

MARCO ANTONIO MATTAR

**MODELO DE COMPRESSÃO CONTÍNUA NA
CULTURA DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde.**

SÃO PAULO

2015

MARCO ANTONIO MATTAR

**MODELO DE COMPRESSÃO CONTÍNUA NA
CULTURA DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Lydia Masako Ferreira

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

COORIENTADORA: Prof^ª. Silvana Gaiba

SÃO PAULO

2015

Mattar, Marco Antonio.

Modelo de compressão contínua na cultura de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano./Marco Antonio Mattar. -- São Paulo, 2015.
xvii, 107 f.

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

Título em inglês: Continuous compression model in fibroblast culture derived from human periodontal ligament.

1. Ligamento periodontal. 2. Sobrevivência celular. 3. Apoptose. 4. Técnicas de culturas de células.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

À Deus pela oportunidade da vida.

*Aos meus pais, **ASSIB MATTAR e ALICE ASTROGILDA HUTTER***

***MATTAR**, in memoriam,*

*aonde estiverem, estarão felizes por esta conquista. **NUNCA** os esquecerei.*

*À minha querida irmã, **LUZ MARA HUTTER MATTAR**, que mesmo*

longe, a distância

nunca nos separará.

*À minha amada esposa, **CHRISTIANE FATIMA CASSEMIRO***

***MATTAR**, amiga e confidente que sempre me apoiou.*

*Aos meus queridos filhos, **SOPHIE CASSEMIRO MATTAR, MURILLO***

***CASSEMIRO MATTAR e JULLIE CASSEMIRO MATTAR**, razões da*

minha vida.

Agradecimentos Especiais

*À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA**,
TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA TRANSLACIONAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, *um exemplo de
pesquisadora, pela oportunidade e confiança depositada em minha pessoa
para a execução deste trabalho.**

*Ao meu coorientador **Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALOISE**,
ORIENTADOR DO PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL
EM REGENERAÇÃO TECIDUAL E FERIDAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO PAULO, *que sempre me incentivou e sempre
acreditou no meu potencial.**

*À minha coorientadora **Prof^a. Dr^a. SILVANA GAIBA**,
PESQUISADORA DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE CÉLULAS
DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO PAULO *por sua colaboração neste trabalho.**

Meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

*Ao Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO, COORDENADOR DO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO,
pelo incentivo e apoio aos pós graduandos e docentes.*

*Ao Prof. NEIL FERREIRA NOVO, PESQUISADOR DA PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
SANTO AMARO e Prof^a. IARA JULIANO, meu muito obrigado pelas
orientações.*

Agradecimentos

Aos colegas de laboratório e PÓS GRADUAÇÃO **ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS, ALLAN ZIMMERMANN, MARCELO MELO SOARES, MARCELO OLIVEIRA SANTOS, FABIANA ZANATA e ROSANA MIEKO YAMAMOTO.**

Obrigado pela convivência e pelos momentos compartilhados.

À todos os professores do Programa de PÓS GRADUAÇÃO em Cirurgia Translacional pelos seus ensinamentos.

Às secretarias do programa de PÓS GRADUAÇÃO **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS,** *agradeço de coração o empenho em resolver minhas solicitações e agradeço pela paciência com que tratam os pós graduandos deste programa.*

Agradecimentos

*Ao meu grupo de trabalho, **FABIO SCHEMANN MIGUEL**, grande amigo e incentivador, **DELAINE PIRES ROMÃO** e **MATEUS DE ABREU PEREIRA**, pela amizade, incentivo e dedicação para que este trabalho tornasse realidade.*

*Ao meu amigo **ANTONIO CARLOS DONATO** pelo incentivo e disponibilidade em sempre ajudar, obrigado.*

*Ao COORDENADOR DO SETOR DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAL – HOSPITAL MUNICIPAL DE URGÊNCIAS DE GUARULHOS, **PÉRSIO BIANCHINI MARIANI** pela oportunidade de poder trabalhar no ambulatório do HMU para a aquisição dos dentes usados neste experimento.*

“A soberania do homem está oculta no seu conhecimento.”

Francis Bacon – filósofo inglês.

1561-1626

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTAS	xi
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	05
3. LITERATURA.....	07
4. MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS.....	58
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS.....	77
NORMAS ADOTADAS.....	85
ABSTRACT.....	87
APÊNDICES.....	89
ANEXOS.....	103
FONTES CONSULTADAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Terceiro molar superior esquerdo após a extração dentro do tubo de 15 mL com meio de transporte (meio de cultura Alpha-MEM suplementado com antibióticos e antifúngico).....	39
Figura 2 – Raspagem do terço médio das raízes com lamina de bisturi nº 12 dentro do fluxo laminar para a obtenção do fragmento de ligamento periodontal.....	40
Figura 3 - Placa milimetrada de 4 mm ² usada para aferição da quantidade de tecido periodontal coletado do terço médio da raiz do terceiro molar.....	41
Figura 4 – Fragmento de tecido periodontal sendo colocado dentro do tubo cônico de 15 mL para lavagem do material coletado.....	41
Figura 5 – Agitação manual para lavagem do material coletado por quatro vezes em quatro tubos diferentes. Cada período de agitação foi em média de 60 segundos.....	42
Figura 6 – Contador de células automático usado para a contagem de células viáveis após o <i>pellet</i> celular ser ressuspensionado.....	43
Figura 7 – Colágeno de alta pureza tipo I (PureCol [®]).....	45
Figura 8 – Substrato de colágeno aplicado na placa de seis poços 24 horas antes da semeadura das células.....	46
Figura 9 – Peso aplicado sobre as células.....	47
Figura 10 – Modelo de cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm.....	48
Figura 11 – Esfera de aço inoxidável dentro do cubo de acrílico.....	48

Figura 12 – Cubo de acrílico e esfera de aço inoxidável dentro da placa de seis poços	49
Figura 13 - Fibroblastos do ligamento periodontal no grupo controle 2D.....	50
Figura 14 – Fibroblastos do ligamento periodontal no grupo controle 3D	51
Figura 15 – Meio de cultura Alpha-MEM dentro da placa de seis poços sem o substrato de colágeno – grupo controle sem compressão.....	51
Figura 16 - Modelo de compressão sem o substrato de colágeno (monocamada) usado nos grupos experimentais GE3 e GE4.....	52
Figura 17 – Substrato de colágeno e meio de cultura Alpha-MEM dentro da placa de seis poços – grupo controle sem compressão.....	52
Figura 18 – Modelo de compressão com substrato de colágeno usado nos grupos experimentais GE3 e GE4.....	53
Figura 19 Citômetro de fluxo <i>Guava EasyCyte HT</i> utilizado para a avaliação da apoptose, necrose, viabilidade e ciclo celular.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das médias das porcentagens de apoptose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o <i>Kit</i> Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).....	62
Tabela 2. Valores das médias das porcentagens de necrose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o <i>Kit</i> Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).....	62
Tabela 3. Valores das médias das porcentagens de viabilidade celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o <i>Kit</i> Guava Via Count (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).....	63
Tabela 4. Valores das médias das porcentagens do ciclo celular, fase sub G0 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o <i>Kit</i> Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).....	63
Tabela 5. Valores das médias das porcentagens do ciclo celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o <i>Kit</i> Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D – cultura celular em monocamada

GC – grupo controle

GE3 – grupo experimental 3 g

GE4 – grupo experimental 4 g

LPH – ligamento periodontal humano

PBS – *Phosphate buffered saline*

3D – cultura celular com substrato de colágeno

RESUMO

RESUMO

Introdução: Modelos de estudos *in vitro* são considerados como padrão ouro para análises de atividades celulares que visam mimetizações da dinâmica das células *in vivo*, inclusive quando as amostras celulares são submetidas à compressão estática. Células quando cultivadas sob um substrato representam a estrutura natural e função dos tecidos *in vivo* no que diz respeito à fisiologia, forma da célula e seu ambiente. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade e morte celular no modelo de compressão contínua na cultura de fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal. **Métodos:** Foram selecionados 10 pacientes, submetidos à extrações dos 4 terceiros molares inclusos por indicação ortodôntica. A amostra consistiu de 4 mm² de tecido periodontal do terço médio das raízes. A mesma foi cultivada até a 6^a passagem e depois as células foram divididas em dois grupos: Grupo Controle (GC), com cultivo em monocamada e substrato sem aplicação de força durante 6h e Grupo Experimental (GE3 e GE4), com cultivo em monocamada e substrato com aplicação de carga de 3 e 4 g/cm² durante 6h. **Resultados:** Tanto o GC quanto o GE3 e GE4, monocamada e substrato, não apresentaram diferença estatística nos valores de viabilidade celular e apoptose. Com o aumento da carga o GE4 indicou maior necrose em relação ao GC e o GE3. **Conclusão:** Não houve diferença na utilização de substrato de colágeno na cultura de fibroblastos periodontais em nenhum dos parâmetros avaliados, mas houve maior necrose com o aumento da carga na avaliação intragrupos.

Descritores: Ligamento periodontal, Sobrevivência celular, Apoptose, Técnicas de cultura de células.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cultura celular é caracterizada por permitir a manutenção e proliferação de células vivas em laboratório, independente do organismo que a originou. Dentre as vantagens da cultura celular pode-se citar os parâmetros fixos como o controle da temperatura, oxigenação, osmolaridade, controle do pH e CO₂ (SANT'ANA *et al.*, 2002). As células que residem, proliferam e se diferenciam no organismo vivo estão dispostas em um micro ambiente tridimensional (3D) conhecido como matriz extracelular (MEC). Esta matriz é uma estrutura complexa, formada a partir de componentes sintetizados e depositados no exterior da superfície celular (colágenos, glicoproteínas e proteoglicanas) os quais fornecem integridade estrutural e funcional para os tecidos conjuntivos e órgãos (DALEY *et al.*, 2008; CHEN & JIN, 2010). Várias tentativas têm sido feitas no sentido de estabelecer um sistema de cultura que mimetize as interações entre células e MEC, como ocorre *in vivo*. Para reconstituir o ambiente *in vivo*, células devem aderir e crescer adequadamente nos arcabouços ou substratos tridimensionais (3D) facilitando assim o contato célula-célula e a expressão do fenótipo esperado (MINUTH *et al.*, 1998; GRIFFITH, 2002). As células cultivadas em matriz 3D representam mais de perto a estrutura natural e função dos tecidos *in vivo* no que diz respeito à fisiologia, forma da célula e seu ambiente (MUELLER-KIESER, 1997; CHEVALLAY & HERBAGE, 2000; XU *et al.*, 2009).

A mecanotransdução pode ser definida como o estímulo mecânico sobre a célula e tem sua aplicação na fisiologia humana por meio da Lei de

Wolff - “Ossos respondem dinamicamente à presença ou ausência de tensão com mudanças de tamanho, forma e densidade”.

Quando uma carga é aplicada sobre a célula, a mesma pode se diferenciar (células viáveis) ou morrer (apoptose e necrose).

A forma de se obter a resposta da atividade celular quando a célula é submetida à uma carga é a partir de um modelo de estudo. O modelo mais complexo para este fim é o que poderia simular as condições próximas à existente no ligamento periodontal humano (LPH) porque esta é uma estrutura altamente diferenciada. O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo que preenche o espaço entre a raiz do dente e sua loja óssea alveolar. Como outros tecidos conectivos, é constituído por fibras, principalmente colágenas, envolvidas por uma matriz gelatinosa juntamente com células, vasos sanguíneos e nervos. A função principal do ligamento periodontal é reter o dente no osso alveolar maxilar e mandibular. A indução da remodelação óssea por meio da aplicação de forças fisiológicas ou mecânicas é muito importante. As forças de compressão estática são estímulos mecânicos importantes no ligamento periodontal e tem uma estreita relação com os movimentos dentários terapêuticos. As respostas iniciais e tardias dos genes relacionados ao estresse compressivo nas células do ligamento periodontal podem contribuir para o movimento dentário mecânico ou para a remodelação óssea alveolar (LEE *et al.*, 2007).

