

PES074 - FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS PARA UM BANCO DE CÉLULAS: ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR

GEOVANNI PEREIRA MITRE¹; MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA²; TATIANY OLIVEIRA DE ALENCAR MENEZES²; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO²; ANA CLÁUDIA BRAGA AMORAS ALVES²

geovannimitre@gmail.com

¹Graduação, ²Doutorado

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: O cultivo de células vem sendo utilizado como um importante método de pesquisa in vitro em diversas áreas e com diferentes finalidades; como na engenharia tecidual e análises de citotoxicidade, possibilitando a observação do comportamento celular em um ambiente controlado. Desta forma, o estabelecimento de uma cultura primária e subculturas de células de interesse é um passo fundamental para o posterior desenvolvimento de testes in vitro. Os fibroblastos gengivais são importantes objetos de estudo, por serem os principais componentes do tecido conjuntivo do periodonto de proteção e realizarem funções essenciais, como a produção e manutenção da matriz extracelular e estarem relacionados com os processos de cicatrização tecidual. Além disso, essas células sintetizam uma grande variedade de fatores de crescimento e podem modular sua capacidade metabólica, o que se reflete em sua morfologia e caracteriza a existência de subpopulações, seja por sua atividade de síntese ou expressão de proteínas específicas. Desta forma, a caracterização das células após o estabelecimento da cultura, confirmando o tipo celular e correlacionando-as com o tecido que as originou, é uma etapa indispensável. **Objetivos:** Estabelecer e caracterizar uma cultura de fibroblastos gengivais humano para criação de um banco dessas células no Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da UFPA. **Métodos:** Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do ICS/UFPA sob parecer N°773.126. Para a realização da cultura primária utilizou-se tecido gengival sadio obtido de cirurgia de cunha distal de um terceiro molar inferior de um paciente jovem, do sexo masculino. Após a obtenção do tecido, este foi imediatamente imerso em meio de cultivo DMEM/F-12, com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução antibiótica/antimicótica (meio suplementado). Em condições assépticas, o tecido gengival foi imerso rapidamente em álcool a 70% e em seguida este foi novamente imerso em meio de cultivo suplementado. Com auxílio de instrumentais cirúrgicos removeu-se o epitélio para obtenção do tecido de interesse, o tecido conjuntivo, o qual foi fragmentado para obtenção de explantes de aproximadamente 1 mm². Esses explantes foram recolhidos e dispostos em um frasco de 25mm² de área de cultivo, previamente tratado com solução de poly-D-lysine, numa concentração de 0,1mg/mL. O frasco de cultivo foi mantido em incubadora a 37⁰C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. A proliferação celular foi observada diariamente em microscópio de contraste de fase e o meio suplementado foi trocado duas vezes por semana. Para os cultivos secundários, alcançada a confluência de 80-90% realizou-se a lavagem do cultivo com PBS (phosphate buffered saline) e os fibroblastos gengivais foram desprendidos enzimaticamente utilizando-se solução de Tripsina-EDTA a 0,25%. Para inativação da tripsina foi acrescido DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado. As células concentradas foram ressuspendidas em de meio suplementado e transferidas para um novo frasco de cultivo. Com a realização dos subcultivos obteve-se uma quantidade de células suficiente para

