

Protocolo Preliminar de Cultura de Fibroblastos Gengivais Humanos

Preliminar Protocol Of Human Gingival Fibroblast Culture

Alberto João Zortéa Jr.*
Gustavo dos Santos Coura*
Luciane Anita Savi**
Claudia Maria Oliveira Simões***
Ricardo de Souza Magini***

Coura G dos S, Zortéa Jr. AJ, Savi LA, Simões CMO, Magini R de S. Protocolo Preliminar de Cultura de Fibroblastos Gengivais Humanos. Rev Bras Implantodont Prótese Implant 2005; 12(47/48):190-6

Esse estudo teve como objetivos: estabelecer um protocolo, *in vitro*, de isolamento e cultivo primário de fibroblastos humanos derivados da gengiva inserida através de biópsia; estabelecer uma linhagem celular de fibroblastos humanos derivados da cavidade bucal; e avaliar a viabilidade celular desses fibroblastos humanos. Uma biópsia de aproximadamente 20mm² de gengiva ceratinizada (tecido conjuntivo e tecido epitelial) foi removida da região retromolar de um paciente e transportada em garrafa de cultura contendo o meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de antibióticos. A biópsia gengival foi lavada com PBS (solução tamponada de fosfato) por três vezes, seccionada em 15 fragmentos menores que foram divididos em três garrafas de cultura contendo o mesmo meio de cultura (trocado duas vezes por semana). A proliferação e crescimento de fibroblastos foram verificados diariamente por microscopia invertida. Após subconfluência de 70%, essas células foram desagregadas através do uso de tripsina a 0,25%, e novas subculturas foram realizadas em garrafas de cultura. Foram utilizadas células da sexta passagem. Para a avaliação da viabilidade celular, foi usado o teste de exclusão pelo corante azul de trypan. A viabilidade celular ficou acima de 90%. Foi possível através do protocolo proposto, estabelecer uma linhagem celular de fibroblastos humanos derivados da gengiva inserida com viabilidade celular compatível com a literatura vigente. Esses resultados possibilitam o uso dessas em futuros experimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Fibroblasto gengival, Viabilidade celular, Engenharia tecidual.

INTRODUÇÃO

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

* Doutorandos em Odontologia, área de concentração em Implantodontia, do Programa de Pós-Graduação da UFSC, Florianópolis, SC. Rua Santa Clara, 965/52. Vila Adyanna. São José dos Campos – SP. E-mail: gustavocoura@hotmail.com.

** Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação da UFSC, Florianópolis, SC.

*** Professores da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC.

Os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços ou "scaffolds") confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento (Ueda *et al.*, 2000).

A aplicação da engenharia tecidual na periodontia e implantodontia com a finalidade de substituir o uso de tecido removido de áreas doadoras intrabucais pela produção de um tecido com características similares, envolve, inicialmente, o estabelecimento de protocolo de cultivo de células humanas *in vitro*.

Durante a formação dos tecidos moles periodontais (gengiva e ligamento periodontal), os fibroblastos são as células responsáveis pela formação e manutenção da matriz extracelular e produção de fibras colágenas do ligamento periodontal (Ten Cate, 1989). Portanto, visto que a engenharia tecidual visa à formação de um tecido similar ao originalmente formado, o primeiro passo para a aplicação futura da engenharia de tecidos envolvendo tecidos moles é o cultivo, *in vitro*, de fibroblastos gengivais humanos.

Em resumo, essa presente pesquisa teve como objetivos iniciar um protocolo de cultura primária, *in vitro*, de fibroblastos gengivais humanos e, posteriormente, obter uma linhagem celular viável.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura Celular

Para obtenção da biópsia de tecido gengival, foi selecionado um paciente de 37 anos, não fumante e cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. O paciente não relatou o uso de qualquer tipo de medicamento. O voluntário foi submetido a uma biópsia (explante) de aproximadamente 20mm² (4x5mm) de mucosa ceratinizada da região retromolar (Figura 1). Após coleta do explante, o mesmo foi colocado em uma garrafa de cultura de 25cm² contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, Sigma Chemical CO., USA), suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino, Gibco, Gibco Industries Inc., USA) e 1% de PSA

(10000U penicilina, 10000Ug estreptomicina e 25µg anfotericina B, Gibco, Gibco Industries Inc., USA) e transferido para o laboratório.