Assim como outros tecidos conjuntivos, o ligamento periodontal é um tecido onde predominam os fibroblastos, mas também pode-se encontrar células mesenquimais indiferenciadas e células epiteliais. As células do ligamento periodontal formam, reparam e mantêm não só o

próprio ligamento como também o osso alveolar e o cimento radicular (ANDERSEN & NORTON, 1991; LEKIC & MCCULLOCH, 1996; BASDRA, 1997; BUMANN *et al.*, 1997; ZENTNER *et al.*, 2000; LE GALL & SASTRE, 2010). Além disso, as fibras do ligamento periodontal estão continuamente em remodelação para se adaptarem às alterações de estresse a que são submetidas (REDILICHA, 2004; NAKAGIMA *et al.*, 2008; HACOPIAN *et al.*, 2011).

Os fibroblastos do ligamento periodontal desempenham um papel importante nos processos de remodelação óssea e movimentação por meio de uma força mecânica induzida pela produção de várias enzimas e citocinas ativas, incluindo o RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β), RANKL (Ligante) e a OPG (Osteoprotegerina) (YOUSEFIAN, 1995; KOHNO *et al.*, 2002; NISHIJIMA *et al.*, 2006; TAN *et al.*, 2009; KOOK, JANG, LEE, 2011; NOTOMI, EZURA, NODA, 2012; ZHU *et al.*, 2013). Em resposta à pressão exercida por forças biomecânicas induzidas, os fibroblastos do ligamento periodontal podem iniciar uma cadeia de eventos na movimentação dentária, incluindo remodelação óssea alveolar (NAKAGO-MATSUO *et al.*, 1996). Estas células cultivadas em géis de colágeno 3D experimentam um ambiente mais rico, complexo, física e geometricamente muito diferentes do que células em superfícies 2D.

O sistema de cultura em substratos tridimensionais tem a finalidade de promover a propagação celular por meio do uso de suportes de matriz 3D. Este modelo de estudo envolvendo a mecanotransdução, por meio da compressão contínua de células, poderá oferecer a resposta da viabilidade e morte celular.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a viabilidade e morte celular no modelo de compressão contínua na cultura de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano.

LITERATURA

3. LITERATURA

NYMAN *et al.* (1982) sugeriram a heterogeneidade dos fibroblastos presentes no periodonto com fenótipo único e atividade funcional distinta. Enquanto os fibroblastos gengivais garantem a síntese e integridade do tecido conjuntivo gengival, os fibroblastos dos ligamentos periodontais com funções especializadas são responsáveis pela formação e manutenção do ligamento periodontal, além do reparo, remodelamento e regeneração do cemento e osso alveolar adjacente, *in vivo*.

MACDONALD (1990) afirmou que a cultura celular é uma tecnologia indispensável nos ramos das ciências biológicas, pois fornece bases para o estudo da proliferação celular, diferenciação e formação de produtos em condições cuidadosamente controladas. A técnica de cultura celular contribuiu significativamente na pesquisa do genoma humano e nas vias de sinalização intra e intercelular, que regulam a expressão gênica. A cultura celular é utilizada em grande escala para o crescimento de vírus, a produção de vacinas, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, a produção de substâncias farmacêuticas, como hormônios, enzimas, fatores de crescimento e coagulação, manipulada por técnicas de DNA recombinante.

YOUSEFIAN *et al.* (1995) desenvolveram um aparelho para aplicar pressão hidrostática dinamicamente às células do ligamento periodontal (PDL) *in vitro*. O objetivo desta pesquisa foi construir este aparelho e

determinar seus efeitos nas células do PDL. Foram colhidas células do PDL humano de pré-molares recentemente extraídos. As células foram estimuladas mecanicamente por este aparelho em diferentes magnitudes de pressão hidrostática contínua positiva ou negativa (PHP ou NHP), respectivamente. A aplicação de PHP entre 0.3 e 30 g/cm² aumentou significativamente a produção de prostaglandinas E (PGE) e de AMP cíclico (cAMP) intracelular. Em contraste, a estimulação por NHP diminuiu significativamente a produção de PGE e o nível intracelular de cAMP. A taxa de proliferação celular aumentou significativamente nas primeiras 24 e 48 horas após a estimulação com -30 g/cm² de NHP. Em contrapartida, a estimulação com +30 g/cm² de PHP diminuiu significativamente a taxa de proliferação dessas células em 24 e 48 horas. A estimulação entre +30 a +60 g/cm² aumentou a largura e o comprimento das células e pareceu aumentar a superfície de adesão ao fundo das placas de cultura. Em contraste, NHP (entre -30 e -60 g/cm²) diminuiu essas dimensões e pareceu reduzir a superfície de fixação. Esses resultados indicaram que este tipo de perturbação mecânica das células do PDL produzem respostas fisiológicas e não é prejudicial à vitalidade das células.

NAKAGO-MATSUO *et al.* (1996) cultivaram fibroblastos do ligamento periodontal que foram expostos à mudança controlada de pressão hidráulica e depois monitorados constantemente com um medidor de pressão elétrica (Gauge). A concentração de cálcio intracelular foi medida em tempo real, por um corante fluorescente de ligação ao cálcio, fluo-3. A elevação da pressão hidráulica, para um nível que variou de 20 a 50 mm Hg, induziu a elevação transitória da concentração de cálcio intracelular em cerca de 10% dos fibroblastos observados, indicando que

estas células poderiam responder à mudanças de pressão. Os resultados mostraram que os fibroblastos do ligamento periodontal, em resposta à pressão exercida pela força ortodôntica, poderiam iniciar uma cadeia de eventos na movimentação ortodôntica, incluindo remodelação óssea alveolar. O nível de limiar de pressão (27 a 68 mm Hg) obtidos neste experimento, no qual os fibroblastos começaram a responder, forneceria uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para clínica ortodôntica.

BUMANN *et al.* (1997) afirmaram que o processo dinâmico de remodelação que ocorre no ligamento periodontal (PDL) é representado pela reação das células do PDL à simulação de diferentes forças ortodônticas, principalmente pela degradação e síntese de colágeno tipo I, III, V, VI, XII e XIV. A proposta deste estudo foi de quantificar os tipos específicos de colágeno encontrados no PDL nas zonas de tensão e compressão dos dentes experimentais. As mudanças ocorridas no tecido poderiam então ser correlacionadas com a degradação tecidual ocorrida nos tecidos estimulados com forças ortodônticas. Pré-molares superiores e inferiores de três pacientes femininos e um masculino foram movimentados com *box loop* por um total de 14 dias antes de serem extraídos. Os dentes colaterais tanto da maxila quanto da mandíbula não foram movimentados e foram utilizados como grupo controle. Um total de sete dentes no grupo experimental e sete no grupo controle foram utilizados nesta investigação. A raspagem de fibroblastos do PDL do terço cervical das raízes (correspondentes à área de tensão e compressão) dos dentes experimentais e também dos dentes controle, foram submetidas a meio de cultura *in vitro* a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂/95 por % de ar. A

síntese de colágeno dos tipos I, III, V e VI foi quantificada utilizando o método ELISA. A aplicação de forças ortodônticas nos dentes experimentais mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) da síntese de colágeno de todos os tipos na região de compressão. O oposto do que ocorreu na região de tensão. Não houve diferença significativa na comparação da síntese de colágeno das áreas de compressão e na distribuição proporcional dos tipos de colágeno entre os dentes da maxila e mandíbula. O metabolismo de colágeno em resposta ao estímulo ortodôntico foi maior nas zonas de compressão e menor nas zonas de tensão. Contrário ao que é normalmente descrito na literatura, os achados indicaram que, em adição à reabsorção óssea, a remodelação tecidual é muito ativa nas zonas de compressão após o desaparecimento das áreas de hialinização. Esses achados constituíram um modelo para futuros estudos do metabolismo do colágeno durante o movimento ortodôntico.

BRASDA (1997) enfatizou que o entendimento dos fundamentos biológicos da movimentação dentária é crucial para a ortodontia. A identificação dos componentes dos sinais de transdução iniciados após a aplicação de força permitiu a sua manipulação levando a melhores resultados. Para examinar os efeitos da estimulação mecânica no periodonto, células do ligamento periodontal foram isoladas, colocadas em meio de cultura e caracterizadas. Em contraste com os fibroblastos gengivais, os fibroblastos do periodonto humano exibiram características típicas dos osteoblastos. Para entender o papel da estimulação mecânica, forças ortodônticas relevantes foram simuladas *in vitro*. Para isso, as células do ligamento foram colocadas em meio de cultura em placas de Petri com fundo flexível que permitiu ser esticado através de um modelo

convexo, de forma que as células aderentes também foram estiradas. O resultado deste experimento demonstrou que as células do ligamento periodontal humano responderam ao estiramento mecânico por sinais de transdução que provavelmente incluíram pequenas proteínas ligantes de GTP (Guanosina Trifosfato) e fatores de transcrição (c-Jun e c Fos).

SANT'ANA *et al.* (2002) concluíram que os estudos *in vitro* para análise da viabilidade de procedimentos que visem a regeneração periodontal possibilitaram o controle do microambiente e a homogeneidade dos tipos celulares envolvidos. O objetivo deste estudo foi estabelecer e caracterizar uma linhagem contínua de células derivadas do ligamento periodontal humano. Estas células foram obtidas por meio da técnica do explante de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de 3^{os} molares extraídos por razões não periodontais de três pacientes saudáveis, sem sinais clínicos ou radiográficos de doença periodontal. Posteriormente, as células foram caracterizadas por meio de microscopia de luz (contraste de fase), padrão de crescimento, testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos para confirmação da sua natureza. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para anticorpos contra vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anti-citoqueratina (AE1/AE3), actina e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados *in vitro* pelas células foi confirmada pelo teste de Von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas do ligamento periodontal e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos *in vitro*.

KOHNO *et al.* (2002) apresentaram um trabalho com o objetivo de investigar as forças leves para a movimentação dentária experimental. O método utilizado incluiu o uso de forças ortodônticas leves de 1, 2, 3, 6, 6,5 e 10 g de força (gf) que foram aplicadas por 14 dias para movimentar molares de ratos, e foram examinados os efeitos das forças sobre a taxa de movimento do dente e as alterações do periodonto. Os resultados foram obtidos no período inicial, a despeito dos diferentes níveis de força utilizados em cada grupo, que não haviam diferenças significativas no deslocamento dentário. Da hora 56 ao dia 14, o deslocamento do dente no grupo de 1,2 gf foi significativamente menor do que nos outros grupos e a taxa foi quase constante. As taxas de deslocamento do dente nos grupos de 3,6, 6,5, e 10 gf variou repetidamente, enquanto as forças ortodônticas diminuíram gradualmente. Concluiu-se que a movimentação dentária experimental em ratos, deslocando sem atrito sob forças leves, era constante ou oscilava em ciclos com vários dias de duração. Essa conclusão foi contraditória com a teoria de três fases do movimento dentário descrito em pesquisas anteriores usando forças pesadas.

