram diferenças significativas entre si (TAB. 4, FIG. 18). As células dos Grupos-Teste apresentaram danos, porém, os escores encontrados podem ser considerados baixos, quando comparados com os escores do Controle Positivo (193,67). Andrighetti-Frohner (2003) encontrou escores de danos de 12,67 e 33,33 ao DNA de fibroblastos de rins do macaco verde da África e de fibroblastos de rins embrionários do macaco *rhesus*, respectivamente, em seus controles negativos, que, assim como no protocolo de cultura deste trabalho, consistiram apenas do meio de cultura e dos reagentes necessários para a manutenção celular.

O dano provocado ao DNA dos fibroblastos humanos tratados com peróxido de hidrogênio (200 μ M), reconhecido agente genotóxico, foi significativamente maior que o dano causado ao DNA das células dos Grupos-Teste (TAB. 3 e 4, $p < 0,01$). O escore desse dano foi de 193,67, valor próximo a 200 (células totalmente danificadas). Andrighetti-Frohner (2003) encontrou 153,33 e 142,83 de escores de danos causados ao DNA de fibroblastos de rins do macaco verde da África e de fibroblastos de rins embrionários do macaco *rhesus*, respectivamente, quando essas células foram tratadas com 200 μ M de peróxido de hidrogênio.

Woollons et al. (1997) encontraram escores baixos ($\cong 12$), através do Ensaio do Cometa nos fibroblastos humanos não expostos a radiação em seu estudo (controles negativos), porém esses autores utilizaram enzimas específicas de reparo de DNA (endonuclease III e endonuclease T4) durante o ensaio do cometa. Adicionalmente, esses autores avaliaram os cometas através do aumento das caudas (comprimento) em μ m e não em escores como realizado em nosso experimento. Vale ressaltar que mesmo as células de seu grupo controle (sem irradiação) tratadas com enzimas apresentaram danos, porém escores baixos quando comparados com as células que sofreram irradiação.

Duas hipóteses são sugeridas para explicar o dano induzido pelo H_2O_2 . A primeira é a formação de radicais hidroxila ($OH\cdot$), através do processo de catálise por metais de transição, tipicamente Fe^{+2} , sendo esta reação denominada reação de Fenton (DREHER; JUNOD, 1996). A segunda hipótese seria a habilidade dos radicais ($OH\cdot$) e outras formas radicalares, que provocam estresse oxidativo, de causar danos no DNA, através da ativação de uma série de eventos metabólicos celulares, permitindo a atividade de enzimas nucleases, as quais clivam a cadeia de DNA. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente (HALLIWELL; ARUOMA, 1991). O peróxido de hidrogênio induz aumento dos danos ao DNA concentração-dependente (SINGH et al., 1991; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995) e uma resposta celular heterogênea que consiste na formação de diferentes classes de cometa (SINGH et al., 1991; TICE et al., 1990).

A sensibilidade do ensaio do Cometa permite utilizá-lo como uma potente ferramenta para o estudo de genotoxicidade, já que aproximadamente 85% dos estudos realizados nessa área encontraram resultados positivos, apesar de que mais estudos são necessários para as investigações de persistência e de reparo dos danos observados e suas correlações com aberrações cromossômicas, mutações ou indução da formação de micronúcleos e mais importante, para a determinação do significado biológico do dano ao DNA observado pela técnica (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

A utilização de apenas um sítio bucal clinicamente saudável foi uma das limitações do trabalho, apesar da obtenção do cultivo primário nas 5 garrafas de cultura. Todas essas garrafas partiram de uma amostra de um mesmo doador; no entanto, somente o aumento no número de participantes confirmará o sucesso ou não do protocolo preliminar proposto.

A participação de um indivíduo não fumante, principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento de protocolos de cultura, fornece maior segurança, pois sabe-se

que derivados do cigarro afetam os fibroblastos gengivais, em relação à sua adesão e proliferação (POGGI; ROTA; BORATTO, 2002). Essa possibilidade de alteração, por ação de derivados do cigarro, nos fibroblastos gengivais, que, posteriormente seriam cultivados resultou na escolha por um indivíduo não fumante.