criação de um banco de fibroblastos gengivais humano. Para manutenção da viabilidade celular por um longo período de tempo e para posterior aplicação experimental, sem a perda de suas funções, realizou-se um processo de criopreservação. As células foram desprendidas enzimaticamente do frasco de cultivo e alíquotas de 1×10^6 células foram dispostas em criotubos contendo 1ml de meio de cultivo suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A estocagem das células foi realizada em nitrogênio líquido (-196°C). Para caracterização das células, proteínas do citoesqueleto e de adesão foram imunomarcadas, utilizando um protocolo de imunofluorescência indireta simples. Para esse ensaio, os fibroblastos foram cultivados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após adesão e proliferação celular, as mesmas foram fixadas com paraformaldeído, permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% e realizou-se então o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de soro de cabra a 10%. Os anticorpos primários anti-vimentina (1:100), anti-citoqueratina AE1/AE3 (1:50), anti-fibronectina (1:100) e anti- α -actina músculo liso (1:100) foram incubados por um período de aproximadamente 18 horas, em câmara úmida e escura a 4°C . Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário. Posteriormente, o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488) foi incubado e os núcleos foram marcados com Hoechst 33258. As lamínulas foram montadas utilizando-se ProLong Antifade Kit. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência equipado com câmera fotográfica digital. **Resultados e Discussão:** A proliferação celular foi observada diariamente utilizando microscópio invertido de contraste de fase, com câmera acoplada, para registrar a liberação das células a partir dos explantes. Ao final da primeira semana de incubação, os primeiros prolongamentos celulares foram observados na periferia dos explantes. Dois dias após esta observação, os fibroblastos podiam ser distinguidos do tecido aderido. Nas semanas seguintes a proliferação celular aumentou gradualmente. Neste período o cultivo foi lavado com PBS, a troca do meio de cultivo suplementado foi realizada duas vezes por semana e a concentração de antibiótico foi reduzida gradualmente. Na quarta semana após o estabelecimento da cultura primária, já se observava a confluência da monocamada celular, quando então realizou-se o primeiro subcultivo (cultura secundária). Assim, progressivamente realizou-se a passagem de células para frascos de cultivos maiores, afim de obter-se uma quantidade de células necessária para realização de testes e criopreservação. As células, morfológicamente, observadas sob microscopia de contraste de fase, mostraram aspecto fibroblástico, com fenótipo fusiforme e prolongamentos citoplasmáticos, achados que estão de acordo com outros estudos publicados na literatura para fibroblastos gengivais. Houve expressão positiva contra vimentina, que é um filamento intermediário componente do citoesqueleto de células eucarióticas, sendo disposta pelo citoplasma como uma rede estrutural de filamentos que se estende da membrana nuclear à plasmática. As citoqueratinas, por sua vez, são filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto de células de origem epitelial e o anticorpo citoqueratina AE1/AE3 tem sido utilizado para identificar a maioria das citoqueratinas humanas, o que justifica sua ausência de expressão na cultura estabelecida. A fibronectina, glicoproteína multifuncional da matriz extracelular, foi expressa nos fibroblastos gengivais e seu estudo neste ambiente tem demonstrado seu papel de adesão nos contatos célula-célula e célula-substrato, compondo uma matriz pericelular. Quanto à expressão contra α -actina músculo-liso, temos que as células de origem mesenquimal, como os fibroblastos, apresentam a capacidade de diferenciação e especialização, o que caracteriza a existência de subpopulações celulares entre os fibroblastos; que podem ser caracterizadas pela expressão de determinadas proteínas. Desta forma, fibroblastos

quiescentes podem diferenciar-se em miofibroblastos, quando estimulados. A expressão contra o anticorpo α -actina de músculo liso caracteriza a existência desta subpopulação celular na cultura. **Conclusão:** De acordo com a metodologia utilizada foi possível estabelecer e caracterizar uma linhagem de fibroblastos gengivais humano, mantida sob criopreservação para futuros experimentos.

Referências Bibliográficas:

Bao k, Akguel B, Bostanci N. Establishment and characterization of immortalized gingival epithelial and fibroblastic cell lines for the development of organotypic cultures. *Cells Tissues Organs* 2014;199:228-237.

Hanan AB, et al. Cytotoxic effect of *Salvadora persica* extracts on human gingival fibroblast cells. *Saudi Med J* 2014;35(8):810-815.

Milinkovic I, et al. Clinical application of autologous fibroblast cell culture in gingival recession treatment. *J Periodontal Res* 2015;50(3):363-370.

Rasika P, et al. Immortalized gingival fibroblast as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23(2):753-762.