

NATASHA MENDONÇA MACHADO

**GLICOSE E GLUTAMINA NA PROLIFERAÇÃO
E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO
DENTAIS HUMANAS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2014

NATASHA MENDONÇA MACHADO

**GLICOSE E GLUTAMINA NA PROLIFERAÇÃO
E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO
DENTAIS HUMANAS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

ORIENTADOR: Prof. Silvio Eduardo Duailibi

CO – ORIENTADORA: Profa. Monica Talarico Duailibi

SÃO PAULO

2014

Machado, Natasha Mendonça.

Glicose e Glutamina na Proliferação e Viabilidade de Células-tronco Dentais Humanas. /Natasha Mendonça Machado.-- São Paulo, 2014.
xvii, 90f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Glucose and Glutamine on proliferation and viability of human dental stem cells.

1. Engenharia Tecidual.
2. Medicina Regenerativa.
3. Células-tronco dentárias.
4. Meios de cultura.
5. Glicose.
6. Glutamina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

*Aos meus pais, Rui Paula Machado e Rafaela Melazo Mendonça Machado,
fonte de grande inspiração e admiração, cujo incentivo constante motiva todas as
minhas conquistas.*

*À minha família, a tudo e a todos que acreditaram nesta causa e contribuíram
para sua realização.*

Ao meu orientador, Professor **SILVIO EDUARDO DUAILIBI**, coordenador do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação, que antes de tudo tornou-se um grande amigo que abriu as portas de seu laboratório e acreditou no meu potencial, motivou a ampliação de meu conhecimento intelectual e científico. Agradeço imensamente a oportunidade de conhece-lo e participar de sua equipe.

A Professora **MONICA TALARICO DUAILIBI**, responsável pelo Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação, minha co-orientadora que com muito carinho auxiliou esta pesquisa, uma grande mulher da qual tenho muita admiração e orgulho.

A Professora **SORAYA SOUBHI SMAILI**, chefe do Laboratório de sinalização e morte celular, agradeço pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa, disponibilizando seu laboratório para a realização de nossos experimentos, dando suporte técnico e científico, além do grande apoio ao grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação.

Meus mais sinceros agradecimentos.

Além de dedicar este trabalho, gostaria de agradecer a minha **FAMÍLIA** que desde o começo acompanhou minhas lutas, minhas vitórias e aprendizados. Este trabalho representa muito mais que um título, é o meu tempo longe de casa, as noites que não dormi e todas as lágrimas que derramei para sua concretização.

À Professora **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela oportunidade de estar aqui junto a profissionais, acadêmicos e docentes que admiro e respeito, e pela luta constante para a formação de grandes cientistas.

Ao Professor **MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pelo apoio e incentivo aos docentes, alunos e todos os participantes das atividades ligadas ao programa.

Às queridas amigas **JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS** e **VANESSA PENNA**, que prestaram grande apoio em todos os experimentos deste projeto e acima de tudo estiveram sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. Acima de tudo por serem grandes responsáveis por minha adaptação neste lugar, me fazendo enxergar toda a beleza e verdade nele.

À toda equipe do **LABORATÓRIO DE ENGENHARIA TECIDUAL E BIOFABRICAÇÃO**, a Rani Moretti, Luciana Iwamoto e Paulo Oliveira Martins, pelo auxílio na obtenção de amostras e pela contribuição pessoal, profissional, intelectual e humana acima de tudo. Agradeço ainda pela amizade, apoio, cumplicidade e harmonia de nossa equipe. Eu não teria chegado aqui sem a ajuda de vocês.

À equipe do **LABORATÓRIO DE SINALIZAÇÃO E MORTE CELULAR**, em especial aos alunos Gustavo Pereira, Adolfo Erustes e Rodrigo Ureshino, pela paciência e grande ajuda para a compreensão de tantos protocolos.

À colega **ROBERTA ELLER BORGES** pelo grande impulso no desenvolvimento de um olhar crítico que possibilitou o desenvolvimento deste projeto, sua generosidade será eternamente notada.

À todos os alunos do **CENTRO DE TERAPIA CELULAR E MOLECULAR**, Adriano Sartori, Heloísa Rosa, Fernando Ogata, Graciele Oliveira, Bianca Zanetti, Fernando Virgílio, Pedro Mathias, pela divisão de experiências e pela companhia. Pelas as discussões acerca do desenvolvimento do universo, foi muito bom viver tudo isso, vocês são o coração do CTCMol.

Aos **COLABORADORES DO CTCMol**, Márcia, Sandra, Ivonete, Magali, Paulo, Danilo e os demais pela competência na manutenção de nosso local de pesquisa e por toda paciência e gentileza.

Às secretárias de nosso Programa de Pós-Graduação, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela seriedade e compromisso no atendimento e apoio a todos os pós-graduandos.

À minha querida professora de inglês **LIEGE BARBOSA**, pelas suas sábias palavras e por toda paciência e incentivo nas etapas de tradução desta pesquisa.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**, pelas grandes contribuições em minha formação, pelos ensinamentos que promoveram e estimularam o desenvolvimento de minha capacidade intelectual.

À **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste projeto.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo financiamento desta pesquisa (processo nº 2013/06877-1).

“A melhor parte da ciência é a sua revolução permanente. A jornada para a sua compreensão é infinita. Para mim, face ao pouco que conhecemos do universo, esse é o modo com que devemos encarar-la. A nossa compreensão nunca será absoluta. Apesar disso, estas pequenas aproximações sucessivas da realidade que a ciência nos oferece são profundamente preciosas e magníficas, dando-nos um vislumbre diante de tudo que é possível.”

Ann Druyan

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
EPIÍGRAFE.....	ix
LISTAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	7
3.1. O METABOLISMO CELULAR.....	7
3.2. O USO DE CÉLULAS EM ENGENHARIA TECIDUAL.....	9
3.3. MEIOS DE CULTURA.....	11
3.4. GLICOSE E GLUTAMINA.....	14
4. MÉTODOS.....	19
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	19
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	19
4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....	19
4.4. AMOSTRAS.....	20
4.5. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	21
4.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	21
4.7. OBTENÇÃO DE IMAGENS.....	22
4.8. CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	22
4.9. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	23

4.10. TESTE DE VIABILIDADE.....	23
4.11. ASPECTOS ÉTICOS.....	24
4.12. ANÁLISE DE RESULTADOS.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1. VIABILIDADE CELULAR.....	27
5.1.1. Análise descritiva.....	27
5.1.2. Análise ANOVA.....	32
5.1.3. Comparações múltiplas.....	35
5.2. CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS MORTAS.....	36
5.2.1. Análise descritiva.....	37
5.2.2. Comparações de células mortas nos meios de cultura.....	40
5.3. PERDA DE CÉLULAS.....	42
5.3.1. Análise descritiva.....	43
5.3.2. Células perdidas de acordo com os meios de cultura.....	44
5.4. AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS CELULARES.....	47
5.4.1. Microscópio invertido.....	47
5.4.2. Microscopia Confocal.....	48
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS.....	60
NORMAS ADOTADAS.....	69
ABSTRACT.....	71
APÊNDICES.....	73
ANEXOS.....	76
FINANCIAMENTO.....	88
FONTES CONSULTADAS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Boxplots</i> da variável Absorbância, de acordo com o meio de cultura (esquerda) e o FBS (direita).....	29
Figura 2. <i>Boxplots</i> da variável Absorbância para cada tipo de Cultura, na presença (esquerda) e na ausência (direita) de FBS.....	31
Figura 3. Gráfico das médias de Absorbância para os grupos do fator Cultura, na presença e ausência de FBS.....	33
Figura 4. Comparações múltiplas das interações, através do teste de <i>Dunnnett</i> , utilizando Low Glc– como controle.....	36
Figura 5. Percentuais de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS.....	38
Figura 6. Percentuais de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS.....	40
Figura 7. Percentuais de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura do controle positivo.....	43
Figura 8. Percentuais de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS.....	44
Figura 9. Avaliação microscópica de células em grupos positivos (1,2) e negativo (3,4).....	47
Figura 10. Microscopia confocal de células do grupo positivo, <i>scale Bar 20μm</i>	49
Figura 11. Microscopia confocal de células do grupo negativo, <i>scale Bar 20μm</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatísticas descritivas da variável Absorbância, de acordo com os grupos de cada fator..... 28

Tabela 2. Estatísticas descritivas da variável Absorbância para cada grupo do fator Cultura, dentro dos grupos do fator FBS..... 30

Tabela 3. Testes de homogeneidade de variâncias para a variável Absorbância, em todos os possíveis grupos formados na combinação dos fatores Cultura e FBS..... 34

Tabela 4. ANOVA de dois fatores com interação..... 35

Tabela 5. Contagens de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS..... 37

Tabela 6. Percentuais (+) de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS..... 37

Tabela 7. Contagens de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS..... 39

Tabela 8. Percentuais (+) de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS..... 39

Tabela 9. Intervalos com 95% de confiança para os percentuais de células mortas, de acordo com o meio de cultura..... 41

Tabela 10. Valores-p das estatísticas do teste Qui-quadrado..... 42

Tabela 11. Contagens de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura do controle positivo..... 42

Tabela 12. Contagens de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura do controle negativo..... 43

Tabela 13. Intervalos com 95% de confiança para os percentuais de células perdidas, de acordo com o meio de cultura nos controles positivo e negativo..... 45

Tabela 14. Valores-p das estatísticas do teste Qui-quadrado para avaliar se o percentual de células perdidas independe do meio de cultura..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – *Analise of variance*

ATP - Adenosina Trifosfato

CO₂ - Dióxido de Carbono

CTCMol - Centro de Terapia Celular e Molecular

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ET - Engenharia Tecidual

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FDA – *Food and Drug Administration*

Glc - Glicose

Gln – Glutamina

HBSS – *Hanks Balanced Salt Solution*

HCl - Ácido Clorídrico

INFAR - Instituto de Farmácia da UNIFESP

MEM – *Minimal essential medium*

MTT - *methylthiazoltetrazolium*

nm - nanômetros

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PDH – Piruvato desidrogenase inativa

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UV - Ultra Violeta

RESUMO

Introdução: Vias de crescimento, expressão genética, síntese de macromoléculas, formação de purinas e pirimidinas e produção de energia estão relacionadas ao metabolismo da glicose e da glutamina. Por isso, o monitoramento dos níveis destes nutrientes é comum na cultura de células. Uma vez que o período *in vitro* é obrigatório na fase pré-clínica da Medicina Regenerativa, as condições de cultivo devem ser bem estabelecidas, sendo importante o estudo dos requerimentos nutricionais celulares.

Objetivo: Investigar o efeito da glicose e da glutamina sobre a proliferação e a viabilidade de células-tronco dentais humanas. **Métodos:** O tecido de terceiros molares foi fragmentado em explantes e cultivado até a obtenção do número de células para as etapas experimentais. As células foram submetidas a diferentes concentrações de glicose e glutamina na presença ou ausência de soro, e em seguida, avaliadas em relação ao número, viabilidade pelo teste de MTT e estruturas do citoesqueleto, núcleo e mitocôndrias com microscopia confocal. **Resultados:** Baixas concentrações de glicose favoreceram a viabilidade e a morfologias adequadas. A presença de glutamina mostrou-se benéfica apenas quando associada a glicose. A preservação do potencial biológico em cultura é possível na ausência de soro, desde que os requerimentos nutricionais estejam adequados. **Conclusão:** O comportamento microscópico e a viabilidade celular demonstraram padrões superiores em um meio de cultura livre de soro animal e isento de glutamina. Para determinar os requerimentos de glutamina, mais investigações são necessárias. As doses adequadas e a composição de nutrientes-chave irão favorecer a seleção de uma população celular adequada.

Palavras chave: Engenharia Tecidual, Medicina Regenerativa, Células-tronco dentárias, Meios de cultura, Glicose, Glutamina.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de nossas vidas, a função dos órgãos diminui progressivamente ou é perdida devido processos naturais de envelhecimento, por eventos traumáticos ou genéticos. No âmbito da Medicina Regenerativa, a pluripotencialidade de células-tronco tem sido estudada para restaurar características primárias e devolver a função de tecidos. Diante disto, estudos avançados nos campos da biologia celular e molecular têm guiado o desenvolvimento de padrões para a concepção de um material biológico adequado para restaurar partes humanas (BATOULI *et al.*, 2003; VATS *et al.*, 2005; BIANCO *et al.*, 2008; SOTO-GUTIERREZ *et al.*, 2011).

Considerando o período *in vitro* como uma etapa obrigatória na fase pré-clínica do transplante de células na Engenharia Tecidual (ET), e reconhecendo a interferência do ambiente extracelular no comportamento celular, a determinação de condições de cultivo controladas se faz extremamente necessária. Nesse sentido, o meio de cultura e seus componentes desempenham um papel central na manutenção das características do material biológico *in vitro*. Entretanto, apesar dos inúmeros avanços na Medicina Regenerativa e na ET, a base da composição química dos meios de cultura não é modificada desde sua concepção (LEE *et al.*, 2013).

O crescimento, proliferação e diferenciação celular em um ambiente artificial ocorrem mediante o consumo de diversas substâncias complexas fornecidas pelo meio de cultura (FALKNER *et al.* 2006). Os nutrientes participam ativamente destes eventos e, desta forma, meios de cultura quimicamente definidos são indiscutivelmente superiores, garantindo a geração de dados confiáveis e o nível de precisão de experimentos (ZIMMERMAN *et al.* 2000).

O equilíbrio das principais atividades metabólicas envolve o fluxo e a utilização da glicose e da glutamina em especial. Estes nutrientes atuam como fonte direta de carbono e nitrogênio para diversas reações bioquímicas, participam em vias de crescimento, expressão genética, síntese de macromoléculas, formação de purinas e pirimidinas e produção de energia (CURI *et al.*, 2007; DEBERARDINIS & THOMPSON, 2012).

As taxas de consumo de glicose e glutamina simbolizam grande parte dos processos naturais de células em cultura e por esta razão, o monitoramento do nível destes nutrientes representa uma rotina na prática de laboratório (SLIVAC *et al.* 2010). A glicose é principalmente utilizada na via pentose fosfato ou na via glicolítica para fornecer intermediários metabólicos e energia, enquanto a glutamina integra os constituintes de proteínas e pode fornecer de 30 a 65% da energia necessária para células de mamíferos em crescimento, (REITZER, WICE, KENNEL, 1979; ZIELKE, ZIELKE, OZAND, 1984; SLIVAC *et al.* 2008) além de possuir propriedades importantes para a proliferação e manutenção de estruturas e funções celulares (CURI *et al.* 2005).

Todos os aspectos da biologia estão ligados ao metabolismo, do nível celular ao sistêmico. Conseqüentemente, qualquer perturbação metabólica promove uma onda de efeitos que podem interferir no organismo como um todo (DEBERARDINIS & THOMPSON, 2012).

O desenvolvimento de alternativas terapêuticas em ET e o crescente número de pesquisas *in vitro* com células-tronco estimulam o desenvolvimento de novas estratégias e abordagens na condução de experimentos. A promoção de boas condições para a

cultura de células viáveis e sem danos é importante para garantir a qualidade e a reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, a aplicação terapêutica de células-tronco humanas exige a padronização de métodos para a expansão da população celular *in vitro*.

