FABIELE BALDINO RUSSO

Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de
mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças
genéticas

São Paulo

2010

FABIELE BALDINO RUSSO

Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Doméstico e Silvestres

Orientador:

Prof^ª Dr^ª Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

SÃO PAULO

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2383
FMVZ

Russo, Fabiele Baldino

Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas / Fabiele Baldino Russo. -- 2010.

93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Epitélio da mucosa oral. 2. Diagnóstico de doenças genéticas. Cultura de células. I. Título.

BIOÉTICA HUMANA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 06608-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 29 de junho de 2010.

PARECER 948/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 28.06.2010, deliberou por **APROVAR** o projeto intitulado: *"Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas"* sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. PATRÍCIA CRISTINA B. BELTRÃO BRAGA e a aluna FABIELE BALDINO RUSSO, **condicionado ao atendimento do seguintes itens:** a) Adequar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido nos itens 2, 3 e 4 para a metodologia e material a serem utilizados, de fato, no presente projeto; b) Incluir o item *"Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos-ICB/USP, no Fone 3091.7733 e (fone do pesquisador) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo"*.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **28.06.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - telefax: (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH. 078.2010

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao *PARECER 948/CEP*, de 28.06.2010, declaro que o Projeto intitulado: "*Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas*", sob responsabilidade da Profa. Dra. PATRÍCIA CRISTINA B. BELTRÃO BRAGA, contempla a aprovação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, 06 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

BIOÉTICA DA FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais da mucosa oral humana: modelo celular para estudo de doenças genéticas", protocolado sob o nº 1648/2009, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Establishment of primary culture of cells epiteliais of human oral mucosa: cell model for study of genetic diseases", protocol number 1648/2009, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum".

São Paulo, 20 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RUSSO, Fabiele Baldino

Título: Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela saúde, fé e determinação que tem me oferecido.

À minha mãe **Leonice**

Foi com você que aprendi tudo que sei da vida e que honro pelo esforço com o qual me criou. Muito obrigada por tudo. Amo você!

Aos meus **irmãos e sobrinhos**,

Pelo incentivo e paciência durante essa fase da minha vida.

Ao meu namorado **Junior**

Por me fazer acreditar no meu potencial e em não temer as dificuldades e obstáculos que surgiram no meu caminho, devo inúmeras desculpas pela falta de atenção em alguns momentos e por você ter escutado tantas vezes a palavra dissertação. Obrigada pelo apoio em todos os momentos de desânimo, pelo incentivo, amizade, companheirismo e amor. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação.

A Profa. Dra. Patricia Braga (Pati)

Primeiramente agradeço pelo voto de confiança e credibilidade que me concedeu ao me aceitar como sua orientada e acima de tudo pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade, incentivo, pela contribuição no meu crescimento profissional e acima de tudo pela amizade sempre presente. Saiba que eu não poderia ter tido uma pessoa melhor para me orientar, deve dizer que me sinto muito privilegiada por isso.

A Graciela Pignatari (Gra)

Pelo tão importante e indispensável auxílio durante todo o desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos sempre de grande valia, e não poderia deixar de frisar os vários puxões de orelha com o intuito de melhorar cada vez mais o meu desempenho que consequentemente me ajudara alcançar o sucesso. Te agradeço acima de tudo pela enorme amizade que construímos e que vou levar por toda a vida.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Pela oportunidade de ingressar na carreira científica e por abrir as portas do departamento para a realização do meu trabalho

A minha grande amiga **Dilayla**

Amiga de outras vidas com certeza. Obrigada pela amizade eterna, paciência, companhia, pelos conselhos e pelo carinho. Inclusive não poderia deixar de agradecer pelo conhecimento que me foi concedido durante meus trabalhos noturnos em sua clínica veterinária, eu diria que são poucas as pessoas que recebem essa oportunidade

e para mim isso representou demais e com toda a certeza me tornei uma pessoa melhor, foi uma das experiências mais gratificantes da minha vida e devo isso a você, minha eterna amiga Di. Te amodoro muito!!!

A minha amiga **Isabella**

Foi você que esteve comigo em todos os momentos dessa pesquisa, literalmente hoje eu sei o que representa uma verdadeira parceira e acima de tudo uma amiga do coração, foi com você que aprendi os meus primeiros experimentos e a partir daí me tornei sua admiradora, sua companhia e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho, saiba que tenho um imenso carinho por você.

A amiga **Renata**

Que foi a primeira pessoa que conheci na pós graduação e que me ajudou. Muito obrigada pela ajuda, carinho e amizade

A minha amiga **Carol**

Pela ajuda na microscopia e acima de tudo pela amizade que sempre levarei comigo

A minha amiga **Vivian**

Pela convivência, amizade e carinho

Ao meu amigo **Sarmentinho**

Por sempre me fazer rir com seu bom humor e pela amizade que sempre levarei comigo

Aos amigos do laboratório **Carol, Evander, Flavinha, Jéssica, Marcos e Rapha**

Ao **Sr. Gaspar e a Rose Eli**

Pela ajuda na microscopia eletrônica e pela atenção prestada

Ao **Fabrizius**

Pela ajuda no tratamento das imagens deste trabalho

Aos amigos **André, Day, Elaine, Greyson, Jana, João, Letícia, Luis, Juliana, Marininha, Marcio, Matheus** e aos **colegas** da Pós-graduação

Aos meus **amigos e familiares**

Que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho

Aos funcionários da FMVZ/USP **Fabiana, Jaqueline, Maycon, Índio e Ronaldo**

Pela ajuda e atenção em todos os momentos que precisei.

Aos professores da FMVZ/USP **Antônio Assis Neto, Carlos Eduardo Ambrósio, José Roberto Kfoury Jr, Paula de Carvalho Papa e Pedro Primo Bombonato**

Pelos ensinamentos e convivência.

À **CAPES**

Pela bolsa de Mestrado que me foi concedida.

RESUMO

RUSSO, F. B. Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas. [Establishment of primary culture from epithelial cells of the human oral mucosa: cellular model for the study of genetic diseases] 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Muitas doenças genéticas permanecem ainda sem sua causa definida. A dificuldade de estudar algumas dessas doenças remontam a problemática da obtenção de material clínico, sugerindo situações extremas para a coleta, dependendo da patologia. Além disso, é necessário que se obtenha material genético em quantidade adequada para os ensaios e que, de preferência, venha de uma fonte celular que não esteja diretamente exposta a mutações. Nesse trabalho estabelecemos o cultivo inédito das células epiteliais de mucosa oral como modelo celular para o estudo de doenças genéticas. As amostras foram coletadas através da raspagem da mucosa oral de voluntários saudáveis. Após estabelecimento do cultivo, as células foram caracterizadas em relação à sua morfologia através de técnica de colorações, ensaios para analisar a viabilidade celular, microscopia eletrônica de transmissão e varredura, análise da expressão de marcadores por imunocitoquímica e por RT-PCR. Os resultados revelaram a expressão de marcadores como citoquetaratinas 4, 13 e 18, conexinas e marcadores de ciclo celular, como PCNA3 e GAPDH. A expressão de marcadores de pluripotência foi negativa, já que essas células são adultas e totalmente diferenciadas. Com a realização deste trabalho, concluímos que essas células são um bom modelo para o estudo de doenças genéticas e futuras terapias gênicas.

Palavras-chaves: epitélio da mucosa oral, diagnóstico de doenças genéticas, cultura de células.

ABSTRACT

RUSSO, F. B. Establishment of primary culture from epithelial cells of the human oral mucosa: cellular model for the study of genetic diseases. [Estabelecimento de cultura primária de células epiteliais de mucosa oral humana: modelo celular para o estudo de doenças genéticas] 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Many genetic diseases are still without their cause defined. The difficulty in studying these diseases back to the problem of obtaining clinical material, suggesting extreme situations for the collection, depending on the pathology. Moreover, it is necessary to obtain genetic material in sufficient quantities for testing and preferably come from a cellular source that is not directly exposed to mutations. This work established for the first time, a protocol for culturing of epithelial cells from oral mucosa as a cellular model for studying genetic diseases. The samples were collected by scraping the oral mucosa of healthy volunteers. After the establishment of cultivation, cells were characterized for their morphology by staining technique, tests to analyze cell viability, transmission electron microscopy and scanning, analysis of expression of markers by immunocytochemistry and RT-PCR. The results revealed the expression of markers such as citoquetaratinas 4, 13 and 18, connexins and cell cycle markers, as PCNA3 and GAPDH. The expression of pluripotency markers were negative, as these cells are adult and fully differentiated. With this work, we conclude that these cells are a good model for studying genetic diseases and future gene therapies.

Keywords: oral mucosa epithelium, the diagnosis of genetic diseases, cell culture.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - do inglês *Bovine Serum Albumin* e do português albumina sérica bovina

°C – grau Celsius

CALF serum – soro de vitelo de bezerro

CEMO – células epiteliais de mucosa oral

CO₂- dióxido de carbon

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

DAPI- 40,6-diamidino-2- phenylindol

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – dioxinucleotidio – trifosfato

FITC- do inglês *fluorescein isothiocyanate* e no português isotiocianato de fluoresceína

HE – Hematoxilina-eosina

IgG- imunoglobulina da classe G

mL- mililitro

MTT – dimethylthiazol-2-yl

min - minuto

Nm – nanômetro

Nanog- do inglês, *nanog homeobox*, em referência à *Tir Nan Og*

NIH3T3 – fibroblastos de embriões murinos

Oct-3/4-do inglês, *octamer 4*

pb – Pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PBS – tampão salina-fostato

rpm - rotações por minuto

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR – reação de polimerização de cadeia por retro-transcrição

SFB - Soro Fetal Bovino

TAE – Tampão tris-acetato – EDTA

µl – micro-litros

µm - micrômetro

mm- milímetro

% - por cento

U.V – ultra-violeta

V/cm² – volts por centímetro quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da anatomia da mucosa oral mostrando as diferentes camadas celulares.....	28
Figura 2 – Esquema representativo do ciclo das células epiteliais da mucosa oral humana e suas diferentes morfologias.....	34
Figura 3 – Fotomicrografia dos passos para a coleta das células epiteliais de mucosa oral humana através de raspagem.....	41
Figura 4 – Fotomicrografia dos fibroblastos murinos, NIH3T3, utilizados como camada de sustentação para o cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana sob microscopia invertida de contraste de fase.....	55
Figura 5 – Fotomicrografia dos fibroblastos murinos, NIH3T3, antes e após inativação com mitomicina C em microscopia invertida de contraste de fase.....	56
Figura 6 – Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.....	58
Figura 7 – Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sem a presença das células de suporte NIH3T3, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.....	59
Figura 8 – Fotomicrografia da cultura de células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre o matrigel, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.....	60
Figura 9 – Fotomicrografia da cultura de células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre o matrigel e com meio condicionado nos fibroblastos murinos, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.....	61
Figura 10 - Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação de fibroblastos, após criopreservação, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.....	64
Figura 11 – Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana após coloração com azul de toluidina.....	65
Figura 12 – Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de coloração de papanicolau.....	66
Figura 13 – Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de hematoxilina-eosina (HE).....	67

