



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

ANÁLISE IN VITRO DA INFLUÊNCIA DO DERIVADO DE MATRIZ DE ESMALTE NO CULTIVO DE FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL: ESTUDO PILOTO DO CULTIVO CELULAR.

Autores: DANIELLE TAYRINE CELESTINA FRÓES, RENATA INÁCIO PEREIRA, AGNALDO ROCHA DE SOUZA JÚNIOR, ANGELINY TAMIARANA LIMA TABOSA, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

Introdução

A doença periodontal é uma enfermidade que leva à perda das estruturas de suporte dos dentes, muitas vezes comprometendo sua funcionalidade. Nos últimos anos, diferentes técnicas e materiais surgiram com a proposta de obter a regeneração tecidual do periodonto. Porém, os resultados mostraram pouca eficácia ou previsibilidade. A regeneração periodontal verdadeira, com a formação do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar é missão difícil de se conseguir (ESPOSITO *et al.*, 2009).

Um dos métodos utilizados que promete tal regeneração é a utilização das proteínas derivadas da matriz de esmalte (DME) de origem suína associada a um veículo à base de alginato de propileno-glicol (PGA) (SLAVKIN e BOYDE, 1978; SCULEAN *et al.*, 2001; BOSSHARDT, 2008).

Apesar das suas qualidades relatadas na literatura, ainda existe uma ausência de consenso quanto aos resultados clínicos; alguns sendo favoráveis e outros desfavoráveis. Uma melhor compreensão e caracterização do efeito da matriz de esmalte sobre o comportamento de fibroblastos do ligamento periodontal pode conduzir a melhores resultados na terapia regenerativa.

Outra terapia que vem sendo utilizada na Odontologia são os raios laser de baixa intensidade, com ação terapêutica sobre tecidos moles e duros, apresentando efeito biomodulador celular, ação anti-inflamatória, analgésica e indutora da reparação tecidual (HENRIQUES *et al.*, 2010).

Portanto, este estudo, apresenta como objetivo inicial, realizar um estudo piloto, a fim de estabelecer as condições técnicas para o cultivo *in vitro* de fibroblastos provenientes do ligamento periodontal. Em seguida, tem-se como proposta de trabalho avaliar o efeito *in vitro* de dme, do laser de baixa intensidade e da associação de ambos sobre os fibroblastos em questão.

Material e métodos

A. Coleta da Amostra

Este é um estudo transversal analítico de caráter experimental.

Para avaliar o efeito do derivado de matriz de esmalte e laser de baixa intensidade sobre fibroblastos periodontais, foram utilizadas 02 (duas) linhagens de cultura primária de fibroblastos do ligamento periodontal, obtidas a partir de indivíduos com dentes hígidos, cuja exodontia foi realizada por indicação ortodôntica ou exodontia de terceiros molares em indivíduos com idade superior a 18 anos. Tais linhagens foram provenientes do Banco de Materiais Biológicos Humano do Norte do Estado de Minas Gerais (Biobanco Institucional - UNIMONTES/ Registro CONEP: B-013). As alíquotas de células foram cedidas pelo Biobanco, sendo estas preservadas em criotubos a -80°C, contendo solução de congelamento (80% de soro fetal bovino, 10% de meio de cultura DMEM e 10% de DMSO). Destaca-se que foram utilizadas células provenientes de cultivo primário, uma vez que não há disponibilidade, em Banco de células, células imortalizadas dessa natureza.

B. Cultivo Celular

Nesse experimento piloto, que visa a expansão das células para obtenção de número suficiente para realização dos tratamentos experimentais com o DME e laser de baixa intensidade, Seguindo o estudo de NETO, J.F.L. 2007, as células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico, contendo 100 U/mL penicilina e estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, USA). Após o descongelamento em Banho-maria a 37°C, centrifugação a 2.500G para a remoção do meio de congelamento, as células foram plaqueadas em garrafas específicas para cultivo celular; o meio de cultura foi renovado a cada 48h para fornecer nutrientes às células e manter o pH do meio em 7,4. A monocamada de células foi visualizada por meio de um microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA), nos aumentos 50x e 100x.

C. Manutenção das células

Uma vez estabelecida confluência de 80% de células, estas foram tripsinizadas, utilizando 1ml de Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para promover a perda de adesão das células. Em seguida, as células foram transferidas para outro frasco, visando a expansão do número de células.

Resultados



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

Esses são os resultados parciais do estudo em andamento.

De acordo com dados e imagem fornecida pelo Biobanco, órgão institucional responsável pela cessão das amostras, a cultura primária foi estabelecida 12 dias a manipulação do tecido em placa de Petri. Microscopicamente, as células apresentaram características morfológicas normais de fibroblastos, sendo alongadas com núcleo oval e membrana birrefringente, sugerindo a integridade da membrana celular (Figura 1). Após o recebimento das alíquotas de fibroblastos, as mesmas foram submetidas ao processo de descongelamento e plaqueamento, em garrafa específica para cultura celular, visando a multiplicação e confluência das células. A Figura 2 mostra as células em atividade proliferativa, 48h após o descongelamento e plaqueamento. Após a expansão das células, estas foram tripsinizadas e transferidas para outras garrafas, visando a expansão do número de células suficientes para a realização dos tratamentos com DME e laser de baixa intensidade. Nessa fase, observou-se que as células modificaram sua morfologia e tamanho, mostrando uma certa contração da estrutura celular, reduzindo o seu tamanho, a atividade proliferativa e número de células na garrafa (Figura 3). O processo de descongelamento foi realizado três vezes em garrafas diferentes, obtendo-se os mesmos resultados.