REDILICHA (2004) descreveu que a capacidade das fibras elásticas de responder a estímulos mecânicos sugere que essas fibras desempenhavam um papel central na adaptação fisiológica a estímulos externos, incluindo aplicação de força ortodôntica. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito de pressão externa simulando força ortodôntica na tropoelastina, que é a expressão gênica em culturas de fibroblastos do tecido do ligamento periodontal humano (hPDLF). A simulação de pressão externa foi obtida por centrifugação durante 10, 30, 60, 90 e 120 min dos hPDLF num rotor horizontal de microplacas. Análise semi-quantitativa

RT-PCR da tropoelastina mRNA foi realizada e b-actina foi utilizada como um controle interno não variável. Enquanto a força centrífuga nos níveis de mRNA da b-actina mostrou quase nenhuma mudança, os níveis de mRNA da tropoelastina aumentou significativamente para um nível de pico de mais do que quatro vezes depois de 30 min. Posteriormente, aos 60 min, foram mantidos os níveis de mRNA em mais de três vezes. Após 90 minutos, o nível de mRNA reduziu-se ao nível controle. Os achados de que não houve mudanças nos níveis de mRNA de b-actina ocorreu durante os primeiros 90 minutos de centrifugação valida a sua utilização como um controle do gene não variável nesse modelo experimental. Este estudo demonstrou que tropoelastina foi expresso em hPDLF e que a pressão causou uma significativa maior regulação (*upregulation*) dependente do tempo do gene tropoelastina. A capacidade de resposta do gene tropoelastina para forças mostrou sua possível importância clínica no movimento dentário ortodôntico. Mais estudos, contudo, serão essenciais a fim de saber se a expressão elevada do gene *in vitro* também seria seguido por síntese da proteína correspondente e deposição *in vivo* na matriz extracelular (ECM) do ligamento periodontal (PDL).

NISHIJIMA *et al.* (2006) realizaram um estudo para determinar os níveis de ativadores de receptores de NFkB ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) no fluido crevicular gengival (GCF) durante os movimentos dentários ortodônticos. Um segundo objetivo foi investigar o efeito da força de compressão no RANKL e produção de OPG pelas células do PDL humano (hPDL). Dez pacientes adolescentes foram incluídos. O GCF foi coletado da margem cervical distal dos dentes experimentais e controle a 0,1, 24 e 168h após a força de retração ser aplicada. Este estudo

in vitro foi feito para examinar a secreção de RANKL e OPG das células do hPDL após a aplicação de força de compressão (zero, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0 g/cm² por 48hs). Foram utilizados *Kits* de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) para determinar os níveis de RANKL e níveis de OPG no GCF e no meio condicionado. Encontraram que os níveis de RANKL no GCF foram significativamente mais altos, e os níveis de OPG foram significativamente mais baixos nos caninos experimentais do que nos dentes controle em 24h, mas não houve diferença estatisticamente significante a 0,1 ou 168h. Os estudos *in vitro* indicaram que a força de compressão aumentou significativamente a secreção de RANKL e diminuiu a de OPG nas células do hPDL de uma forma dependente do tempo e magnitude da força. A secreção de RANKL estimulada pela compressão aumentou aproximadamente 16.7 vezes e a de OPG diminuiu 2.9 vezes, comparada com o grupo controle. Os resultados obtidos sugeriram que as alterações da quantidade de RANKL e OPG poderiam estar envolvidas na reabsorção óssea como resposta à força de compressão.

LEE *et al.*, (2007) confirmaram que forças compressivas eram estímulos mecânicos importantes no PDL e tinham uma estreita relação com os movimentos dentários terapêuticos. Neste estudo, foram avaliadas as respostas iniciais e tardias dos genes relacionados ao estresse compressivo nas células do PDL. Particularmente, a expressão de interleucina (IL) - 6, IL-8 e fosfatase alcalina (ALP) foram estudadas. As culturas primárias de células do PDL foram cultivadas em gel de colágeno tridimensional e receberam força estática de compressão contínua (1.76 g/cm²). Os genes expressados foram examinados por ensaios de microarranjos cDNA em 2 ou 12 horas após a iniciação da aplicação de

força mecânica. Os genes de interesse que mostraram alterações de expressão significantes no ensaio de microarranjo cDNA foram analisados posteriormente por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISA) e ensaios ALP. As ALP, IL-6 e IL-8 foram selecionados entre os genes que tiveram alterações significativas de expressão ($M > 0.7$) e subsequentemente foram confirmados por RT-PCR quantitativa. A concentração de proteína secretada para IL-6, IL-8 e atividade de ALP foram medidas 72 horas após a aplicação de força compressiva estática contínua. Os níveis de proteína de IL-6 aumentaram significativamente em 72h ($p < 0,001$), mas não houve mudança significativa na IL-8 ($p > 0,05$). A atividade de ALP diminuiu 41.5% comparada com o grupo controle ($p = 0,015$). Considerando que a IL-6 é um potente ativador osteoclástico e que o lado de compressão do PDL durante o movimento ortodôntico mostrou a reabsorção do tecido calcificado, a alteração da expressão de IL-6 e ALP em resposta à força de compressão estática nas células do PDL puderam contribuir para o movimento ortodôntico dentário ou para a remodelação óssea alveolar.

NAKAGIMA *et al.* (2008) relataram que o estresse mecânico ocasionado pelo aparelho ortodôntico induziu a substâncias biologicamente ativas. Fator de crescimento de fibroblastos é uma citocina multifuncional que possui vários efeitos nas células fibroblásticas, e fator-2 de crescimento de fibroblasto desempenhando um papel importante na remodelação do ligamento periodontal. O receptor ativador do fator nuclear KAPPA B ligante (RANKL) é uma importante proteína envolvida na osteoclastogênese e os autores relataram recentemente que os níveis de

RANKL foram aumentados pela força de compressão *in vitro*. No presente estudo foram investigados os efeitos da força de compressão no fator-2 de crescimento de fibroblastos e produção de RANKL pelas células do ligamento periodontal humano. Uma força de compressão (0,5 - 4,0 g/cm²) foi aplicada nas células do ligamento periodontal humano por 0 - 24 horas. As quantidades de RANKL (sRANKL) solúveis e fator-2 de crescimento de fibroblastos foram medidas usando ELISA enquanto que os níveis de mRNA foram determinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, anti-fator-2 de crescimento de fibroblastos foram adicionados para os meios de cultura de células e mediram a inibição de sRANKL e fator-2 de crescimento de fibroblastos pela *enzyme-linked immunosorbent assay*. A força de compressão induziu a um nível mais alto de RANKL e fator -2 de crescimento de fibroblastos no tempo e magnitude da força de uma forma dependente. Tratamento com fator-2 crescimento anti-fibroblasto inibiu a liberação da sRANKL. Concluíram que o fator-2 de crescimento de fibroblasto poderia estar envolvido parcialmente na osteoclastogênese durante o movimento dental.

LISBOA *et al.* (2009) certificaram que as forças compressivas ortodônticas no ligamento periodontal promovem a expressão de mediadores pró-inflamatórios e da matriz metaloproteinase responsáveis pela movimentação dentária. A quantidade de tempo atuando nas células periodontais e o aumento da quantidade de esforço mecânico (estresse) causados pelas forças ortodônticas são considerados reguladores dos níveis de metaloproteinases (MMPs) no tecido periodontal. Para estudar a possibilidade de regulação na atividade das metaloproteinases 2, 3, 7, 9, e 10 pela simulação de forças ortodônticas, culturas de fibroblastos do

ligamento periodontal humano foram centrifugadas (141 x g) durante 30, 60, 90, e 120 minutos, simulando forças ortodônticas. A viabilidade celular, quantificação de proteínas e atividade das metaloproteinases por zimografia foram avaliados em 24, 48 e 72 horas após a centrifugação nas células lisadas e crescimento médio. A atividade da 72-k da matriz metaloproteinase 2 foi reduzida em 24 horas, independentemente da duração da centrifugação e às 48 horas em células centrifugadas durante 30 minutos somente. Diminuição da quantidade de proteína total nos lisados foi visto em 48 e 72 horas, sem qualquer alteração na viabilidade celular. Os dados indicaram que a quantidade de esforço mecânico regulou os níveis de secreção da matriz metaloproteinase. Além disso, a centrifugação tal como um modelo para simular força ortodôntica, pode ser usado como um simples e confiável método, para estudar o papel desempenhado pelas matrizes de metaloproteinases no ligamento periodontal, quando submetidos às forças mecânicas que ocorrem durante a movimentação dentária.

LE GALL & SASTRE (2010) estudaram os fundamentos da movimentação dentária. Afirmaram que os avanços no campo dos fenômenos moleculares permitiram um total entendimento dos mecanismos que trabalham na movimentação dentária. As forças aplicadas pelos aparelhos ortodônticos são convertidas em sinais celulares através da deformação das paredes ósseas e da reação inflamatória que elas provocam. Sucessivamente, as numerosas citocinas que são criadas por esse processo, ativam outros mensageiros que diferenciam, ativam e inibem a variedade celular envolvida na movimentação dentária. O objetivo deste estudo foi rever os princípios fundamentais envolvidos na remodelação óssea que são

indispensáveis na realização de movimentos dentários rápidos e harmoniosos, respeitando os limites fisiológicos para evitar as repercussões indesejadas (reabsorção e anquilose radicular) ou recidivas. Concluíram que os recentes avanços na área da biologia tem levado à um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na movimentação ortodôntica. Dependendo do estado da movimentação dentária, diferentes interações célula-célula e célula-matriz extracelular ocorrem, e estas determinam a forma de remodelação do osso e do ligamento. Novos estudos que tentam descobrir as interações moleculares e os mecanismos reguladores destes fenômenos poderão levar a um tratamento ortodôntico mais efetivo e evitar efeitos colaterais indesejados como anquilose e reabsorção radicular.

URIBE *et al.* (2011) desenvolveram um modelo ortodôntico de cultura de órgão em ratos para examinar as alterações inicialmente induzidas na diferenciação de odontoblastos através de marcadores dentro do ligamento periodontal (PDL) e do osso alveolar. Foram dissecadas e cortadas mandíbulas de ratos transgênicos de 4 a 12 semanas de vida. Uma mola ortodôntica super elástica convencional (25g) foi colada do incisivo ao primeiro molar de um lado da mandíbula. O outro lado serviu como controle. As mandíbulas dissecadas foram colocadas em meio de cultura por 6 horas e então foram analisadas pela histologia em relação a proliferação (imunocorante BrdU) e expressão de proteína fluorescente. Além disso, um modelo *in vivo* usando os mesmos métodos foi aplicado em ratos transgênicos contendo 3.6 Coll-GFP. Foi observado um aumento significativo *in vitro* de células positivas BSP-GFP e 3.6 Coll-GFP após 6 horas de carga ortodôntica, no lado de tração do PDL comparado com o lado controle. No lado de compressão, houve uma significativa diminuição

das células positivas 3.6 Coll-GFP comparando com o lado controle. *In vivo*, as mesmas tendências foram encontradas. Este novo modelo *in vitro* de cultura de órgão para movimento dentário mandibular associado com a tecnologia dos ratos transgênicos, ofereceu uma potente ferramenta de delimitação dos eventos iniciais celulares e moleculares da movimentação ortodôntica dentária.