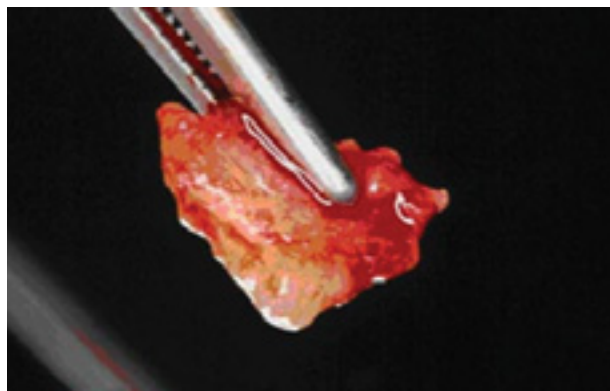


FIGURA 1: Biópsia (explante) de aproximadamente 20mm² (4x5mm), obtida da região retromolar.

O explante de 20mm² foi lavado por duas vezes com PBS (solução salina de fosfato tamponada) e, posteriormente, a camada epitelial foi removida. Após a desepitelização, foi fragmentado em 15 partes de aproximadamente 1mm² (Figura 2). Em cada uma das três garrafas de cultura de 25cm², cinco explantes de aproximadamente 1mm² foram inseridos. As garrafas de cultura foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ (NUAIRE™ US AUTOFLOW CO₂ Water Jacketed Incubator, EUA). O crescimento celular foi checado diariamente através de um microscópio invertido (40x a 200x, Olympus, Japão) e o meio de cultura trocado a cada quatro dias.

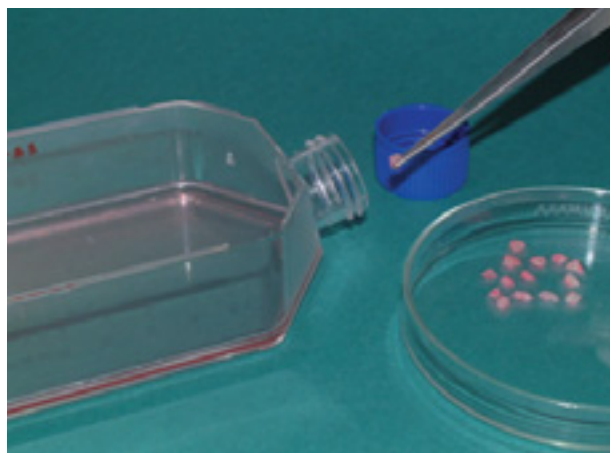


FIGURA 2: Fragmentação da amostra, aproximadamente 1mm² cada explante. Cada uma das três garrafas de cultura recebeu cinco explantes.

As células foram tripsinizadas quando uma subconfluência de 70% foi atingida, e essa cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1. Na primeira passagem, os explantes foram removidos. Foram utilizadas suspensões celulares da 6ª passagem, das três garrafas de cultura, para análise da viabilidade celular.

Viabilidade Celular

Para esta finalidade, o teste de exclusão do corante azul de Trypan (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado. Após a confluência das três garrafas de cultura que se encontravam na 5ª passagem (média de 10 dias entre as passagens), o meio de cultura (DMEM/SFB/PSA) foi removido totalmente e substituído por 4ml meio de cultura DMEM. Após um período de incubação de 2h a 37°C, as células foram tripsinizadas (6ª passagem). Foi removida uma alíquota de 2ml dessa suspensão celular, de cada uma das três garrafas, e acondicionada em microtubos de 2ml. Os microtubos foram centrifugados por 4min a 1000rpm/350Xg (Centrifuga 5410 Geratebau. Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento (pellet) foi ressuspensionado em 125µl de meio de cultura DMEM. Uma nova alíquota de 25µl dessa nova suspensão foi homogeneizada em um novo microtubo com mais 50µl do corante azul de Trypan (solução de 0,4% em PBS) e 25µl de meio de cultura. Os 100µl restantes da suspensão celular foram desprezados. As contagens foram realizadas em câmaras de Neubauer. Como previamente descrito na literatura, a viabilidade celular deveria permanecer acima de 90% (HELBIG; SPEIT, 1997) para que o protocolo preliminar de cultura proposto fosse aceito e novos testes, principalmente aqueles que avaliam as alterações de DNA celular, pudessem validar a utilização dessa linhagem celular viável em pesquisas futuras.