A ausência de um grupo controle negativo (item 4.2.3) para a execução do Ensaio do Cometa diretamente na cultura primária foi outra dificuldade encontrada nesse experimento. Não foram encontradas na literatura consultada, pesquisas que correlacionam a cultura primária de fibroblastos gengivais humanos e o uso do Ensaio do Cometa. Portanto, novas investigações são pertinentes para a confirmação ou corroboração dessa limitação.

Os resultados dessa dissertação, apesar de preliminares, possibilitam a adoção do mesmo protocolo de cultura em novos voluntários. Além disso, vislumbra-se a possibilidade futura da utilização da engenharia tecidual, com a finalidade de obtenção de tecidos gengivais e periimplantares, de acordo com necessidades estéticas, funcionais e higiênicas. A eliminação de uma grande quantidade de tecido conjuntivo doador, a diminuição de processos álgicos, de cicatrizes residuais e de processos hemorrágicos, são estímulos na busca pela implementação dessa nova modalidade de tratamento.

7 CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um protocolo preliminar de cultura de fibroblastos de gengiva humana e uma linhagem celular, a partir de cultivo primário desses fibroblastos, oriundos de um sítio bucal clinicamente saudável.

A viabilidade celular acima de 90%, detectada através do método de exclusão do corante azul de Trypan, e os baixos escores dos danos causados ao DNA, obtidos através do Ensaio do Cometa, permitem o uso dessa linhagem celular com segurança em pesquisas posteriores.

REFERÊNCIAS²

ABUKAWA, H.; TERAI.; HANNOUCHE, D.; VACANTI, J.P.; KABAN, L.; TROULIS, M.J. et al. Formation of the mandibular condyle in vitro by tissue engineering. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 94-100, 2003.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, London, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Mol. Biol. Cell.** New York: Plenum Press, 1989. p.123-156

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências – Opção Engenharia Biomédia) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

ANDERSON, D.; YU, T.; MCGREGOR, D. Review: comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998.

ANDERSON, D.; YU, T.W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. **Mutat. Res.**, London, v. 307, p. 261-271, 1994.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Opção Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.

² Baseado na NBR 6023: 2002 da ABNT.

ASSAEL, L. A. The promise of tissue engineering. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, n.2, p.155-156, 2003.

BAUME L.J.; HOLZ J.; FIORE DONNO, G. Produits intermediaires d'obturation soumis au test biologique normalise [Biological testing of intermediate lining substances]. **J. Can. Dent. Assoc.**, Edinburg, v.38, p.18-27, 1972.

BEERTSEN, W.; Mc CULLOCH, C.A.G.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. **J. Periodontol.** 2000, Chicago, v. 13, p. 20-75, 1997.

BODNER, L.; GROSSMAN, N. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: A clinical study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, p. 169-173, 2003.

BODNER, L.; GROSSMAN, N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery. **J. Isr. Dent. Assoc.**, v. 18, p. 32-34, 2001.

BORKE, J. L.; MAILHOT, J. M. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. **Clin. Oral Implants. Res.**, Copenhagen, v.9, n.1, p.43-50, 1998.

BOYCE, S. T.; HANSBROUGH, J. F. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6 sulfate substrate. **Surgery**, v. 103, p.421-431, 1988.

BROWN, R. A.; PORTER, R. A. Tissue engineering. In: MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3. ed. Oxford: Oxford University press, 2000. cap. 6.

BURT, A.M.; PALLET, C.D.; SLOANE, J.P.; O'HARE, M.J.; SCHAFNER, K.F.; YARDENI, P.; ELDAD, A.; CLARKE, J.A.; GUSTERSON, B.A. Survival of culture allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. **Br. Med. J.**, London, v. 298, p.915-917, 1989.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **J. Exp. Med.**, Hampshire, v. 15, p.516-528, 1912.

COLLINS, A.R. The Comet assay: principles, applications and limitations. In: DIDENKO, V.V. (Ed.). **Methods Mol. Biol.** Totawa: Humana, 2002. v. 203, p. 163-177.

COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKA, M.; PETROVSKA, H. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 30, p. 139-146, 1997.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chem. Ind.**, v. 24, p. 950-954, 1992.

DENNIS, L. W. Tissue-cultured skin grafts. **J. Burn Care Rehab.**, v. 13, p. 93-94, 1992.

DREHNER, O.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur. J. Cancer**, v. 32A, p. 30-38, 1996.

EARLE, W.R. Production of malignancy in vitro: IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 4, p.165-212, 1943.

EISEBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 193-236, 2002.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, London, v. 339, p. 37-59, 1995.

FERRER, M.; SANCHEZ-LAMAR, A.; FUENTES, J.L.; BARBE, J.; LLAGOSTERA, M. Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. **Mutat. Res.**, London, v. 517, p. 251-254, 2002.

FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C. Angiogenesis *in vitro*. **Nature**, v. 288, p.551-556, 1980.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells. **A Multimedia Guide**. Wiley-Liss, 1999. CD.

FRESHNEY, R. I. **Biology of the cultured cell**: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p.347.

FRIES, K. M. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 72, p. 283-292, 1994.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p.364-365, 1952.

GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p.5665-5668, 1979.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v. 281, p. 9-19, 1991.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 4, p.140-143, 1907.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HELBIG, R.; SPEIT, G. DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studied with the comet assay. **Mutat. Res.**, London, v. 377, p. 279-286, 1997.

HUANG, T.H.; TSAI, C.Y.; CHEN, S.L.; KAO, C.T. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer cell-line. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.63, n.6, p.814-821, 2002.

KAN, E.; UNDERGER, U.; BALI, M.; BASARAN, N. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline Comet assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. **Mutat. Res.**, London, v. 520, p. 151-159, 2002.

KARRING, T., LANG, N.P.; LÖE, H. The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation. **J. Periodont. Res.**, Chicago, v.10, p.1-11, 1974.

KARRING, T., OSTERGAARD, E.; LÖE, H. Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingival and alveolar mucosa. **J. Periodont. Res.**, Chicago, v.6, p.282-293, 1971.

KAWAHARA H, SHIOTA M, YAMAKAWA Y. Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. **J. Osaka Odontol. Soc.**, Osaka, v.18, p.348, 1955.

KENT, L.W.; DYKEN, R.A.; RAHEMTULLA, F.; ALLISON, A.C.; MICHALEK, S.M. Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. **Archs. Oral Biol.**, v. 41, n. 3, p. 262-270, 1996.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, London, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 2, n. 3, p. 103-115, 1995.

KURU, L; PARKAR, M.H.; GRIFFITHS, G.S.; NEWMAN, H.N.; OLSEN, I. Flow cytometry of ingival and periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, Washington, v.77, n.4, p.555-564, 1998. April.

LAFFON, B.; PÁ SARO, E.; MÉNDEZ, J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the Comet assay. **Toxicol. Lett.**, v. 126, p. 61-68, 2002.

LANGDON, J.; WILLIAMS, D.M.; NAVSARIA, H.; LEIGH, I.M. Autologous keratinocyte grafting: A new technique for intra-oral reconstruction. **Br. Dent. J.**, London, v. 171, n.3-4, p. 87-90, 1991.

LANGELAND L. K., GUTTUSO J, JEROME D.R., LANGELAND K. Histologic and clinical comparison of addent with silicate cements and cold-curing materials. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.72, p.373–385, 1966.

LAUER, G.; SCHIMMING, R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 59, p. 169-177, 2001.

LEE, K. Y., ROWLEY, J. A, EISELT, P., MOY, E., BOUHAIR, K., MOONEY, D. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. **Macromolecules**, v. 33, p. 4291-4294, 2000.

LEON, P.E. Biotechnology for developing countries. The case of the Central American isthmus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.21, p.194-203, 1993.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies. **Teratog., Carcinog. Mutagen.**, v. 19, p. 109-119, 1999.

MacDONALD, C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.10, n.2, p.155-178, 1990.

MALEKZADEH, R.; HOLLINGER, J.O. ; BUCK, D. ; ADAMS, D.F. ; McALLISTER, B. S. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **J. Periodontol.**, Boston, v. 69, p.1256-1262, 1998.

MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3. ed. Oxford: New York, 2000.

MCGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, London, v. 455, p. 3-20, 2000.

MCKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. L.; DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): an European review. **Mutat. Res.**, London, v. 288, p. 47-63, 1993.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutat. Res.**, London, v. 418, p. 131-140, 1998a.

MIYAMAE, Y.; ZAIZEN, K.; OHARA, K.; MINE, Y.; SASAKI, Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (comet) assay 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. **Mutat. Res.**, London, v. 415, p. 229-235, 1998b.

- NARDONE, R.M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p. 471-495.
- NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Chicago, v. 9, p. 290-296, 1982.
- OLIVE, P.L. The Comet assay: an overview of techniques. In: DIDENKO, V.V. (Ed.) **Methods Mol. Biol.** Totawa: Humana, 2002. v. 203, p. 179-194.
- OLIVE, P.L.; BANATH, J.P.; DURANG, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. **Rad. Res.**, v. 122, p. 86-94, 1990.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.
- PEAT, N.; GENDLER, S.J.; LALANI, N.; DUHIG, T.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Tissue-specific expression of human polymorphic epithelias mucin (MUC1) in transgenic mouse. **Cancer Res.**, local?, v. 52, p.1954-1960, 1992.
- PEGO, A P., POOT, A, GRIJMA, D., FEIJEN, J. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **J. Control. Rel.**, v. 87, p. 69-79, 2003.
- PENDERGRASS, W.; ANGELLO, J.; NORWOOD, T.H. The relationship between cell size, the activity of DNA polymerase α and proliferative activity in human diploid fibroblast-like cell cultures. **Exp. Gerontol.**, v. 24, p. 383-393, 1989.
- PIEPER, J. S., OOSTERHOF, A., DIJKSTRA, P. J., VEERKAMP, J.H., KUPPEVELT, T. H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomat.**, v. 20, p. 847-848, 1999.
- PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.20, p.553-559, 2000.
- PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C.; MUZZI, L.; CAIRO, F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation : A case series. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.
- POGGI, P.; ROTA, M.T.; BORATTO, R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. **J Periodontal Res.**, v. 37, n. 3, p.230-235, 2002.

RAGHOEBAR, G.M.; TOMSON, A.M.; SCHOLMA, J; BLAAUW, E.H.; WITJES, M.J.; VISSINK, A. Use of cultured mucosal graft to cover defects caused by vestibuloplasty: An vivo study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 53, n. 8, p. 872-878, 1995.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Review: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatogr. B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROSSA JÚNIOR, C.; MARTINEZ, K.G.; SILVÉRIO, A.E.T. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*. **Pesqui. Odontol. Brás.**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. :234-238, 2002.

SANT'ANNA, A.C.P.; MARQUES, M.M.; BARROSO, E.C.; PASSANEZI, E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. **Rev. Fac. Odontol.**, Bauru, v. 10, n. 3, p. 134-140, 2002.

SARDAS, S.; KARABIYIK, L.; AYGÜN, N.; KARAKAYA, A.E. DNA damage evaluated by the alkaline Comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. **Mutat. Res.**, London, v. 418, p. 1-16, 1998.

SATO, J.D.; HAYASHI, I.; HAYASHI, J.; HOSHI, H. KAWAMOTO, T.; McKEEHAN, W.L.; MATSUDA, R.; MATSUZAKI, K.; MILLS, K.H.G.; OKAMOTO, T.; SERRERO, G. SUSSMAN, D.J.; KAN, M. Specific cell types and their requirements. In: DAVIS, J.M. (Ed.). **Basic Cell Culture: a practical approach**. Oxford University Press: New York. 1994. p. 181-222. Cap. 6.

SILVA, J.; HERRMANN, S.M.; HEUNER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by Comet assay and micronucleous test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 941-947, 2002.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. **Mutat. Res.**, London, v. 252, p. 289-296, 1991.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutat. Res.**, London, v. 488, p. 151-169, 2001.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell test) - a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D.S. **Methods Mol. Biol.**: DNA repair protocols: eukaryotic systems. Totowa : Humana, 1999. p. 203-211. v. 113.