Figura 14 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação e coradas com azul de toluidina.....	69
Figura 15 - Fotomicrografia da corte semi-fino da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação.....	70
Figura 16 – Fotomicrografia da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação	71
Figura 17 Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação.....	73
Figura 18 – Análise do perfil de expressão de Citoqueratina Pan nas células epiteliais da mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação celular.....	75
Figura 19 – Análise do perfil de expressão do marcador Citoqueratina 18 nas células epiteliais da mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação celular	76
Figura 20 - Análise do perfil de expressão do marcador PCNA3 nas células epiteliais da mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação celular.....	77
Figura 21- Análise do perfil de expressão do marcador Oct4 nas células epiteliais da mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação celular.....	78
Figura 22 - Análise do perfil de expressão do marcador Nanog nas células epiteliais da mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação celular.....	78
Figura 23 - Análise molecular por RT-PCR das células de células epiteliais de mucosa oral humana.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise da viabilidade celular da coleta das células epiteliais de mucosa oral humana através de raspagem da mucosa oral de três voluntários sadios.....	62
Gráfico 2 - Porcentagem de células epiteliais de mucosa oral humana, vivas e mortas, obtidas após raspagem da mucosa oral de três voluntários sadios com idades aproximadas.....	63
Gráfico 3 - Análise da proliferação celular das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais características dos quatro tipos básicos de tecidos encontrados no corpo humano.....	29
Quadro 2 - Tipos de epitélios de revestimento encontrados no corpo humano.....	31
Quadro 3 - Principais funções das células do tecido conjuntivo.....	32
Quadro 4 - Anticorpos primários utilizados para caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de imunocitoquímica.	50
Quadro 5 - Anticorpos secundários utilizados para caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de imunocitoquímica	51
Quadro 6 – Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR das células epiteliais de mucosa oral humana.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 MUCOSA ORAL.....	27
2.1.1 Tipos de mucosa oral.....	29
2.2 TECIDO EPITELIAL.....	29
2.3 TECIDO CONJUNTIVO.....	31
2.4 MORFOLOGIA CELULAR.....	33
2.5 AS CELULAS EPITELIAIS DA MUCOSA ORAL E SUA UTILIZAÇÃO NO ESTUDO E TRATAMENTO DE DOENÇAS.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA.....	40
4.1.1 Análise da viabilidade da coleta.....	42
4.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA.....	42
4.2.1 Cultivo das CEMO sobre a camada de sustentação celular de fibroblastos murinos.....	43
4.2.2 Cultivo das células CEMO sem camada de sustentação.....	43
4.2.3 Cultivo das CEMO sobre matrigel.....	43
4.2.4 Cultivo das CEMO sobre o matrigel e com meio condicionado em camada de sustentação celular.....	44
4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEMO (CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO CELULAR).....	44
4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA.....	45
4.4.1 Microscopia óptica.....	45

4.4.2 Coloração de Azul de Toluidina.....	45
4.4.3 Coloração de Papanicolaou.....	46
4.4.4 Coloração de Hematoxilina-eosina.....	46
4.4.5 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico MTT.....	47
4.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	48
4.4.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	49
4.4.8 Análise imucitoquímica das células epiteliais de mucosa oral humana.....	49
4.4.9 Análise molecular das células epiteliais de mucosa oral humana por RT-PCR.....	51
5 RESULTADOS.....	54
5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DA CAMADA DE SUSTENTAÇÃO.....	55
5.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA.....	57
5.2.1 Células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas, sobre a camada de sustentação de fibroblastos murinos (NIH3T3).....	57
5.2.2 Células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sem nenhuma camada de sustentação.....	58
5.2.3 Células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre o matrigel.....	59
5.2.4 Células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre o matrigel com meio condicionado.....	60
5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL.....	61
5.3.1 Ensaio de viabilidade celular da coleta.....	62
5.3.2 Viabilidade celular após criopreservação.....	63
5.3.3 Colorações para análise morfológica das CEMO.....	64
5.3.4 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT.....	67

5.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	68
5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	72
5.3.7 Análise imucitoquímica das células epiteliais de mucosa oral humana.....	74
5.3.8 Análise das células epiteliais de mucosa oral humana por RT-PCR.....	79
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Mesmo com a conclusão do mapeamento do genoma humano, em 2003, com cerca de 40.000 genes (The International Hap Map Consortium, 2003) diversas doenças genéticas permanecem sem o conhecimento de sua causa (NUSSBAUM et al., 2002).

Hoje em dia, grandes progressos têm sido feitos no que diz respeito aos distúrbios monogênicos e no futuro, entretanto, é provável que mais descobertas sejam feitas no que concerne à revelação dos componentes genéticos envolvidos em determinadas condições como, por exemplo, a hipertensão, distúrbios do comportamento e câncer.

As estratégias de mapeamento gênico, juntamente com métodos mais sofisticados para a análise de heredogramas começam a ser mais aplicáveis em outros distúrbios genéticos que ainda não possuem sua causa elucidada.

Entretanto, para realizar essas pesquisas, é necessário ter material clínico em quantidade suficiente para analisar o genoma e a expressão de proteínas celulares nesses pacientes, além de ter um número suficiente de pacientes para que se possa fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos.

A facilidade na coleta do material também é um ponto fundamental, considerando-se que muitas vezes, esta coleta pode ser feita em pacientes especiais. Diversas patologias genéticas manifestam um quadro clínico que dificulta qualquer tipo de coleta de material biológico, podendo exigir cuidados extras. Em alguns casos, a simples coleta de sangue pode ser muito traumática para o paciente, sendo que o mesmo precisaria até ficar imobilizado. Sendo assim, uma amostra que pudesse ser coletada de forma simples e indolor facilitaria muito os procedimentos em pacientes especiais.

Neste trabalho visamos o uso das células epiteliais da mucosa oral humana, obtidas através de raspagem da mucosa oral como um modelo celular para o estudo de doenças genéticas, como por exemplo, o autismo.

O racional para usar essa fonte de células adultas se dá devido à fácil obtenção, que não requer biópsia nem intervenções que possam ser dolorosas ou requeiram procedimentos anestésicos. A coleta dessas células pode ser feita com o paciente sentado confortavelmente, pois apenas uma raspagem na gengiva e no céu da boca com uma escova estéril, após a higienização bucal será feita.

Também vale ressaltar que a mucosa oral tem uma velocidade alta de regeneração, ponto favorável à coleta. Entretanto, não é oportuno nesses casos pensar apenas na

praticidade de coleta do material, mas, também é importante procurar uma célula que não esteja exposta a agentes indutores de mutações, como por exemplo, os fibroblastos da pele que estão expostos a luz ultravioleta (SOUTO et al., 2006; MUOTRI et al., 2004) e com isso mais expostos a “novas” mutações, ou seja, mutações que apareceram depois da doença e que, podem ser falsamente responsabilizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MUCOSA ORAL

A estrutura que reveste a boca é conhecida como mucosa bucal e é formada por dois tipos de tecidos: epitélio de revestimento e tecido conjuntivo adjacente (KATE, 2001). A boca é constantemente úmida devido à presença da saliva (KATHBURIAN, 2004) e a mucosa oral desempenha funções como proteção, regulação de temperatura e secreção (PEREIRA PINTO et al., 1997).

A mucosa oral é formada por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso denominado de lâmina própria ou cório, encontrados nas superfícies úmidas e em áreas de desgaste (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; KATE, 2001).

Logo abaixo da lâmina própria ou cório encontramos a submucosa na maioria das regiões da cavidade bucal (DONG et al., 2009; KALMANI et al., 2010). Nas bochechas, por exemplo, a submucosa contém feixes de colágenos e fibras elásticas que ligam a mucosa ao músculo subjacente. Essa elasticidade impede o excessivo pregueamento da mucosa, que poderia ser lesionada durante a mastigação. Ainda na submucosa encontramos uma grande quantidade de glândulas e tecido adiposo (BRASKAR, 1989; ROSS; REITH; RONRELL, 1993).

A morfologia das células epiteliais varia muito, desde células colunares até células pavimentosas achatadas como ladrilhos, e com todas as formas intermediárias entre estas duas (GÓES, 2003).

O epitélio estratificado possui algumas camadas celulares sendo que a mais profunda é denominada camada basal ou germinativa. Essa camada é formada por células com formas cilíndricas e é o local onde ocorrem às mitoses (KULKARNI et al., 2009).

A partir do momento que essas células migram para a superfície, ocorre uma condensação dos tonofilamentos e assim, elas tendem a possuir pequenas projeções, formando as interdigitações (BENETTI, 2005).

Após essa camada, superficialmente, as células tornam-se achatadas em formas de grânulos, formando assim a camada granulosa. E, segundo Benetti (2005), ainda temos profundamente a este epitélio a lâmina própria, que é uma camada de tecido conjuntivo denso que forma uma estrutura de sustentação (Figura 1).

Fonte KULKARNI, et al., 2009

Figura 1 - Esquema da anatomia da mucosa oral mostrando as diferentes camadas celulares

2.1.1 Tipos de mucosa oral

A boca é revestida por epitélio pavimentoso estratificado que se divide em três tipos teciduais: a mucosa de revestimento, a mastigatória e a especializada (ARRUDA, 2006).

A mucosa de revestimento é aquela que recobre o assoalho da boca, os lábios, o palato mole e as bochechas. Essa mucosa é delicada, maleável e não queratinizada. Já, a mucosa mastigatória reveste o palato duro e é assim chamada, pois, é a primeira estrutura que entra em contato com o alimento durante a mastigação, sendo queratinizada. E então, a especializada é a que recobre a língua, sendo composta principalmente por papilas epiteliais cornificadas que atuam na mastigação (AVERY, 2001).

2.2 TECIDO EPITELIAL

Apesar de sua grande complexidade, o organismo humano é constituído por apenas quatro tipos básicos de tecidos: o epitelial, o conjuntivo, o muscular e o nervoso (Quadro 1).

Tecido	Células	Matriz Extracelular	Funções
Nervoso	Longos prolongamentos	Nenhuma	Transmissão de impulsos
Epitelial	Poliédricas justapostas	Pequena quantidade	Revestimento/ secreção
Muscular	Alongadas contráteis	Quantidade moderada	Movimento
Conjuntivo	Vários tipos	Abundante	Apoio e proteção

Quadro 1- Principais características dos quatro tipos básicos de tecidos encontrados no corpo humano

O tecido epitelial é constituído por células poliédricas justapostas, entre as quais há pouca matriz extracelular (ALBERTS et al., 2010). As células epiteliais geralmente aderem firmemente umas as outras por meios de junções intercelulares. Esta característica permite que essas células se organizem como folhetos que revestem a superfície externa e as cavidades do corpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Segundo Junqueira; Carneiro (2008), os epitélios são divididos em dois grupos principais, de acordo com a sua estrutura e função: o epitélio de revestimento e o epitélio glandular.

Nos epitélios de revestimento as células são organizadas em camadas que cobrem a superfície externa ou que revestem as cavidades do corpo. Eles podem ser classificados de duas maneiras: de acordo com a quantidade de camadas, sendo chamado de epitélio simples quando existe apenas uma camada ou epitélio estratificado quando possuem mais de uma camada, como por exemplo, a mucosa oral (ROSS; REITH; RONRELL, 1993).

Em relação à morfologia das células, o epitélio simples pode ser classificado como: pavimentoso, cúbico ou prismático. Já, o epitélio estratificado é classificado em pavimentoso, cúbico, prismático ou de transição. O epitélio pavimentoso ainda pode ser dividido em queratinizado ou não queratinizado (Quadro 2).