Desta forma, existe uma significância profunda no desenvolvimento da pesquisa voltada para a criação de meios de cultura específicos, atendendo os requerimentos nutricionais celulares, uma vez que a variação nas concentrações de nutrientes em meios de cultura comercialmente disponíveis não se baseia em evidências científicas e sim no empiricismo (WAYMOUTH, 1965; LEE *et al.*, 2013).

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar o efeito da glicose e da glutamina sobre a proliferação e viabilidade de células-tronco dentais humanas provenientes do tecido não mineralizado de terceiros molares *in vitro*.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1. O METABOLISMO CELULAR

Em 1966, MONOD relatou que existem interações químicas regulamentares entre células, tecidos e órgãos. Estas interações são as responsáveis principais pelo desenvolvimento, funcionamento e a sobrevivência de organismos. Subjacente a praticamente todas as atividades fisiológicas, existe uma rede integradora complexa que regula e traduz sinais químicos. A partir disto, foi possível estimular respostas a diversas substâncias, inclusive nutrientes.

PERLMAN (1968) descreveu que o metabolismo e os requerimentos nutricionais variam de acordo com o tipo celular. O cultivo isolado de células permitiu o estudo e a compreensão mais detalhada da utilização de nutrientes, embora as necessidades ideais para a multiplicação adequada não estejam completamente definidas para muitas linhagens celulares. O metabolismo celular modifica-se *in vitro*, de forma que apenas alguns aminoácidos e vitaminas são dados como imprescindíveis para o crescimento e a divisão celular. Entretanto, a necessidade destes macro e micronutrientes varia amplamente dependendo da presença ou ausência de suplementos como o soro.

HOOPER (1982) desenvolveu uma pesquisa sobre a cooperação metabólica de células *in vitro*, abordando a troca de diversas substâncias metabolicamente ativas entre junções localizadas na membrana celular. Dentre as substâncias estudadas estão aminoácidos e nucleotídeos, além de outros substratos relacionados a estrutura e a função celular. Neste estudo, o autor descreveu a presença de adaptações metabólicas determinadas a partir de condições de cultivo.

BALLARD (1994) relatou que o fluxo de nutrientes específicos em um ambiente *in vitro* favoreceu o estudo da nutrição celular, produzindo informações relativas à habilidade de produzir estímulos determinados para o aumento da compreensão do metabolismo.

Em 2002, YOUNG definiu a participação do nutriente em diversas funções metabólicas, conceituando-o como “*um componente físico, químico e fisiológico que serve como um substrato energético significativo ou um precursor para a síntese de macromoléculas ou outros componentes necessários para a diferenciação celular normal, crescimento, renovação, reparação, defesa e/ou manutenção ou um sinalizador molecular, co-fator ou determinante da estrutura celular normal, função e/ou um promotor da integridade da célula e do órgão*”.

METALLO & HEIDEN (2010) abordaram a importância da nutrição celular frente a sinalização no controle de importantes funções como o crescimento, a proliferação, diferenciação e apoptose. A transformação de moléculas inorgânicas e substratos nutritivos constituem etapas fundamentais para a síntese de biomassa. As vias de crescimento celular podem influenciar a dinâmica do metabolismo, pois estimulam a captação de nutrientes, a progressão do ciclo celular e o crescimento propriamente dito. Neste contexto, o fornecimento de carbono e nitrogênio, ocorre principalmente pela oxidação de glicose e glutamina. Apesar destas funções já terem sido discutidas na literatura, o conhecimento acerca do fluxo destes nutrientes para determinadas vias celulares, bem como o controle de sinalização e ainda necessitavam de mais estudos.

VARUM *et al.* (2011) compararam o metabolismo de células-tronco embrionárias e células-tronco induzidas analisando a morfologia mitocondrial e a expressão de genes de vias metabólicas da glicólise, via pentose fosfato e ciclo do ácido tricarboxílico. O consumo de oxigênio, o ATP intracelular e a expressão de proteínas chave relacionadas a regulação do metabolismo da glicose também foram determinados.

Os autores concluíram que embora exista diferença entre o metabolismo das células em estudo, as células pluripotentes humanas dependem principalmente da glicólise para atender suas demandas energéticas.

Em 2012, WELLEN & THOMPSON descreveram a influência mútua e direta entre o metabolismo e diversas vias de sinalização, desempenhando funções essenciais para a vida, manutenção da integridade, função e atividade celular. Os produtos finais de processos metabólicos celulares são conhecidos como metabólitos e o nível de concentração destes influencia de maneira importante alguns mecanismos de transformação de proteínas, como acetilação, metilação, glicosilação e fosforilação. Estes eventos bioquímicos alteraram a transdução de sinais, expressão genética e o metabolismo propriamente dito, modificando ainda a biologia celular.

DEBERARDINIS & THOMPSON (2012) enfatizaram que o metabolismo atravessa todos os aspectos da biologia, desde o nível de uma célula até um organismo inteiro. Nenhuma função celular acontece independente do metabolismo e qualquer perturbação metabólica causa uma onda de efeitos que podem se estender através de redes e afetar outros sistemas.

3.2. O USO DE CÉLULAS EM ENGENHARIA TECIDUAL

O início da ET foi marcado pela publicação de LANGER & VACANTI (1993) na revista Science. Dentre os diversos aspectos abordados, o isolamento de células do sistema nervoso, córnea, tecido epitelial, fígado, pâncreas, cartilagem, ossos e músculo foram mencionados. Os autores descreveram diversas perspectivas acerca das aplicações clínicas da alternativa terapêutica e afirmaram que a ET certamente possuirá um futuro promissor.

Segundo SARTAJ & SHARPE (2006) diversos tipos celulares despertam o interesse de pesquisadores ao redor do mundo, contudo, células dentárias tem sido foco constante de estudos direcionados a ET. Devido o órgão dentário não representar um órgão indispensável à vida, como pâncreas ou fígado, os ensaios clínicos com abordagem direcionada ao reparo ou transplante de dentes produzidos em laboratório apresentam menor risco à saúde. Desta forma, os autores descreveram que o transplante de dentes fabricados em laboratório poderia representar muito mais do que uma alternativa válida para resolver problemas na saúde oral. Estas investigações poderiam representar o início da aplicação clínica de órgãos criados por ET e abrir portas para compreender e superar eventuais situações adversas decorrentes desta terapia.

DUAILIBI *et al.* (2006), abordaram as perspectivas para o desenvolvimento de elementos dentários por meio da ET. Os autores reforçaram a presença de células-tronco progenitoras no tecido pulpar de dentes decíduos e permanentes em estágios iniciais de desenvolvimento. Isto foi considerado importante para a geração de dentina, esmalte, osso alveolar e cimento. A interação tecidual necessária para o desenvolvimento dental e a geração natural de elementos dentários ocorre por meio de interações teciduais recíprocas entre os tecidos do epitélio dental e células da crista neural já descrita em estudos anteriores e posteriores (DUAILIBI *et al.* 2004; DUAILIBI *et al.* 2008).

ESTRELA *et al.* (2011), relatou o crescimento exponencial da pesquisa com células-tronco nos últimos anos. Devido o reconhecimento do potencial destas células para tratar diversos estados patológicos, a sua aplicação na Medicina Regenerativa foi considerada muito interessante. Os autores afirmaram que os tecidos dentais possuem células-tronco mesenquimais e o seu potencial de diferenciação pode variar de células progenitoras neurais, odontoblastos, osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

SUJESH *et al.* (2013) afirmaram que a criação de um elemento dentário parcial ou completo em laboratório depende da manipulação de células-tronco. Segundo os autores, este processo necessita da sinergia de todos os eventos celulares e moleculares que levam a formação de tecidos específicos do dente. Diferentes fontes de células-tronco foram consideradas para a construção de dentes *in vitro*. Dentre as mais utilizadas, os autores destacaram as células-tronco embrionárias, pós-natal e adultas, que demonstraram um potencial regenerativo considerável. Apesar destas vantagens, ainda foram relatadas grandes limitações como risco de rejeição e comportamento celular inadequado. Nesse sentido, os autores concluíram que o desenvolvimento de uma abordagem de reconstrução dentária utilizando células-tronco possuirá um futuro promissor, embora grandes desafios ainda necessitem de investigação.

OTSU *et al.* (2014) abordaram o uso de células pluripotentes induzidas para aplicação na construção de elementos dentários por ET. Os autores relataram que problemas relativos a técnica e a ética representam os maiores desafios a serem vencidos antes da aplicação clínica. Estas células foram apontadas como uma opção bastante válida, com grandes possibilidades de favorecimento do transplante de um material biológico autólogo.

3.3. MEIOS DE CULTURA

A história da cultura de células foi iniciada por CARREL (1913), que após diversos experimentos em laboratório desenvolveu métodos para isolar e prolongar a vida de células e tecidos *in vitro*. Apesar de seu grande achado para a história da cultura de células, o autor reconheceu a imaturidade de seus experimentos, admitindo que certamente muitas outras técnicas fossem se desenvolver no futuro. Seu estudo concluiu que condições assépticas e o fornecimento de nutrientes adequados constituíram aspectos fundamentais para manutenção de células em cultura.

Um estudo metuculoso desenvolvido por EAGLE (1955) analisou os requerimentos nutricionais de células humanas em cultura. O estudo teve como um dos objetivos principais o desenvolvimento de uma solução padrão que pudesse ser utilizada em uma grande variedade de células humanas. O autor relatou cuidadosamente a determinação de doses adequadas de macro e micronutrientes, considerando suas funções nos processos bioquímicos vitais.

Um artigo publicado por HAM (1974) relatou aspectos importantes no desenvolvimento de meios de cultura. A visão imposta pela bioquímica clássica limitou a percepção de muitos estudiosos acerca da importância do desenvolvimento de meios de cultura. O autor enfatizou ainda que muitas agências de fomento se recusaram a financiar mais pesquisas acerca dos requerimentos nutricionais celulares por acreditarem que existiam temas muito mais importantes em biologia celular.

BJARE (1992) especificou que o meio de cultura desenvolvido por Eagle determinou o início do desenvolvimento de outros diversos tipos de meio com modificações refinadas em sua composição. A diminuição ou eliminação de componentes do meio poderiam afetar o crescimento celular em menor escala. Isto iria interferir na reprodutibilidade dos experimentos, especialmente sobre os efeitos de fatores de crescimento e parâmetros bioquímicos. No entanto, substitutos de soro normalmente precisam ser adicionados, embora a ausência destes se faça necessária quando se deseja isolar ou purificar um produto específico a partir de culturas de células.

LUBINIECKI (1999) descreveu que visando melhorar o processo e a qualidade dos produtos e na tentativa de evitar a exposição de agentes adventícios, bem como reduzir os custos, muitas organizações optaram por promover o crescimento na ausência de soro animal. Levantamentos bibliográficos sugeriram que estudos

acadêmicos substanciais em meio isento de soro foram perseguidos por muitas décadas, obtendo variados níveis de sucesso relativos ao alcance do crescimento e na manutenção da função celular.

STEIN (2007) afirmou que a cultura de células de mamíferos não apresentou grandes mudanças nos últimos 50 anos. Tipicamente, um meio de cultura sintético é escolhido para cumprir os requerimentos ambientais e nutricionais de um dado tipo celular. Aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e nutrientes fonte de carbono como a glicose são elementos normalmente utilizados em meios de cultura clássicos. A suplementação de meios de cultura com soro animal em uma concentração que varia entre 5 a 20% é amplamente utilizada, embora avanços recentes na produção de meios de cultura quimicamente definidos e livres de soro foram consideradas opções interessantes para a manutenção de células em cultura. De acordo com o regulamento do FDA (*Food and drug administration*) a eliminação do soro representa uma preocupação primordial.

NAKAMURA *et al.* (2008) estudaram o efeito de um meio de cultura desenhado especificamente para células-tronco mesenquimais e compararam com o meio clássico desenvolvido por EAGLE (1955). O meio de cultura especificamente desenhado para células-tronco mesenquimais não foi considerado de grande aplicabilidade para utilização em ET, devido alto custo e composição protegida por patentes. O estudo concluiu que a curva de crescimento celular apresentou-se similar em ambos os meios estudados e o meio de cultura desenvolvido por Eagle poderia ser utilizado como meio basal de células-tronco mesenquimais para posterior aplicação clínica.

LEE *et al.* (2013) estudaram a segurança de determinadas substâncias tradicionalmente adicionadas em meios de cultura. Os autores relataram que indicadores de pH e soluções tampão podem induzir transformações celulares desconhecidas,

modificando as características naturais de um material biológico, invalidando seu futuro transplante na ET. Para solucionar esta questão, os autores desenvolveram um meio de cultura especial, baseado nas concentrações de nutrientes do meio de cultura desenvolvido por EAGLE (1955) e utilizaram soluções autorizadas para uso em seres humanos como adjuvantes. O estudo concluiu que o meio de cultura desenvolvido apresentou condições favoráveis para fins de Medicina Regenerativa e ET.

3.4. GLICOSE E GLUTAMINA

STUMVOLL *et al.* (1999) descreveram aspectos peculiares da glutamina e sua participação no metabolismo. A singularidade deste nutriente em relação aos demais aminoácidos foi relatada por vários autores, especialmente devido a sua ampla participação em diversos processos metabólicos. O estudo descreveu que além de um substrato metabólico, a glutamina pode atuar como um regulador de muitos processos fisiológicos.

A glicose e a glutamina são nutrientes fundamentais para o metabolismo celular *in vitro*. CRUZ *et al.* (1999) utilizaram diferentes concentração destes nutrientes para estudar mecanismos de regulação metabólica e encontraram desvios no consumo e na utilização destes nutrientes de acordo com a dose de metabólitos do ambiente extracelular.

BOHNSACK & HIRSCHI (2004) abordaram a progressão do ciclo celular em relação às taxas de nutrientes. A glicose foi descrita como um carboidrato fundamental para a manutenção da biologia celular e a formação metabólica de energia. Este nutriente participa de vias bioquímicas, sinalização intracelular e regulação de processos de osmolaridade, tornando-se um composto ligado a modificações de diversas funções celulares, incluindo a atividade proliferativa. As transformações metabólicas a partir da glicose ocorrem em uma seqüência de reações bioquímicas integradas, que se

iniciam na transformação da glicose em piruvato, formando 2 moléculas de ATP. Posteriormente, o piruvato converte-se em acetil coenzima A e entra no ciclo de Krebs, transferindo elétrons para o oxigênio na cadeia respiratória e formando 34 moléculas de ATP. Em situações de déficit de glicose, houve uma inibição da síntese de DNA em algumas células.

LI *et al.* (2007) caracterizaram os efeitos *in vitro* de altas doses de glicose (25mM) sobre células mesenquimais humanas primárias e imortalizadas. Nestas condições, houve um aumento da proliferação em longo prazo apenas nas células imortalizadas. A proteína *thioredoxin-interacting*, envolvida na regulação da apoptose, foi estimulada nas células imortalizadas. Entretanto, a apoptose não foi influenciada pelos níveis elevados de glicose em ambas as células em estudo. Os autores identificaram um potencial de diferenciação osteogênica aumentado nestas circunstâncias. Portanto, ocorreu uma resistência aos níveis tóxicos de glicose no microambiente de células primárias.