SPEIT, G.; TRENZ, K.; SCHÜTZ, P.; ROTHFUB, A.; MERK, O. The influence of temperature during alkaline and electrophoresis on results obtained with the Comet assay. **Toxicol. Lett.**, v. 110, p. 7-78, 1999.

STAMMEN, J. A., WILLIAMS, S., KU, D., GULBERG, R. E. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. **Biomat.**, v. 22, 799-806, 2001.

STEINERT, S.A.; STEIB-MONTEE, R.; LEATHER, J.M.; CHADWICH, D.B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutat. Res.**, London, v. 399, p.65-85, 1998.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infections. **Advanced Cell Culture**, v. 1, p. 67-90, 1981.

TANG, A.T.H.; LIU, Y.; BJÖRKMAN, L.; EKSTRAND, J. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v.116, n.2, p.132-138, 1999.

TEN CATE, A. R. The fibroblast and its products. In: Oral Histology. Development structure and function. In: _____. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, 1989. cap. 6.

TICE, R. R.; ANDREWS, P. W.; HIRAI, O.; SINGH, N. P. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: WITMER, C. M. **Advances Exp. Med. Biol.**: Biological Reactive Intermediates IV. New York: Plenum, 1990. p. 157-164. v. 283.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRAORE, F.; GASQUET, M.; LAGET, M.; GUIRARD, H.; GIORGIO, C.D.; AZAS, N.; DOUMBO, O.; TIMON-DAVID, P. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *mitragyna ineremis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 608-611, 2000.

UEDA, M.; HATA, K-I.; SUMI, Y; MIZUNO, H.; NIIMI, A. Peri-implant soft tissue management through use of mucosal epithelium. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 86, n. 4, p. 393-400, 1998.

UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M. ODA, T.; WADA, K.; BOO, J.S.; KEN-ICHIRO, H. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. **Mater. Sci. Eng.**, v.13, p.7-14, 2000.

UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI, H. Tissue engineering research in oral implant surgery. **Artif. Organs.**, v. 25, n.3, p.164-171, 2001.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D.A. Plant substances as antiviral agents. **Curr. Organ. Chem.**, v. 1, p. 307-344, 1997.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutat. Res.**, London, v. 437, p. 21-49, 1999.

WILSON, A.P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3. ed. Oxford: University, 2000. p. 175-219.

WOOLLONS, A.; CLINGEN, P.H.; PRICE, M.L.; ARLETT, C.F.; GREEN, M.H.L. Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblast after exposure to artificial tanning lamps. **Br. J. Dermatol.**, London, v. 137, p. 687-692, 1997.

ZACCHI, V.; SORANZO, C.; CORTIVO, R.; RADICE, M.; BRUN, P.; ABATANGELO, G. In vitro engineering of human skin-like tissue. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 40, p.187-194, 1998.

GLOSSÁRIO

Banho Maria: aquecer reagentes e soluções, descongelar células.

Câmara de Neubauer: placa de vidro que contém 2 quadrados (superior e inferior) divididos em áreas utilizada para contagem celular.

Capela de fluxo laminar: câmara com aspiração constante de oxigênio utilizada para manipulação asséptica dos procedimentos laboratoriais.

Células HeLa: linhagem celular derivada de carcinoma de útero que se multiplica facilmente em cultura.

Confluência celular: quando todo o substrato está integralmente forrado por células. Diz-se 100% de confluência.

Container de N₂: armazenamento de células a -120°C.

Cultura celular *in vitro*: cultivo de células em meio e garrafas de cultura.

Cultura primária: cultura de células obtida dos explantes.

Estufa de CO₂: equipamento que promove a manutenção da temperatura e gás carbônico constantes para o crescimento celular.

Explantos: fragmentos de tecidos removidos de seus sítios originais e mantidos em meios artificiais.

Garrafa ou frasco de cultura: dispositivo em forma de garrafa contendo um filtro em sua tampa utilizado para cultura celular.

Idade da cultura: número de passagens que a cultura foi subcultivada.

Linhagem celular contínua: mesma família de células com tempo de vida teoricamente infinita.