Os epitélios glandulares como o próprio nome diz, são constituídos por células especializadas na atividade de secreção. Essas células podem sintetizar, armazenar e secretar proteínas, como por exemplo: o pâncreas e glândulas sebáceas entre outras secretando lipídios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Epitélio e número de camadas	Morfologia das células	Localização	Funções
Simples (uma camada)	Pavimentoso	Revestimento de vasos, das cavidades pericárdica, pleural e peritoneal	Facilita o movimento das vísceras, secreção de moléculas biologicamente ativas
Pseudo-estratificada	Cúbico, prismático ou colunar	Revestimento externo do ovário, ductos de glândulas, folículos, intestino, vesícula biliar, traqueia e cavidade nasal	Revestimento, secreção, proteção, lubrificação, absorção, transporte mediado por cílios
Estratificado (duas ou mais camadas)	Pavimentoso queratinizado, não queratinizado , cúbico, prismático ou colunar	Epiderme, boca , esôfago, vagina, canal anal, glândulas sudoríparas, bexiga, ureteres e conjuntiva	Proteção, prevenção da perda de água e secreção

Quadro 2: Tipos de epitélios de revestimento encontrados no corpo humano

2.3 TECIDO CONJUNTIVO

O tecido conjuntivo é responsável pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo. Este papel mecânico é dado por um conjunto de moléculas (matriz celular) que conecta e liga as células e órgãos, dando suporte ao organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Diferente dos outros tecidos, o principal constituinte do tecido conjuntivo é a matriz extracelular, que consiste em diferentes combinações de proteínas fibrosas e de

substância fundamental. Além de desempenhar uma evidente função estrutural, essas moléculas do tecido conjuntivo desempenham importantes papéis biológicos, como a reserva para muitos fatores de crescimento que controlam a proliferação e diferenciação celular.

A matriz do tecido conjuntivo também serve como um meio através dos quais nutrientes e catabólitos são trocados entre as células e seu suprimento sanguíneo. O tecido conjuntivo se origina do mesenquima, que é um tecido embrionário que se origina do mesoderma (ARRUDA, 2006; HORI et al., 2008).

Como mostra o quadro 3, as células do tecido conjuntivo são os fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos.

Os fibroblastos sintetizam proteínas do colágeno e elastina, além de moléculas que fazem parte da matriz extracelular que estão envolvidas na produção de fatores de crescimento. Estas possuem citoplasma abundante com muitos prolongamentos e seu núcleo é ovóide, grande e com nucléolos proeminentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Tipo celular	Funções
Fibroblastos, condrócitos e osteócitos	Produção de moléculas da matriz extracelular
Plasmócitos	Produção de anticorpos
Linfócitos	Participação na resposta imunológica
Neutrófilo	Fagocitose de substâncias e organismos estranhos
Macrófago	Fagocitose de substâncias estranhas e bactérias, secreção de citocinas e fatores quimiotáticos que participam da inflamação.
Mastócitos e basófilos	Liberação de moléculas farmacologicamente ativas, participação em reações alérgicas
Célula adiposa	Reserva de gordura, energia e produção de calor

Quadro 3 - Principais funções das células do tecido conjuntivo

2.4 MORFOLOGIA CELULAR

As células epiteliais possuem uma morfologia muito variável, desde células arredondadas até células poliédricas.

Uma única célula epitelial de mucosa oral é, em momentos diferentes de seu ciclo, parte de cada camada do epitélio bucal (BHASKAR, 1989). Segundo o mesmo autor após a mitose, ela pode permanecer na camada basal em sua respectiva forma basal, local onde se encontram as células- tronco da mucosa oral (IGARASHI et al., 2008), sofrendo mitoses ou ela pode migrar para as outras camadas. Durante essa migração, as células sofrem alterações bioquímicas e morfológicas.

Quando elas migram da camada basal para a intermediária, elas passam a ser chamada de células intermediárias. Segundo Araujo (2008), no momento em que essas células atingem a superfície, elas perdem o seu núcleo, passam a ser chamadas de células superficiais ou “fantasmas” e descamam, ou seja, ocorre a morte celular e o fim de seu ciclo (Figura 2).

Legenda: Ciclo de vida das células epiteliais de mucosa oral onde, observamos primeiramente as células basais em seu formato arredondado e nucleada, células intermediárias com núcleo e morfologia irregulares com aspecto poliédrico e as células superficiais sem o núcleo. Quando a célula chega neste estágio superficial ocorrerá à descamação e o seu ciclo será finalizado.

Figura 2 - Esquema representativo do ciclo das células epiteliais da mucosa oral humana e suas diferentes morfologias.

2.5 AS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA ORAL E SUA UTILIZAÇÃO NO ESTUDO E TRATAMENTO DE DOENÇAS

As células epiteliais da mucosa oral humana são originadas da ectoderme (KOLLTVEIT, 2010; QUEIROZ, 2010) e já vêm sendo estudada por alguns grupos como fonte de células no tratamento de doenças oculares graves (ANG et al., 2006; AIDAR; LINE, 2007; KLINGBEIL, 2010; MADHIRA et al., 2008; HIGA; SHIMAZAKI, 2008).

Em 2008, Higa; Shimazaki demonstraram o potencial das CEMO para tratamento de pacientes com ceratoconjuntivite cicatricial. Além disso, estes autores demonstraram a praticidade de cultivar as CEMO sobre membrana amniótica humana livre de células, dispensando o uso de camada de sustentação na cultura celular. O mesmo feito já havia sido reportado por outro grupo, na Índia (MADHIRA et al., 2008; KANAYAMA et al., 2009).

A utilização de células epiteliais da mucosa oral como fonte de células para FISH (hibridização fluorescente *in situ*) em meninas com baixa estatura também foi relatado (MARTINS et al., 2003).

Em 2008, Munce; Simpson; Bowling conseguiram eficientemente comprovar as mutações que determinam a síndrome Prader-Willi a partir de DNA extraídos tanto de linfócitos de sangue periférico como de células epiteliais da mucosa oral por PCR em tempo real.

Uusimaa et al., (2007) estudaram a prevalência de uma doença mitocondrial em mães e suas crianças usando células do epitélio bucal. Bianco et al., (2006) detectou a presença de fragmentos do cromossomo Y, conhecido por aumentar o risco de gonadoblastoma, em pacientes com síndrome de Turner, usando células da mucosa oral. Já, Sgarbosa, (2009) estudou também através dessas células pacientes portadores da síndrome de Apert.

Dias et al., (2008); Bremmer et. al., (2009) mostraram uma comparação da técnica de citologia em meio líquido comparada à citologia convencional em raspados de mucosa oral de voluntários saudáveis para futuros estudos clínicos. Therezita et al, (2009) também realizaram através de raspado da mucosa oral a detecção de papilomavirus humano (HPV), uma das mais frequentes doenças sexualmente transmissíveis, com o objetivo de verificar a presença do DNA do HPV na mucosa oral

de pacientes com infecção por HPV. Oliveira, (2009) estudou a periodontite crônica através da análise das células epiteliais de mucosa oral coletas pela técnica de bochecho.

Em todos os trabalhos citados acima, os autores estudaram diversas doenças a partir da coleta das CEMO onde predominou a coleta por biópsia, que é invasiva e dolorida ou por citologia esfoliativa, onde as células são apenas coletadas e não são mantidas em cultura.

Já, neste trabalho mostramos a viabilidade de obtenção e cultivo das CEMO obtidas a partir de raspagem da mucosa oral, que é um procedimento pouco invasivo e indolor. Dessa forma, podemos dizer que a CEMO obtidas por raspagem podem ser um bom método para futuras pesquisas de doenças genéticas, tendo em vista que um dos grandes problemas para realização desses estudos é a dificuldade da coleta do material.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram divididos conforme abaixo:

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a cultura de células epiteliais da mucosa oral humana a fim de gerar um modelo celular eficiente e de fácil obtenção para o estudo de doenças genéticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o protocolo de obtenção das células epiteliais da mucosa oral humana com procedimento minimamente invasivo e sem dor através da raspagem da mucosa oral.
- Estabelecer o protocolo de cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana.
- Caracterizar biologicamente as células epiteliais de mucosa oral humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação do comitê de ética em pesquisa humana, o trabalho experimental foi conduzido como mostra o texto a seguir.

4.1 COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA

As amostras foram coletadas a partir de doadores voluntários saudáveis em consultórios odontológicos de dentistas que colaboram conosco, mediante a leitura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Uma avaliação da mucosa oral foi feita antes da coleta, e voluntários com histórico de fumo, mastigação de tabaco, infecções ou inflamações na mucosa oral foram descartados.

Antes da coleta, os doadores foram submetidos a um processo de higienização bucal que consistia na escovação dos dentes. Desta forma, após a higienização, a coleta das células epiteliais da mucosa oral foi feita através de raspagem do céu da boca e gengiva usando uma escova dental descartável e estéril (OralB, Palmolive-Colgate, São Paulo).

O material obtido após a coleta, foi dispensado em um tubo contendo PBS com 4% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, CA, USA) e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm para lavagem das células e remoção de possíveis agentes contaminantes. Em seguida, o precipitado celular obtido na centrifugação foi novamente lavado com meio DMEM-H (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) contendo 1% de antibiótico e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm (Figura 3). Novamente, o sobrenadante foi removido e o precipitado celular obtido foi ressuspensionado em meio de cultivo DMEM high glicose contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 15% de soro fetal de vitelo (Thermo Scientific, CA, USA). As culturas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e o meio de cultura foi substituído a cada dois dias.

Legenda: A) Escova estéril utilizada para a raspagem da mucosa oral. B) Raspagem da mucosa oral. C) Transferência das escovas contendo as células em tubo com PBS contendo antibióticos para lavagem e remoção de possíveis agentes contaminantes. D) Precipitado celular obtido após a centrifugação.

Figura 3 – Fotomicrografia dos passos para a coleta das células epiteliais de mucosa oral humana através de raspagem

4.1.1 Análise da viabilidade da coleta

Para analisar a viabilidade das células coletadas, 3 voluntários com idades aproximadas variando entre 20 e 25 anos, foram submetidos a coleta.

Após a coleta, o precipitado celular foi ressuspendido em 1mL de meio. Em seguida, 100µl da suspensão celular foi colocado em um tubo de microcentrífuga, e nele foram adicionados 20 µl de azul de trypan (Invitrogen). Após gentil homogeneização das células com o corante, aproximadamente 10 µl foram colocados na Câmara de Neubauer e submetidos a microscópio óptico para realização da contagem de células mortas e células vivas uma vez que, o corante é incorporado nas células mortas onde se tornam azuis.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de barra utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA

Para o estabelecimento do cultivo destas células testamos quatro tipos de condições, que foram:

- 1) células cultivadas sobre camada de sustentação celular de fibroblastos murinos (NIH3T3);
- 2) células cultivadas sem camada de sustentação celular;
- 3) células cultivadas sobre matriz extracelular, matrigel;
- 4) células cultivadas sobre o matrigel e com meio condicionado nas células de sustentação, NIH3T3.

4.2.1 Cultivo das CEMO sobre a camada de sustentação celular de fibroblastos murinos

Em umas das condições de cultivo realizadas nesse trabalho, as CEMO foram cultivadas em placas de cultura contendo meio DMEM-H, penicilina, estreptomicina e 15% de soro fetal de vitelo. Estas células foram cultivadas sobre uma camada de sustentação de fibroblastos de embriões murinos, NIH3T3.

As células NIH3T3 foram cultivadas em meio DMEM-H, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina).

