

Cultivo "in vitro" de tecidos normais e patológicos da cavidade bucal de humanos

Pantelis Varvaki Rados*
João Jorge Diniz Barbachan*
Manoel Sant'Ana Filho*

RESUMO

Foi realizado o cultivo "in vitro" de fragmentos de mucosa bucal e de lesões apicais obtidas de humanos com o objetivo de avaliar a aplicabilidade desta técnica como um modelo de estudo. Os resultados obtidos foram de relativo sucesso devido a fatores, tais como: diferenciação tecidual muito grande e problemas de estabilidade dos nutrientes no meio de cultivo empregado.

O cultivo "in vitro" de tecidos patológicos da cavidade bucal permite a possibilidade técnica de se tentar explicar melhor a patogênese de várias lesões bucais pouco conhecidas ainda e, avaliar melhor formas de tratamento de inúmeras patologias da boca.

Assim sendo, uma primeira tentativa precisava ser feita para testar as várias técnicas de cultivo "in vitro" para a manutenção da vitalidade de tecidos patológicos da boca.

SUMMARY

The authors presents the results of "in vitro" cultivation of human gingiva and dental abscess with a partial grade of success.

According the authors, failure is related with: the decomposition of the ascorbic acid and the neutralization of sodium bicarbonate used in the culture medium. Other problem could be the grade of differentiation of the tissue used in culture.

DESCRITORES

CULTIVO IN VITRO • GENGIVA • LESÕES APICAIS

REVISÃO DA LITERATURA

A técnica de cultivo "in vitro" de tecidos representa para o campo da patologia bucal uma técnica muito promissora, na medida em que cria um modelo experimental capaz de preservar a vitalidade do tecido isolado do resto do organismo e com isso auxiliar o entendimento das reações e etiopatogenia das doenças e permitir o controle de algumas formas de tratamento medicamentoso em lesões com etiopatogênese incerta (1, 2, 7, 9, 11).

Para tanto é necessário inicialmente estabelecer um modelo de cultivo "in vitro" que seja realmente efetivo para a manutenção da vitalidade de tecidos patológicos da cavidade bucal.

As técnicas de cultivo de tecidos "in vitro" estão já demonstradas e são utilizadas em diversas áreas de estudo, tais como: embriologia (1, 3, 4, 8), citologia

(5, 6).

Em cada uma destas áreas existem características particulares, o que torna necessárias adaptações destas técnicas para a patologia bucal.

Em 1975, Buchner e Milnek (1, 7) testaram a utilização desta técnica de cultivo "in vitro" para fragmentos de gengiva de humanos obtendo resultados favoráveis inclusive com observação morfológica da proliferação de tecido epitelial dos explantes.

Rados (9) testou a possibilidade de cultivar fragmentos de mucosa bucal, fragmentos de pele e germes dentários de ratos recém nascidos obtendo também sucesso ao final de 7 dias de cultivo.

As técnicas de cultivo "in vitro" podem ser classificadas de acordo com o meio de cultivo a ser empregado:

Meios de cultivo líquidos, próprios para células isoladas ou como meio de trans-

porte do tecido desde o local onde é obtido até o laboratório (1, 9).

Meios de cultivo semi-sólidos, utiliza-se a associação de um meio sólido Agar/Agar como base de sustentação dos explantes e enriquece-os com meios líquidos, 199, Eagle entre outros, para aumentar os locais de chegada de nutrientes, uma vez que a parte superior do explante é coberta por meio líquido (10, 12, 13).

Esta técnica de cultivo tem a vantagem de fornecer nutrientes ao explante por todos os lados e, de a princípio não oferecer limitação quanto ao tempo de manutenção do explante em cultivo (1, 6, 8).

Cultivo em membrana corio-alantoidea, consiste na preparação destas membranas em ovos de galinha fecundados (24 horas). Após este período se realizam os

* Professor de Patologia Geral e Buco Dental da F.O./UFRGS

explantes sobre a membrana, que é ricamente vascularizada. Esta técnica tem a vantagem de determinar a circulação sanguínea nos explantes e apresenta o inconveniente de ter um período de tempo de cultivo limitado, de aproximadamente 2 semanas (1, 9).