HACOPIAN *et al.* (2011) descreveram que os mecanismos biológicos do movimento dentário se baseiam na resposta dos tecidos periodontais para forças mecânicas. O resultado final desta resposta é a remodelação da matriz extracelular. As reações teciduais podem variar dependendo do tipo, intensidade e duração das forças aplicadas. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da força centrífuga na transcrição de colágeno tipo I (Col-I), matriz de metaloproteinase-1 (MMP-1), e inibidor de tecido de genes de metaloproteinase-1 (TIMP-1) em fibroblastos do ligamento periodontal (PDL) humano. Fibroblastos humanos obtidos a partir do PDL foram cultivados e submetidos à forças centrífugas ($36,3 \text{ g/cm}^2$) de 30, 60 e 90 min de forma contínua. Isto também foi realizado ininterruptamente, três vezes, durante 30 min e seis vezes durante 15 min. A codificação mRNAs para Col-I, MMP-1, e TIMP-1 foram quantificados utilizando RT-PCR. Os níveis de mRNA de Col-I e MMP-1 foram aumentados quando força contínua foi aplicada durante 30 min e 60 min, respectivamente. A força interrompida teve quase nenhum efeito em genes Col-I, MMP-1 e TIMP-1. Estes resultados indicaram que as forças contínuas tiveram um efeito maior na indução da expressão de genes durante o processo de remodelação de PDL em comparação com as forças interrompidas com curto períodos de descanso.

KOOK, JANG, LEE (2011) relataram que fibroblastos do ligamento periodontal (FLP) sentem e respondem à estímulos mecânicos e participam da reabsorção óssea alveolar durante o tratamento ortodôntico. Este estudo examinou como o FLP influencia a osteoclastogênese de macrófagos derivados da medula óssea (BMM), após a aplicação de tensão ou força de compressão. Investigaram também se linfócitos poderiam ser um estimulador primário da ativação osteoclástica durante remodelação óssea alveolar. Descobriram que as forças mecânicas inibiram a diferenciação osteoclástica de BMM em co-culturas com FLP, com FLP produzindo predominantemente osteoprotegerina (OPG), em vez de receptor ativador do fator nuclear-kappaB (NF-kB) ligante (RANKL). Em particular, o FLP aumentou a expressão do fator de necrose tumoral (TNF)-a em resposta à compressão. Experimentos adicionais mostraram a presença de células T CD4-p e B220 - positivas com um aumento subsequente da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) e as células positivas para expressão RANKL apenas no lado da compressão dos tecidos periodontais sujeitos a força. TNF-a exógeno aumentou o número de células TRAP- positivas e formação de poço em co-culturas de BMM com células *Jurkat*, mas não com células BJAB e este efeito foi quase totalmente inibido por anticorpos anti-TNF-a, ou do receptor de TNF. Coletivamente, os resultados sugeriram que FLP podem secretar níveis relativamente altos de TNF-a no lado de compressão do que no lado de tensão e este desequilíbrio conduz a expressão de RANKL, ativando CD4 β células T, o que facilitou a reabsorção óssea durante a movimentação dentária ortodôntica.

DIERCKE *et al.* (2011) consideraram que durante o movimento dentário ortodôntico, a aplicação de forças adequadas permitiu que os

dentos pudessem ser movidos através do osso alveolar. Estas forças foram transmitidas através dos ligamentos periodontais (PDL) para o osso alveolar de suporte e levou à deposição ou a reabsorção de osso, dependendo se os tecidos estivessem expostos à uma mecânica de tensão extensiva ou compressiva. Os fibroblastos no interior do PDL (PDLF) foram considerados serem de resposta mecânica. Os mecanismos de transdução da carga mecânica do PDLF para iniciarem a remodelação óssea não estão claramente compreendidos. Recentemente, tem sido mostrado que membros da família ephrin/Eph estão envolvidos na regulação da homeostase óssea. Pela primeira vez, demonstrou-se que PDLF expostos a tensão elástica induzem a expressão de ephrin B2 via um FAK, Ras, ERK1/2-, e via de SP1-dependente. Osteoblastos do osso alveolar estimulados com efrina-B2 aumentaram a expressão de genes osteoblastogênicos e demonstrou sinais funcionais da diferenciação dos osteoblastos. Numa configuração fisiológica, a sinalização de ephrin-B2-EphB4 entre PDLF e osteoblastos do osso alveolar pode contribuir para osteogênese em locais de tensão durante o movimentação ortodôntica.

LI *et al.* (2013) apresentaram um modelo de tecido do ligamento periodontal que poderia imitar o comportamento biológico deste ligamento sob compressão estática na movimentação ortodôntica. Neste estudo, o objetivo foi investigar o período de tempo dos perfis de expressão gênica no modelo de tecido do ligamento periodontal sob compressão. O modelo de tecido do ligamento periodontal foi estabelecido por meio da cultura de células do ligamento periodontal em 3D, em camadas de folhas finas de ácido láctico-co-glicólico (PLGA poroso), que foi submetido à compressão estática de 25 g/cm² durante 6, 24 e 72 horas, respectivamente. Após, os

perfis de expressão gênica foram investigados utilizando o ensaio de microarranjo seguido por via de sinalização e análise ontologia do gene (GO). A verificação de 15 genes identificados e de interesse foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A alteração da proliferação celular foi detectada por meio da rotulagem EdU. Os resultados mostraram que entre os genes identificados e expressos diferencialmente, houve numerosos indutores de Osteoclastogênese (incluindo CCL20, a COX-1, inibidores de COX-2, RANKL, PTHrP, IL-8, etc), inibidores de Osteoclastogênese (incluindo IL-1Ra, NOG, OPG, etc) e outros reguladores potenciais de remodelação óssea (incluindo STCL, Cyr 61, FOS, etc). De acordo com os dados da análise do microarranjo, as vias mais significativas incluíram o receptor de interação citocina-citocina (contendo CCL20, RANKL, IL-11, IL-8), a MAPK (contendo FGF7, FOS, MAP3K8) e ciclo celular (contendo CDLK, CCNA2, etc). Os GOs mais significativos incluiu sinalização celular (contendo CCL20, STC1, FGF7, IL-11, IL-8), o espaço celular (contendo CCL20, IL-1Ra, NOG, PTHrP, a IL-11, IL-8) e movimento baseado em microtubos (contendo KIF11, KIF23). Após a compressão prolongada, a proliferação celular foi significativamente inibida. Concluíram que os achados neste estudo expandiu a compreensão dos papéis como o ligamento periodontal reage sob compressão estática durante a movimentação ortodôntica.

JACOBS *et al.* (2013) enfatizaram que no tratamento ortodôntico a força correta de tensão mecânica tem um papel importante na remodelação óssea durante a movimentação dos dentes. O objetivo deste estudo foi o de investigar a diferenciação osteogênica de fibroblastos do ligamento periodontal humano submetidos à aplicação de força mecânica comparando

com osteoblastos. No experimento *in vitro* fibroblastos e osteoblastos foram expostos às diferentes forças (1% = 0,7 cN/mm², 5% = 3 cN/mm² e 10% = 5,2 cN/mm²) de pressão mecânica estática durante 12 horas. A viabilidade celular foi avaliada por MTT e a apoptose por meio do ensaio de TUNEL. A expressão do gene de ciclina, fosfatase alcalina, colágeno I, osteocalcina, osteoprotegerina (OPG) e RANKL foram investigados utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A síntese de OPG e RANKL foi medida pelo ensaio de ELISA e a atividade da fosfatase alcalina por meio do ensaio colorimétrico. Na aplicação de 10% de força de compressão estática houve um decréscimo da viabilidade celular de ambas as células, mas não houve aumento da taxa de apoptose. O PCR mostrou maior aumento da expressão para ciclina, fibroblastos e osteoblastos quando aplicada uma força de compressão de 5% e osteoblastos mostraram uma duplicação da expressão do colágeno do gene de colágeno I. Os fibroblastos e os osteoblastos mostraram-se dependentes da força na síntese de Osteoprotegerina e atividade da fosfatase alcalina, enquanto os osteoblastos demonstraram uma diminuição na síntese de osteoprotegerina e da atividade da fosfatase alcalina quando aplicada força compressiva de 10%. Diferenciação osteogênica de fibroblastos correlacionou-se com o aumento da força de compressão. Osteoblastos mostraram diminuição da sua atividade quando foram submetidos às forças mais altas, demonstrando um potencial comprometimento na remodelação óssea. Forças compressivas de 5% proporcionaram melhores condições para a formação óssea durante e após a movimentação mecânica dos dentes.

SAMINATHAN, VINOTH, CAO (2013) argumentaram que as células do ligamento periodontal ficam estacionadas nos sistemas de culturas bidimensionais e que estão em um estado padrão duplo. O principal objetivo deste trabalho foi o de projetar e caracterizar as construções tridimensionais, semeando células do ligamento periodontal em películas de *hydrogel* de gelatina e hialuronano (80-100 μm) num formato capaz de ser deformada mecanicamente. Arcabouços de ligamento periodontal humano foram cultivados com e sem fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FG) – 2 em culturas bidimensionais e culturas mecanicamente ativas submetidas às forças cíclicas de 12% em 0.2 Hz a cada minuto, 6 horas por dia, numa unidade de força no Flexcell FX-4000. Os seguintes parâmetros foram medidos: número de células e viabilidade celular verificadas por microscopia confocal de varredura; proliferação celular com ensaio MTS; a expressão de um painel de 18 genes utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR); matriz de metaloproteinases (MMPs) 1-3, TIMP-1, CTGF e FGF-2 níveis de proteínas nos sobrenadantes das culturas ativadas mecanicamente com ensaios imunossorventes ELISA. Construções de culturas bidimensionais também foram examinadas com microscopia eletrônica de varredura e histoquímica para actina e vinculina. Embora inicialmente distribuídas aleatoriamente, as células se organizaram em uma bicamada no 7º dia; células apoptóticas mantiveram-se constantes à cerca de 5% do total. CTGF/FGF-2 estimularam a proliferação celular em culturas estacionárias, mas valores de quantidades relativas sugeriram efeitos modestos sobre a expressão gênica. Concluíram que os arcabouços de tecido tridimensionais são mais complexos que os sistemas de cultura em monocamada, e sugeriram algumas suposições a respeito do

crescimento celular, diferenciação e dobra da matriz baseada em culturas bidimensionais que podem ser aplicadas às células em matrizes tridimensionais.

HECKLER *et al.* (2013) afirmaram que existem poucos modelos tridimensionais para estudar os aspectos celulares e moleculares na regulação do movimento dentário ortodôntico. O objetivo deste estudo foi o de desenvolver um modelo *in vitro* 3D para estudar a aplicação de forças compressivas em fibroblastos do ligamento periodontal humano. Os fibroblastos do ligamento periodontal humano foram cultivados dentro de géis de colágeno para formar uma estrutura análoga ao ligamento periodontal. A caracterização dos géis de colágeno semeados revelou que as células suportadas no gel apresentaram viabilidade e o surgimento de um possível fenótipo contrátil, repetindo a condição constrita do ligamento periodontal humano *in vivo*. Foi desenvolvido um modelo 3D que incorporava géis de colágeno semeados, interligados mecanicamente em duas extremidades de placas terminais móveis. Estas placas permitiram uma tração estática ou força compressiva dos fibroblastos do ligamento periodontal semeados nos géis de colágeno. Testes preliminares mostraram que este modelo 3D imitou as fibras do ligamento periodontal humano sendo semelhantes as observadas durante a movimentação dentária ortodôntica. Este modelo 3D de movimentação dentária ofereceu uma perspectiva para estudos futuros para melhorar a compreensão e os efeitos desta movimentação no ligamento periodontal humano.