WEIL *et al.* (2009) avaliaram o efeito de altos níveis de glicose sobre a proliferação e a síntese de fatores de crescimento de células-tronco mesenquimais humanas submetidas a condições de hipóxia e inflamação. O estudo baseou-se no princípio de que o desempenho de células-tronco é modesto e de curta duração quando aplicado em ensaios clínicos, provavelmente devido à condição patológica do organismo. A hiperglicemia é uma condição clínica frequentemente associada a estados críticos originados por trauma ou cirurgia ou em pacientes portadores de diabetes mellitus, sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Esta condição pode resultar ainda da administração de nutrição parenteral ou uso de corticosteróides. A concentração de glicose utilizada neste estudo fundamentou-se nos níveis séricos de glicose considerados normais e os observados como níveis clinicamente extremos. Os valores de glicose utilizados foram 5.5 mM, 20 mM e 30 mM, equivalentes a 99 mg/dl, 360 mg/dl e 540 mg/dl respectivamente. Os autores destacaram a importância da determinação de um protocolo de explantação, expansão em cultura e pré-

condicionamento, para garantir a expressão do potencial terapêutico e sobrevivência destas células após a transplantação.

METALLO & HEIDEN (2010) descreveram que a glutamina e outros aminoácidos não auxiliam a divisão celular na ausência de glicose. Nestas condições, a utilização de glutamina ocorreu anapleroticamente, pela utilização de alfa cetoglutarato, um substrato oriundo da glutamina que participa do ciclo de Krebs e auxilia na síntese de ATP. Desta forma, a célula pode crescer, mas não se dividir. Diante destas perspectivas, alguns questionamentos foram levantados: as células utilizam postos únicos de controle metabólico para progredir no ciclo celular? Através de que vias a glutamina é preferencialmente metabolizada no interior das células? Em que condições fisiológicas a glutamina é utilizada como fonte preferencial de carbono para a síntese de biomassa? A glutamina entra na célula através de transportadores de aminoácidos e age como uma fonte importante de nitrogênio, sendo essencial para a síntese de hexosaminas e nucleotídeos. Estas reações produzem glutamato, um dos nutrientes mais abundantes nas células. O glutamato pode ser convertido em alfa cetoglutarato através de reações que catalizadas pelo glutamato desidrogenase ou aminotransferases.

WELLEN *et al.* (2010) demonstraram que o fluxo da via de biosíntese de hexosaminas coordena o metabolismo da glicose e da glutamina regulando a expressão de receptores de superfície de fatores de crescimento. A privação de glicose levou a redução na captação de glutamina e conseqüentemente a uma atrofia em diversos tipos de celulares. Em circunstâncias de ausência de glicose os processos de biosíntese cessam, uma vez que esta reação necessita de intermediários oriundos da glicólise.

RAMOS & KAEBERLEIN (2012) abordaram o efeito benéfico da restrição calórica sobre o potencial de células-tronco. Diversas funções celulares sofreram mudanças em condições de restrição calórica, incluindo tradução de mRNA em proteínas, atividade mitocondrial e autofagia.

DEBERARDINIS & THOMPSON (2012) explicam que várias décadas de pesquisa procuraram caracterizar o metabolismo das células. A maior parte desta atenção foi centralizada no metabolismo da glicose. No entanto, uma vez que os biólogos reconheceram a importância da glutamina, este contexto mudou. A Glutamina contribui essencialmente para cada tarefa metabólica de células de rápida proliferação: participa de etapas relativas a bioenergética, suporta defesas de células contra o estresse oxidativo, além do complemento do metabolismo da glicose para a produção de macromoléculas. O interesse no metabolismo da glutamina foi despertado pela descoberta de que a própria glutamina exercia uma influência sobre uma série de vias de sinalização que contribuem para o crescimento de tumores. Estas observações estimularam um esforço renovado para a compreensão da regulação do metabolismo da glutamina.

HIGERA *et al.* (2012) afirmaram que os requerimentos nutricionais de células-tronco mesenquimais não foram e estão longe de ser determinados. Os autores relataram que a cinética do crescimento de células-tronco mesenquimais humanas e o metabolismo de aminoácidos apresentou mudanças de acordo com o tipo de cultura. Isto mostrou que o metabolismo é profundamente alterado conforme as condições extracelulares, sendo que a glutamina foi o aminoácido mais consumido pelas células em estudo.

4. MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo apresenta caráter primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, comparativo e realizado em centro único.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram utilizados terceiros molares inclusos (intra-ósseo) de pacientes com indicação clínica de remoção, de ambos os gêneros, com idade entre 14 e 20 anos. Os pacientes não apresentavam doenças sistêmicas e possuíam os terceiros molares em estágios 2-3 segundo a classificação de DUAILIBI *et al.* (2011). A concordância na participação voluntária foi manifestada com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Não foram incluídos os pacientes com utilização crônica de medicação contendo drogas corticosteróides, pacientes submetidos a cirurgias com indicação de odontosseção ou desgaste coronário, portadores de doenças infecto-contagiosas ou

anomalias dentárias de qualquer natureza, terceiros molares com exposição coronária, contaminados ou próximos a regiões contaminadas.

4.4. AMOSTRAS

As amostras de células humanas foram obtidas a partir do explante do tecido não mineralizado de terceiros molares de doadores voluntários atendidos no ambulatório de odontologia da USP no Curso de Cirurgia Buco-maxilo-facial da Fundectó, órgãos de saúde públicos ou consultórios particulares, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico. Os dentes inclusos com indicação clínica de extração foram cirurgicamente removidos, sob anestesia local, de acordo com protocolo descrito por TORRES *et al.* (2010). As amostras foram transportadas em meio de preservação (*Hanks Balanced Salt Solution* - HBSS), sob a temperatura de 37°C até o Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP, local de realização das etapas experimentais. Um panorama geral dos métodos do presente estudo pode ser observado no Apêndice 1.

A separação do tecido não mineralizado foi realizada em placa de Petri, com auxílio de lâminas de bisturi número 3. O material foi fragmentado em dimensões de 1mm. Em seguida, os explantes foram transferidos para *well-plates* previamente submetidos ao tratamento de superfície adequado com soro fetal bovino (FBS). Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, de acordo com o protocolo utilizado por DUAİLİBİ *et al* (2004) e DUAİLİBİ *et al.* (2008).

4.5. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Primeiramente, a população de células foi ampliada até a obtenção do número de células necessário para as etapas experimentais, o equivalente a 80×10^6 . Os explantes foram mantidos até a migração e confluência de células. O meio de cultura utilizado nesta etapa foi composto por DMEM / HAM'S F12 1:1 (Dulbecco's Modified Eagle's medium/Ham's F-12 *nutrient mixture*), suplementado com 5% de FBS e 0,5% de antibióticos (penicilina e streptomicina). As células foram mantidas em incubadora umidificada, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) na temperatura de 37°C. A troca do meio de cultura foi realizada a cada três dias.

4.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células em cultura foram tripsinizadas conforme o protocolo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação (APÊNDICE 2) e em seguida foi realizada a homogeneização do *pellet* formado em meio de cultura. O volume de 10 microlitros foi retirado deste concentrado celular e misturado com o mesmo volume do corante *trypan blue* a 0,4% e homogeneizado novamente. Dez microlitros da solução corada foram transferidos para o espaço destinado na *chamber slide*. A amostra foi introduzida no contador de células automático (Countess – Invitrogen ®), que calculou a quantidade de células totais, vivas e mortas. Este procedimento foi realizado após a expansão celular e após todas as tripsinizações.

4.7. OBTENÇÃO DE IMAGENS

As células foram fotografadas em seu local de incubação sob microscopia óptica invertida (Carl Zeiss®) com auxílio do *Software AxioVison*® 4.1 - Germany.

4.8. CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Após a expansão da população celular, as células foram divididas em dois grupos: suplementado com 5% de FBS ou livre de soro (OSKOWITZ *et al.* 2011). Em seguida, as células foram cultivadas em quatro meios de cultura comercialmente disponíveis (DMEM – Gibco, ANEXO II) com variações nas concentrações de Glicose (Glc) e Glutamina (Gln), criando quatro tipos de meio de cultura:

- Low Glc (1,000 mg / L de Glc isento de Gln);
- Glc (4,500 mg / L de Glc isento de Gln);
- Gln (584 mg / L de Gln isento de Glc);
- Glc-Gln (4,500 mg / L de Glc e 584 mg / L de Gln);

Todos os meios de cultura foram adicionadas penicilina e estreptomicina (0,5% 1:1), nas mesmas condições anteriormente descritas. Os experimentos foram realizados 7 dias após a cultura com estes meios específicos.

4.9. MICROSCOPIA CONFOCAL

A atividade mitocondrial, estruturas do citoesqueleto e núcleo foram investigadas por microscopia Confocal de fluorescência por varredura a laser. No fundo das placas de *well plate* de 6 poços, foram introduzidas lamínulas de 25x25 mm para o crescimento e adesão celular.

Para a identificação das estruturas foram utilizados os marcadores *Hoesth* na concentração de 4µg/ml durante 15 minutos para a coloração do núcleo (azul), *Mitotracker* na concentração de 5 nM durante 10 minutos para as mitocôndrias (vermelho) e *Alexa Fluor 1:500* durante 40 minutos para o citoesqueleto (verde). A incubação dos marcadores foi realizada ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As avaliações das células coradas foram realizadas em Microscópio Confocal Zeiss – LSM, no Instituto de Farmácia (INFAR) da UNIFESP.

4.10. TESTE DE VIABILIDADE

O teste do *methylthiazol tetrazolium* (MTT) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria Ultra Violeta (UV) visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em *well plates* de 96 poços. O tratamento consistiu na remoção do sobrenadante de meio de cultura e adição de 5 µL de MTT juntamente com 195 µL de meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas em 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz. O sobrenadante foi removido com a inversão da microplaca e adicionou-se 200µL de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), para dissolução dos cristais. Em seguida, as placas foram agitadas em vortex orbital. A leitura da absorbância foi realizada com o comprimento de onda 570 nanômetros (nm) com auxílio do equipamento de Espectofotometria.

4.11. ASPECTOS ÉTICOS

Contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos, o presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – CEP/UNIFESP, com parecer registrado com protocolo nº1493/11, obedecendo a Resolução 196/96 (ANEXO III).

A concordância da participação no estudo foi previamente concedida pelo sujeito ou seu responsável legal, através da assinatura do TCLE.

4.12. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os testes de ANOVA, *Dunnnett* e Qui-quadrado foram aplicados nos resultados com intervalo de confiança fixado em 95%. O modelo estatístico ANOVA com interação foi utilizado para o teste de viabilidade, fixando o meio de cultura e o FBS como fatores de interação. Após esta etapa, comparações múltiplas unilaterais foram realizadas pela versão não paramétrica do teste de *Dunnnett* e o teste Qui-quadrado para verificação do percentual de células mortas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

As células foram cultivadas até a obtenção do número necessário para todas as etapas experimentais. Após esta etapa, as células foram divididas em dois grupos, um suplementado com FBS e outro livre de soro. Em cada grupo foram utilizados 4 meios de cultura diferentes, com variações nas concentrações de glicose e glutamina, conforme descrito previamente (ANEXO II). Desta forma, o presente estudo contou com oito variações de cultura.

5.1. VIABILIDADE CELULAR

Nesta seção, a viabilidade celular foi estudada. Os dados foram obtidos através do teste MTT. Basicamente, para um determinado grupo de células, foi realizada a leitura de uma medida denominada Absorbância com o comprimento de onda de 570nm em um espectrofotômetro.

5.1.1. Análise descritiva

A análise foi iniciada com os dados da variável Absorbância por meio de medidas descritivas. O interesse constituiu a observação da influência que os fatores (Meios de cultura e FBS) estão exercendo na Absorbância, ou seja, na viabilidade celular. Na Tabela 1 os dados referentes à absorbância são estudados, separadamente, de acordo com os grupos de cada fator. No caso do fator FBS, verificou-se que as estimativas são valores próximos, o que indicou inicialmente que a medida de absorbância das células tende a se comportar de forma parecida, independentemente de se utilizar ou não FBS como suplemento das células.

Tabela 1. Estatísticas descritivas da variável Absorbância, de acordo com os grupos de cada fator.

Variável	Fator	Grupo	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	n
Absorbância	Cultura	Glc	2,04	0,24	1,75	2,89	5
		Glc/Gln	2,17	0,31	1,84	3,09	5
		Gln	0,37	0,18	0,05	0,63	5
		Low Glc	1,71	0,64	1,00	2,76	5
	FBS	Presente	1,57	0,80	0,49	3,09	5
		Ausente	1,58	0,83	0,05	2,76	5

Por outro lado, quando observamos os dados da absorbância nos grupos do fator meio de cultura, já é possível perceber indícios de que o meio de cultura em que a célula foi tratada influenciou o padrão da absorbância. A média da absorbância quando tratada utilizando o meio de cultura Gln foi bem menor do que em qualquer outro meio (em uma ordem pelo menos quatro vezes menor do que os demais). Observações similares podem ser feitas a partir da Figura 1, em que são apresentados *boxplots*, levando em conta cada fator separadamente.

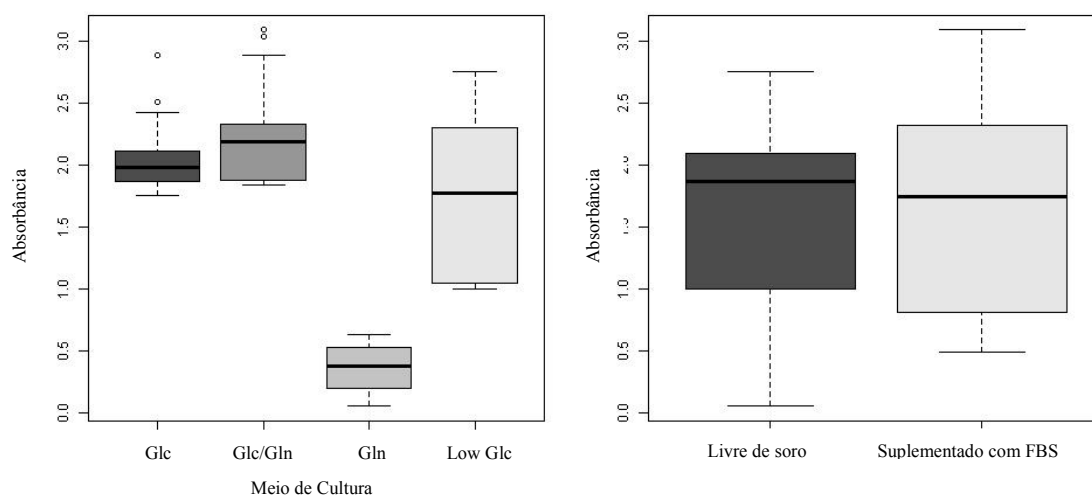


Figura 1. *Boxplots* da variável Absorbância, de acordo com o meio de cultura (esquerda) e o FBS (direita).