Avaliação dos Dados - Análise Estatística

O protocolo de cultura de fibroblastos gengivais humanos foi realizado em triplicata na fase de cultivo primário. As três garrafas de cultura primária sofreram seis passagens assim que atingiram a subconfluência celular (70%), dando origem a uma cultura celular contínua. Foi realizada a análise da viabilidade celular dessas culturas e o protocolo

de cultura seria considerado exitoso quando a viabilidade celular estivesse acima de 90% (Teste de proporções, valor de referência 90%) nos três frascos de cultura.

RESULTADOS

Estabelecimento da Cultura Primária e Linhagem Celular

Após 25 dias em cultura, foi estabelecida a cultura primária de fibroblastos humanos (Figuras 3 e 4). As subculturas realizadas até a 6ª passagem, estabelecendo uma linhagem celular, foram obtidas após um período aproximado de 10 dias (Figura 5).

Microscopicamente, as células apresentaram características morfológicas normais de fibroblastos.

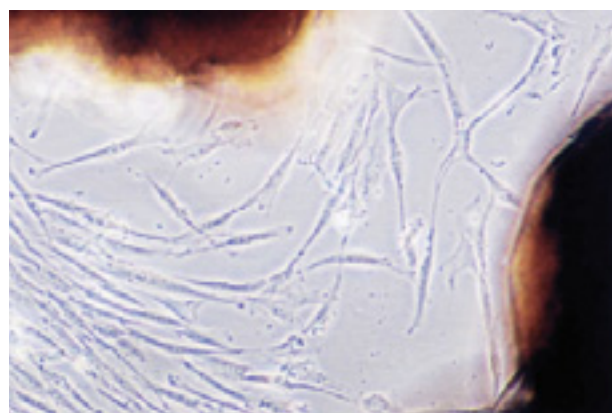


FIGURA 3: Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 17 dias, em microscopia invertida.

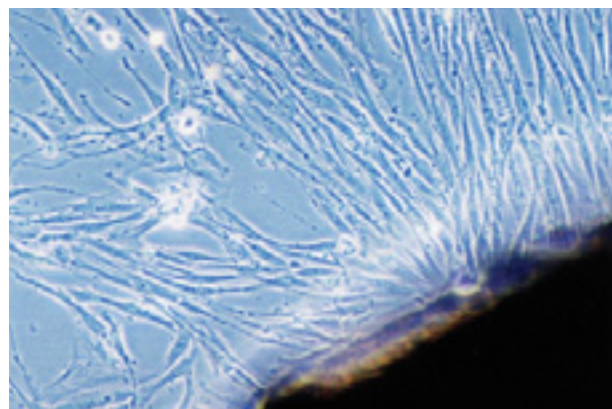


FIGURA 4: Cultura primária de fibroblastos observada ao redor dos explantes, após 23 dias, em microscopia invertida.

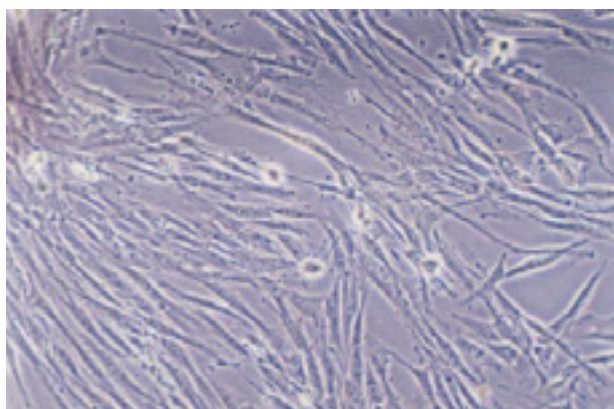


FIGURA 5: Linhagem celular de fibroblastos, obtida após a 6ª passagem, observada em subconfluência de 70%. (Microscópio invertido 400x).

Avaliação da viabilidade celular

Os resultados, obtidos pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan mostraram que a viabilidade celular dos fibroblastos humanos foi mantida acima de 90% nas três garrafas de cultura (Tabela 1), como descrito na literatura. A figura 6 mostra células viáveis (não coradas) em um número maior quando comparadas com as células coradas (não viáveis).