ZHU *et al.* (2013) demonstraram que células troncos mesenquimais multipotentes são obtidas a partir de polpas dentárias de dentes

permanentes e dentes decíduos esfoliados, e são conhecidas por induzir a geração de osso e dentina. No entanto, o papel das células tronco da polpa de dentes decíduos (DDPSCs) com reabsorção radicular fisiológica ainda não está claro. Estudaram as células tronco da polpa dentária (DPSCs) em dentes permanentes que foram obtidos e comparados as de células tronco da polpa dentária de dentes decíduos a partir de incisivos decíduos em estágios diferentes de reabsorção da raiz: estáveis (S), médio (M) e final (F). Secções descalcificadas de dentes mostraram que osteoclastos e lacunas de reabsorção foram mais prevalentes na fase de reabsorção M. A taxa de proliferação mais elevada em DDPSC foi também na fase M. As DDPSCs na fase F produziram mais nódulos calcificados do que aqueles nas fases S e M. A expressão de fosfatase alcalina (ALP) foi mais elevada na fase F, indicando que DDPSCs promoveu a mineralização. Além disso, a proporção de receptor ativador do fator nuclear Kappa beta ligante (RANKL) e a expressão de osteoprotegerina (OPG) foram significativamente mais elevada na fase M, indicando que DDPSCs promoveram a reabsorção. Expressão de Dickkopf 1 (DKK1) foi notavelmente maior no grupo F e P, sugerindo que a via Wnt foi inibida durante o processo de reabsorção. Concluíram que a DDPSCs influenciou a osteoclastogênese durante o processo de reabsorção radicular fisiológica, e que a via regular Wnt pode alterar a relação de expressão RANKL/OPG em DDPSCs.

QIN & HU (2014) enfatizaram que enquanto a sinalização da mecanotransdução foi comprovada essencial para a regeneração de tecidos, continua crítica para determinar respostas celulares específicas tais como sinais mecânicos e mecanismos subjacentes. O fluxo de fluido dinâmico

induzido por carga mecânica tem sido demonstrado que têm potencial para regular a adaptação óssea e reduzir a perda óssea. Vias de mecanotransdução são de grande interesse na elucidação da produção de sinais mecânicos e tais efeitos observados incluíram redução da perda óssea, aumento da formação óssea e diferenciação de células osteogênicas. O objetivo desta revisão foi desenvolver uma compreensão molecular dos processos de mecanotransdução em regeneração tecidual podendo fornecer novos *insights* sobre a fisiologia óssea. Foi discutido o potencial de carga mecânica utilizada para induzir o fluxo de fluido ósseo dinâmico, regulação de adaptação óssea e otimização de parâmetros de estimulação em vários níveis de carga. O potencial de carga mecânico para regular a microcirculação também foi discutida. A atenção foi atribuída ao potencial das vias celulares e moleculares em resposta a uma carga, incluindo osteócitos associados com a sinalização Wnt, elevação das células estaminais, a supressão de células adipócitas, bem como as funções de Lrp5 e microARN. Estes dados e discussões destacaram o processo ainda altamente complexo e coordenado de mecanotransdução na regeneração do tecido ósseo.

DUSCHER *et al.* (2014) observaram que cicatrizes e fibroses de tecidos representavam uma fonte significativa de morbidade nos Estados Unidos. Apesar de considerável pesquisa focada em elucidar os mecanismos envolvidos na formação de cicatriz cutânea, terapias clínicas eficazes ainda estavam nos estágios iniciais de desenvolvimento. Um profundo conhecimento das várias vias de sinalização envolvidas foi essencial para formular estratégias de combate às fibroses e cicatrizes. Enquanto os esforços iniciais foram focados principalmente nos

mecanismos bioquímicos envolvidos na formação de cicatrizes, uma pesquisa mais recente revelou um papel central para as forças mecânicas na modulação destas vias. Mecanotransdução, que se refere aos mecanismos pelos quais forças mecânicas são convertidas em estímulos bioquímicos, tem sido estreitamente relacionada com inflamação e fibrose e acreditou-se desempenhar um papel crítico na formação de cicatrizes. Esta revisão apresentou uma visão geral da atual compreensão dos autores dos mecanismos envolvidos na formação de cicatrizes, com ênfase no relacionamento entre vias de mecanotransdução e suas implicações terapêuticas.

SHEN *et al.* (2014) constataram que forças ortodônticas resultaram na reabsorção e formação óssea alveolar predominantemente nos lados de pressão e tensão das raízes dos dentes, respectivamente. Células-tronco do ligamento periodontal humano demonstraram a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, desempenhando funções importantes na homeostase e regeneração dos tecidos periodontais. No entanto, pouco se sabe como as células-tronco do ligamento periodontal humano contribuíram para a osteoclastogênese durante o movimento ortodôntico dos dentes no lado de tensão. Neste estudo, foi aplicada uma força de tensão cíclica de 12% (12% de deformação) nas culturas de células-tronco do ligamento periodontal humano em um meio indutor. Os marcadores osteogênicos Runx2, ALP e OCN foram detectados no mRNA e níveis de proteínas em diferentes períodos de tempo, utilizando PCR em tempo real e análise *Western blot* (método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas). Foi descoberto que o mRNA e os níveis de Runx2, ALP e OCN foram significativamente auto regulados depois de 6, 12 e 24

horas de carga mecânica nas células-tronco do ligamento periodontal humano em comparação aos níveis não estimulados de células-tronco do ligamento periodontal humano. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito da tensão mecânica na diferenciação osteogênica das células-tronco do ligamento periodontal humano, como examinado com o aparelho Flexcell FX-4000T Sistema Plus de Tensão. Os resultados sugeriram que a tensão cíclica poderia promover a diferenciação osteogênica das células-tronco do ligamento periodontal humano. Além disso, os efeitos da força ortodôntica na remodelação do osso alveolar podem ser conseguidos por meio das células-tronco do ligamento periodontal humano.

KURESHI *et al.* (2015) constataram que géis de colágenos naturais são suportes de apoio celulares biomiméticos importantes, e um processo de compressão plástica poderia ser usado para a remoção rápida de qualquer espessura de fluido de colágeno, produzindo um consistente modelo de tecido 3D. Este estudo teve como objetivo medir as propriedades mecânicas de deformação dos suportes celulares e quantificar qualquer deformação que poderia ocorrer na presença de células (deformação mediada por células). O desenvolvimento do equipamento de teste aplicou tensão de deformação constante durante a cultura e mediu a extensão em tempo real conveniente à ação das células. Este foi usado como modelo de deformação da matriz extracelular, implicando em cortes transversais (TF) da hérnia inguinal. Experimentos mostraram que uma tensão aplicada equivalente a 15% mostrou ruptura, a deformação mediada por células sobre um período de cultura de 24h foram identificadas taxas de deformação de 0,46 e 0,38% /hora para TF normal e fibroblastos dérmicos humanos, respectivamente. No entanto, fibroblastos (TF) da hérnia

produziram níveis de deformação mediada por células sob as mesmas condições. O aumento da temperatura da cultura celular de 4° para 37° foi utilizado para demonstrar células vivas dependentes da deformação. Isto representou o primeiro trabalho *in vitro* de TF na deformação do colágeno mediado por células e, para os pesquisadores, a primeira demonstração funcional, relacionando anormalidade celular da hérnia.

KANG & ROBLING (2015) confirmaram que a carga mecânica é essencial para a manutenção do metabolismo normal do osso e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Os mecanismos celulares que controlam a mecanotransdução não estão completamente definidos, mas várias vias principais já foram identificadas. Já foi discutido o papel dos vários componentes da cascata de sinalização Wnt (via de sinalização intracelular), nomeadamente Lrp5, Lrp6, e b-catenina na formação óssea induzida por carga mecânica. Lrp5 é um importante co-receptor Wnt para a regulação da massa óssea e mecanotransdução, e sua função é principalmente aumentar a formação óssea. LRP6 também regula a massa óssea, mas a sua ação pode envolver a reabsorção, bem como a formação de osso. Estudos que abordaram o papel da b-catenina no metabolismo ósseo e mecanotransdução destacaram as incertezas dos moduladores Lrp5 e Lrp6. Esses dados quando somados indicaram que a carga mecânica pode afetar a regulação óssea provocando a sinalização Wnt canônica (e talvez outras vias), não só através da Lrp5 mas também por meio da Lrp6. Concluíram que mais pesquisas são necessárias para esclarecer o papel da via de sinalização Wnt em Lrp5 e/ou Lrp6 mediada por mecanotransdução o que poderia eventualmente levar à agentes terapêuticos poderosos que pudessem mimetizar os efeitos anabólicos de estimulação mecânica.

ALVES *et al.*, (2015) procuraram a influência de um modelo de cultura de células tridimensional na expressão do fenótipo osteoblástico em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano (hPDLF). Fibroblastos foram cultivados em arcabouços bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) utilizando substrato de colágeno Tipo I (grupos experimentais), e numa lamínula de plástico (grupo controle) por 14 dias. A viabilidade celular e a atividade da fosfatase alcalina (ALP) foram realizadas. A morfologia celular e imunomarcação para a fosfatase alcalina e osteopontina (OPN) foram avaliadas por epifluorescência e microscopia confocal. A expressão de marcadores osteogênicos, incluindo a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina (OC), colágeno I (COL I) e o fator 2 de transcrição (RUNX2), foram analisados por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Osso mineralizado foi visualizado por microscopia e o conteúdo de cálcio foi avaliado quantitativamente pelo ensaio com vermelho de Alizarina. As culturas dos grupos experimentais produziram um aumento na proliferação celular. Imunomarcação para OPN e ALP nos hPDLF aumentou e a atividade da ALP foi inibida na cultura tridimensional. OPN e expressão do gene RUNX2 foram significativamente maior na cultura 3D quando comparados com o grupo controle. Os níveis de ALP e a expressão do gene COL I foram significativamente mais elevados na cultura 3D em comparação com culturas 2D após 7 dias. No entanto, aos 14 dias, as culturas 3D exibiram níveis mais baixos de ALP e expressão do gene COL I do que o grupo controle, e a expressão do gene COL I também foi significativamente mais baixa em culturas 2D do que em 3D. Mineralização de cálcio foi detectada e quantificada pelo ensaio com vermelho de Alizarina. Concluíram neste estudo que as culturas 3D foram capazes de suportar a proliferação de

hPDLF e favorecer a diferenciação e formação de matriz mineralizada, que poderiam ser um potencial na terapia regenerativa periodontal.

NETTELHOFF *et al.* (2015) investigaram e compararam *in vitro* as alterações em fibroblastos do ligamento periodontal humano e osteoblastos, após a aplicação de força de compressão utilizando dois diferentes tipos de cargas. Os fibroblastos e osteoblastos foram expostos às forças compressivas computadorizadas (*Compression Plus System Flexcell – FX-3000*) com uma magnitude de 2 cN/mm² e 4 cN/mm² durante 12 horas para simular forças moderadas e altas respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a taxa de apoptose pelo ensaio do TUNEL. As expressões dos genes da fosfatase alcalina, osteocalcina, osteoprotegerina e RANKL foram analisadas usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Osteopontina, matriz metalaproteinase e inibição do tecido de metalaproteinase foram quantificados pelo ensaio ELISA. A força de 4 cN/mm² (força alta) diminuiu a viabilidade celular, especialmente nos osteoblastos, mas não induziu ao aumento da apoptose. A expressão do gene de fosfatase alcalina aumentou depois de mais de 2 cN/mm² nos fibroblastos e após 4 cN/mm² nos osteoblastos. Osteocalcina não sofreu alteração após a aplicação das forças compressivas. A maior relação de RANKL/Osteoprotegerina foi medida após a aplicação de 2 cN/mm² em ambos os tipos celulares. Concluíram que os osteoblastos manifestaram um maior efeito sobre a remodelação óssea por meio da regulação positiva da Osteopontina, enquanto os fibroblastos facilitaram a movimentação ortodôntica, influenciando a matriz extracelular por meio da proporção de metalaproteinase 8 e 1. Forças compressivas altas em ortodontia devem ser evitadas para prevenir alterações nos tecidos,

enquanto que a força compressiva moderada permitiu a remodelação do tecido ósseo e movimentação dentária.