No gráfico à esquerda, pode-se notar que a absorbância tende a apresentar menores valores, quando se considerou apenas o meio de cultura Gln, enquanto que nos outros três meios de cultura o padrão de comportamento é mais parecido, embora a absorbância apresente uma maior variabilidade quando as células são tratadas com o meio Low Glc. No gráfico à direita, pode-se observar que a absorbância apresenta um padrão de comportamento parecido quanto aos grupos do fator FBS.

Além das análises descritivas acima, também foram consideradas as interações dos dois fatores, ou seja, avaliou-se o comportamento da medida absorbância em cada grupo do fator cultura na presença ou ausência de FBS. As estatísticas descritivas podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estatísticas descritivas da variável Absorbância para cada grupo do fator Cultura, dentro dos grupos do fator FBS.

Variável	FBS	Cultura	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	N
Absorbância	Presente	Glc	2,21	0,22	1,96	2,89	5
		Glc/Gln	2,42	0,25	2,26	3,09	5
		Gln	0,54	0,04	0,49	0,63	5
		Low Glc	1,10	0,13	1,00	1,54	5
	Ausente	Glc	1,88	0,09	1,75	2,27	5
		Glc/Gln	1,91	0,08	1,84	2,13	5
		Gln	0,20	0,03	0,05	0,25	5
		Low Glc	2,32	0,20	2,00	2,76	5

Além dos valores descritivos apresentados na referida tabela, o comportamento dos dados da absorbância também pode ser estudado na Figura 2, em que os *boxplots* consideram o meio de cultura associados ao FBS.

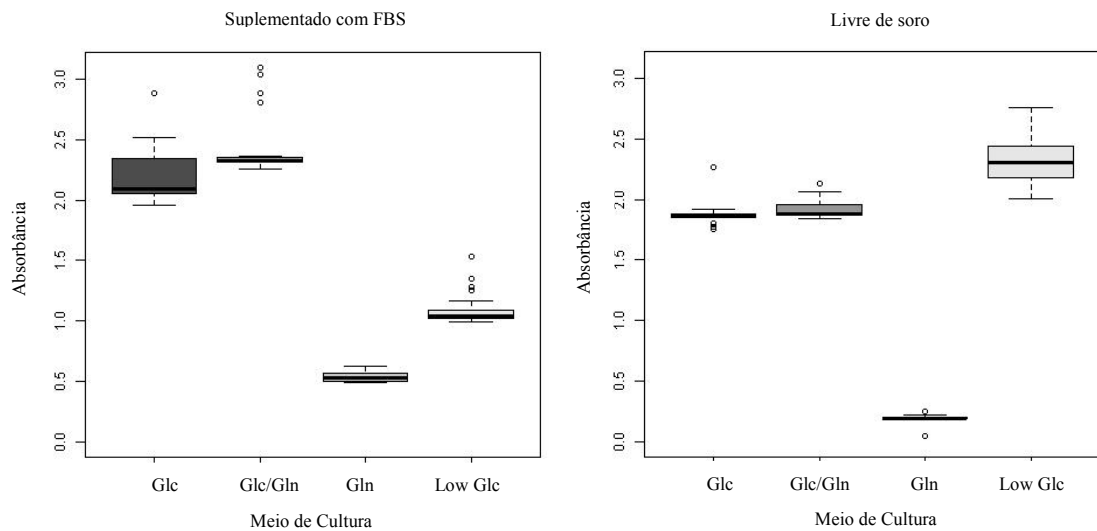


Figura 2. Boxplots da variável Absorbância para cada tipo de Cultura, na presença e na ausência de FBS, esquerda e direita, respectivamente.

O objetivo desta etapa consiste na avaliação do padrão de comportamento da absorbância nos diferentes meios de cultura suplementados ou não com FBS. Os gráficos sugerem indícios de que o uso de FBS influencia diretamente a mudança no padrão de viabilidade. No meio de cultura Glc, a variabilidade dos dados é ampla e a absorbância passa a ser discretamente maior quando se utiliza o FBS. No meio de cultura Gln a variabilidade diminui e os dados passam a apresentar valores mais discrepantes. No meio de Glc/Gln, a Absorbância tende a ser maior com o uso de FBS. Por último, no meio Low Glc, nota-se um aumento substancial na absorbância na ausência de FBS. Essas mudanças no padrão de comportamento sugerem a interação entre os fatores meio de cultura e FBS.

Com o intuito de inferir a respeito da população com base na amostra, a análise de variância (ANOVA) foi realizada.

5.1.2. Análise ANOVA

Para avaliar o efeito dos fatores meio de cultura e FBS na viabilidade celular a análise ANOVA do tipo dois fatores (BOX, HUNTER, HUNTER, 2005) foi empregada. Uma vez observado na Tabela 2 e Figura 2 indícios de comportamento diferente da viabilidade (absorbância) nos meios de cultura em relação ao FBS, julgou-se importante a avaliação de prováveis interações entre os fatores através da ANOVA. Esses indícios de interação também podem ser observados na Figura 3, devido ao cruzamento das duas linhas que ligam as médias dos grupos do fator meio de cultura e FBS.

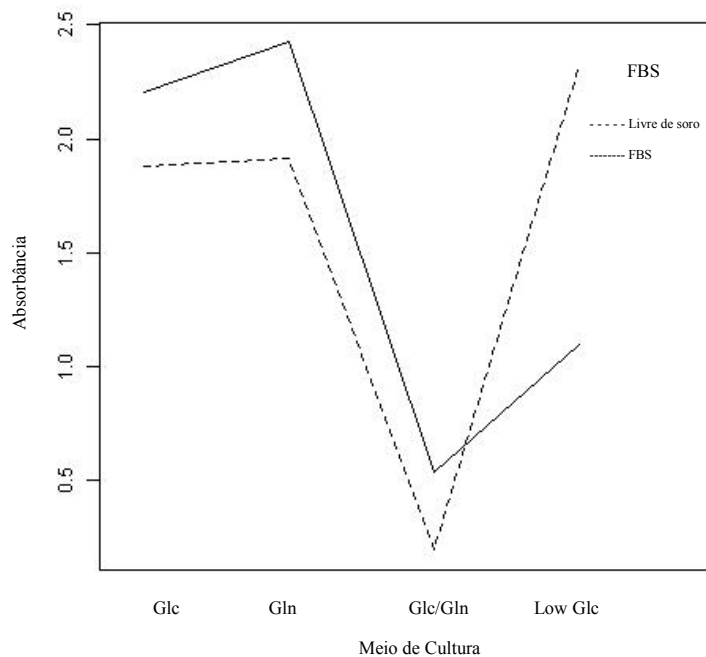


Figura 3. Gráfico das médias de Absorbância para os grupos do fator Cultura, na presença e ausência de FBS.

A modelagem tradicional da ANOVA não foi adequada devido a distribuição para os erros e homogeneidade não mostrar-se normal (variâncias iguais) nos grupos formados pelo cruzamento dos dois fatores. Os testes utilizados correspondem ao teste de *Fligner-Killeen* (CONOVER, JOHNSON, JOHNSON, 1981) e *Levene* (FOX & WEISBERG, 2011), cujo valor-p (nível descritivo) para cada teste é exibido na Tabela 3.

Tabela 3. Testes de homogeneidade de variâncias para a variável Absorbância, em todos os possíveis grupos formados na combinação dos fatores Cultura e FBS.

Teste	valor-p
<i>Fligner-Killeen</i>	<0,001
<i>Levene</i>	<0,001

Para a distribuição irregular de dados, foram aplicados testes de permutação (EFRON & TIBSHIRANI, 1994) para calcular os níveis descritivos da ANOVA. Os resultados obtidos através dessa metodologia são apresentados na Tabela 4, com fortes evidências de interação entre os fatores os meios de cultura e o FBS.

Tabela 4. ANOVA de dois fatores com interação

Efeito	Grau de liberdade	Média da Soma dos Quadrados	F	p-valor
Meio de cultura	3	32,737	1423,348	<0,001
FBS	1	0,006	0,261	0,612
Meio de cultura x FBS	3	7,943	345,348	<0,001

5.1.3. Comparações múltiplas

Comparações múltiplas utilizando uma versão não paramétrica do teste de *Dunnnett* (KONIETSCHKE, HOTHORN, BRUNNER, 2011) foram realizadas, considerando o grupo livre de soro do meio de cultura Low Glc (Low Glc-) como referência. Para padronizar as notações denotaram-se de forma análoga, os demais grupos com uso de sinais (“-“ para os grupos livres de soro e “+” para os grupos suplementados com FBS), desta forma Glc-, Glc/Gln-, Gln-, Glc+, Glc/Gln+, Gln+ e Low Glc+.

Do ponto de vista de testes de hipóteses, todos os grupos foram comparados dois a dois com o grupo de referência (Low Glc-). A similaridade de absorbância (viabilidade) é testada nesta etapa, contra a hipótese alternativa de que a Absorbância do grupo de referência tende a ser maior do que a do outro grupo, a um nível de significância de 5%. Esses mesmos testes de hipóteses podem ainda ser interpretados sob o ponto de vista de intervalos de confiança, no caso, a um nível de 95% de confiança. A hipótese de grupos equivalentes não será rejeitada nos intervalos em que o valor 0 (zero) estiver contido. Por outro lado, quando o valor nulo não estiver contido

no intervalo, significa que há evidências estatísticas de que a absorvância (viabilidade) obtida por células tratadas com o meio de cultura Low Glc-, tende a ser maior do que a Absorvância obtida no grupo concorrente. Os intervalos de confiança são apresentados na Figura 4, a partir da qual é possível inferir que a absorvância (viabilidade) de células cultivadas com o meio Low Glc-, apresenta valores similares aos casos da absorvância de células tratadas por Glc e Glc/Gln+. A comparação dos demais grupos nos permite concluir que existem evidências estatísticas de que dentre os meios de cultura livres de soro, a viabilidade celular é superior nas culturas mantidas com o meio Low Glc.

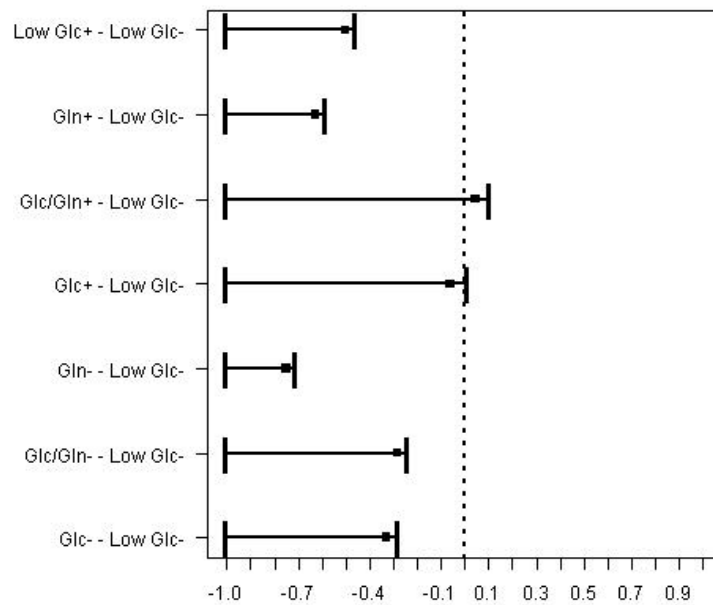


Figura 4. Comparações múltiplas das interações, através do teste de *Dunnett*, utilizando Low Glc- como controle.

5.2. CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS MORTAS

Nesta seção, estudou-se a respeito da concentração de células mortas, em cada meio de cultura, de acordo com a presença ou ausência de FBS. Os resultados apresentados foram coletados com o uso de um contador automático de células (Countess – Invitrogen ®). Inicialmente, para cada meio de cultura haviam três milhões de células.

5.2.1. Análise descritiva

Quantidades absolutas do número de células vivas e mortas são expressas na Tabela 5. Quantidades totais podem ser igualmente observadas, representando o número de células observadas por mL em cada meio de cultura. A maior quantidade de células deriva do meio de cultura de Glc/Gln, enquanto a menor quantidade foi observada no meio de cultura Low Glc. A Tabela 6 apresenta as quantidades percentuais (%).

Tabela 5. Contagens de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS.

	Glc	Gln	Glc/Gln	Low Glc
Nº de células Vivas	2045000	1240000	2535000	1060000
Nº de células Mortas	80000	70000	140000	60000
Total	2125000	1310000	2675000	1120000

Tabela 6. Percentuais (+) de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS.

	Glc	Gln	Glc/Gln	Low Glc
Vivas	96,24	94,66	94,77	94,64
Mortas	3,76	5,34	5,23	5,36
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

O uso de FBS apresentou baixas taxas de morte celular em todos os meios de cultura, com menos de 6%, enquanto o meio de cultura Glc apresentou um número menor (3,76%). Estes resultados podem ser observados graficamente, através da Figura 5.

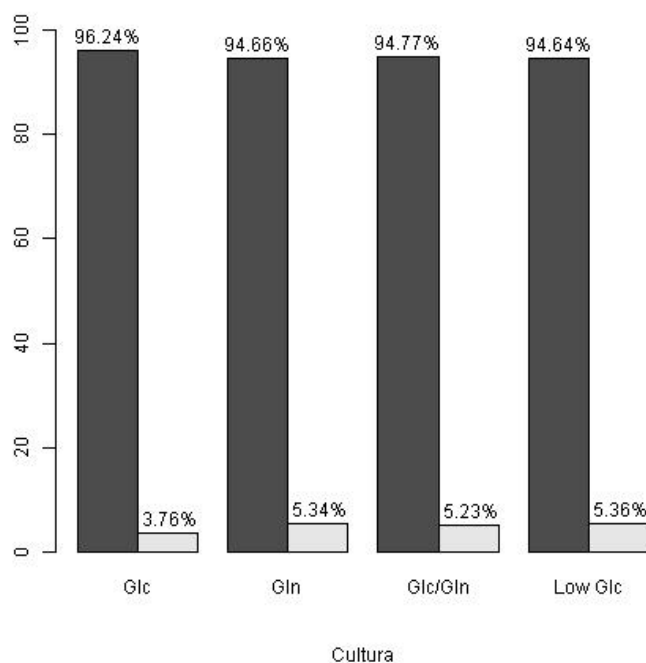


Figura 5. Percentuais de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que foi utilizado FBS. Barras em cor cinza escuro representam

as quantidades percentuais de células vivas, enquanto que barras em cor cinza claro representam as quantidades percentuais de células mortas.

Considerando a ausência de FBS, a Tabela 7 apresenta as quantidades absolutas observadas. Nesta tabela, é possível verificar que houve uma maior perda de células no meio de cultura de Baixa Glicose, enquanto uma menor perda foi verificada no meio de cultura Glc.

Tabela 7. Contagens de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS.

	Glc	Gln	Glc/Gln	Low Glc
Vivas	560000	225000	470000	415000
Mortas	55000	5000	40000	150000
Total	615000	230000	510000	565000

Para a melhor compreensão, a Tabela 8 apresenta os percentuais de células vivas e células mortas, cujos resultados são refletidos graficamente através da Figura 6. Portanto, observando o gráfico, é possível notar que apesar de existir maior viabilidade no meio de cultura Low Glc-, este meio obteve um grande número de morte celular.