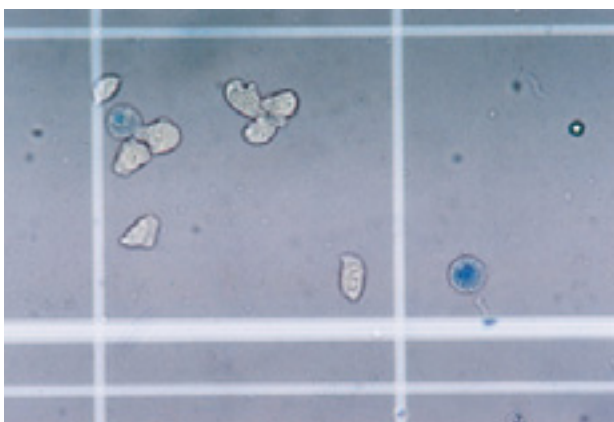


FIGURA 6: Análise da viabilidade celular em câmaras de Neubauer (400x). As células não coradas são viáveis, enquanto que as coradas, são células mortas (não viáveis).

TABELA 1: Resultados da determinação da viabilidade celular de fibroblastos de gengiva humana das suspensões celulares das três garrafas de cultura, pelo método de exclusão do azul de Trypan.

Garrafas de cultura	Viabilidade Celular (%)
1ª Garrafa	92,83
2ª Garrafa	91,24
3ª Garrafa	92,56

DISCUSSÃO

A medicina reconstrutiva, baseada na terapia gênica com a utilização da clonagem, na pesquisa de células e na engenharia tecidual, representa a mais excitante área de investigação neste início de milênio. A engenharia tecidual caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas (Assael, 2003).

Na odontologia, Pini Prato *et al.* (2000) relataram o caso de uma paciente, que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para restabelecimento da mucosa ceratinizada, previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreendeu o cultivo primário de fibroblastos a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores obtiveram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, o que foi confirmado pela análise macroscópica e histológica. Recentemente, os mesmos autores relataram o sucesso da técnica em seis pacientes tratados pela engenharia de tecidos (Pini Prato *et al.*, 2003). Adicionalmente, a aplicação de enxertos de mucosa oral gerada, *in vitro*, em defeitos da cavidade oral (Langdon *et al.*, 1991), em cirurgias periimplantares (Ueda *et al.*, 1998), em procedimentos protéticos (Bordner; Grossman, 2001) e em vestibuloplastias (Raghoobar *et al.*, 1995) têm sido utilizada com sucesso.

Sabe-se que os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células, entre outras); (2) matrizes e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento (Ueda *et al.*, 2000). Dessa forma, o cultivo de fibroblastos em matrizes biocompatíveis pode ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares, que necessitam de aumento de tecido mole (Pini Prato *et al.*, 2000).

Para esta finalidade, o estabelecimento de protocolos de cultura de células humanas tem sido amplamente estudado, bem como o desenvolvimen-

to de matrizes biocompatíveis. Os fibroblastos são as células encontradas com alta predominância nos tecidos conjuntivos periodontais e periimplantares e responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (Ten Cate, 1989). Alguns estudos sugerem a heterogeneidade dos fibroblastos presentes nesses tecidos com fenótipo único e atividade funcional distinta (Fries, 1994). Enquanto os fibroblastos gengivais garantem a síntese e integridade do tecido conjuntivo gengival, os fibroblastos dos ligamentos periodontais com funções especializadas são responsáveis pela formação e manutenção do ligamento periodontal, além do reparo, remodelamento e regeneração do cimento e osso alveolar adjacente, *in vivo* (Nyman *et al.*, 1982).

No presente estudo, fibroblastos oriundos da mucosa gengival ceratinizada de humanos foram cultivados. De acordo com Lõe *et al.* (1971 e 1974), o tecido conjuntivo gengival foi delicadamente separado do tecido epitelial, uma vez que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfo-genéticos do tecido conjuntivo subepitelial.

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

Morfológicamente, as células derivadas da gengiva humana mostraram aspecto fibroblástico, com fenótipo alongado ou estrelado e longos prolongamentos citoplasmáticos, compatíveis com os achados de outros pesquisadores (Ten Cate, 1989; Sato *et al.*, 1994; Beertseen; Me Culloch; Sodek, 1997).

Ao avaliar a característica de proliferação celular, os resultados obtidos revelaram a subconfluência de 70% após 25 dias em cultura. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos da literatura que mostraram a subconfluência de 60 a 70% em cultura primária de fibroblastos gengivais humanos após 20-21 dias (Kent *et al.*, 1996) ou 20 dias (Almeida-Lopes, 1999), e ainda de 3 a 4 semanas (Sant'anna *et al.*, 2002).