ZHU & LIANG (2015) estudaram as células-tronco do ligamento periodontal que residiam no espaço perivascular do periodonto e afirmaram que as células mesenquimais são uma ferramenta promissora para a regeneração periodontal. Recentemente, grandes progressos foram alcançados no transplante de células-tronco do ligamento periodontal. Os pesquisadores tentaram maximizar o potencial de proliferação e diferenciação modificando as condições de culturas destas células e aplicando fatores de crescimento. Não obstante, os problemas permaneceram. Primeiro, a incomparabilidade entre os diferentes estudos deve ser minimizada por meio de protocolos e diretrizes para a identificação e cultura de células-tronco do ligamento periodontal. Notavelmente a atenção deve ser dada a segurança biológica de transplantes de células-tronco do ligamento periodontal. A presente revisão atualizou as últimas descobertas sobre células-tronco do ligamento periodontal e discutiu os critérios de padronização para a identificação e cultura das células-tronco do ligamento periodontal. Finalmente, a avaliação requereu uma análise cuidadosa para o transplante seguro de células-tronco do ligamento periodontal para ajudar na regeneração periodontal.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

- Primário
- Experimental
- Prospectivo
- Centro Único

4.2 AUTORIZAÇÕES

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob o protocolo 378.852 de 12/12/2013 (ANEXO 1), obedecendo a Resolução 196/96, contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos e a concordância da participação no estudo foi previamente concedida pelos participantes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 2). Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp que está localizado na Rua Pedro de Toledo, 781, 11º andar – frente.

4.3 AMOSTRAS

Foram coletados fragmentos de ligamento periodontal humano de 10 pacientes submetidos à extração de terceiros molares inclusos (intra-ósseos) por indicação ortodôntica. Destes fragmentos foram isolados e cultivados fibroblastos do ligamento periodontal.

4.4 SELEÇÃO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A CIRURGIA DOS TERCEIROS MOLARES

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram considerados candidatos à participação no estudo pacientes de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 30 anos, não tabagistas, com os quatro terceiros molares inclusos (intra-ósseos) com indicação clínica de remoção dos mesmos, sem história de doenças e sem uso de medicamentos.

4.4.2 Critérios de não inclusão

Não foram considerados candidatos à participação no estudo pacientes que apresentavam terceiros molares com necessidade de odontosecção ou desgaste coronário, processos inflamatórios e infecciosos locais, alterações patológicas locais (cistos, granulomas) e alterações de ordem sistêmicas.

4.4.3 Critério de exclusão

Impossibilidade de se adquirir 4 mm² de ligamento periodontal, contaminação da cultura de células e a não confluência das garrafas.

4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

4.5.1 Obtenção do ligamento periodontal humano

O ligamento periodontal foi obtido por meio da raspagem radicular de terceiros molares inclusos descartados após serem extraídos de pacientes atendidos no ambulatório odontológico do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos. As cirurgias foram realizadas pelo próprio pesquisador. A técnica operatória foi padronizada para todos os pacientes da seguinte forma: 1) antissepsia extraoral com Clorexidina à 4% e antissepsia intraoral com Clorexidina à 0,12%, 2) instalação dos campos operatórios esterilizados, 3) anestesia local com Alphacaine 100 à 2% com Epinefrina 1:100.000, 4) extrações dos terceiros molares, 5) sutura com fio de seda 3-0, agulhado, com agulha triangular. No pós-operatório foi prescrito antibiótico por sete dias (Amoxicilina 500) e antiinflamatório hormonal por três dias (Dexametasona 4 mg). As suturas foram removidas sete dias após as extrações.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, acondicionou-se os dentes em tubos cônicos estéreis de 15 mL (Figura 1) contendo 5 mL de solução de transporte com: meio de cultura Alpha-MEM suplementado com 1% de antibióticos e antifúngico (penicilina, estreptomicina e anfotericina-B) [10000U penicilina + 10000ug estreptomicina + 25ug anfotericina-B] (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA).



Figura 1 – Terceiro molar superior esquerdo após a extração dentro do tubo de 15 mL com meio de transporte (meio de cultura Alpha-MEM suplementado com antibióticos e antifúngico).

Os tubos com os dentes extraídos foram transportados para o Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp até no máximo, seis horas após o ato operatório. Os tubos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo para que o transporte fosse realizado corretamente. Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil), seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas. Os dentes foram lavados por duas vezes com solução salina de fosfato tamponado (PBS – Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Os

fragmentos de ligamento periodontal de todos os dentes foram obtidos por raspagem do terço médio da raiz (Figura 2) utilizando um cabo de bisturi nº 3 (Duflex S.A., Rio de Janeiro, RJ) e uma lâmina cirúrgica nº 12 (Feather Safety, Razor Co., Ltd., Osaka, Japão).

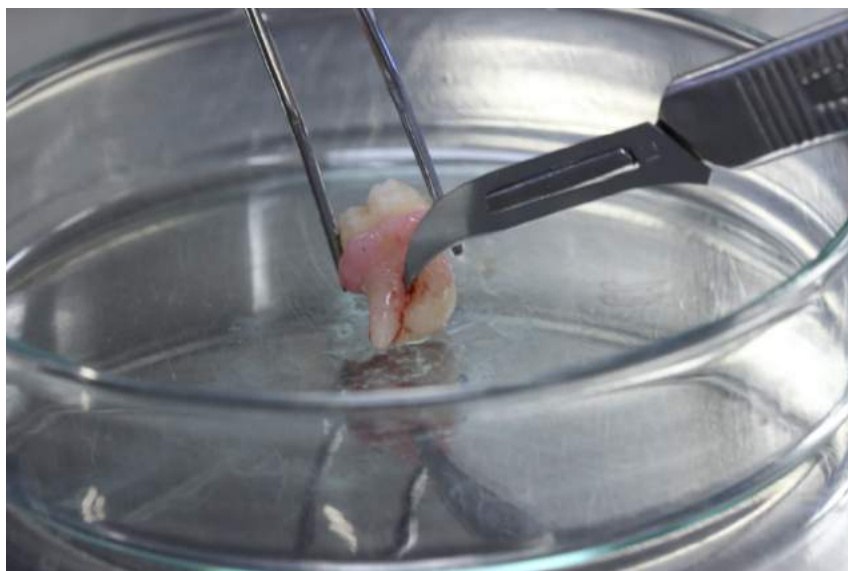


Figura 2 – Raspagem do terço médio das raízes com lâmina de bisturi nº 12 dentro do fluxo laminar para a obtenção do fragmento de ligamento periodontal.

De todos os pacientes foram coletados os quatro terceiros molares (superiores e inferiores), e a quantidade de raízes raspadas estavam relacionadas à obtenção da quantidade pré-fixada de tecido periodontal, no caso, 4 mm^2 . Para aferição da quantidade de tecido periodontal utilizou-se uma placa milimetrada de $2 \times 2 \text{ mm}$ (Figura 3).

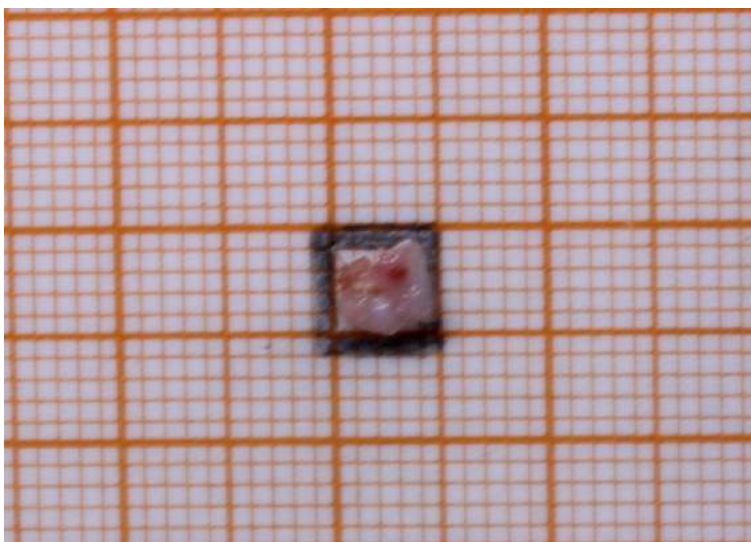


Figura 3 – Placa milimetrada de 4 mm² usada para aferição da quantidade de tecido periodontal coletado do terço médio da raiz do terceiro molar.

O tecido periodontal coletado foi inserido em um tubo cônico de 15 mL (Corning, MA, USA) (Figura 4) contendo 4 mL de solução de Hank's (HBSS – Sigma Aldrich CA, USA) e então por agitação manual foi lavado por quatro vezes em quatro tubos diferentes, cada período de agitação foi em média de 60 segundos (Figura 5).

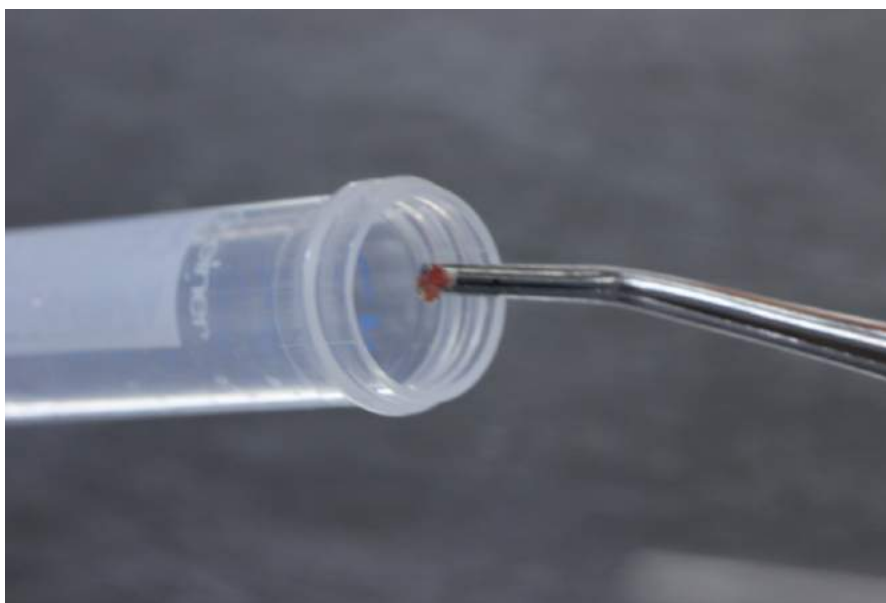


Figura 4 – Fragmento de tecido periodontal sendo colocado dentro do tubo cônico de 15 mL para lavagem do material coletado.



Figura 5 – Agitação manual para lavagem do material coletado por quatro vezes em quatro tubos diferentes. Cada período de agitação foi em média de 60 segundos.

Na sequência o tecido periodontal foi inserido em um tubo cônico de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura, 1mL de collagenase tipo II 190.00 unit/mg (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1 mL de dispase 1:80 unit/mg (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e então submetidos à uma agitação e aquecimento na agitadora magnética à 37°C por 30 minutos. A solução de collagenase e dispase foi neutralizada com a adição de 5 mL de meio de cultura Alpha-MEM (Lab Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% se Soro Fetal Bovino (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA). Após este período o tecido remanescente foi descartado e a solução neutralizada de collagenase e dispase foi transferida para um outro tubo de 15 mL e submetida a uma centrifugação com os seguintes parâmetros: 100 g de força centrífuga por seis minutos à temperatura ambiente (Centrífuga Fanem Excelsa II, São Paulo, Brasil).