Tabela 8. Percentuais (+) de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS.

	Glc	Gln	Glc/Gln	Low Glc
Vivas	91,06	97,83	92,16	73,45
Mortas	8,94	2,17	7,84	26,55
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

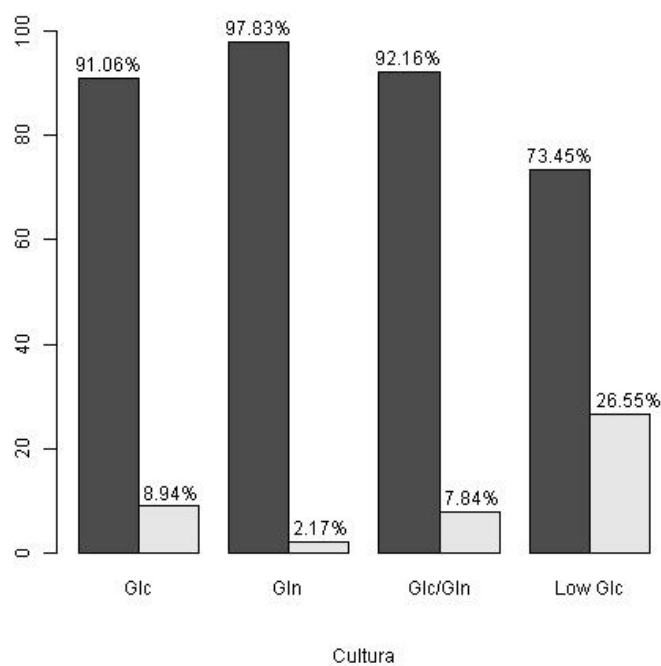


Figura 6. Percentuais de células vivas e células mortas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS. Barras em cor cinza escuro representam as quantidades percentuais de células vivas, enquanto que barras em cor cinza claro representam as quantidades percentuais de células mortas.

Além dos resultados observados, uma análise mais detalhada se fez necessária, com o intuito de investigar a relação entre o percentual de células mortas e o meio de cultura. O teste Qui-quadrado foi utilizado para esta análise.

5.2.2. Comparações de células mortas nos meios de cultura

Os intervalos de confiança percentuais de células mortas em cada meio de cultura estão exibidos na Tabela 9. Tais intervalos foram calculados com base na aproximação pela distribuição Normal (MORETTIN & BUSSAB, 2012).

Tabela 9. Intervalos com 95% de confiança para os percentuais de células mortas, de acordo com o meio de cultura.

Grupo	Glc		Glc/Gln		Gln		Low Glc	
Suplementado com FBS	3,74	3,79	5,31	5,38	5,21	5,26	5,32	5,40
Livre de soro	8,87	9,01	2,11	2,23	7,77	7,92	26,43	26,66

Do ponto de vista estatístico, vale ressaltar que o fato de alguns desses intervalos se sobreporem não implica necessariamente em evidência estatística de que as proporções de células mortas sejam as mesmas. Para avaliar a existência de evidências de associação entre o percentual de células mortas e o meio de cultura, o teste Qui-

quadrado de independência (AGRESTI, 2007) foi realizado, com base nas Tabelas A Tabela 6 apresenta as quantidades percentuais (%).

Tabela 5 e Tabela 7. Os valores-p dos dois testes encontram-se na Tabela 10, em que se pode observar fortes evidências de que a proporção de células mortas varia de acordo com o meio de cultura em ambos os casos.

Tabela 10. Valores-p das estatísticas do teste Qui-quadrado.

Grupo	Qui-quadrado calculado	Grau de liberdade	Qui-quadrado Crítico	valor-p
Suplementado com FBS	7604,739	3	7,815	<0,001
Livre de soro	136291,500	3	7,815	<0,001

Uma vez que a hipótese de independência entre o meio de cultura e a sobrevivência da célula foi rejeitada em ambos os grupos, comparações múltiplas foram realizadas para verificar diferenças de proporções. O menor percentual de células mortas encontra-se no meio de cultura de Glc, enquanto que os meios de cultura Gln e Low Glc apresentam maior percentual de células mortas, não apresentando evidências estatísticas de que possam diferir entre si.

5.3. PERDA DE CÉLULAS

Inicialmente um padrão de três milhões de células foi distribuído em cada meio de cultura. Todavia, após sete dias uma quantidade inferior foi verificada. A quantidade de células observadas varia de acordo com o meio de cultura utilizado e o uso de FBS e a quantidade de células não conseguiu detectadas foi atribuída a perda de células. Nesta seção, analisou-se a concentração de células perdidas em cada meio de cultura. Uma análise descritiva dos dados coletados é apresentada a seguir.

5.3.1. Análise descritiva

Nas Tabelas 11 e 12, encontram-se os valores absolutos das quantidades de células observadas pelo contador automático de células (*Countess – Invitrogen*®) em cada meio de cultura.

Tabela 11. Contagens de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura suplementado com FBS.

	Glc	Glc/Gln	Gln	Low Glc
Observadas	2125000	1310000	2675000	1120000
Perdidas	875000	1690000	325000	1880000
Total	3000000	3000000	3000000	3000000

Tabela 12. Contagens de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura do grupo livre de soro.

	Glc	Glc/Gln	Gln	Low Glc
Observadas	615000	230000	510000	565000
Perdidas	2385000	2770000	2490000	2435000
Total	3000000	3000000	3000000	3000000

As quantidades percentuais desses valores podem ser observadas nas Figuras 7 e 8. Na Figura 7 observamos uma menor perda (10,83%) no meio de cultura Glc/Gln, enquanto que as maiores perdas foram observadas nos meios de cultura de Gln 56,33% e Low Glc 62,67%. Os percentuais de perdas são ainda maiores nos grupos livres de soro. Na Figura 8 pode-se notar que o menor percentual de perda aconteceu no meio de cultura Glc 79,50%, enquanto o meio de cultura Gln apresentou maior concentração de perda corresponde (92,33%).

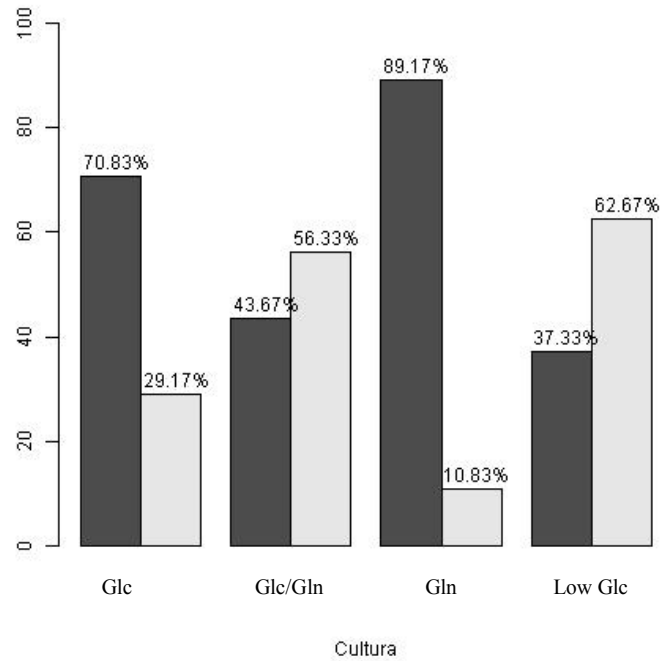


Figura 7. Percentuais de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura na situação em que os meios foram suplementados com FBS. Barras em cor cinza escuro representam as quantidades percentuais de células observadas, enquanto que barras em cor cinza claro representam as quantidades percentuais de células perdidas.

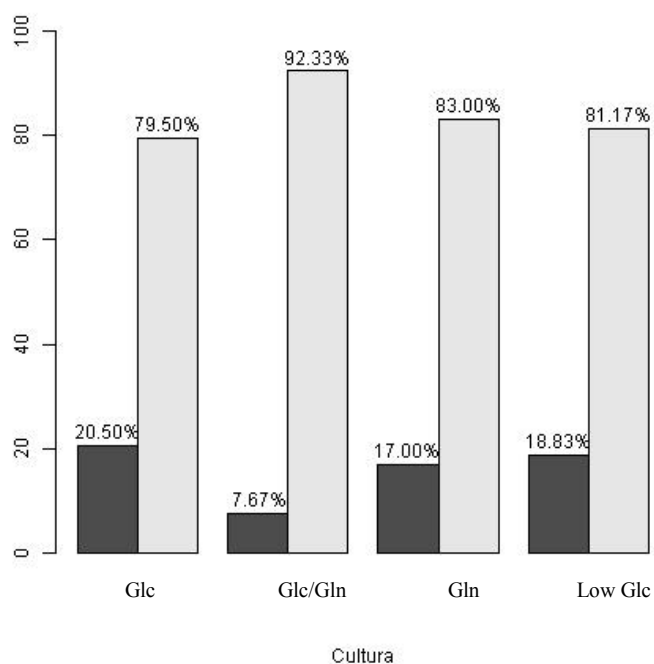


Figura 8. Percentuais de células observadas e células perdidas, por mililitro, em cada meio de cultura, na situação em que não foi utilizado FBS. Barras em cor cinza escuro representam as quantidades percentuais de células observadas, enquanto que barras em cor cinza claro representam as quantidades percentuais de células perdidas.

5.3.2. Células perdidas de acordo com os meios de cultura

Os intervalos de confiança dos percentuais de células perdidas de acordo com o meio de cultura utilizado são apresentados na Tabela 13. Tais intervalos foram calculados com base na aproximação pela distribuição normal.

Tabela 13. Intervalos com 95% de confiança para os percentuais de células perdidas, de acordo com o meio de cultura nos grupos suplementados com FBS e livres de soro.

Grupo	Glc		Gln		Glc/Gln		Low Glc	
Suplementado com FBS	29,12	29,22	56,28	56,39	10,80	10,87	62,61	62,72
Livre de soro	79,45	79,55	92,30	92,36	82,96	83,04	81,12	81,21

Considerando, por exemplo, o percentual de células perdidas no meio de cultura Glc suplementado com FBS, note que o verdadeiro percentual de células perdidas encontra-se entre 29,12% e 29,22%, com probabilidade de 95%. Interpretações análogas podem ser extraídas nos demais casos. Para avaliar a existência de evidências estatísticas da associação entre o percentual de células perdidas ao meio de cultura, o teste Qui-quadrado foi aplicado. Os valores-p dos dois testes encontram-se na Tabela 14, em que podemos fortes evidências de que a proporção de células mortas varia de acordo com o meio de cultura em ambos os casos.

Tabela 14. Valores-p das estatísticas do teste Qui-quadrado para avaliar se o percentual de células perdidas independe do meio de cultura.

Grupo	Qui-quadrado calculado	Grau de liberdade	Qui-quadrado Crítico	valor-p
Suplementado com FBS	2190071,000	3	7,815	<0,001
Livre de soro	220362,100	3	7,815	<0,001

5.4. AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS CELULARES

5.4.1. Microscópio invertido

A avaliação microscópica das estruturas celulares e sua arquitetura denotou um comportamento irregular em resposta a composição do meio de cultura, mostrando ainda que a presença de FBS no meio de cultura pode induzir transformações na morfologia celular (Figura 9).

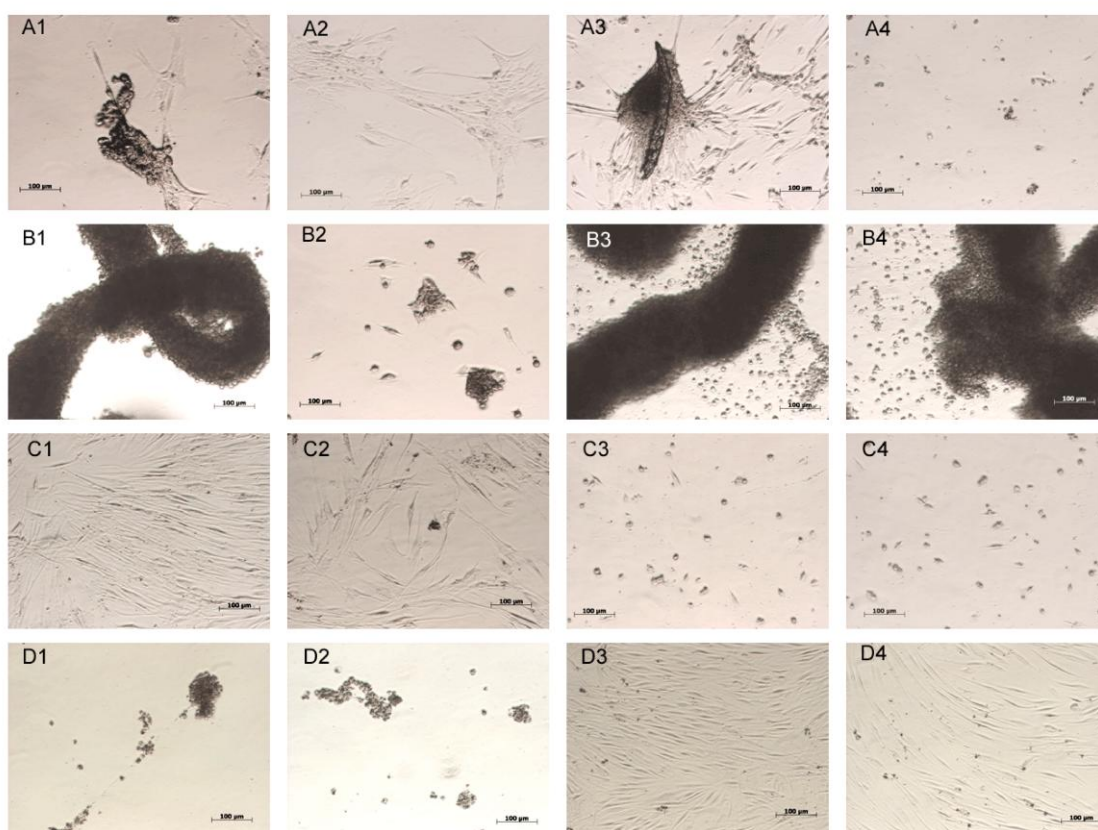


Figura 9. Avaliação microscópica de células em grupos suplementados com FBS (1,2) e livres de soro (3,4). Os meios de cultura estão dispostos na seguinte ordem: Glc com FBS (A1,A2) e grupo livre de soro (A3,A4), Gln suplementado com FBS (B1,B2) e livre de soro (B3,B4), Glc/Gln suplementado com FBS (C1,C2) e livre de soro (C3,C4) e Low Glc suplementado com FBS (D1,2) e livre de soro (D3,D4). *Scale Bar 100µm.*

Alterações nos padrões convencionais foram notadas em ambos os controles suplementados com FBS (1,2) e livres de soro (3,4). O meio de cultura Glc apresentou uma descontinuidade na adesão celular (A1-A3), exibindo um arredondamento no formato celular associado ao desprendimento com a formação de pequenos *clusters* (A4).