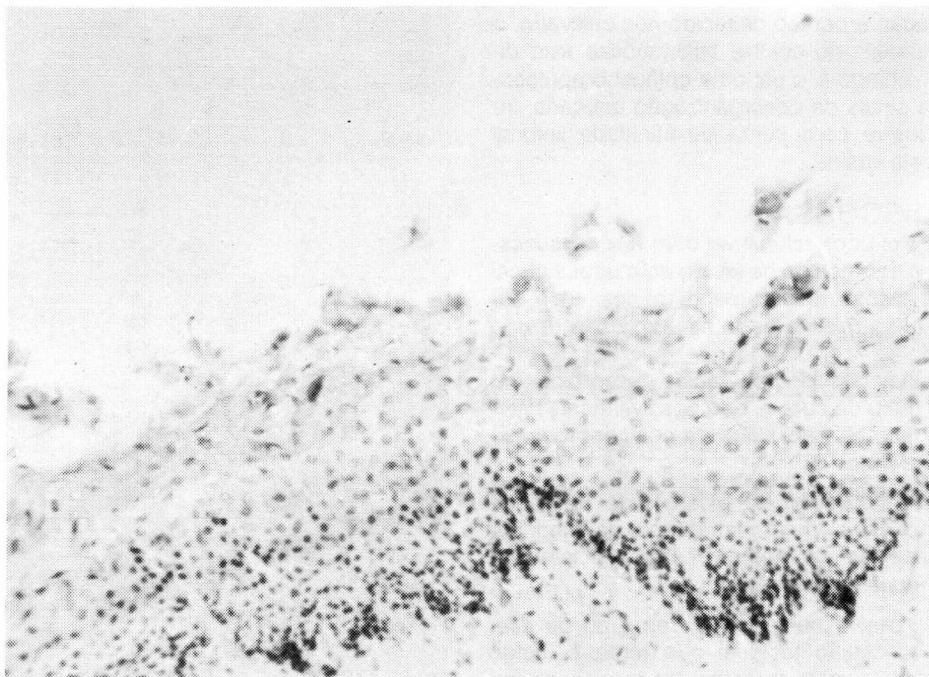
OBJETIVOS

Este trabalho visa testar uma das técnicas de cultivo "in vitro" de tecidos para a sua aplicabilidade com tecidos obtidos da cavidade bucal de pacientes que foram submetidos a biópsia para confirmar lesões bucais pré-existentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 2 casos de lesões apicais diagnosticados clínica e radiograficamente, e nestes casos durante a intervenção cirúrgica para remoção das lesões foram removidos fragmentos de mucosa da região anatômica com objetivo de plastia de tecidos moles. Estes tecidos também foram submetidos a cultivo.

O material obtido das cirurgias era colocado em frascos estéreis contendo meio de cultivo líquido 199 (Interlab - Flow) e transportados até o laboratório de patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Uma vez no laboratório, estes fragmentos eram removidos do frasco com meio líquido e divididos em duas partes, com aproximadamente 1mm³, sendo uma parte fixada em formol 10% a fim de servir como controle e a outra parte transferida para placas de cultivo semi-sólido.



Preparação das placas:
Parte semi-sólida
Agar a 1% - 5 partes
Cultivo líquido 199 - 1 parte (Interlab -Flow)
Extrato embrionário ovino - 1 parte

a) Preparação do Agar

O agar proporciona um substrato semi-sólido para o cultivo de órgãos ou fragmentos de tecidos. O agar é um complexo de polissacarídeos que contém grupos sulfato e carboxila, o que confere a propriedade sinéresi.

Se dissolve 2.5g de agar em 250ml de líquido de cultivo 199.

Se torna líquido na autoclave por 15 minutos.

Agrega-se o bicarbonato 0.0575g.

Filtra-se com papel filtro e coloca-se em frascos até meia altura e se tampa.

Esterilização em autoclave por 30 minutos. Deixa-se esfriar e conserva-se em congelador.

Parte líquida

Líquido de cultivo 199, Interlab - Flow.