Para tanto, aproximadamente 1×10^5 células foram semeadas em placas de 60 mm. Ao atingirem confluência em torno de 70 %, as células foram lavadas com PBS e inativadas com 25 µg/ml de Mitomicina C (Sigma Aldrich, MO, USA) durante 30 minutos. Em seguida, as CEMO foram semeadas sobre essa camada de células inativadas que chamamos de camada de sustentação celular. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2.2 Cultivo das células CEMO sem camada de sustentação celular

Na condição de cultivo das CEMO livre da camada de sustentação celular, as células foram coletadas conforme protocolo estabelecido e após a coleta, foram cultivadas em placas de cultura contendo meio DMEM-H, penicilina, estreptomicina e 15% de soro fetal de vitelo. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2.3 Cultivo das CEMO sobre matrigel

Em umas das condições de cultivo realizadas nesse trabalho, as CEMO foram cultivadas em placas de cultura contendo meio DMEM-H, penicilina, estreptomicina e

15% de soro fetal de vitelo. Estas células foram cultivadas sobre uma camada de matrigel (100 µl/ml- BD Bioscience, NJ, USA), um produto produzido a partir de matriz extracelular. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2.4 Cultivo das CEMO sobre matrigel e com meio condicionado por camada de sustentação celular

Nessa condição, as CEMO foram cultivadas sobre matrigel em placas contendo meio DMEM *high glicose*, antibióticos e 15% de soro fetal de vitelo, condicionados previamente na camada de sustentação de fibroblastos murinos. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEMO (CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO CELULAR)

Para testar a viabilidade de criopreservação, as células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação de fibroblastos murinos, NIH3T3 foram submetidas ao processo de congelamento.

Para tanto, as células que atingiam semi-confluência foram lavadas com PBS e tripsinizadas com 1 mL de tripsina. Após o descolamento celular, a ação da tripsina foi bloqueada ressuspendendo as células em meio de cultivo contendo soro. Em seguida, a suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos. Então, o precipitado celular obtido foi ressuspendido em 1 mL de meio de congelamento composto por 30% de DMEM-H, 60% de SFB (Invitrogen) e 10% de DMSO (Invitrogen) e transferidos para criotubos. Os criotubos foram transferidos para o freezer -80°C. Depois de 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

Após 30 dias, as células foram submetidas ao processo de descongelamento com o objetivo de testar a sua habilidade para o processo de criopreservação.

Para o descongelamento, as células foram colocadas rapidamente no banho-maria a 37°C. Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida para tubos de polipropileno de 15 mL contendo meio de cultivo suplementado com SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em meio de cultivo e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO² a 37 °C.

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA

A caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana foi realizada conforme descrito abaixo:

4.4.1 Microscopia óptica

A morfologia das células derivadas do cultivo foi fotodocumentada periodicamente, através do microscópio óptico de luz invertido (Nikon, Japão). Desta forma, todo o desenvolvimento morfológico durante o crescimento e a proliferação celular em cultura foi acompanhado.

4.4.2 Coloração de Azul de Toluidina

A coloração de azul de toluidina foi realizada para analisar a morfologia das células epiteliais de mucosa oral. Dessa forma, as células coletadas através de raspagem da mucosa oral com uma escova estéril, foram submetidas a esfregaços em

lâminas silanizadas e fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse processo, as células foram coradas com azul de toluidina durante 10 minutos e as lâminas foram montadas. As células submetidas a este processo foram analisadas por microscopia de luz no microscópio Olympus B50 (Olympus, PA, USA) e a morfologia encontrada foi registrada fotograficamente.

4.4.3 Coloração de Papanicolaou

As células epiteliais de mucosa oral humana foram coletadas através de raspagem da mucosa oral com uma escova estéril e posteriormente o material obtido foi submetido a um esfregaço em uma lâmina silanizada. Após secagem, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, as células foram submetidas a dez imersões em álcool 70%, dez imersões em álcool 50% e dez imersões em água destilada. Após essas imersões, as células foram coradas com hematoxilina por aproximadamente 8 minutos. Após lavagem em água por 5 minutos, as células foram submetidas à desidratação, passando por 10 imersões cada nos seguintes alcoóis 50%, 70%, 80% e 95% e coradas pelo laranja G por 90 segundos e novamente submetidas a 10 imersões em álcool 95%. A seguir, as células foram coradas por eosina-verde-claro por 90 segundos e lavadas por 10 vezes em álcool 95%. Após esta fase de coloração, as células foram desidratadas pelo álcool absoluto, as lâminas foram montadas e as células foram analisadas por microscopia de luz, observando a morfologia, com registro fotográfico no microscópio óptico (Olympus BX50).

4.4.4 Coloração de Hematoxilina-eosina

As células epiteliais de mucosa oral humana foram coletadas através de raspagem da mucosa oral com uma escova estéril e foi realizada a técnica de esfregaço em uma lâmina silanizada. Em seguida, as células foram fixadas com

paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após esse processo, as células foram coradas com hematoxilina por 1 minuto e lavada com PBS para retirar o excesso de corante. Em seguida, as células foram coradas pela eosina por 10 minutos e lavadas novamente com PBS. As lâminas foram montadas e as células foram analisadas por microscopia de luz, observando a morfologia, com registro fotográfico (Olympus BX50).

4.4.5 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

O método baseia-se na medida da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), a qual, se ativa, sendo capaz de metabolizar o reagente MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, em cristais de formazan de cor violeta, portanto, ocorrendo somente em células vivas. O teste do MTT se baseia no princípio da conversão do substrato amarelo pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas em cristais de formazan, de cor violácea (HASEN; NIELSEN; BERD, 1989).

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das CEMO. Para tanto, aproximadamente 1×10^4 células de fibroblastos de embriões murinos foram plaqueadas em placas de 96 orifícios para cada dia de experimento. Após 24 horas estas células foram inativadas com mitomicina C (25 $\mu\text{g/mL}$) para o co-cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana. Após a coleta, aproximadamente 24 células epiteliais de mucosa oral humana foram adicionadas sobre a camada de sustentação e as células foram mantidas em cultura por 10 dias sendo que a dosagens foram realizadas a cada 48 horas.

Em cada dia de experimento o meio de cultura foi removido e adicionou-se 90 μl de meio de cultivo celular e 10 μl de solução de MTT (5mg/mL). Essa mistura foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um poço limpo e 100 μl de DMSO foram adicionados. Após completa dissolução do formazan, a mistura foi homogeneizada e colocada novamente no poço com células. Em seguida, as células foram deixadas em temperatura ambiente por 30

minutos protegidas da luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (M-Quant, Bio-Bio Tek Instruments, VT, USA) em comprimento de onda de 535 nm.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de linha utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Após o crescimento celular, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 1mL de meio de cultivo e centrifugadas novamente, em microtubos, por 5 minutos à 1500rpm. Passada a centrifugação, novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular obtido foi submetido à fixação. Para tanto, uma solução de glutaraldeído (3% em PBS) foi colocado cuidadosamente sobre a amostra que foi deixada em temperatura ambiente por três horas. Após esse procedimento, três lavagens em PBS de 5 minutos cada, em misturador rotatório foram realizadas. As amostras após lavagem foram mantidas em PBS e deixadas à 4° C durante 16 h.

No dia seguinte, a pós-fixação foi realizada com ósmio (1%) por uma hora em temperatura ambiente em misturador rotatório. Para retirada do excesso do pós-fixador, foram feitas duas lavagens em PBS. A desidratação foi realizada gradualmente, em séries de etanóis 50%, 70%, 90% e 100%. Para finalizar a etapa de desidratação, foram feitas duas passagens, de 15 minutos cada, pelo óxido de propileno com a tampa do microtubo fechada.

Para inclusão, a resina foi misturada ao óxido de propileno na proporção 1:1, e deixado em misturador rotatório, com tampa aberta por um período de quatro horas. Em seguida, foi adicionada a resina pura, que permaneceu no misturador rotatório por um período de 12 a 18 horas, em microtubo com tampa fechada.

Finalizando o processamento, a resina foi trocada por uma nova resina pura e deixada em estufa a 37°C, por uma hora, com tampa aberta para a evaporação dos resíduos de óxido de propileno que ainda estavam presentes na amostra. As amostras foram emblocadas.

Os cortes ultrafinos foram realizados no ultra micrótomo, algumas submetidas à coloração de hematoxilina-eosina seguindo as instruções do fabricante e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (FEI Morgagni 268d - FEI, Oregon, USA).

4.4.7 Microscopia eletrônica de varredura

As células foram cultivadas em placas de petri de 3 cm de diâmetro. Após atingirem a confluência, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas com PBS e submetidas ao fixador glutaraldeído (3% em PBS). Após o tempo de fixação necessário que varia de 2 a 24h, as placas foram lavadas em PBS e água destilada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) e desidratadas em série gradual de etanóis. Para finalizar, foi realizada então a secagem do material em aparelho de ponto crítico usando CO₂ e as placas receberam o recobrimento metálico com ouro por *sputtering*, terminado assim o processamento e tendo o material pronto para observação no microscópio eletrônico de varredura (Leo 435 VP – Zeiss, Germany).

4.4.8 Análise Imunocitoquímica das células epiteliais da mucosa oral

Células provenientes do cultivo celular primário da mucosa oral humana foram cultivadas em placas de 24 orifícios sob lamínulas de vidro. Após 48 horas, todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com solução de PBS por 1 vez, para a retirada de todos restos celulares. Posteriormente as células foram fixadas por 1 hora em solução de paraformaldeído a 4%.

Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 min cada em tampão de lavagem contendo 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20 e fixadas em 4 % de paraformaldeído durante 1 hora. Após fixação as células foram novamente lavadas com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 min cada e permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 15 min a temperatura ambiente. Ao final da

permeabilização, as células foram lavadas novamente com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada lavagem.

O bloqueio foi feito com 5 % de soro albumina bovino (BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários diluídos de acordo com o quadro 4 em câmara úmida por 16 h a 4°C. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem e anticorpos secundários diluídos 1:200 marcados com FITC (Quadro 5) foram adicionados e incubados por 1 h em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e a imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência (Microscópio de Fluorescência Axioskopz e câmara axios cam HRC, Zeiss, Germany).

Anticorpo	Diluição	Catálogo	Empresa
Anti-Oct4 (monoclonal-camundongo)	1:50	sc-5279	Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A)
Anti-Nanog (policlonal-cabra)	1:50	sc-30331	Santa Cruz Biotechnology
Anti-citoqueratina 18 (monoclonal-camundongo)	1:50	SC-32329	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PCNA3 (monoclonal-camundongo)	1:50	SC-56	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Citoqueratina Pan (policlonal - camundongo)	1:25	M082101	DAKO (Glostrup, Denmark).

Quadro 4 - Anticorpos primários utilizados para caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de imunocitoquímica

ANTICORPOS	Diluição	EMPRESA
anti- IgG de camundongo – conjugado a FITC	1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti- IgG de cabra - conjugado a FITC	1:200	Santa Cruz Biotechnology

Quadro 5 - Anticorpos secundários utilizados para caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de imunocitoquímica

4.4.9 Análise molecular das células da mucosa oral por RT-PCR

Primeiramente as células epiteliais da mucosa oral foram coletadas como descrito acima e uma parte foi submetida diretamente a extração de RNA utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) segundo protocolo descrito pelo fabricante, e outra parte foi colocada em cultura sem a presença da camada de sustentação durante dois dias e posteriormente submetida à extração de RNA. Além dessas duas condições, uma nova coleta foi realizada e as células foram cultivadas sobre a camada de sustentação e após expansão, estas células bem como apenas células da camada de sustentação foram também submetidas à extração de RNA.

Para tanto, o meio das células foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após remoção total do PBS, 1 mL de TRIzol foi adicionado e as células foram homogeneizadas nas placas e transferidas para tubos de microcentrifuga onde adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio. Após gentil homogeneização, as células foram centrifugadas a 12000 x g durante 15 min a 4 °C.