O meio de cultura Gln promoveu a degradação da matriz extracelular quando suplementado com FBS (B1,B2) e livre de soro (B3,B4), além de danos na adesão celular e uma sobreposição celular instável (B1,B3,B4). Desta forma, estas estruturas complexas e amorfas sugerem um papel central da glicose na síntese de matriz extracelular. Apesar do arredondamento do citoesqueleto em algumas regiões do controle livre de soro (C3,C4), o meio de cultura Glc-Gln suportou as características naturais de células em cultura, preservando a adesão e a matriz extracelular nos controles suplementados com FBS (C1,C2). O controle livre de soro do meio de cultura Low Glc demonstrou melhor padrão microscópico, preservando a arquitetura da cultura de células, com ausência de sinais de apoptose (D3,D4). Nos controles suplementados com FBS (D1,D2) foram observadas mudanças importantes, incluindo o desprendimento de células em cultura, formação de *clusters*, arredondamento do citoesqueleto e ausência de matriz extracelular.

5.4.2. Microscopia Confocal

A análise microscópica não demonstrou alterações específicas relativas a concentração de nutrientes nas circunstâncias deste estudo. Entretanto, a suplementação com FBS promoveu transformações nítidas nas estruturas celulares (Figura 10). O

citoesqueleto apresentou danos importantes e arredondamento de sua estrutura, além de fragmentação mitocondrial e alterações discretas na organização do núcleo (A1,A2,A3).

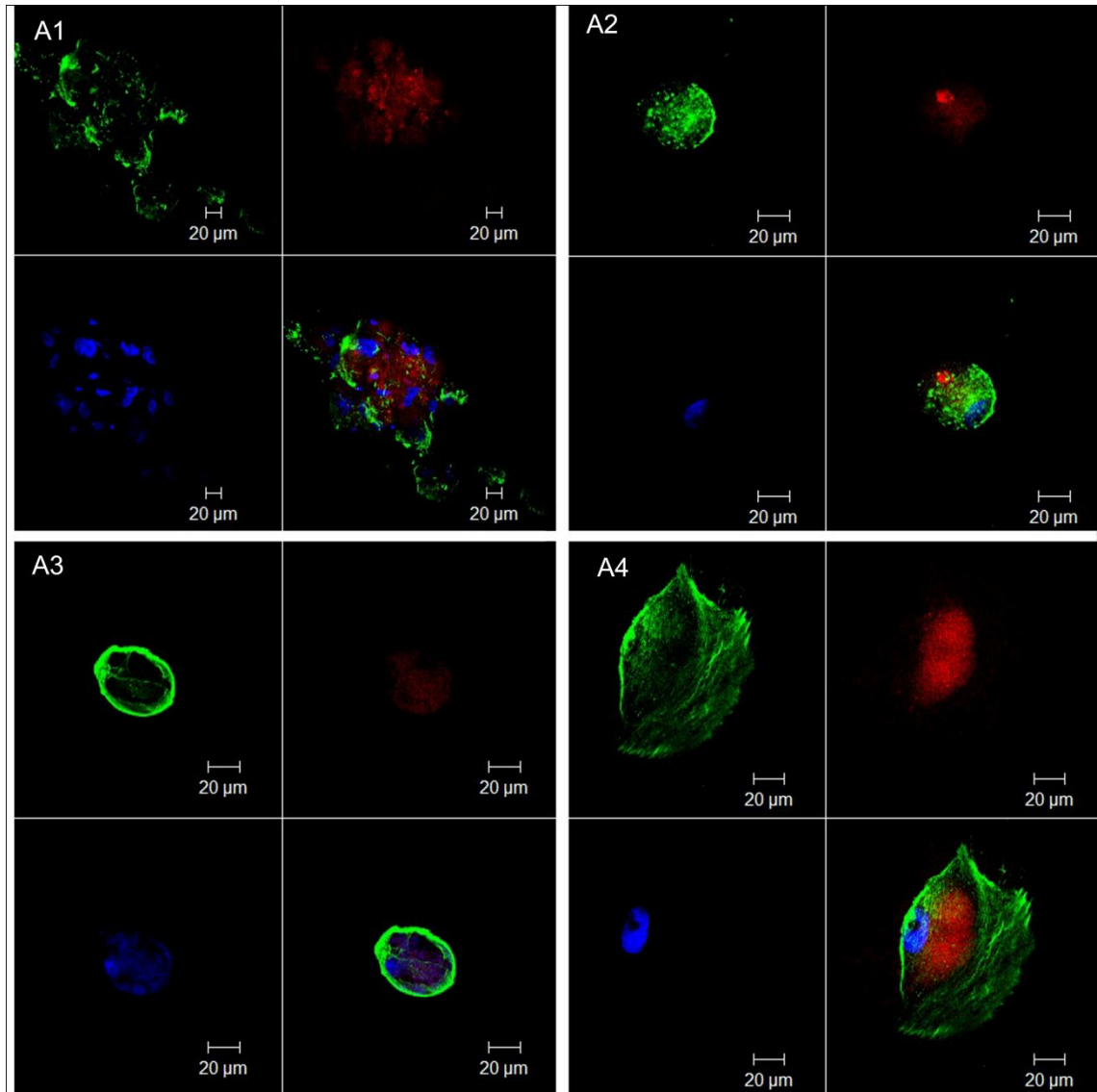


Figura 10. Microscopia confocal de células do grupo suplementado com FBS, *scale Bar 20µm.*

Os grupos livres de soro (Figura 11) também apresentaram algum dano estrutural. Entretanto, isto ocorreu em menor escala, preservando parte da configuração

clássica das estruturas de células em cultura. Prolongamentos do citoesqueleto se mantiveram presentes, suportando a adesão celular, comunicação célula-célula e proliferação (B1,B2,B3,B4), apesar de variações eventuais no contorno do citoesqueleto (B1,B3).

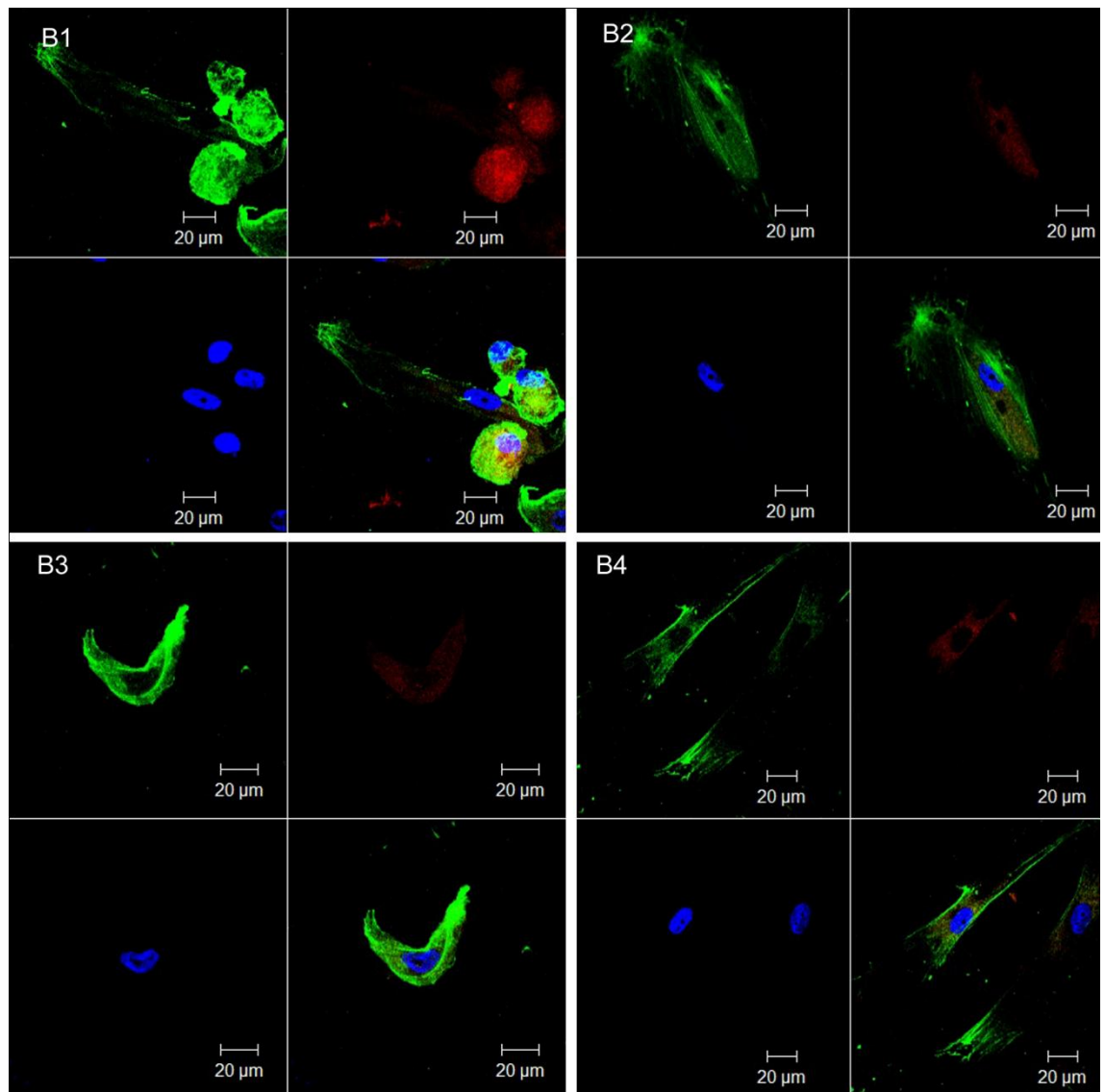


Figura 11. Microscopia confocal de células do grupo livre de soro, *scale Bar 20μm*.

6. DISCUSSÃO

Os resultados de estatísticas descritivas mostram que o meio de cultura Low Glc livre de soro promoveu padrões superiores de viabilidade celular enquanto o meio de cultura Gln apresentou os piores resultados no controle livre de soro. No controle suplementado com FBS o padrão manteve um comportamento similar, exceto para o meio Low Glc demonstrando uma redução considerável. A análise descritiva considerando a interação entre os fatores meio de cultura e FBS apresentou-se bem mais informativa do que a análise considerando cada fator individualmente. Conclusões distorcidas poderiam ser conduzidas caso esta interação fosse ignorada, visto que observamos comportamentos diferentes nos dados em cada meio de cultura, na presença e ausência de soro.

O teste ANOVA apontou uma forte interação entre o meio de cultura e o FBS, claramente observada pelo cruzamento de linhas no gráfico ($p < 0,001$). A versão não paramétrica do teste de *Dunnnett* demonstrou uma superioridade estatisticamente significativa para o grupo livre de soro do meio de cultura Low Glc sobre a viabilidade celular. Adicionalmente, os meios de cultura Gln e Glc/Gln apresentaram resultados similares quando suplementados com FBS, ilustrado pelo cruzamento dos dados na linha de referência central do gráfico ($p < 0,001$).

O teste Qui-quadrado foi aplicado na análise do efeito do meio de cultura e do FBS no número de células mortas. O intervalo de confiança sugere fortemente que a morte celular foi afetada exclusivamente pelo meio de cultura ($p < 0,001$).

Embora o meio de cultura Low Glc demonstre um padrão superior na viabilidade celular, foi observado um número considerável de células mortas neste meio de cultura. Este resultado sugere uma pequena seleção a partir da população de células viáveis.

Uma diferença estatisticamente significativa foi estabelecida entre o número de células mortas em todos os meios de cultura ($p < 0,001$). Os grupos suplementados com FBS apresentaram um menor número de células mortas em todos os meios de cultura. Estes dados indicam a presença de elementos não caracterizados no FBS, afetando a cultura celular quando associados a outros nutrientes.

Por uma perspectiva alternativa, as mudanças no fluxo de glicose e glutamina modificaram a atividade metabólica a ponto de induzir efeitos sobre a morte celular. A atividade celular é modulada de acordo com o estado metabólico e isto interfere na biologia e na função celular, uma vez que a transdução de sinais, expressão genética e metabolismo são processos que dependem da transformação de proteínas (WELLEN & THOMPSON, 2012).

Em relação a estudos anteriores, LEE *et al.* (2013) relataram a importância do monitoramento de diversas substâncias fornecidas pelo meio de cultura e sua influência sobre o comportamento celular. Adicionalmente, o presente estudo pressupõe que as condições de cultivo *in vitro* clássicas ainda são muito primitivas para garantir a preservação de características naturais do material biológico.

As células dependem de um fluxo constante de energia para manter processos mecânicos, elétricos, osmóticos e bioquímicos. Subprodutos tóxicos como amônia e lactato derivam do metabolismo da glicose e da glutamina, interferindo na viabilidade e proliferação celular e prejudicam o crescimento adequado (GLACKEN, 1988; OZTURK *et al.*, 1992; GENZEL *et al.*, 2005).

O déficit nutricional em cultura pode promover a estagnação do ciclo celular na fase G0/G1 impedindo a proliferação celular. Além disso, a modificação de proteínas da matriz extracelular representa uma consequência do abalo ao estado energético celular

(FOCK *et al.*, 2010). A construção de um material biológico para aplicação clínica requer a padronização de técnicas de cultivo, estabelecendo procedimentos adequados para a futura aplicação clínica. Nas condições do presente estudo, o estímulo ao potencial proliferativo nem sempre representa a preservação das características celulares essenciais. A literatura descreve que limitações na fonte de glicose podem induzir a alterações profundas na dinâmica celular, com reprogramação metabólica, alterações na estabilidade de proteínas e taxa de transcrição de genes (GUTTERIDGE *et al.* 2010).

De fato, estas perspectivas demonstram a importância da conservação de nutrientes na cultura de células para manutenção da biologia celular e melhora da evolução proliferativa. A utilização adequada de nutrientes na cultura de células permite a organização de propriedades específicas, contribuindo para o desenvolvimento de uma população celular densa que preserve a viabilidade natural e sua morfologia. Eventualmente, variações na concentração de nutrientes e acúmulo de substâncias indesejadas fazem parte do contexto do cultivo de células, interferindo no desempenho e na expansão da população celular. Além disso, o padrão de síntese de nutrientes pode variar de acordo com as condições de cultivo.

As reações envolvidas no processo de nutrição alcançam um alto nível de complexidade, requerendo pesquisas contínuas para guiar o entendimento de vias metabólicas inexploradas em virtude da imaturidade impostas pela visão clássica da bioquímica. A interação entre o metabolismo dinâmico e processos vitais associados a condições fisiológicas e patológicas representa um ponto chave para a aplicação conceituada de nutrientes.

No presente estudo, a avaliação da proliferação evidenciou que a adição de FBS em cultura promove a proliferação celular intensa independente do meio de cultura utilizado. Não obstante, apesar do aspecto positivo associado a suplementação com FBS, a literatura defende o emprego de meios de cultura livres de soro. Um estudo conduzido por POCHAMPALLY *et al.* (2004) mostrou que existe a seleção de uma sub-população de células-tronco mesenquimais primitivas e seguras após 21 dias de privação de FBS.