O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspendido em 5 mL de meio de cultura Alpha-MEM completo e uma contagem de células viáveis foi realizada utilizando-se um contador de células

automático (Figura 6) pelo método de exclusão por azul de tripan (Invitrogen - Countess, Seul, Korea). O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento.



Figura 6 – Contador de células automático (Invitrogen™ - Countess, Seul, Korea) usado para a contagem de células viáveis após o botão de células ser ressuspendido.

A solução contendo o meio de cultura e as células do ligamento foi inserida em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning, MA, USA). As garrafas foram levadas à uma incubadora onde permaneceram à uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂ (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil). O meio de cultura foi trocado totalmente à cada 48 horas até atingir 80% de confluência (80% da área cultivável recoberta de células).

Quando a confluência foi atingida, que em média durou entre 30 a 40 dias, foram realizadas cinco sub-culturas utilizando-se tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA).

O congelamento das células na quinta passagem foi realizado utilizando-se o meio de cultura Alpha-MEM com 50% SFB inativado, BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albumina Sérica Bovina, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) a 1% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA). A solução de congelamento foi transferida para criotubos (Ciencor, Aton, São Paulo, Brasil) com uma densidade de 1×10^5 células/mL. Os criotubos foram imediatamente colocados em gelo a 4°C e transferidos para o congelador a -20°C, onde permaneceram por 30 minutos. A seguir, foram transferidos para o *freezer* a -80°C, onde permaneceram por 24 horas e, armazenados no nitrogênio líquido, onde as células foram mantidas a -196°C até a realização dos experimentos.

O descongelamento das células para uso nos experimentos foi na proporção de um criotubo para uma garrafa de 75 cm². Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de Alpha-MEM com 10% SFB inativado. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por 6 minutos. O sobrenadante contendo DMSO foi desprezado e o botão de células, ressuspenso em 15 mL de meio de cultura para Alpha-MEM. Foi realizado o cultivo das células por 24 - 48 horas para que elas pudessem aderir e ficar na placa. Após, elas foram tripsinizadas e contadas de forma que houvesse 2×10^5 em 200 µL de meio de cultura.

4.6 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO DE COLÁGENO

Foi utilizada uma matriz de colágeno bovino tipo I de alta pureza (97%), o PureCol[®] (3.1mg/mL) (Advanced Bio Matrix, Inc CA, USA) (Figura 7).

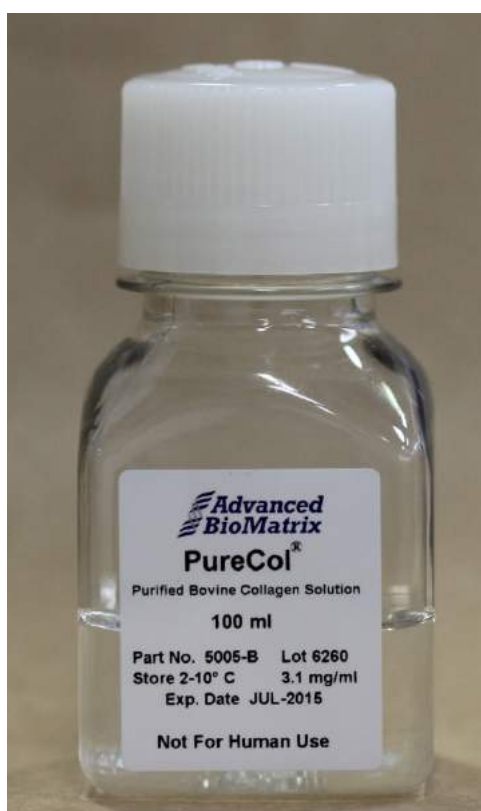


Figura 7 – Colágeno de alta pureza tipo I, PureCol[®] (Advanced Bio Matrix, Inc CA, USA).

Utilizou-se o seguinte protocolo:

- diluição do PureCol[®] em uma solução de NHCL 0.01 obtendo uma densidade de 50 a 100 µg/mL;
- preenchimento homogêneo de aproximadamente 2,0 mm com a solução em todos os poços da placa de cultura (placa de seis poços);

-
- transferência da placa com tampa para a incubadora a 37°C por 2 horas;
 - aspiração do material remanescente;
 - lavagem da superfície delicadamente com PBS (Sigma Aldrich, CA, USA) evitando arranhar a superfície do substrato.

O substrato foi aplicado na superfície dos poços 24 horas antes da semeadura das células e guardado no refrigerador (Figura 8).



Figura 8 – Substrato de colágeno depositado na placa de seis poços 24 horas antes da semeadura das células.

4.7 APLICAÇÃO DA COMPRESSÃO ESTÁTICA CONTÍNUA

Para o ensaio de compressão foi utilizada a densidade de 2×10^5 células/poço diluídas em 200 μ L de meio de cultura. A semeadura das células foi sempre realizada de forma que o meio de cultura contendo as células fosse depositado no centro do poço e assim permanecesse por 10 minutos para fixação e na sequência o volume de meio de cultura no poço era completado até alcançar 3,0 mL. As células foram pré-incubadas

durante seis horas em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino antes da aplicação da pressão. Depois, o peso foi aplicado sobre as células (Figura 9) durante 6 horas na incubadora, ou seja, elas foram continuamente comprimidas utilizando uma compressão uniforme, baseadas num modelo de compressão estática contínua para experiências *in vitro*. Este modelo foi aplicado da mesma forma nas placas contendo ou não o substrato de colágeno.

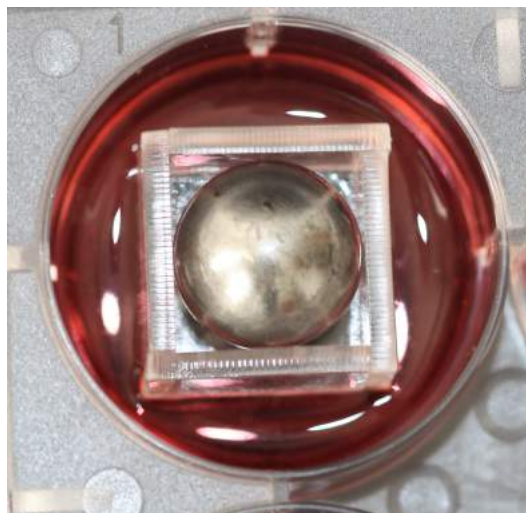


Figura 9 – Peso aplicado sobre as células

Este modelo consistiu de um cubo de acrílico com as dimensões de 2x2x2 cm colocado no centro de cada poço da placa de cultura imediatamente sobre as células (Figura 10).

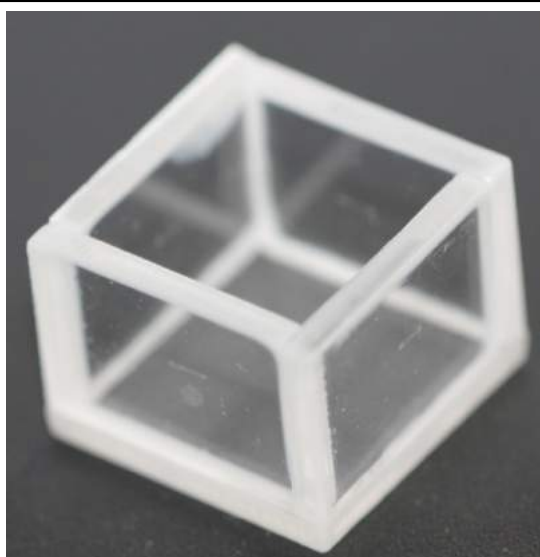


Figura 10 – Modelo de cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm.

Dentro do cubo foram inseridas esferas de aço inoxidável (Figuras 11 e 12) para que se pudesse manipular o peso.

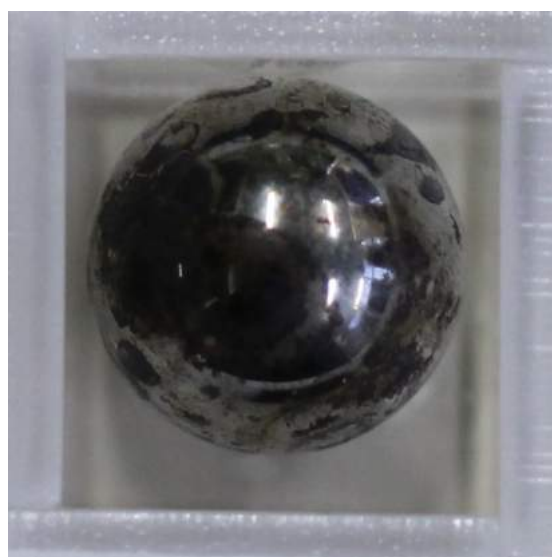


Figura 11 – Esfera de aço inoxidável dentro do cubo de acrílico.

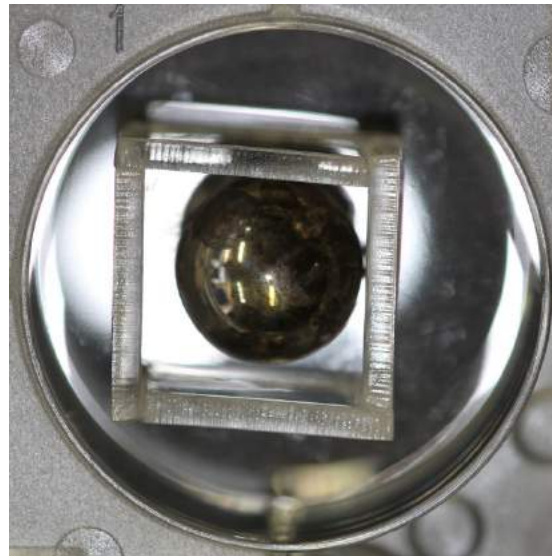


Figura 12 – Cubo de acrílico e esfera de aço inoxidável dentro da placa de seis poços.

Após a compressão as células foram removidas do substrato com tripsina e EDTA e levadas para a avaliação dos resultados.

4.8 DESENHO DO EXPERIMENTO

4.8.1 Experimento

Estudo realizado com as células derivadas de dez doadores de forma a obter as informações pertinentes às variáveis estudadas (Figuras 13 e 14):

- Grupo Controle (GC) Monocamada (sem compressão por 6 horas)
– Figura 15;
- Grupo Experimental 3 (GE3) Monocamada ($3,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas)
– Figura 16;
- Grupo Experimental 4 (GE4) Monocamada ($4,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas);
- Grupo Controle (GC) Substrato (sem compressão por 6 horas) –

Figura 17;

- Grupo Experimental 3 (GE3) Substrato ($3,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas) –

Figura 18;

- Grupo Experimental 4 (GE4) Substrato ($4,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas).