Em seguida, a fase incolor obtida após a centrifugação foi cuidadosamente retirada e 0,5 mL de álcool isopropílico foram adicionados para a precipitação do RNA. Após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado a 12000 x g durante 10 min a 4°C. O precipitado incolor obtido foi lavado com etanol 70 %, preparado em água DEPC para evitar contaminação, e novamente centrifugado a 7500 x g durante 5 min a 4 °C.

Posteriormente o etanol foi removido e o precipitado secou ao ar livre durante aproximadamente 10 minutos. Após secagem o RNA foi ressuspendido de acordo com o tamanho de seu precipitado em água DEPC. Dessa forma, o RNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para visualização da qualidade do RNA. Em paralelo, o RNA foi dosado por espectrofotometria utilizando o nanofotômetro (Implen, CA, USA) e posteriormente utilizado na síntese do cDNA.

Para a síntese de cDNA, uma solução contendo 1 µg de RNA, oligo dT e água foi aquecida durante 65°C durante 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo e adicionou-se tampão da enzima, Ribolock RNase, dNTPs e a enzima RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Life Science, Amherst, NY, EUA) para a síntese do cDNA seguindo as instruções do fabricante. Esta mistura foi então submetida a uma temperatura de 42°C durante 1 h e posteriormente 70°C durante 10 min. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo para visualização e posteriormente armazenado em - 20°C até a sua utilização.

Após síntese e análise os cDNAs foram utilizados como fita molde na reação de PCR, para tanto, misturou-se 1 µl cDNA, 0.2 µM de oligonucleotídeos sense e anti-sense que anelam nos genes de interesse, 0.2 µM dNTPs, MgCl₂ 1,5 mM, tampão da enzima e 1U de Taq DNA Polymerase (5U/µl) (Fermentas Life Science) e água deionizada para um volume final de 25 µl. Esta mistura foi colocada em um termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo a 94° C por 4 min seguindo 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura: 94° C por 1 min para denaturação, 56/58/60° C por 1min para anelamento e 72° C por 1 min para polimerização e 1 ciclo extra de 10 min a 72° C para a extensão final.

Aproximadamente 10 % do produto desta reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador UV. Marcador de peso molecular, *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* foram utilizados para confirmar o tamanho esperado dos fragmentos.

Gene	Sequência	TA	Produto
Oct4	hOct4-S: 5'GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3' hOct4AS: 5'CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC 3'	60 °C	120 pb
Nanog	hNANOG-S: 5' CCTATGCCT GTGATTTGT GG 3' hNANOG-AS: 5' CTGGGACCTTGTCTTCCTTT 3'	60 °C	210 pb
Vimentina	hVimentin-S: 5' AAGCAGGAGTCCACTGAGTACC 3' hVimentin-AS: GAA GGTGACGAGCCATTTCC 3'	56° C	204 pb
CK4	hCK4-S: 5' GCCATGATTGCCAGACAGCAGTGT 3' hCK4-AS: 5' GGGGGTGAGCAAGCTATGGTTG 3'	58 ° C	408 pb
CK13	hCK13-S: 5' GATCCAGGGACTCATCAGCA hCK13-AS: 5' AAGGCCTACGGACAT CAGAA 3'	58 ° C	289 pb
CK12	hCK12-S: 5'ACATGAAGAAGAACCACGAGGATG 3' hCK12-AS: 5'TCTGCT CAGCGATGGTTTCA 3'	60° C	150 pb
Con43	hCon43-S:5' CTTCTTGCTGATCCAGTGGTA 3' hCon43-AS: 5' ACCAAGGACACCACCAGCA. 3'	60° C	145 pb
GAPDH	hGAPDH-S: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' hGAPDH-AS: 5 'TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	60° C	463 pb

Quadro 6 – Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR das células epiteliais de mucosa oral humana

Em todas as reações, água e células da camada de sustentação, NIH3T3, foram usadas como controle das reações.

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos conforme descrito abaixo:

5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DA CAMADA DE SUSTENTAÇÃO

Os fibroblastos de embriões murinos NIH3T3 foram usados como células de suporte para o cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana. A figura 4 mostra a morfologia dos fibroblastos murinos, NIH3T3 em diferentes aumentos. Observe nesta figura a morfologia alongada, a presença de núcleo ovóide e muitos nucléolos (Figura 4D).

Legenda: A) aumento de 4x; B) 10x; C) 20x e D) 40x.

Figura 4 - Fotomicrografia dos fibroblastos murinos, NIH3T3, utilizados como camada de sustentação para o cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana sob microscopia invertida de contraste de fase.

Como relatado no item 4.2.1, os fibroblastos murinos que serão utilizados como camada de sustentação foram cultivados até atingirem confluência de aproximadamente 80%. Após atingirem esta confluência, eles tiveram seu crescimento inibido após o tratamento das células com mitomicina C, um inibidor da divisão celular, pois a camada de sustentação celular não deve continuar crescendo, e sim as CEMO que serão plaqueadas sobre essa camada de células. Na figura 5, demonstramos que as células inativadas não sofreram alterações morfológicas (Figura 5).

Legenda: A, B e C) células NIH3T3 antes da inativação com mitomicina C nos aumentos de 10x, 20x e 40x. D, E e F) células NIH3T3 após tratamento com mitomicina C para inativação do seu crescimento, nos aumentos de 10x, 20x e 40x.

Figura 5 - Fotomicrografia dos fibroblastos murinos, NIH3T3, antes e após inativação com mitomicina C em microscopia invertida de contraste de fase

5.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL HUMANA

Para o isolamento das células epiteliais de mucosa oral humana foram utilizados voluntários saudáveis, não fumantes, sem histórico de doenças ou inflamações bucais, sendo as amostras coletadas em consultórios odontológicos.

Vários testes foram feitos no intuito de estabelecer o melhor local, forma de coleta, necessidade de higienização bucal completa, lavagem das células antes de sua colocação em cultivo bem como, a necessidade de células de suporte para o cultivo. Dessa forma, após essas tentativas, conseguimos estabelecer a cultura primária das células epiteliais de mucosa oral humana sobre as células de suporte NIH3T3. Nas condições estabelecidas e descritas as CEMO cresciam de forma gradual, necessitando de um repique celular semanal. Esses resultados nos levaram a acreditar que o procedimento era factível e capaz de produzir um número de células adequado para futuros ensaios genéticos (Figura 6).

Além disso, testamos o cultivo das células epiteliais de mucosa oral humana na ausência das células de suporte NIH3T3, através de três tipos de cultivo: sem suporte nenhum (Figura 7), sobre o matrigel, um suporte de proteínas de matriz extracelular (Figura 8) e ainda sobre o matrigel com meio condicionado sobre o suporte celular de fibroblastos murinos (Figura 9), pois se as CEMO fossem capazes de crescer sem a necessidade das células de suporte, o cultivo seria muito mais fácil.

5.2.1 Células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação de fibroblastos murinos (NIH3T3)

Com o objetivo de estabelecer e otimizar o cultivo, as CEMO foram cultivadas sobre uma camada de fibroblastos murinos (NIH3T3), que serviram como um “tapete nutritivo”, chamado de camada de suporte ou sustentação celular, onde os fibroblastos liberam fatores para auxiliar o crescimento as CEMO. Na figura 6A, B e C, observamos a presença de células epiteliais aderidas na sua forma basal, indicadas pelas setas. Observe a presença de células após 5 dias da coleta (Figura 6A) e depois do primeiro e

segundo repiques (Figuras 6B e C). Dessa forma, podemos dizer que o cultivo destas células sobre a camada de sustentação foi satisfatório, pois, observamos crescimento celular, necessitando de repique semanal.

Legenda: A) Células CEMO após 5 dias após a coleta. B) CEMO após a primeira passagem. C) CEMO após a segunda passagem. A) aumento de 10x, B e C) 20x

Figura 6 - Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.

5.2.2 Células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sem nenhuma camada de sustentação

A figura 7 mostra o cultivo das CEMO sem nenhuma camada de sustentação, onde observamos um pequeno número de células obtidas a partir da coleta (Figura 7A), porém com uma proliferação celular dois dias após a mesma (figura 7B). Apesar deste crescimento, as CEMO quando cultivadas sem nenhuma camada de sustentação morrem após o sexto dia da coleta (Figura 7C).

Com isso podemos afirmar que esta condição de cultivo não foi eficiente para o crescimento celular das CEMO.

Legenda: A) CEMO após coleta; B) 2 dias após a coleta; C) 6 dias após a coleta. A, B e C) Aumento de 20x

Figura 7 - Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sem a presença das células de suporte NIH3T3, vista sob microscopia invertida de contraste de fase.

5.2.3 Células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre o matrigel

As CEMO também foram cultivadas sobre uma fina camada de matrigel que é uma camada de sustentação feita a partir de proteínas da matriz extracelular derivadas de cultura de células de sarcoma murino. Essa condição de cultivo foi realizada para verificar se o suporte de matrigel seria eficiente para o cultivo e se essas células seriam capazes de sobreviver e proliferar nestas condições.

Dois dias após a coleta observamos aumento na proliferação celular (Figura 8A), mas esse aumento não foi mantido, pois, já, no quarto dia a cultura apresentava poucas células, indicando que houve uma morte celular (Figura 8B). Dessa forma, não observamos células após o quinto dia e no sexto dia observamos apenas restos celulares (Figura 8C).

Com isso podemos dizer que a substituição da camada celular pelo matrigel não se mostrou eficiente e as CEMO não viveram por muito tempo.

Legenda: A) CEMO 2 dias após coleta com confluência de aproximadamente 60%. B) CEMO 4 dias após coleta, observamos poucas células. C) 6 dias após coleta, observamos apenas restos celulares. A, B e C) aumento de 20x

Figura 8 - Fotomicrografia da cultura de células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre o matrigel, vista sob microscopia invertida de contraste de fase

5.2.4 Células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre o matrigel com meio condicionado

A partir do momento que verificamos que essas células não sobreviveram por muito tempo sobre o matrigel, um novo cultivo foi realizado sobre a camada de matrigel, porém, para substituir a presença das células de sustentação, usamos meio previamente condicionado nos fibroblastos murinos para nutrição das CEMO. Pensamos que condicionar o meio nos fibroblastos murinos poderia solucionar o problema da baixa proliferação celular encontrado anteriormente.

O condicionamento do meio foi feito por 24 h e então o meio condicionado era adicionado na cultura de CEMO, pois nesse período de tempo os fibroblastos poderiam liberar fatores de crescimento que deveriam auxiliar no crescimento das células.

A figura 9 mostra as CEMO cultivadas sobre o matrigel e mantidas com meio condicionado no dia da coleta (Figura 9A), dois dias após a coleta (Figura 9B) e oito dias após coleta (Figura 9C). Observe na figura 9B um aumento no número de células e conseqüentemente uma alta taxa de proliferação celular quando comparada com o número de células no dia da coleta (Figura 9A). A figura 9C mostra que apesar do crescimento ter sido alto dois dias após a coleta o mesmo não foi sustentado e no

oitavo dia não observamos mais células e sim uma grande quantidade de restos celulares.

Com isso, verificamos que nessas condições, matrigel e meio condicionado, as CEMO cresceram mais e viveram por mais tempo em cultura, em relação às outras condições, sem camada de sustentação ou apenas matrigel, mas mesmo assim viveram apenas oito dias, o que foi um resultado insatisfatório quando comparamos a sobrevivência e proliferação destas células sobre a camada de sustentação celular.