A conservação da morfologia celular é considerado um aspecto básico para o escopo da Biologia Molecular e variações típicas na configuração celular alteram as proteínas do citoesqueleto, incluindo microfilamentos intermediários, microtubos, receptores superficiais de membrana e moléculas de matriz extracelular. Os fenômenos envolvidos neste processo podem ser iniciados por uma série de fatores e substâncias presentes no meio extracelular (COSTA *et al.* 2002).

A análise microscópica exibiu algumas alterações na arquitetura de estruturas celulares após o cultivo com diferentes concentrações de glicose, glutamina e FBS. Estas alterações incluem arredondamento de citoesqueleto e redução importante ou ausência de moléculas da matriz extracelular. Isto promove um contorno assimétrico e sobreposição de células, deslocando interações da organização célula-célula, inviabilizando a proliferação e a sinalização, especialmente nas células nutridas com glutamina. Apesar da importância da glutamina para a cultura de células, acredita-se que o uso deste nutriente é efetivo apenas se conjugado a glicose.

A formação de tecidos depende da habilidade de contato e sinalização entre células e a matriz extracelular, descrita em sua morfologia como uma estrutura discreta e rígida, garantindo a firmeza e a adesão celular. Esta estrutura é altamente dinâmica,

com potencial de rápida agregação e desagregação conforme estímulos promovidos por fatores citoplasmáticos ou externos (JOCKUSCH *et al.* 1995).

Recentemente, pesquisadores demonstraram a sensibilidade de células primárias a altas doses de glicose (MA *et al.* 2012) interferindo na morfologia celular, função mitocondrial e taxa de apoptose (NING *et al.* 2012). O estado metabólico de candidatos a terapia celular pode interferir negativamente na taxa de proliferação celular, apoptose e senescência devido a hiperglicemia temporária estabelecida por processos traumáticos. Estes resultados são verificados ainda em estudos *in vitro* e *in vivo* (STOLZING *et al.* 2006; LI *et al.* 2007).

A concentração de glicose no meio de cultura (4.500 mg/L), disponível comercialmente como *High Glucose* corresponde a uma glicemia de 450 mg/dL, enquanto um meio de cultura com baixas doses de glicose (*Low glucose* – 1.000mg/L) corresponde a uma glicemia de 100,8 mg/dL (LI *et al.* 2007; WEIL *et al.*, 2009).

Apesar das barreiras existentes na comparação de reações *in vitro* e *in vivo*, sabe-se que o excesso de glicose promove danos nas propriedades biológicas e o conhecimento dos níveis adequados de glicose para determinados tipos de células representa uma prioridade para estabelecer padrões de cultivo de células. O uso isolado de glutamina revelou uma condição insuficiente para manter os requerimentos básicos responsáveis pela manutenção da adesão e da matriz extracelular.

Baseando-se nos resultados do presente estudo, acredita-se que condições individualizadas de cultivo devem ser estimuladas para promover um desenvolvimento adequado e o potencial biológico de células-tronco mesenquimais humanas. Neste contexto, o desenvolvimento de meios de cultura específicos é importante para

estimular o crescimento, proliferação, viabilidade e função, bem como todas as atividades ligadas ao uso de nutrientes.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Dadas as condições da presente investigação, a concentração de glicose correspondente a 1.000 mg/L favoreceu a viabilidade e a proliferação das células em estudo. A presença de glutamina no meio de cultura se mostrou favorável apenas quando associada a glicose. Entretanto, para determinar os requerimentos de glutamina, mais investigações são necessárias. O uso de soro animal estimulou a intensa proliferação celular, embora tenha promovido danos as suas propriedades biológicas e morfologia. No que diz respeito à viabilidade celular, observamos evidências estatísticas de que o grupo livre de soro do meio de cultura Low Glc, apresentou mais células viáveis do que todos os outros grupos. Esses resultados em conjunto, reúnem evidências de que um meio de cultura livre de soro com baixas doses de glicose elimine células que não tenham propensão a ser viáveis. Nesse sentido, o emprego da dosagem adequada de nutrientes favorece a seleção de uma população celular mais adequada para a futura aplicação clínica de células-tronco dentais humanas.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

BALLARD FJ. Cell Culture as a Tool for Identifying Nutritional Disease Therapies. *J Nutr.* 1994;124:1540S-45S.

BATOULI S, MIURA M, BRAHIM J, *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Den Res.* 2003; 82:976-81.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2:313-9.

BJARE U. Serum-free cell culture. *Pharmacology & Therapeutics.* 1992;53(3): 355-74.

BOHNSACK BL, HIRSCHI KK. Nutrient regulation of cell cycle progression. *Ann Rev Nutr.* 2004; 24:433–53.

CARREL A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med.* 1912;15(5): 516-28.

CONOVER WJ, JOHNSON ME, JOHNSON MM. A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. *Technometrics.* 1981;23(4):351-61.

COSTA KD, HUCKER WJ, YIN FC. Buckling of actin stress fibers: A new wrinkle in the cytoskeletal tapestry. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2002;52(4):266-74.

CRUZ HJ, MOREIRA JL, CARRONDO MJ. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol Bioeng.* 1999;66(2):104-13.

CURI R, LAGRANHA CJ, DOI SQ, *et al.* Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol.* 2005;204:392-401.

CURI R, NEWSHOLME P, PROCOPIO J, *et al.* Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci.* 2007;12:344–57.

DEBERARDINIS RJ & THOMPSON CB. Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? *Cell.* 2012;148:1132-44.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, YOUNG C, *et al.* Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research, Estados Unidos.* 2004;83(7):523-38.

DUAILIBI SE, DUAILIBI MT, VACANTI JP, *et al.* Prospects for tooth regeneration. *Periodontology 2000.*2006;41:177–87.

DUAILIBI SE, DUAILIBI MT, ZHANG W, *et al.* Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of Dental Research.* 2008;87:745-50.

DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, DUAILIBI NETO EF, *et al.* Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artif Organs.*2011;2(2):1-7.

EAGLE H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science*. 1955;122(3168):501-4.

ESTRELA C, ALENCAR AH, KITTEN GT *et al*. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91-8.

FALKNER E, APPL H, EDER C, *et al*. Serum free cell culture: The free access online database. *Toxicology in Vitro*. 2006;20:395–400.

FOCK RA, BLATT SL, BEUTLER B, *et al*. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein–energy malnutrition. *Nutrition*. 2010;26(10):1021–8.

GENZEL Y, RITTER JB, KÖNIG S, *et al*. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog*. 2005;21(1):58–69.

GLACKEN MW. Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio-Technology*. 1988;6(9):1041–50.

GUTTERIDGE A, PIR P, CASTRILLO JI, *et al*. Nutrient control of eukaryote cell growth: a systems biology study in yeast. *BMC Biology*. 2010;8(68):1-20.

HAM RG. Nutritional requirements of primary cultures, a neglected problem of modern biology. *In vitro*. 1974;10(1):119-29.

HIGERA GA, SCHOP D, SPITTERS TW, *et al.* Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.*2012;18(5-6):654-64.

HOOPER M. Metabolic co-operation between mammalian cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1982;651:85-103.

JOCKUSCH BM, BUBECK P, GIEHL K, *et al.* The molecular architecture of focal adhesions. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:379-416.

KONIETSCHKE F, HOTHORN L A, BRUNNER E. Rank-based multiple test procedures and simultaneous confidence intervals. *Electronic Journal of Statistics.*2011;6:1-8.

LANGER R & VACANTI JP. Tissue engineering. *Science.*1993; 260:920-6.

LEE S, KIM BY, YEO JE *et al.* New culture medium concepts for cell transplantation. *Transplantation proceedings.* 2013;45:3108-12.

LI Y, SCHILLING T, BENISCH P, *et al.* Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.*2007;363(1):209-15.

LUBINIECKI AS. Elimination of serum from cell culture medium. *Dev Biol Stand.*1999;99:153-6.

MA Z, WIRSTRÖM T, BORG LA, *et al.* Diabetes reduces β -cell mitochondria and induces distinct morphological abnormalities, which are reproducible by high glucose in vitro with attendant dysfunction. *Islets*. 2012; 4(3):233-42.

METALLO CM, HEIDEN MG. Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes & Development*. 2010;24:2717-22.

MONOD J. On the Mechanism of Molecular Interactions in the Control of Cellular Metabolism. The Upjohn Lecture of The Endocrine Society. 1966; 78:412-25.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

NAKAMURA S, YAMADA Y, BABA S, *et al.* Culture medium study of human mesenchymal stem cells for practical use of tissue engineering and regenerative medicine. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2008;18:129-36.

NING H, QIU X, BAINE L, *et al.* Effects of High Glucose on Human Cavernous Endothelial Cells. *Urology*. 2012;80(5):1162.e7-11.

OSKOWITZ A, MCFERRIN H, GUTSCHOW M, *et al.* Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Research*. 2011;6: 215–25.

OTSU K, KUMAKAMI-SAKANO M, FUJIWARA N, *et al.* Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Front Physiol.* 2014;5(36):1-10.

OZTURK SS, RILEY MR, PALSSON BO. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 1992;39(4):418–31.

PERLMAN D. Value of mammalian cell culture as a biochemical tool. *Science.* 1968;160(3823):42-6.

POCHAMPALLY RR, SMITH JR, YLOSTALO J, *et al.* Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood.* 2004;103(5):1647–52.

RAMOS FJ & KAEBERLEIN M. A healthy diet for stem cells. *Nature.* 2012;486:477-8.

REITZER LJ, WICE BM, KENNEL D. Evidence that glutamine, not sugar is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979;254:2569–676.

SARTAJ R & SHARPE P. Biological tooth replacement. *J Anat.* Oct 2006;209(4):503–9.

SLIVAC I, BLAJIC V, RADOSEVIC K, *et al.* Influence of different ammonium, lactate and glutamine concentrations on CCO cell growth. *Cytotechnology*. 2010;62:585–94.

SLIVAC I, GAURINA SV, RADOSEVIC K, *et al.* Growth characteristics of channel catfish ovary cells–influence of glucose and glutamine. *Cytotechnology*.2008;57:273–8.

SOTO-GUTIERREZ A, ZHANG L, MEDBERRY C, *et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods*.2011;17(6):677–86.

STEIN A. Decreasing variability in your cell culture. *Biotechniques*. 2007; 43(2):228-9.

STOLZING A, COLEMAN N, SCUTT A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res*.2006; 9(1): 31–5.

STUMVOLL M, PERIELLO G, MEYER C, *et al.* Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney international*. 1999;55:778-92.

SUJESH M, RANGARAJAN V, RAVI KUMAR C, *et al.* Stem cell mediated tooth regeneration: new vistas in dentistry. *J Indian Prosthodont Soc*. 2012;12(1):1-7.

TORRES JB, FREITAS MD, MÉNDEZ LL, *et al.* Evaluation of the surgical difficulty in lower third molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6):e869-74.

VATS A, BIELBY RC, TOLLEY NS, *et al.* NEREM R, POLAK JM. Stem cells. *Lancet.* 2005;366:592–602.

VARUM S, RODRIGUES AS, MOURA MB, *et al.* Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Counterparts. *PlosOne.*2011.6(6):e20914.

WAYMOUTH C. The cultivation of cells in chemically defined culture media and the malignant transformation of cell in vitro. In: Ramakrishnan CV. *Tissue Culture.* The Hague: Junk Publ;1965. p. 168-79.

WEIL BR, ABARBANELL AM, HERRMANN JL, *et al.* High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(6):R1735–43.

WELLEN KE, LU C, MANCUSO A, *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes & Development.* 2010;24:2784-99.

WELLEN KE & THOMPSON CB. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nature reviews molecular cell biology.* 2012;13:270-6.

YOUNG VR. 2001 WO Atwater Memorial Lecture and the 2001 ASNS President's Lecture: Human Nutrient Requirements: The Challenge of Post Genome Era. J Nutr. 2002;132(4):621-9.

ZIELKE HR, ZIELKE CR, OZAND PT. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. Fed Proc. 1984; 43:121-5.

ZIMMERMAN AM, VIERK JL, O'REILLY BA, *et al.* Formulation of a defined medium to maintain cell health and viability in vitro. Methods in Cell Science. 2000;22:43-9.

NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal.*
Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF;1996. 24p.
- Consulta DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.
- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo;2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

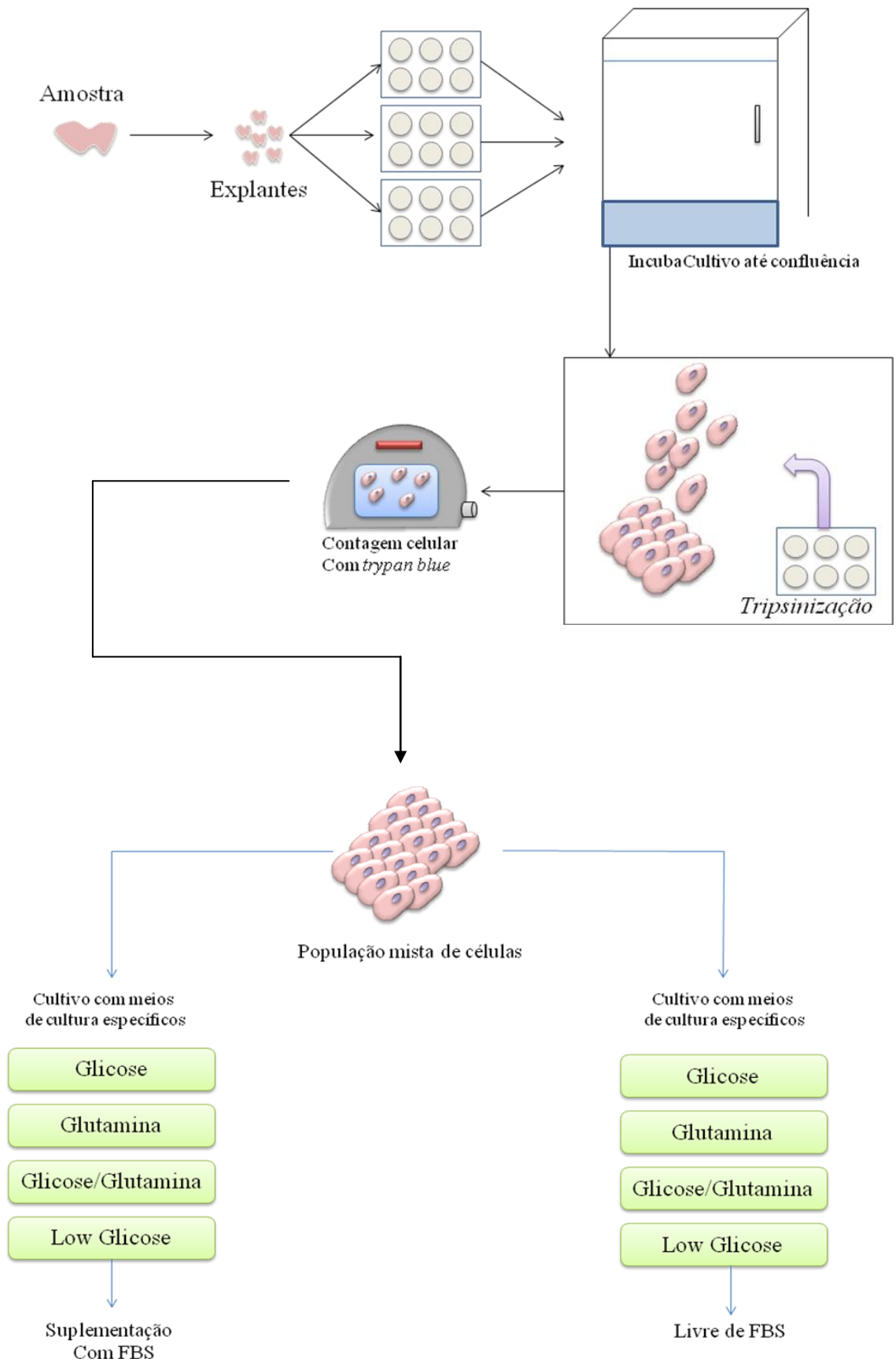
ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Monitoring the glucose and glutamine levels is a common practice in the context of cell culture. Growth pathways, genetic expression, macromolecules synthesis, purine and pyrimidine formation, and energy production are connected to glucose and glutamine metabolism. Before transplantation in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, cells need to proliferate *in vitro* and the culture conditions must be well-established. In order to preserve cell biological activity and viability following transplantation, cell nutrient requirements need to be studied. **Objective:** To evaluate microscopic behavior, morphology and viability of human mesenchymal cells under glucose and glutamine deprivation. **Materials and Methods:** Human tooth tissues were minced in isolated pieces and cultured until the desired cellular proliferation for experimental phases. The cells were cultured under variations of Glucose and Glutamine in both serum presence and absence, and then those cells were evaluated according to number and viability by MTT assay. The confocal microscopy analyzed cytoskeleton, nucleus, and mitochondria integrity. **Results:** A low concentration of glucose favored cellular viability and microscopic behavior; the presence of glutamine in culture medium was favorable only when associated with glucose. The preservation of cell biological potential in culture is possible in serum absence provided that the nutritional requirements are adequate. **Conclusion:** Cell microscopic behavior and viability has demonstrated better patterns on serum-free low glucose culture medium with glutamine deprivation. Further glutamine analysis are necessary to understand its requirements to the HDSC. The employment of the correct dose and composition of key nutrients will favor an appropriate cell population selection for future transplantation.