Linhagem celular: mesma família de células.

Meio de cultura: solução contendo todos os nutrientes necessários para a manutenção e proliferação celular.

Microscópio de observação direta: equipamento para visualização celular no meio de cultura, porém sua fonte de luz é invertida.

Microtubos: tubos eppendorf™ de 2ml.

Senescência: células próximas da apoptose ou morte celular.

Subconfluência celular: Numa razão de 70%, entende-se que o substrato está tomado por células em 70% de sua área.

Subcultura ou passagem: indica o número de vezes que foi realizada a tripsinização das garrafas de cultura.

Substrato: A face inferior da garrafa de cultura onde há formação de uma monocamada celular.

Tapete celular: monocamada celular que se forma no substrato.

Tripsinização: ação que resulta em células soltas de seu substrato e individualizadas.

Tris-HCl: solução detergente que dissolve a membrana celular.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC
 TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

Projeto nº 200/03 (entrada no CEPESH em 30/09/2003)

Título do Projeto: "Isolamento e cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos derivados da cavidade bucal."

Pesquisador Responsável: Ricardo de Souza Magini

Instituição onde será realizado o estudo: UFSC: CEPID – Centro de Estudo e Pesquisa em Implante Dentário e LVA – Laboratório de Virologia Aplicada

Sumário do Projeto

Trata-se de um estudo *in vitro* que busca estabelecer um protocolo de isolamento e cultivo primário de fibroblastos humanos derivados da gengiva. Para tanto, serão feitas 3 (três) biópsias de aproximadamente 2 mm² de gengiva inserida, serão removidas da região papilar entre os dentes pré-molares de três diferentes pacientes. Os fragmentos serão cultivados em laboratórios em soluções químicas apropriadas, e acompanhados diariamente por meio de microscopia invertida. Por último, as células serão avaliadas quanto a sua viabilidade celular por meio de teste de exclusão, utilizando o corante azul de trypan.

Comentários frente à Resolução CNS 196/96 e complementares

Trata-se de um projeto de pesquisa no nível de mestrado, que deverá ser realizado pelo acadêmico Gustavo dos Santos Coura, do Curso de Pós-graduação em odontologia, área de concentração Implantodontia do CCS, sob a orientação e responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini e Co-orientação da Profa. Dra. Cláudia M. Oliveira Simões, ambos do CCS/UFSC. Trata-se de um tema de pesquisa relevante, tem uma fundamentação científica, os pesquisadores orientadores tem experiência na área comprovada e o projeto, como um todo, está bem instruído. Da mesma forma, vem acompanhado de todos os demais documentos exigidos pelo CEP e CNS, de acordo com Resolução 196/96 e complementares.

Parecer do CEPESH:

- aprovado
 reprovado
 com pendência (detalhes pendência)*
 retirado
 aprovado e encaminhado ao CONEP

Florianópolis, 03 de novembro de 2003.


 Prof^a. Vera Lúcia Bosco
 Coordenadora do CEPESH/UFSC

TERMO DE CONSENTIMENTO

Informação e consentimento pós-informação para pesquisa

Meu nome é Gustavo dos Santos Coura, aluno do curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Implantodontia e estou desenvolvendo a pesquisa “Protocolo inicial de cultivo de fibroblasto gengival humano.”, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, com o objetivo de cultivar em laboratório apropriado células derivadas da gengiva humana. Este estudo é necessário porque pesquisas variadas podem ser realizadas com células humanas cultivadas em laboratórios, diminuindo a necessidade de estudos em animais e pesquisas diretamente sobre humanos. Para isto, será realizada uma cirurgia para retirada de uma porção gengival de aproximadamente 2mm². Isto não traz riscos, porém algum desconforto nessa área pode permanecer por alguns dias, semelhante a uma ferida na pele. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone 48 3319077. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais (ou material coletado), e só serão utilizados neste trabalho.

Assinatura _____

Orientador _____

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____,
fui esclarecido sobre a pesquisa “Isolamento e cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos derivados da cavidade bucal ” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, _____ de _____ de 2003.

Assinatura: _____ RG: _____