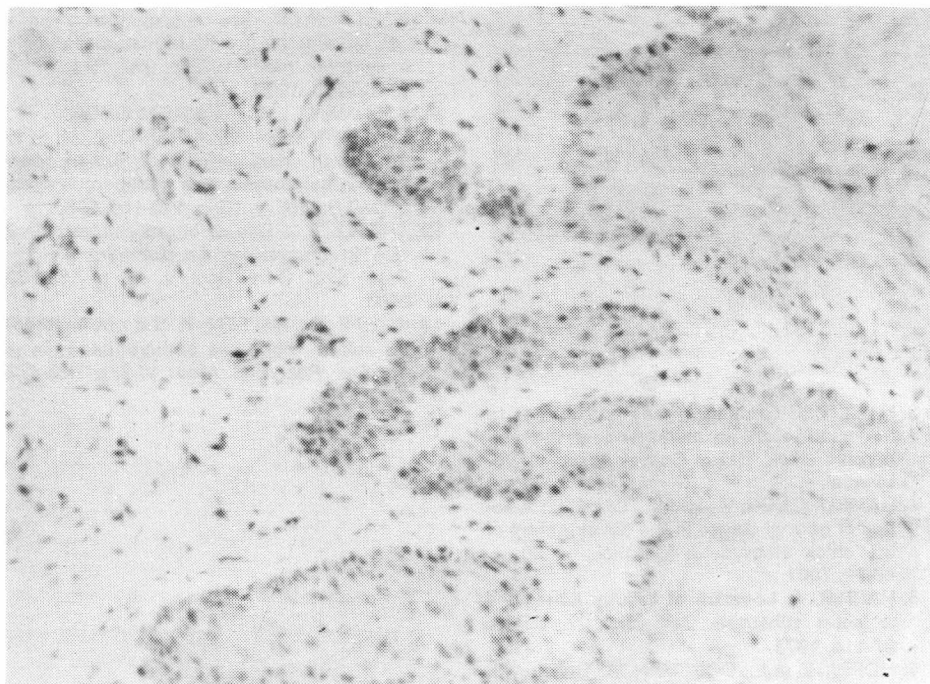
A parte líquida (Líquido de cultivo 199) dos meios de cultivo era substituída diariamente até o quinto dia, quando constatou-se infecção das placas. Neste dia os explantes foram removidos do cultivo e fixados, seguindo a rotina de processamento para inclusão em parafina, corte e coloração pela Eosina/Hematoxilina.

RESULTADOS

Os resultados obtidos podem ser avaliados a partir da observação das fotografias 1 e 2 no que diz respeito aos fragmentos de mucosa e nas figuras 3 e 4 para as lesões periapicais.

Com relação a mucosa bucal, Fig. 1 e 2, pode-se constatar que em comparação com o tecido fixado diretamente ao tecido epitelial da mucosa cultivada perdeu parcialmente sua estruturação, ausência de células queratinizadas e início de desagregação da camada das células basais. O tecido conjuntivo apresenta do ponto de vista morfológico a diminuição discreta do número de núcleos celulares.

No que diz respeito as lesões apicais Fig. 3 e 4, constatamos que em compa-

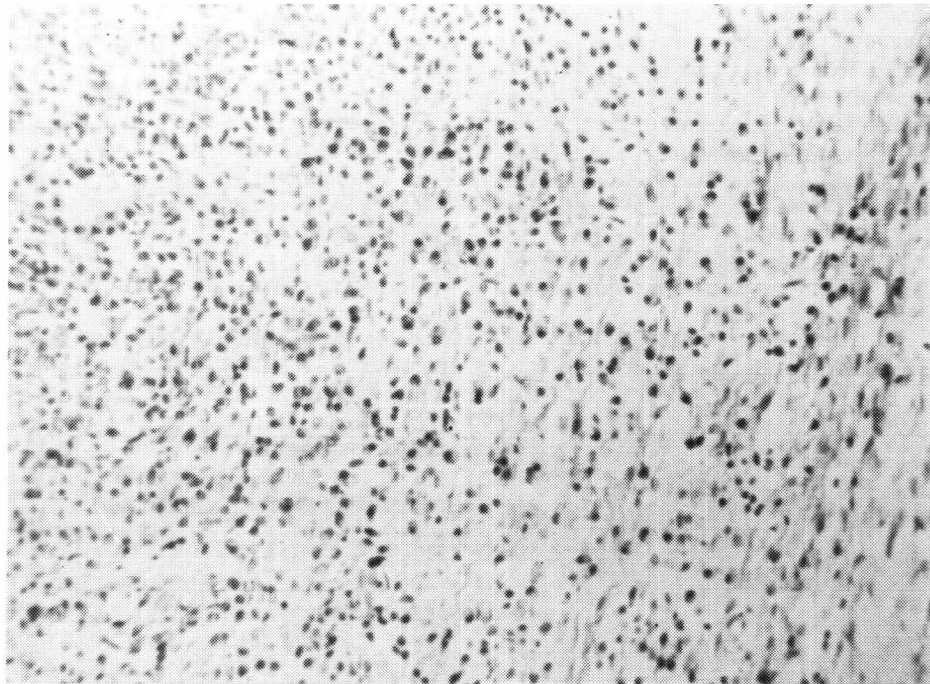
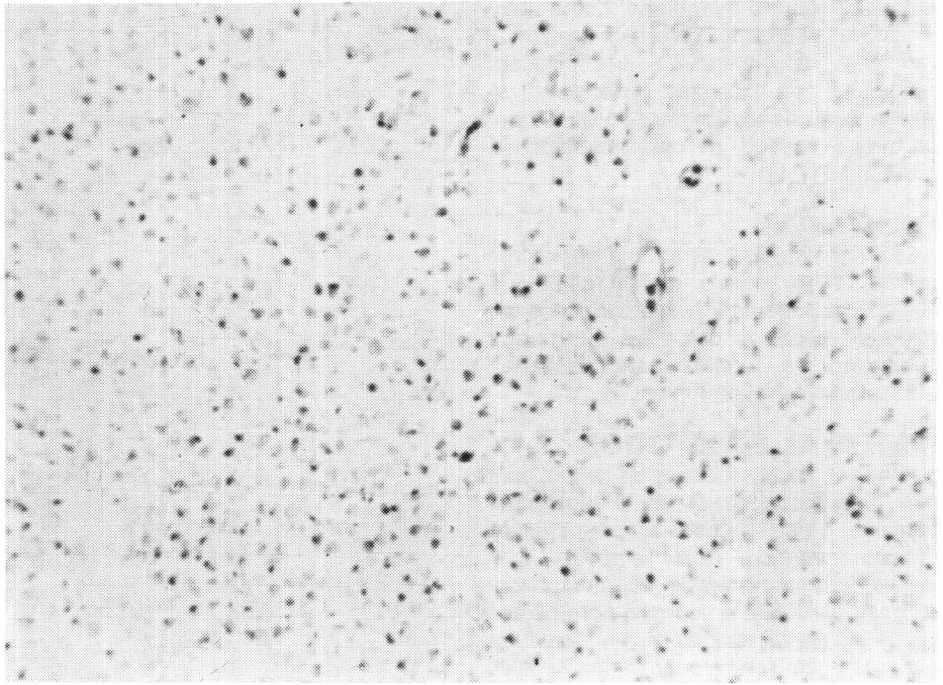