Key Words: Tissue Engineering, Regenerative Medicine, Culture Medium, Glucose, Glutamine.

APÊNDICE 1 - FLUXOGRAMA DOS MÉTODOS



APÊNDICE 2 - PROTOCOLO TRIPSINIZAÇÃO DE CÉLULAS

Etapas do procedimento

Retirar as células da incubadora (37°C).

Com uma pipeta, retirar o meio de cultura da garrafa T 75.

Adicionar 2 ml de PBS para remover resíduos localizados na superfície das culturas, movimentando a garrafa para que a solução cubra toda a superfície.

Repetir o procedimento.

Adicionar 1ml de tripsina e movimentar a garrafa para cobrir toda a superfície da cultura. Incubar a 37°C por 15 minutos.

Após 15 minutos, retirar a garrafa da incubadora e adicionar 5ml de meio de cultura e re-suspender a solução para homogeneizar a amostra. Levar a solução homogeneizada para um tubo falcon e repetir o procedimento.

Centrifugar as amostras a 1.500 RPM durante 10 minutos.

Retirar a amostra da centrífuga e desprezar o meio de cultura sobrenadante em Becker com hipoclorito, mantendo o pellet.

Adicionar 10ml de meio de cultura e re-suspender o pellet para homogeneizar a amostra.

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)****1 – TÍTULO DA PESQUISA – GLICOSE E GLUTAMINA NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR****2 – PROPOSTA DE ESTUDO**

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Pesquisa. Antes de decidir se quer participar ou não, é importante que entenda porque o Estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Por favor, leia com atenção as informações ou peça que as mesmas sejam lidas a você pelo profissional que está apresentando. Sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos visando responder as suas dúvidas.

O objetivo desta pesquisa é estudar o desempenho de diferentes nutrientes em células de dentes humanos *in vitro* (em laboratório), na tentativa de beneficiar a pesquisa com estas células. Para este estudo serão utilizados dentes com indicação de extração, avaliados por meio de exame clínico e radiográfico, os quais em condições normais seriam desprezados após a cirurgia. A sua participação será somente como doador do órgão dental. A obtenção das células dentais será executada em laboratório. As células serão alimentadas com nutrientes específicos (glicose e glutamina) e posteriormente avaliadas com testes pertinentes.

3 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes incluídos neste estudo deverão concordar com o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** assinando o protocolo clínico anexado.

Após os exames clínico e radiográfico e constatada a indicação de extração dental como único tratamento, você será submetido ao procedimento cirúrgico. Este procedimento é exatamente igual ao praticado na rotina odontológica e também seria realizado independente deste estudo.

4 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS

O procedimento cirúrgico consistirá na extração dentária e você poderá ser medicado com anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e analgésicos de acordo com as rotinas e necessidades clínicas pré e pós-operatórias de cirurgias de dentes inclusos.

5 - RISCOS E DESCONFORTO

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos nos procedimentos de extração dentária ocorrerão independentemente da sua participação nesta pesquisa. Os riscos e desconfortos poderão ser:

Anestesia local durante a cirurgia: dor da punção na anestesia; sensação de amortecimento na região; pressão, vibração.

No pós operatório: inchaço; dor; limitação de movimento; dor na articulação da boca; mal gosto e febre.

Todos os itens descritos são os mesmos observados em procedimentos semelhantes à extração dental de dentes inclusos. Você não deverá deixar de informar ao profissional a respeito de quaisquer dúvida ou sintomas que observar telefonando imediatamente ao

profissional responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

6 - BENEFÍCIOS

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento *in vitro* (em laboratório) das células dentais alimentadas com nutrientes específicos. Este protocolo de estudo não lhe trará benefícios diretos mas, ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. Somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de benefícios e o quanto úteis eles poderão ser.

7 - ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO

Caso você opte por não participar deste Protocolo de Pesquisa não doando o dente, o profissional responsável dispensará o mesmo jogando-o no lixo contaminado.

8 - GARANTIA DE ACESSO

Você terá acesso a todo e qualquer destino dado às células utilizadas e/ou estocadas, além dos resultados obtidos com este estudo, garantimos que em qualquer etapa, você poderá esclarecer suas eventuais dúvidas com os profissionais responsáveis pela pesquisa. Os principais investigadores são Profs. Drs. Silvio Eduardo Duailibi e Monica Talarico Duailibi que podem ser encontrados no seguinte endereço: Av. Chibarás, 452 e no telefone 011- 5051 1898. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua

Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

9 – PARTICIPAÇÃO

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa.

10 - CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários. Tanto o profissional responsável quanto a equipe envolvida, manterão em sigilo absoluto sua identidade e as informações que você vier a apresentar. Você não será identificado em nenhuma publicação onde o conteúdo do trabalho seja apresentado, garantindo o segredo profissional.

11 – ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, após a sua extração. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Se existir qualquer despesa adicional no estudo, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – COMPROMISSO

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “GLICOSE E GLUTAMINA NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR”. Eu discuti com o Dr. Silvio Eduardo Duailibi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/_____

Assinatura da Testemunha

Data: ___/___/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/_____

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE DEZOITO ANOS

Meu nome é Natasha Machado e o meu trabalho é pesquisar a nutrição das células de dente para ver qual nutriente as deixa mais vivas e saudáveis em laboratório. Queremos melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e achamos que esta pesquisa pode ajudar nisso. Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não, é você quem decide. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei.

Queremos achar melhores maneiras para tratar doenças causadas por acidentes e precisamos testar a nutrição das células de dente para manter elas vivas e saudáveis.

Estamos testando células de crianças/adolescentes que são da sua idade porque as suas células estão mais novas e mais adequadas para esta pesquisa.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Se decidir não participar da pesquisa, nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

A sua saúde é muito importante e você veio ao dentista para tratá-la. O seu dente precisa ser arrancado mesmo que você decida não participar desta pesquisa. Para participar desta pesquisa você deve doar o seu dente que seria jogado no lixo para utilizarmos em laboratório.

O uso do dente em laboratório é seguro e já foi testado em outras crianças e adolescentes. Não houve nada que nos preocupasse. Porém, se qualquer coisa incomum acontecer a você, você deverá se sentir à vontade de nos chamar a qualquer momento para falar sobre suas preocupações ou perguntas. Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. Talvez você sinta dor depois que o seu dente for arrancado, mas isso é passageiro e não tem nada a ver com este estudo.

A sua participação nesta pesquisa é muito importante para melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes. Isto irá ajudar muitas pessoas agora ou mais tarde.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não comunicaremos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Eu entendi que a pesquisa é sobre um teste nutrientes em células de dente feito em laboratório. Eu entendi que o meu dente precisa ser arrancado mesmo que eu não queira participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/___

Assinatura dos Pais ou Responsável

Data: ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/___

ANEXO II – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA

COMPONENTES	Peso Molecular	Concentração (mg/L)	mM
Aminoácidos			
Glicina	75	37.5	0.5
L-Alanina		8.9	∞
Cloridrato de L-Arginina		84	∞
L-Asparagina		13.2	∞
L-Ácido aspártico		13.3	∞
L-Cisteína 2HCl		63	∞
L-Ácido glutâmico		14.7	∞
L- Cloridrato de Histidina - H2O		42	∞
L-Isoleucina		105	∞
L-Leucina		105	∞
L- Cloridrato de Lisina		146	∞
L-Methionina		30	∞
L-Fenilalanina		66	∞
L-Prolina		11.5	∞
L-Serina		52.5	∞
L-Treonina		95	∞
L-Triptofano		16	∞
L-Tirosina disodium salt dihydrate		104	∞
L-Valina		94	∞

Vitaminas			
Fosfato de ácido ascórbico		2.5	∞
Cloreto de Colina		4	∞
D-Pantotenato de cálcio	477	4	0.00839
Ácido Fólico	441	4	0.00907
Niacinamida		4	∞
Cloridrato de Piridoxina		4	∞
Riboflavina		0.4	∞
Cloridrato de Tiamina		4	∞
i-Inositol		7.2	∞
Sais inorgânicos			
Cloridrato de Cálcio (CaCl ₂) (anid.)	111	200	1.8
Nitrato Férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)		0.1	∞
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (anhyd.)		97.67	∞
Cloreto de Potássio (KCl)		400	∞
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)		3700	∞
Cloreto de Sódio (NaCl)		6400	∞
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)		125	∞
Proteínas			
AlbuMAX® II		400	∞
Transferrina Humana (Holo)		7.5	∞
Cadeia de insulina recombinante total		10	∞

Elementos Traço			
Metavanadate de amônio		0.0003	∞
Sulfato Cúprico		0.00125	∞
Cloreto de Manganês		0.00005	∞
Selenito de Sódio		0.005	∞
Outros componentes			
D-Glucose (Dextrose)		4500	∞
Etanolamina		1.9	∞
Glutathiona (reduzida)	307	1	0.00326
Vermelho de fenol		15	∞
Piruvato de sódio		110	∞

Nota: Os meios de cultura Low Glc, Glc, Gln e Glc Gln apresentam a mesma composição química, sofrendo variações apenas nas quantidades de glicose e glutamina, conforme especificado nos métodos do presente estudo.

ANEXO III – APROVAÇÃO CEP – UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 21 de outubro de 2011
CEP Nº: 1493/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): NATASHA MENDONÇA MACHADO

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia

Pesquisadores associados: Sílvio Eduardo Dualibi (orientador), Monica Talarico Dualibi

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: O papel da glutamina na nutrição celular in vitro: proliferação e viabilidade :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo com material de descarte

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, sem procedimento invasivo

OBJETIVO DO ESTUDO: Caracterizar o efeito da glicose e da glutamina sobre a proliferação e viabilidade celular.

RESUMO: Serão considerados candidatos a participação no presente estudo os pacientes com indicação clínica de remoção do terceiro molar, de ambos os gêneros, com idade entre 14 a 20 anos. Os pacientes deverão ser saudáveis, não devem fazer uso crônico de medicamentos e deverão possuir os terceiros molares em estágios 2-3. As amostras de células humanas serão obtidas a partir do explante do capuz do terceiro molar de doadores voluntários atendidos no ambulatório de odontologia da USP no Curso de Cirurgia Buco-maxilo-facial da Fundectó, órgãos de saúde públicos ou consultórios particulares, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico. Os dentes (terceiro molar) com indicação clínica de extração serão cirurgicamente removidos, sob anestesia local. Os dentes serão transportados em meio de preservação, sob a temperatura de 37°C até o Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP. Será realizada cultura de células, na qual os explantes serão transferidos e cultivados em well plates contendo 6 poços, até que ocorra a migração e confluência de células. Após a expansão da população celular, as células serão submetidas a um déficit nutricional, padronizado com redução no percentual de concentração de FBS. Em seguida, as células serão transferidas e cultivadas em garrafas T75, em quatro meios de cultura de composição quimicamente definida, com variações específicas no conteúdo de glicose e glutamina. As células serão purificadas e identificadas por FACS, distinguidas através dos anticorpos monoclonais CD 117, CD 105 e CD 90 para células mesenquimais, CD 166 e CD 29 para células epiteliais e CD 34 para células tronco, em uma diluição de 1:10 de acordo com as instruções do fabricante. Será realizado ensaio da incorporação de Bromodeoxyuridina que mensurará o conteúdo total de Ácido Desoxirribonucléico (DNA) e a proporção de atividade celular que sintetizam o DNA. Este teste constitui uma metodologia bem estabelecida para o estudo cinético do ciclo celular. A atividade mitocondrial, estrutura do citoesqueleto e estrutura do retículo endoplasmático serão investigadas por microscopia Confocal de fluorescência por varredura a laser.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, utilizando material que seria normalmente descartado

TCLE: Adequado, contemplando a resolução 196/96

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Será submetida à FAPESP - R\$35.585,28

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 12 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 15/10/2012 e 10/10/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

FINANCIAMENTO

Configuram como parceiros do Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação - UNIFESP a Faculdade de Engenharia de Materiais, Química e Mecânica da UNICAMP, a FAPESP vinculada ao Projeto JP 07/51227-4, o CNPq vinculado ao projeto nº 573661/2008-1 do INCT Biofabris (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biofabricação) e FAPESP 08/57860-3, além do apoio da Rede Ibero-Americana de Biofabricação – Cytel.

O presente projeto possui auxílio regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP 2013/06877-1.

FONTES CONSULTADAS

AGRESTI A. An Introduction to Categorical Data Analysis. 2^a ed. Nova York: John Wiley & Sons; 2007. 357p.

BOX GE, HUNTER J, HUNTER WG. Statistics for experimenters. 2^a ed. Hoboken: Wiley-Interscience; 2005. 655p.

EFRON B & TIBSHIRANI RJ. An introduction to the bootstrap. New York: Chapman & Hall, 1994. 456p.

FOX J & WEISBERG S. An R companion to applied regression. 2^a ed. Los Angeles: Sage, 2011. 312p.

MORETTIN PA & BUSSAB WO. Estatística básica. 7^a ed. São Paulo: Saraiva, 2012. 568p.