Legenda: A) CEMO no dia da coleta. B) CEMO 02 dias após a coleta. C) CEMO 08 dias após a coleta. Convém ressaltar que um aumento importante no número de células foi observado no 2º dia após coleta e que este crescimento celular não foi mantido por muito tempo e no 8º dia observamos apenas restos celulares.. A) aumento de 20x, B) aumento de 10x e C) aumento de 20x

Figura 9 - Fotomicrografia da cultura de células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre o matrigel com meio condicionado nos fibroblastos murinos, vista sob microscopia invertida

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA ORAL

Através da caracterização das células epiteliais de mucosa oral humana obtivemos os resultados conforme descritos abaixo:

5.3.1 Ensaio de viabilidade celular da coleta

Nesse experimento analisamos a viabilidade celular, ou seja, o número de células vivas e mortas após a coleta de três voluntários com idades aproximadas variando entre 20 e 25 anos. Observe que o número de células vivas e mortas é bem parecido entre os indivíduos (Gráfico 1).

Para melhor entendimento do resultado citado acima, o gráfico 2 mostra a porcentagem de células mortas e células vivas de cada voluntário. Observe que o voluntário 1 apresentou 62% de células mortas e 38% de células vivas. Já, o voluntário 2, 55% de células mortas e 45% de células vivas. E o voluntário 3, 53% de células mortas e 47% de células vivas.

Observe que o número de células vivas foi menor que o número de células mortas. Esse resultado era esperado, já que na raspagem da mucosa oral retiram-se as células mais superficiais, ou seja, células que estão expostas a mastigação e outros atritos. Entretanto, os resultados observados foram positivos já que observamos uma viabilidade celular de aproximadamente 50%, o que é suficiente para a realização do cultivo e outros experimentos.

Legenda: A) número de células vivas obtidas na coleta; B) numero de células mortas obtidas na coleta. Verde (voluntário 1), vermelho (voluntário 2) e azul (voluntário 3)

Gráfico 1 – Análise da viabilidade celular da coleta das células epiteliais de mucosa oral humana através de raspagem da mucosa oral de três voluntários sadios

Legenda: A) número de células vivas obtidas na coleta; B) número de células mortas obtidas na coleta. Verde (voluntário 1), vermelho (voluntário 2) e azul (voluntário 3)

Gráfico 2 – Porcentagem de células epiteliais de mucosa oral humana, vivas e mortas, obtidas após raspagem da mucosa oral de três voluntários sadios com idades aproximadas.

5.3.2 Viabilidade celular após criopreservação

Com o objetivo de analisar a capacidade de criopreservação destas células um processo congelamento e descongelamento foram realizados onde, verificamos que estas células são passíveis de congelamento, pois não perderam sua capacidade de proliferação e não sofreram alterações morfológicas conforme observado na figura 10.

Legenda: Observamos as células após o congelamento e descongelamento, mostrando assim sua viabilidade após esse processo. A) aumento 10x; B) aumento 20x

Figura 10 - Fotomicrografia das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre a camada de sustentação de fibroblastos, após criopreservação, vista sob microscopia invertida de contraste de fase

5.3.3 Colorações para análise morfológica das CEMO

As células foram preparadas a partir da citologia esfoliativa, um método laboratorial conhecido desde o século XIX.

Algumas técnicas de colorações Foram realizadas para caracterização de sua morfologia. Observamos que as CEMO são na maioria das vezes células poliédricas e justapostas, ou seja, unidas entre si e com uma grande variação na sua morfologia. Na coloração de azul de toluidina pudemos constatar que as CEMO são células grandes, com núcleo grande e arredondado (Figura 11A,B e C).

Legenda: A-C) CEMO após coloração com azul de toluidina A) aumento 4x. B) 10x. C) 20x

Figura 11 - Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana após coloração com azul de toluidina

Na coloração de papanicolaou observamos novamente que as CEMO possuem núcleo grande. Observe que o núcleo foi corado de azul e o citoplasma corado de acordo com sua morfologia e tipo celular (Figura 12 A-D). As células basais, que fazem parte da camada basal foram coradas de rosa, as intermediárias de verde-azulado e estão presentes nas camadas intermediárias da mucosa oral. Já, as células superficiais ou “fantasmas” foram coradas de amarelo e, como dito anteriormente essas células fazem parte da camada superficial que é o último estágio do ciclo celular destas células pois, perdem o seu núcleo e descamam.

Observem na figura 12 que o número de células basais e intermediárias foram semelhantes e um número menor de células superficiais. Esses resultados são favoráveis, pois, as células basais são as que estão em processo de mitose enquanto que as superficiais estão no fim do seu ciclo celular.

Legenda: A – D) CEMO após coloração de papanicolaou . A) aumento 4x. B) aumento 10x. C) aumento 20x. D) aumento 40x. O núcleo das células corado com azul e o citoplasma corado de acordo com a morfologia e tipo celular. As células basais são coradas de rosa, as células intermediárias de verde-azulado e as superficiais ou fantasmas de amarelo.

Figura 12 - Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de coloração de papanicolaou

Observamos também na figura 13, a morfologia das CEMO através da coloração hematoxilina-eosina (HE) onde novamente notamos células com o núcleo grande marcado pela hematoxilina corroborando com os resultados encontrados acima.

Legenda: A - C) CEMO após coloração com HE. A) aumento 10x. B) aumento 20x. C) aumento 40x. Observamos células com núcleo pequeno corado com hematoxilina, bastante citoplasma corado com eosina e observamos muitas células justapostas e algumas células isoladas.

Figura 13 - Fotomicrografia do esfregaço de células epiteliais de mucosa oral humana através da técnica de hematoxilina-eosina (HE)

5.3.4 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

No ensaio de proliferação celular as células da camada de sustentação (NIHNIH3T3) também foram cultivadas como sendo controle do experimento, uma vez que as CEMO foram cultivadas sobre elas. O gráfico 13 representa o resultado obtido neste experimento onde, pudemos observar que as NIH3T3, apesar de terem sido tratadas com a mitomicina C para parada do ciclo celular, continuaram crescendo e que o número de células da camada de sustentação é muito maior que o número de CEMO. Com isso, as células da camada de sustentação podem acabar “mascarando” o resultado do crescimento das CEMO, pois, antes de realizarmos os ensaios, as células foram submetidas à análise por microscopia óptica e foi observado um excelente crescimento celular.

Gráfico 3: Análise da proliferação celular das células epiteliais de mucosa oral humana cultivadas sobre camada de sustentação

5.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Na microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar as estruturas internas das células epiteliais de mucosa oral humana.

Em paralelo, um corte ultrafino das CEMO foi submetido a uma coloração de azul de toluidina onde, observamos uma grande quantidade de células da camada de sustentação e a presença de CEMO. Conseguimos diferenciar as CEMO da camada de sustentação, pelo tamanho do núcleo uma vez que, as CEMO têm núcleo muito grande quando comparados com os fibroblastos (Figura 14).

Legenda: A-C) Cortes ultrafinos de CEMO após coloração com azul de toluidina. A e B) visão geral das CEMO em menor aumento. C) observamos em maior aumento as CEMO apresentando grande núcleo, pouco citoplasma e nucléolo presente na maioria das células

Figura 14 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação e coradas com azul de toluidina

Na microscopia eletrônica, observamos nos cortes semi-finos, as CEMO justapostas entre si, e novamente podemos afirmar que estas células têm um núcleo grande em relação ao tamanho do seu citoplasma (Figura 15). Na figura 15A observamos células justapostas com grande núcleo, pouco citoplasma e nucléolo. Já, em na figura 15B observamos células justapostas com grande núcleo e podemos observar uma célula em apoptose.

Legenda: A – B) Corte semi-fino da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação, mostrando uma visão geral das CEMO. N (núcleo), NL (nucléolo), CT (citoplasma), MP (membrana plasmática), J (junções intercelulares) AP (apoptose). Em (A) observamos células justapostas com grande núcleo, pouco citoplasma e nucléolo. Já, em (B) observamos células justapostas com grande núcleo e podemos observar uma célula em apoptose. A) escala de barras de 10µm; B) escala de barras de 5µm

Figura 15 – Fotomicrografia do corte semi-fino da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

Quando realizamos registros fotográficos em maior aumento, pudemos observar as organelas e verificamos que estas células têm uma grande quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e grânulos de secreção e ainda a dupla membrana nuclear e junções ligando uma célula à outra (Figura 16A-D). O grande número de mitocôndrias e organelas viáveis, incluindo os grânulos de secreção, mostra que essas células estão viáveis e em plena atividade metabólica.

Legenda: A-D) Corte semi-fino da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação. CT (citoplasma), GS (grânulo de secreção), J (junções intercelular), MN (membrana nuclear), MT (mitocôndrias), N (núcleo), NL (nucléolo), RER (retículo endoplasmático rugoso). Em todas as fotomicrografias observamos no citoplasma uma grande quantidade de mitocôndrias, bastante retículo endoplasmático rugoso, uma considerável quantidade de grânulos de secreção, dupla membrana nuclear, núcleo grande, nucléolo e junções intercelulares. Em A, B, C e D) escala de barras de 2µm

Figura 16 – Fotomicrografia da microscopia eletrônica de transmissão das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

Na microscopia eletrônica de varredura analisamos a superfície das CEMO cultivadas sobre a camada de sustentação. Neste experimento foi possível observar uma grande quantidade de fibroblastos murinos da camada de sustentação e uma menor quantidade de CEMO. Ainda, com a microscopia eletrônica de varredura, pudemos verificar algumas das diferentes morfologias que essas células apresentam, como basal e intermediária ou superficial.

Na figura 17A podemos observar os fibroblastos murinos e uma célula em apoptose. Na figura 17B observamos as CEMO cultivadas sobre a camada de sustentação em menor aumento, na 17C CEMO em sua forma basal e 17D CEMO em sua forma intermediária ou superficial, pois não é possível evidenciar por essa técnica, que só mostra a superfície celular, se essas células tem ou não núcleo celular.

Legenda: A) Camada de sustentação em maior aumento e uma dos fibroblastos em morte celular. B) Grande quantidade de fibroblastos murinos e as CEMO em sua forma basal C) Forma basal da CEMO. D) Forma intermediária ou superficial da CEMO. Em A e B) escala de barra de 30µm; C e D) 3µm.

Figura 17 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais de mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

5.3.7 Análise Imunocitoquímica das células epiteliais da mucosa oral

A análise da expressão de marcadores celulares para células epiteliais foi realizada nas células de mucosa oral humana através dos ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais anti-Oct-3/4, anti-Nanog, citoqueratina pan, citoqueratina 18 e PCNA3.

A imunopositividade para os anticorpos citoqueratina pan (Figura 18), citoqueratina 18 (Figura 19) e PCNA3 (Figura 20) foi observada nas CEMO, já os anticorpos para marcação de células-tronco (Oct4 e Nanog) foram negativos (Figuras 21 e 22), o que era esperado, pois essas células são adultas e apresentam-se totalmente diferenciadas.

Na Figura 18A-D, observamos expressão de citoqueratina pan no citoplasma das CEMO como era esperado, pois citoqueratinas são proteínas do citoesqueleto, sendo o núcleo das células marcado com DAPI. A intensa expressão de citoqueratina 18 também foi observada no citoplasma das CEMO, conforme era esperado uma vez que são proteínas do citoesqueleto presentes abundantemente em células epiteliais (MADHIRA et al., 2008). Observe na figura 19A e 19B esta forte marcação. Em todos os experimentos, as células foram coradas com DAPI e o núcleo foi visualizado em luz ultravioleta.