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

Outro achado importante foi a manutenção da organização da monocamada celular até a 6ª passagem. De acordo com Streissle; Schwobel; Hewlett (1981), o aparecimento de alterações morfológicas, tais como células com aspecto granuloso, arredondado e/ou vacuolizado, e resultado de adversidades que comprometem o cultivo celular, como, por exemplo, a idade da cultura ou a ação de agentes químicos citotóxicos. Kent *et al.* (1996) encontraram células contendo vacúolos nas 9ª e 10ª passagens, porém, em quantidades reduzidas quando comparadas ao número de células normais.

O método de exclusão do corante azul de Trypan é comumente utilizado para determinar a viabilidade celular, o qual indica a presença de células mortas com membranas desintegradas ao

final dos tratamentos. Segundo critério de aceitação para protocolo de cultura celular, a viabilidade celular obtida foi > 90% (Tabela 1, teste de proporções, $p=90\%$). Estudos apresentaram resultados semelhantes utilizando o método de exclusão do corante azul de Trypan, os quais mostraram valores acima de 90% em cultura de fibroblastos gengivais humanos até a 7ª passagem (Kent *et al.*, 1996; Rossa Junior; Martinez; Silverio, 2002), bem como para fibroblastos obtidos de rins embrionários do macaco rhesus e fibroblastos de rins do macaco verde da África (Andrighetti Frohner *et al.*, 2003).

A utilização de apenas um sítio bucal clinicamente saudável foi uma das limitações do trabalho, apesar da obtenção do cultivo primário a partir de um explante, no entanto, o aumento no número de participantes aumentará as chances de sucesso do protocolo preliminar proposto.

A participação de um indivíduo não fumante, principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento de protocolos de cultura, fornece maior segurança, pois se sabe que derivados do cigarro afetam os fibroblastos gengivais, em relação à sua adesão e proliferação (Poggi; Rota; Boratto, 2002). Essa possibilidade de alteração nos fibroblastos gengivais, que posteriormente seriam cultivados, resultou na escolha por um indivíduo não fumante.

Os resultados preliminares dessa pesquisa possibilitam a adoção do mesmo protocolo de cultura

em novos voluntários. No entanto, além de testes de citotoxicidade (viabilidade celular), testes que avaliem os possíveis danos ao DNA celulares das células cultivadas são alternativas adicionais de análise (por exemplo, o ensaio do cometa), pois a genotoxicidade tem um significado importante, principalmente quando ocorre em células viáveis que foram capazes de sobreviverem ao agente citotóxico (Anderson; Yu; Mcgregor, 1998; Tice *et al.*, 2000).

Além disso, vislumbra-se a possibilidade futura da utilização da engenharia tecidual, com a finalidade de obtenção de tecidos gengivais e periimplantares, de acordo com necessidades estéticas, funcionais e higiênicas. A eliminação de uma grande quantidade de tecido conjuntivo doador, a diminuição de processos algícos, de cicatrizes residuais e de processos hemorrágicos, são estímulos na busca pela implementação dessa nova modalidade de tratamento.

CONCLUSÕES

Foi possível iniciar um protocolo de cultura, *in vitro*, de fibroblastos humanos e obter uma linhagem celular, a partir de cultivo primário de fibroblastos de gengiva humana, oriunda de um sítio bucal clinicamente saudável. Os resultados positivos quanto à viabilidade (acima de 90%) permitem o uso dessa linhagem celular com maior segurança em pesquisas futuras.

Coura G dos S, Zortéa Jr. AJ, Savi LA, Simões CMO, Magini R de S. Preliminar Protocol of Human Gingival Fibroblast Culture. Rev Bras Implantodontol Prótese Implant 2005; 12(47/48):190-6

The objectives of this study include establishing a protocol of isolation and primary culture of *in vitro* human gingival fibroblasts and, consequently, establish a cell lineage to evaluate cell viability. A 20mm² (4x5mm) gingiva biopsy was obtained from the retromolar region of a patient and stored for transport in a culture flask containing DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics. The biopsy was rinsed three times with PBS, sectioned in 15 smaller pieces further divided in 3 flasks using the same culture medium, which was changed twice a week. The proliferation and growth of fibroblasts was verified through microscopy. After 70% confluence, these cells were disaggregated through trypsin 0.25% and new subcultures were obtained. Cells from the sixth passage were used. Trypan Blue exclusion test was used for the evaluation of cell viability. The cell viability of the test groups was above 90%. The proposed protocol permitted to establish a human fibroblasts cell lineage with compatible cell viability similar to other results found in the literature. The results obtained in this study indicate that it is possible to use these cells for future research.