ração à porção de tecido não cultivado, o número de células inflamatórias está diminuindo e o estroma colágeno apresenta sinais de desorganização marcada, inclusive com perda de afinidade tintorial pela eosina.

DISCUSSÃO

Foi possível cultivar com relativo sucesso fragmentos de tecido de mucosa bucal e lesões apicais de humanos. Este sucesso relativo pode ser explicado devido a:

- Instabilidade do ácido ascórbico no meio de cultivo, que possivelmente interferiu na viabilidade do colágeno dos explantes.
- A inativação do bicarbonato de sódio, que é elemento importante na integridade da membrana basal da interface epitélio/mesenquima.
- Possivelmente devido ao grau de diferenciação tecidual que torna o tecido muito mais exigente em termos de nutrição.



of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J. Cell Biol.*, v. 45, p. 434-438, 1970.

7. MLNEK, A. & BUCHNER, A. In vitro cultivation of adult human gingiva I. *J. Periodont. Res.*, v. 10, p. 73-78, 1975.
8. POURTORS, M. Onset of the acquired potentiality for fusion in the palatal shelves of rats. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 16, p. 171-182, 1966.
9. RADOS, P.V. Técnica de cultivo de tejidos y organos embrionarios "in vitro". Santiago do Chile: Unidad de Investigacion, Facultad de Odontologia U. de Chile, 1986, p. 14.
10. RAPPAPORT, C.; POOLE, J.P.; RAPPAPORT, H.P.: Studies on properties of surfaces requires for growth of mammalian cells in synthetic medium. *Exp. Cell. Res.*, v. 20, p. 465-510, 1960.
11. STENMAN, G.; MAGNUSSON, B.; LENNARTSSON, B.; JUBER-ODE, M. In vitro growth characteristics of human odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. *J. Oral Pathol.*, v. 15, p. 143-145, 1986.
12. THESLEFF, I. Use of organ culture technique in cranofacial development biology. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, v. 77, p. 159-169, 1981.
13. WOLFF, E.; HAFFEN, K. Sur une methode de culture d'organes embryonnaires in vitro. *Tex. Rep. Biol. Med.*, v. 2, p. 463-472, 1952.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACUÑA, J.G. Estudio macro e microscópico del desarrollo del paladar secundario en el raton in vivo e in vitro bajo la accion de Dexametasona. Santiago do Chile: Unidad de Investigacion. Facultad de Odontologia U. de Chile, 1985, p. 33.
2. BUCHNER, A.; MLNEK, A. In vitro cultivation of adult human gingiva II. *J. Periodont. Res.*, v. 10, p. 346-356, 1975.
3. HALL, B.K. Grafting organs and tissues to the chorioallantoic membrane of the embryonic chick. *Tissue Culture Assoc.*, 1978. Manual, 4.
4. HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, v. 88, p. 49-92, 1961.
5. HARRIS, A. Location of cellular adhesions to solid substrata. *Dev. Biol.*, v. 35, p. 97-114, 1973.
6. HORWITZ, A.L.; DORFMAN, A. The growth