Com o objetivo de analisar se as células em cultivo estavam se proliferando utilizamos o marcador PCNA3 e pudemos observar a expressão do mesmo tanto no núcleo como no citoplasma. Estes resultados são compatíveis com o que temos na literatura uma vez que o PCNA3 pode ser encontrado tanto no núcleo como na forma solúvel no citoplasma (Figura 20A-E). Observe na figura 20D que um fibroblasto proveniente da camada de sustentação foi marcado e que a morfologia das CEMO são bem diferente das células da camada de sustentação.

Legenda: A-D) Expressão de Citoqueratina Pan nas CEMO. A) e C) FITC B) e D) Sobreposição das imagens. Em A, B aumento de 20x. Em C, D aumento de 40x. Neste experimento as células epiteliais de mucosa oral humana foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo para Citoqueratina Pan. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo conjugado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI.

Figura 18- Análise do perfil de expressão de Citoqueratina Pan nas células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação celular.

Legenda: A- D) Expressão de citoqueratina 18 nas CEMO. Neste experimento as células epiteliais de mucosa oral humana foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo para Citoqueratina 18. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo conjugado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) e B) FITC; C) e D) Sobreposição das imagens. Aumento de 20 x.

Figura 19 - Análise do perfil de expressão do marcador Citoqueratina 18 nas células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

Legenda: A-F) Expressão de PCNA3 nas CEMO. Neste experimento as células epiteliais de mucosa oral humana foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo para PCNA3. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo conjugado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) e D) FITC; B) e E) DAPI e C) e F) Sobreposição das imagens. Aumento de 20 x.

Figura 20 - Análise do perfil de expressão do marcador PCNA3 nas células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

Legenda: Expressão de Oct-4 nas CEMO. Neste experimento as células epiteliais de mucosa oral humana foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo para Oct-4. O núcleo foi corado com DAPI com marcação negativa para Oct-4. Aumento de 40x

Figura 21- Análise do perfil de expressão do marcador Oct-4 nas células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

Legenda: Expressão de Nanog nas CEMO. Neste experimento as células epiteliais de mucosa oral humana foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo para Nanog. O núcleo foi corado com DAPI com marcação negativa para Nanog. Aumento de 40x

Figura 22- Análise do perfil de expressão do marcador Nanog nas células epiteliais da mucosa oral humana, cultivadas sobre camada de sustentação

5.3.8 Análise das células epiteliais da mucosa oral por RT-PCR

O cDNA foi obtido a partir do mRNA como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes citoqueratina 4 (CK4), citoqueratina 12 (CK12), citoqueratina 13 (CK13), conexina, Oct-4, Nanog, vimentina e GAPDH (Figura 23).

As bandas de 408 pb para CK4 foram observadas tanto para as NIH3T3 como para CEMO cultivadas sobre camada de sustentação, sendo negativa para as CEMO sem camada de sustentação. Podemos dizer que a quantidade de RNA extraído das CEMO cultivadas sem camada de sustentação foi baixa e por isso não observamos bandas nessas amostras.

Surpreendentemente, observamos bandas de 289 pb para a CK13 nas CEMO cultivadas sem camada de sustentação uma vez que, a quantidade de RNA obtida e consequentemente, de cDNA foi muito baixa. Como isso, podemos sugerir que a expressão de citoqueratina 13 é muito alta. O mesmo padrão de expressão não foi observado nas CEMO cultivadas sobre camada de sustentação.

Como controle na caracterização das células epiteliais da mucosa oral, utilizamos a CK12, que é um marcador de epitélio de córnea, ou seja, a amplificação dessa banda não era esperada, como demonstrado na figura 23.

A expressão de conexina, marcador de junções celulares, foi encontrada nas amostras NIH3T3 e CEMO + NIH3T3 e uma banda de 145 pb foi observada.

Em relação à expressão dos marcadores de células-tronco Oct-4 e Nanog, conferimos a amplificação obtida às células NIH3T3, pois baseados nos ensaios de imunocitoquímica, negativos para essas proteínas, e no fato das NIH3T3 serem células provenientes de embriões murinos é muito provável que a amplificação seja atribuída aos fibroblastos e não as CEMO.

Com relação ainda a expressão de vimentina, proteína de filamentos intermediários do citoesqueleto celular e a GAPDH, enzima envolvida no metabolismo da glicose expressa em todas as células eucarióticas e seus respectivos tecidos, foi observada expressão semelhante em ambos. Entretanto, não podemos deixar de mencionar que o gene GAPDH é um gene de expressão constitutiva e as diferenças na expressão de alguns genes pode ter se devido ao fato de que a quantidade de RNA utilizada para síntese do cDNA foi diferente

Legenda: O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes citoqueratina 4, 13 3 12, conexina 43, Oct-4, Nanog, vimentina e GAPDH (controle). O produto obtido na RT-PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 %, sob tensão de 100 V/cm² e corado com brometo de etídeo antes de ser fotografado pelo sistema *Image Quant VDS*. Linha 1: CEMO C – Células epiteliais da mucosa oral humana submetidas à extração de RNA logo após coleta; Linha 2: CEMO 2 – Células epiteliais da mucosa oral humana submetidas à extração de RNA 2 dias após coleta; Linha 3: NIH3T3 – células de fibroblasto murinos utilizadas como camada de sustentação; Linha 4: NIH3T3 + CEMO- CEMO cultivadas sobre as células da camada de sustentação de fibroblastos murinos, NIH3T3; Linha 5: água utilizada como controle negativo das reações. M: Marcador de peso molecular, *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*

Figura 23 – Análise molecular por RT-PCR de células epiteliais de mucosa oral humana

6. DISCUSSÃO

Muitas doenças genéticas ainda não têm sua causa definida, sendo assim, a dificuldade em estudar certas doenças se dá pelo fato de haver obstáculos na coleta do material biológico para o diagnóstico. Em alguns casos especiais, uma simples coleta de sangue se torna demasiadamente estressante para alguns pacientes especiais, sendo necessária a sedação do mesmo.

Esse trabalho buscou estabelecer um modelo celular para utilização no diagnóstico de doenças genéticas através de uma coleta pouco invasiva e indolor, a raspagem da mucosa oral, assim obtendo as células epiteliais de mucosa oral humana (CEMO). Na literatura só existem relatos de cultura dessas células através da biópsia da mucosa oral, sendo um procedimento invasivo e com dor, ora necessitando de analgesia local, o que não representaria uma alternativa de coleta para pacientes especiais.

O protocolo e os resultados apresentados nesse trabalho são inéditos e representam uma importante ferramenta de estudo para coleta e amplificação de células de pacientes em geral, sobretudo para aqueles onde qualquer procedimento, principalmente doloridos, se tornam um entrave.

Para o estabelecimento da cultura primária das CEMO foram testadas quatro condições: na primeira, as células foram cultivadas sobre uma camada de sustentação de fibroblastos; na segunda, cultivadas livres dessa camada de sustentação; na terceira, sobre matrigel, que é um material produzido a partir da matriz extracelular de sarcoma murino e na quarta condição sobre matrigel, mas com o meio condicionado na camada de sustentação de fibroblastos murinos.

No cultivo sobre a camada de sustentação, as células se apresentaram em sua forma basal, essa é a fase do ciclo em que ocorrem as divisões celulares, ou seja, elas estavam em proliferação. Nessa condição de cultivo, as CEMO cresceram e se mantiveram em cultura, foi possível repicar essas células, amplificar e utilizá-las em vários ensaios para sua caracterização biológica.

O bom desempenho do cultivo de células CEMO nessa condição poderia ser explicado pela proximidade do modelo encontrado *in vivo*, onde células do epitélio estratificado pavimentoso, característicos da mucosa oral, se encontram depositadas

sobre uma lâmina própria e tecido conjuntivo, rico em fibroblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

No cultivo livre da camada de sustentação as células proliferaram nos primeiros dias, mas logo entraram em apoptose, não sustentando por muito tempo a condição de proliferação celular. Esse resultado só reforça a tese anteriormente assinalada, onde a presença da camada de sustentação na cultura celular mimetiza o ambiente encontrado *in vivo* se tornando mais apropriado para o cultivo celular. O mesmo resultado foi observado quando as células foram cultivadas somente sobre um suporte de proteínas de matriz extracelular, o matrigel, mostrando que não são apenas as proteínas da matriz extracelular que estariam sinalizando para o ingresso e manutenção do ciclo celular dessas células. Frente a esse dado, partimos para a última condição, na tentativa de verificar se oferecendo às células as proteínas de matriz e o meio de cultura contendo fatores produzidos pelos fibroblastos, mas não os próprios, sanaríamos a necessidade de utilizar a camada de sustentação na cultura de CEMO, o que facilitaria e muito sua manipulação. Os resultados obtidos mostraram que não obstante, os fatores e as proteínas estivessem presentes na cultura, as células apresentavam uma proliferação nos primeiros dias, que não se sustentava por mais de uma semana, observando-se após oito dias da coleta apenas restos celulares. Dessa forma, podemos inferir que com este ultimo resultado e os obtidos na primeira condição de cultivo celular, podemos sugerir que o contato célula-célula entre as CEMO e os fibroblastos parece fazer muita diferença para a proliferação e sobrevivência das células epiteliais da mucosa oral. Esses dados corroboram com outros já descritos na literatura, onde células de mucosa oral provenientes de biópsia são cultivadas sobre uma camada de fibroblastos ou, até mesmo, sobre a membrana amniótica (HIGA; SHIMAZAKI, 2008).

Na análise da viabilidade celular da coleta verificamos a quantidade de células vivas e mortas através desta técnica de raspagem, observando que em média 45% das células coletadas do epitélio da mucosa estavam vivas e 55% estavam mortas. Esse valor alto do número de células mortas é esperado, uma vez que se trata de um epitélio de descamação, especialmente produzido e localizado em uma região de muito atrito, onde é acreditado que as células sofram renovação constante em função do alto grau de morte e descamação celular. Entretanto, mesmo sendo maior o número de células mortas, observamos um número suficiente de células vivas, e que em contato com as

condições estabilizadas *in vitro*, foram capazes de se proliferarem. Com isso, podemos inferir que a coleta através da raspagem é eficiente, pois conseguimos obter uma quantidade suficiente para cultivo celular e para a realização de futuros experimentos, já que comprovamos que essas células vivem e proliferam em uma das condições de cultivo apresentadas.

Em relação à caracterização dessas células, ensaios para análise da morfologia celular mostrou que essas células têm sua forma muito variável. Isso é bem caracterizado em outros tecidos provenientes de mucosas, que também apresentam epitélio estratificado pavimentoso, como é o caso, por exemplo, da mucosa vaginal (THEREZITA et al, 2009).

Quando comparamos a morfologia celular encontrada logo após a raspagem e a morfologia encontrada nas células em cultivo, foi possível observar que também *in vitro* as células apresentam as várias morfologias encontradas *in vivo*, ou seja, forma basal, intermediária e superficial (KULKARNI et al., 2009). Isso poderia significar que todas as células vivas extraídas da mucosa oral tem capacidade de sobreviver em cultura, pelo menos por algum tempo, ou até que as células em cultivo continuam seguindo seu rumo natural, como se estivessem avançando no tecido da mucosa oral, ciclando por todas as suas morfologias até a fase de morte e descamação. Não podemos afirmar qual das duas alternativas estão ocorrendo na cultura das CEMO, ou se as duas ocorrem concomitantemente. Entretanto, com os resultados obtidos onde observamos que essas células proliferam em cultura, acreditamos que pelo menos uma parte das células basais continuam fazendo apenas mitose, sem se diferenciar em outras células do seu ciclo, como ocorre *in vivo*.