KEYWORDS: Gingival fibroblast. Cell viability. Tissue engineering

REFERÊNCIAS

- Almeida-Lopes L. Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências – Opção Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
- Anderson D, Yu T, Mcgregor D. Review: comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998.
- Andrighetti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CM. O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.
- Assael LA. The promise of tissue engineering. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.61, n.2, p.155-156, 2003.
- Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *J. Periodontol.* 2000, Chicago, v. 13, p. 20-75, 1997.
- Bodner L, Grossman N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery. *J. Isr. Dent. Assoc.*, v. 18, p. 32-34, 2001.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Multimedia Guide*. Wiley-Liss, 1999. CD.
- Fries KM. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 72, p. 283-292, 1994.
- Helbig R, Speit G. DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studied with the comet assay. *Mutat. Res.*, London, v. 377, p. 279-286, 1997.
- Huang TH, Tsai CY, Chen SL, Kao CT. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer cell-line. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.63, n.6, p.814-821, 2002.
- Karring T, Lang NP, Löe H. The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation. *J. Periodont. Res.*, Chicago, v.10, p.1-11, 1974.
- Karring T, Ostergaard E, Löe H. Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingival and alveolar mucosa. *J. Periodont. Res.*, Chicago, v.6, p.282-293, 1971.
- Kent LW, Dyken RA, Rahemtulla F, Allison AC, Michalek SM. Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. *Archs. Oral Biol.*, v. 41, n. 3, p. 262-270, 1996.
- Langdon J, Williams DM, Navsaria H, Leigh IM. Autologous keratinocyte grafting: A new technique for intra-oral reconstruction. *Br. Dent. J.*, London, v. 171, n.3-4, p. 87-90, 1991.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, Chicago, v. 9, p. 290-296, 1982.
- Pendergrass W, Angello J, Norwood TH. The relationship between cell size, the activity of DNA polymerase α and proliferative activity in human diploid fibroblast-like cell cultures. *Exp. Gerontol.*, v. 24, p. 383-393, 1989.
- Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, v.20, p.553-559, 2000.
- Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation : A case series. *J. Periodontol.*, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.
- Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodontol Res.*, v. 37, n. 3, p.230-235, 2002.
- Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Witjes MJ, Vissink A. Use of cultured mucosal graft to cover defects caused by vestibuloplasty: An vivo study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v. 53, n. 8, p. 872-878, 1995.
- Rossa Júnior C., Martinez KG, Silvério AET. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*. *Pesqui. Odontol. Brás.*, São Paulo, v. 16, n. 3, p. :234-238, 2002.
- Sant’anna ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. *Rev. Fac. Odontol.*, Bauru, v. 10, n. 3, p. 134-140, 2002.
- Sato JD, Hayashi I, Hayashi J, Hoshi H, Kawamoto T, Mckeehan WL, Matsuda R, Matsuzaki K, Mills KHG, Okamoto T, Serrero G, Sussman DJ, Kan M. Specific cell types and their requirements. In: Davis JM. (Ed.). *Basic Cell Culture: a practical approach*. Oxford University Press: New York. 1994. p. 181-222. Cap. 6.
- Streissle G, Schwobel W, Hewlett, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infections. *Advanced Cell Culture*, v. 1, p. 67-90, 1981.
- Tang ATH, Liu Y, Björkman L, Ekstrand J. *In vitro* cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, St. Louis, v.116, n.2, p.132-138, 1999.
- Ten Cate AR. The fibroblast and its products. In: *Oral Histology. Development structure and function*. In: _____. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, 1989. cap. 6.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/ Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 35, p. 206-221, 2000.
- Ueda M, Hata KI., Sumi Y, Mizuno H., Niimi A. Peri-implant soft tissue management through use of mucosal epithelium. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v. 86, n. 4, p. 393-400, 1998.
- Ueda M, Sumi Y, Mizuno H, Honda M, Oda T, Wada K, Boo JS, Ken-Ichiro H. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Mater. Sci. Eng.*, v.13, p.7-14, 2000.

Recebido para publicação em: 01/12/04

Enviado para análise em: 13/04/05

Aceito para publicação em: 26/10/05