Discussão

O processo de descongelamento celular geralmente ocorre de forma rápida e simplificada. A remoção da ampola do tanque de nitrogênio líquido e adição em água a 37°C é um procedimento comum de ser realizado. O processo de criopreservação, que se trata da adição de crioprotetores às células para congelamento, torna a membrana das células protegidas dos cristais de gelo formados durante o congelamento, sendo uma manutenção ao longo prazo de produtos biológicos em temperaturas abaixo de -80 °C (URIO, Monica 2012). Os crioprotetores mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO). Apesar de todo o cuidado necessário durante o congelamento, a criopreservação pode ser danosa para as células. Após o descongelamento, deve-se remover o meio de congelamento das células, seguido pelo plaqueamento em placa de Petri ou garrafa para cultivo as células aderidas devem ser lavadas após 24 horas de adesão para a retirada de células mortas. (ALVES e GUIMARÃES, 2010)

Dependendo da linhagem celular criopreservação pode ocasionar perda expressiva de viabilidade e morte das células. Em estudo realizado por Jacob 2011, pode-se observar as limitações ocasionadas pelo processo de criopreservação, assim como o estresse que as células são expostas e as inviabilidades celulares que são ocasionadas por esse processo, semelhante ao que foi observado nesse estudo. Sendo o estresse grande e repentino, as células não conseguem recuperar a atividade metabólica e, conseqüentemente, a morte acontece. Em um estresse intermediário a célula pode sofrer lesão, mas sem morte instantânea, pois há tempo de ativar o mecanismo de morte por apoptose. Na criopreservação, o estresse em que as células são submetidas pode ocasionar em morte celular devido a inviabilidade do meio para sua sobrevivência, sendo tal fato dependente do tipo de linhagem celular e, também, da força de centrifugação a que as células foram submetidas.

Conclusão

Após o descongelamento das células primárias do ligamento periodontal, estas apresentaram uma atividade proliferativa satisfatória por um curto espaço de tempo, seguida pela redução importante da população celular. A redução da atividade proliferativa e aumento da taxa de morte celular pode ter sido influenciada tanto pelo estresse do processo de congelamento e descongelamento da linhagem primária, bem como da força de centrifugação. Sendo assim, o prosseguimento dos testes experimentais deverá ser realizado a partir de linhagens que não foram criopreservadas. Além disso, serão submetidas a menor força de centrifugação, inferior a 2500G.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Montes Claros, pelo apoio financeiro na forma de bolsa de Iniciação Científica através do programa BIC-UNI.

Referências

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** - Cultivo Celular. Volume 4. Cap. 5. Pag. 215-253.
- ESPOSITO, M.; GRUSOVIN, M.G.; PAPANIKOLAOU, N.; COULTHARD, P.; WORTHINGTON, H.V. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol., 2(4):247-66, Jul. 2009
- HENRIQUES, A. C. G; CAZAL, C; CASTRO, J. F. L. **Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura.** Rev. Col. Bras. Cir. 2010; 37(4): 295-302. 2010.
- JACOB, P. V. **Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 β -estradiol.** Dissertação de Mestrado. Covilhã, Portugal. 2011.
- NETO, J.F.L. **Análise da viabilidade e ciclo celular de fibroblastos equinos cultivados in vitro: comparação pré- e pós-descongelamento.** 2007. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre, Botucatu – São Paulo, 2007.
- SLAVKIN, H.C., BOYDE, A. **Cementum: an epithelial secretory product?** J Dent Res., 53, p.157, 1975.
- SCULEAN A., ALESSANDRI R., MIRON R., SALVI G.E., BOSSHARDT D. **Clinical Advances in Periodontics**, vol 1, n. 2, 2011.
- URIO, M. **Viabilidade de fibroblastos bovinos submetidos a diferentes estratégias de criopreservação.** Dissertação de Mestrado. Lages, SC. 2012.



FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X



Figura 1. Fibroblastos provenientes de cultura primária de ligamento periodontal. Microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA), no aumento de 50x.

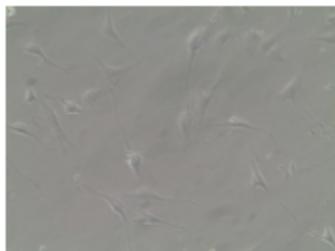


Figura 2. Fibroblastos após o descongelamento, e plaqueamento, em fase de multiplicação celular. Microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA), no aumento de 100x.



Figura 3. Fibroblastos após o descongelamento. Microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA), no aumento de 50x.