Na tentativa de caracterizarmos a ultra-estrutura das CEMO, utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão e foi possível observar que as CEMO cultivadas apresentam uma enorme quantidade de mitocôndrias, dado significativo que reforça a tese que as células *in vitro* apresentam alta atividade e metabolismo. Outra ultra-estrutura que chamou a atenção pela quantidade foram os grânulos de secreção. Por serem células da mucosa, é esperado que uma de suas funções seja secretar substâncias que permitam a manutenção da umidade e viscosidade do ambiente. Entretanto, foi extremamente interessante verificar que também em cultivo, as CEMO preservaram essa característica encontrada *in vivo*. Esse é mais um fato importante quando pensamos em estudar a célula como se apresenta no paciente, e encontramos

um modelo celular que mimetiza as condições encontradas no seu ambiente natural. Outras ultra-estruturas celulares citoplasmática, como retículo endoplasmático rugoso, núcleo, nucléolos, membrana plasmática e dupla membrana nuclear também foram evidenciadas, corroborando com o fato de que essas células apresentavam-se em plena atividade metabólica.

Em relação aos ensaios para verificação de expressão de proteínas das células CEMO em cultivo, foi observado que as mesmas apresentavam marcadores celulares para proteínas do citoesqueleto encontrada em células epiteliais, as citoqueratinas 18 e Pan (que reage com qualquer uma das citoqueratinas). Para melhor caracterizar a origem epitelial das CEMO em cultura, foram testados marcadores de células de mucosa oral e de córnea, sendo as CEMO negativas para essa última e comprovando a origem dessas células. Além disso, as células em cultura também expressavam proteínas que indicavam proliferação celular, a PCNA3, o que foi gratificante, corroborando com o observado por microscopia óptica onde aparentemente as células estavam se multiplicando e aumentando em número.

Por fim, diferentemente do encontrado na literatura, onde as células da mucosa oral são obtidas por biópsia (ANG et al., 2006; AIDAR; LINE, 2007; KLINGBEIL, 2010; MADHIRA et al., 2008; HIGA; SHIMAZAKI, 2008) as CEMO não apresentaram positividade para marcadores de células-tronco, indicando assim a real superficialidade da coleta e o caráter totalmente diferenciado dessas células.

Com os resultados apresentados nesse trabalho podemos acreditar que é possível a realização de uma coleta indolor e apropriada de células com vistas à amplificação em cultura celular, possibilitando seu uso posterior para diversos protocolos, inclusive como material para diagnóstico de doenças genéticas cuja coleta se mostra difícil, por causar dor, desconforto e estresse ao paciente, principalmente aos pediátricos e especiais.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- A coleta das células epiteliais de mucosa oral humana através da raspagem foi estabelecida com facilidade, sendo indolor e pouco invasiva.
- As células epiteliais de mucosa oral humana podem ser cultivadas e seu número amplificado nas condições de cultivo estabelecidas nesse trabalho e descritas como ideais.
- As CEMO necessitam de uma camada de sustentação de fibroblastos murinos como camada de sustentação para seu cultivo e crescimento.
- As CEMO em cultura são capazes de se proliferarem.
- As CEMO são passíveis a criopreservação mostrando-se viáveis após esse processo.
- As CEMO em cultura aparentemente apresentam características semelhantes às observadas *in vivo*, de acordo com os resultados obtidos.
- As CEMO estabelecidas em cultura por raspagem foram positivas para expressão de proteínas específicas de células epiteliais da mucosa oral e não apresentaram positividade para os marcadores de células-tronco testados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AIDAR, M & LINE, S.R.P. A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**. V.18, n.2, p. 148-152, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1132-1204.

ANG, L. P. K.; NAKAMURA, T.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C.; KOIZUMI, N. YOKOI, N.; KINOSHITA, S. Autologous Serum-Derived Cultivated Oral Epithelial Transplants for Severe Ocular Surface Disease. **Archives of Ophthalmology**. V.124, p.1543-1555, 2006.

ARAUJO, M. R. [**Estudo clínico, citológico e de prevalência do papilomavirus humano em mucosa ora na anemia de fanconi**]. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Bauru, 2008.

ARRUDA, E. P. [**Avaliação citológica das células epiteliais da mucosa bucal em contato com o aparelho ortodôntico em humanos**]. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 2006.

AVERY, J. K. **Fundamentos de histologia e embriologia bucal: uma abordagem clínica**. 6. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.198-201.

BENETTI, E. J. [**Estudo da mucosa da língua e da superfície de interface epitélio-tecido conjuntivo da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*, Illiger, 1811), empregando os métodos de microscopia de lua e eletrônica de varredura**]. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

BHASKAR, S. N. **Histologia e embriologia oral de Orban**. 10. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989, p.48-52.

BIANCO, B.; LIPAY M. V.; MELARAGNO M. I., GUEDES A. D.; VERRESCHI I. T. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**. v.19, n.9, p.1113-1117, 2006.

BREMMER, J. F.; GRAVELAND, A. P.; BRINK, A.; BRAAKHUIS, J. M. B.; KUIK, J. D.; LEEMANS, R.; BLOEMENA, E.; WAAL, I. V. D.; BRAKENHOFF, R. H. Screening for

Oral Precancer with Noninvasive Genetic Cytology. **Cancer Prevention Research**. v.2 n. 2 p.128-133, 2009.

DIAS, E. P.; MILAGRES, A.; SANTOS, J. B.; VALLADARES, C. P.; SOUZA, A. C. B., PINHEIRO, R.S. Estudo comparativo de raspados orais submetidos à técnica de citologia em meio líquido e citopatologia convencional. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.44, n.1, p.25-29, 2008.

DONG, R.; LIU, X.; FAN, M.; YANG, L.; PENG, L.; ZHANG, L. Isolation and differentiation of nestin positive cells from rat oral mucosal lamina própria. **Elsevier**. 2009.

GÓES, F. C. G. S. [**Carcinoma escamoso Basalóide na mucosa bucal: comportamento clínico, prognóstico, e análise da expressão de PCNA, p53, Bax e BCLx**]. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol Methods**, v.119, p. 203-210, 1989.

HIGA, K. & SHIMAZAKI, J. Recent advances in cultivated epithelial transplantation . **Journal of Cornea**. Suppl. 1. v.27, n.8, p.S41-S47, 2008.

HORI, Y.; NISHIDA, K.; YAMATO, M.; SUGIYAMA, H.; SOMA, T.; INOUE, T.; MAEDA, N.; OKANOT.; TANO, Y. Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets. **Experimental Eye Research**. v.87, n.3, p.191-196, 2008.

IGARASHI, T.; SHIMMURA, S.; YAOSHIDA, S.; TONOGI M.; SHINOZAKI N.; YAMANE, G. Y. Isolation of oral ephitelial progenitors using collagen IV. **Oral Diseases**. v.14, n.5, p.413-418, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. edição. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 10. edição. Rio de Janeiro. editora Guanabara Koogan, 2008.

KALMANI, K. M.; TREVES, S.; YAFEE, M.; RACHIMA, H.; GAFNI, Y.; COHEN, M. A.; PITARU, S. The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells*. v.28, p. 984-995, 2010.

KANAYAMA, S; NISHIDA, K; YAMATO, M; HAYASHI, R; MAEDA, N; OKANO, T.; TANO, Y. Analysis of soluble vascular endothelial growth. **British Journal Ophthalmology**. v.93, p.263-267, 2009.

KATE, T. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.68-70.

KATCHBURIAN, E. **Histologia e Embriologia oral**. 2. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.87-92.

KOLLTVEIT, K.M., SCHREURS, O., OSTREM, J., SOLAND, T.M., KHUU, C., BERGE, T., MESSELT, E., HAYASHI, K., GRANUM, S., SPURKLAND, A., SCHENCK, K. Expression of the T-cell-specific adapter protein in oral epithelium. **European Journal of Oral Sciences**. V.118, P.159-167, 2010.

KLINGBEIL, M. F. G.; MATHOR, M. B.; GIUDICE, F. S.; YOSHITO, D.; PINTO Jr, D. S. Is It safe to utilize in vitro reconstituted human oral epithelium? An oncogenetic pathway study. **Cell Tissue Bank**. 2010.

KULKARNI, U.; MAHALNGAM, R.; PATHER, S. I.; LI, X.; JASTI, B. Porcine buccal mucosa as an *in vitro* model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. **Journal of pharmaceutical sciences**. v.98, n.2, p. 471-483, 2009.

MADHIRA, S. L.; VEMUGANTI, G.; BHADURI, A.; GADDIPATI, S.; SANGWAN, V. S.; GHANEKAR, Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Molecular Vision**. v.14, p.189-196, 2008.

MARTINS, R. R. S.; H.I.B.; RAMOS, J. C.; LLERENA J. R.; ALMEIDA, J. C. C. Investigação Clínica e Genética em Meninas Com Baixa Estatura Idiopática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. v.47, n.6, p.684- 694, 2003.

MUNCE, T.; SIMPSON, R.; BOWLING, F. Molecular characterization of Prader-Willi syndrome by real-time PCR. **Genetic Testing**. v.12, n.2, p.319-24, 2008.

MUOTRI, A. R.; BURNS, D. K.; FRIEDBERG E. C.; MENCK C. F. M. Gene transduction in skin cells: preventing cancer in xeroderma pigmentosum mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, n.51, p.17759-64, 2004.

NUSSBAUN, R.; MCLNNES, R.; WILLARD, H. In: THOMPSON & THOMPSON. **Genética médica**. 6.edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

OLIVEIRA, N. F. P. [Análise de metilação no promotor dos genes *il8*, *tlr2* e *tlr4* em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival de indivíduos fumantes e não fumantes com periodontite crônica]. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, 2009.

PEREIRA PINTO, L.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A.; FIGUEIREDE, C. R. L. V.; GALVÃO, H. C.; CAMARA, M. L. A. S.; CARVALHO, R. A. **Patologia básica**: sinopse. Natal: EDUFRN, 1997. p.19-35.

QUEIROZ, A. B.; FOCCHI, G.; DOBO, C.; GOMES, T. S.; RIBEIRO, D. A.; OSHIMA, C. T. F. Expression of p27, p21 and p16 in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. v.30, p.2799-2801, 2010.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; RONRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. 2. edição. São Paulo: Panamericana. 1993. p.93-95.

SCARBOSA, S. H. P. V. [Análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica da mucosa de palato duro em pacientes portadores de Síndrome de Apert]. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Bauru, 2009.

SOUTO, L. R. M.; REHDER, J.; VASSALLO J.; CINTRA M. L.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI M. B. Model for skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Medical Journal**. São Paulo. v.124, n.2, p.71-76, 2006.

THEREZITA, M.; CASTRO, P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I.; NASCIMENTO, V. X.; XAVIER, S. D. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v.75, n.2, p.167-171, 2009.

The International Hap Map Consortium. The International HapMap Project. **Nature**. v.426, n.6968, p.789-796, 2003.

UUSIMAA, J.; MOILANEN, J. S.; VAINIONPÄÄ, L.; TAPANAINEN P.; LINDHOLM P.; NUUTINEN M.; LÖPPÖNEN T.; MÄKI-TORKKO E.; RANTALA H.; MAJAMAA K. Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. **Annals of Neurology**. v.62, n.3, p.278-87, 2007.