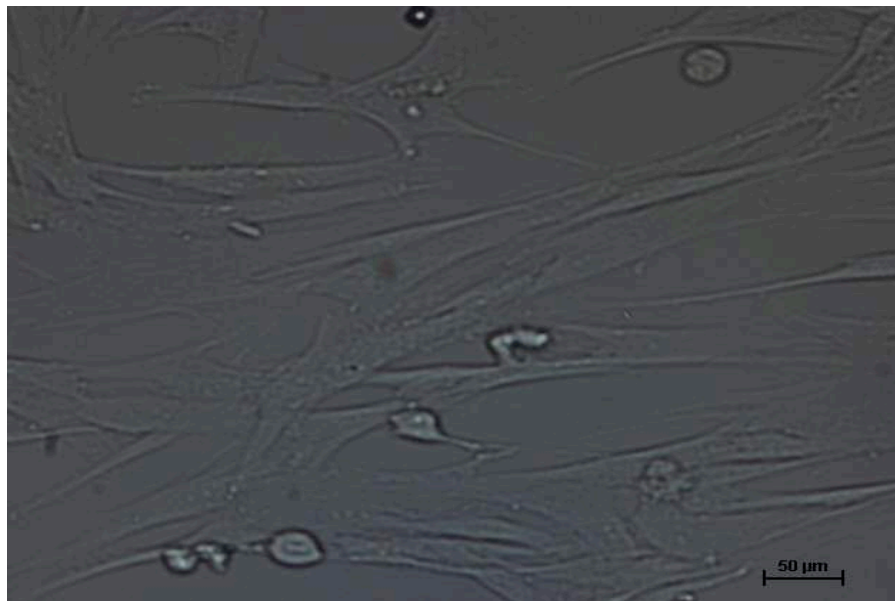


Figura 13 - Fibroblastos do ligamento periodontal no grupo controle 2D.

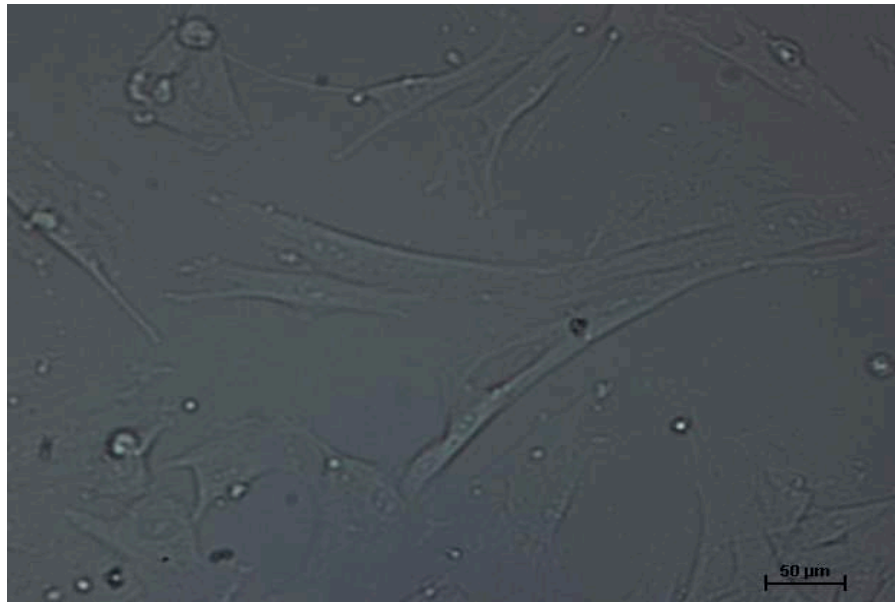


Figura 14 – Fibroblastos do ligamento periodontal no grupo controle 3D.

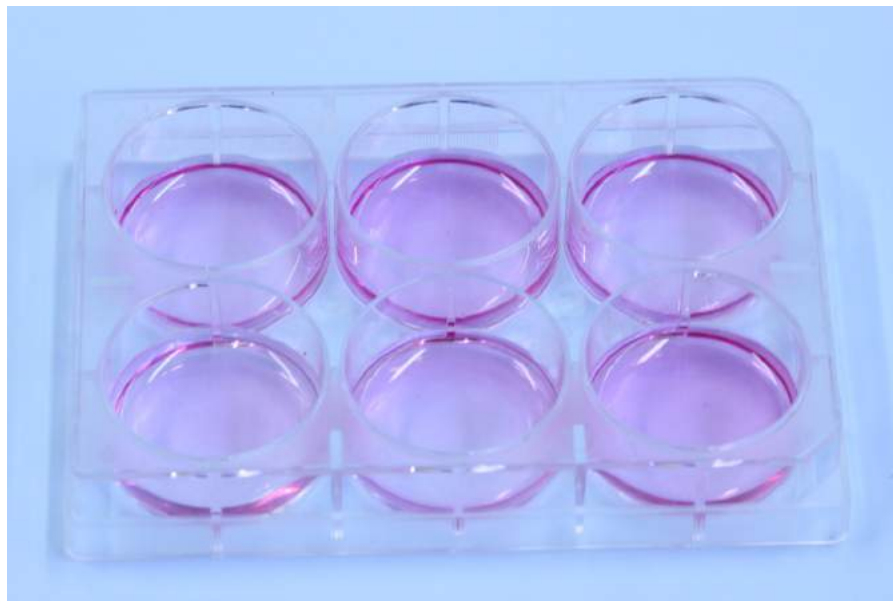


Figura 15 – Meio de cultura Alpha-MEM dentro da placa de seis poços sem o substrato de colágeno – grupo controle sem compressão.



Figura 16 – Modelo de compressão sem o substrato de colágeno (monocamada) usado nos grupos experimentais GE3 e GE4.

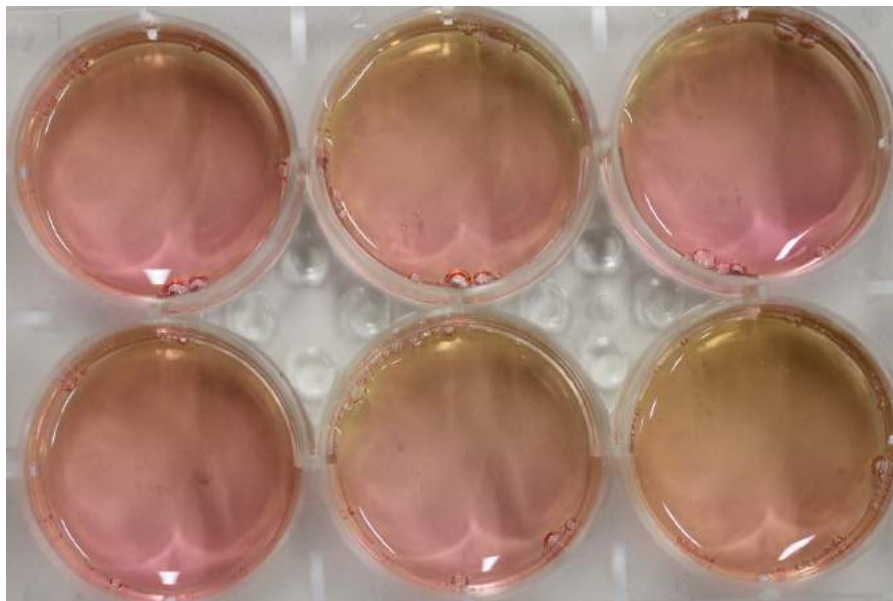


Figura 17 – Substrato de colágeno e meio de cultura Alpha-MEM dentro da placa de seis poços – grupo controle sem compressão.

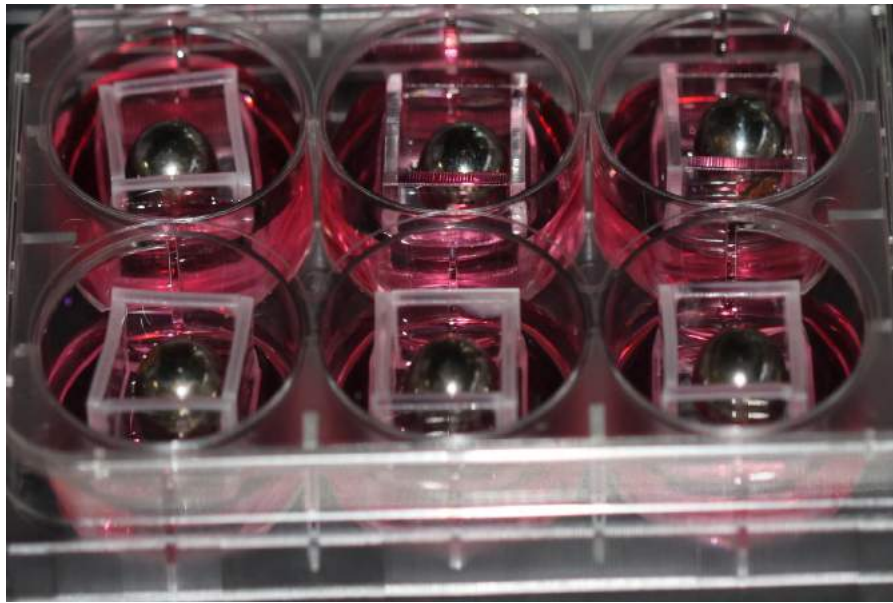


Figura 18 – Modelo de compressão com substrato de colágeno usado nos grupos experimentais GE3 e GE4.

4.9 AVALIAÇÕES

Para as avaliações dos resultados foi utilizada a citometria de fluxo que é uma técnica usada na análise qualitativa e quantitativa de células em suspensão, podendo verificar o tamanho, a complexidade e características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Estas avaliações, neste estudo, foram realizadas pelo citômetro de fluxo *Guava Easy Cyte HT* (Figura 19) , que conta com um laser de excitação (azul) e três cores fluorescentes (verde, amarelo e vermelho). É um aparelho simples, mas eficiente que depende de um número mínimo de células que passam uma a uma por um capilar. Há um computador instalado com um *software (InCyte Software)* cujas as informações foram processadas por meio de gráficos. Neste estudo foram utilizados três *Kits*, um para viabilidade celular, um para morte celular e outro para o ciclo celular.

4.9.1 Viabilidade celular

- as células foram tripsinizadas e o botão de células foi centrifugado a 300 g por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS. A lavagem do botão de células foi repetida novamente;

- as células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS e distribuídas em três microtubos de 1,5 mL;

- foi adicionado 100 μ L do reagente Guava Via Count (Millipore, Belford MA, USA);

- no segundo tubo e no terceiro tubo as células foram fixadas em 200 μ L de etanol 70% e incubadas a 4C° por um período de 12 horas;

- os microtubos 1 e 2 contendo as células e o reagente foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz;

- foi acrescentado 200 μ L de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT* (Millipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa *InCyte Software*.



Figura 19 – Citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT* utilizado para a avaliação da apoptose, necrose, viabilidade e ciclo celular.

4.9.2 Necrose celular

- as células foram tripsinizadas e o botão de células centrifugado a 300 g por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS. A lavagem da suspensão de células foi repetida novamente;

- as células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS e distribuídas em três microtubos de 1,5 mL;

- foi adicionado 100 microlitros do reagente Guava Nexin (Millipore, Belford MA, USA);

- no segundo tubo e no terceiro tubo as células foram fixadas em 200 μ L de etanol 70% e incubadas a 4°C por um período de 12 horas;

-
- os microtubos 1 e 2 contendo as células e o reagente foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz;
 - foi acrescentado 200 μ L de PBS e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT* (Millipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa *InCyte Software*.

4.9.3 Apoptose celular

- as células foram tripsinizadas e o botão de células foi centrifugado a 300 g por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS. A lavagem do botão de células foi repetida novamente;
- as células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS e distribuídas em três microtubos de 1,5 mL;
- em um tubo foi adicionado 100 μ L do reagente Guava Nexin (Millipore);
- no segundo tubo e no terceiro tubo as células foram fixadas em 200 μ L de etanol 70% e incubadas a 4°C por um período de 12 horas;
- os microtubos 1 e 2 contendo as células e o reagente foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz;
- foi acrescentado 200 μ L de PBS e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT* (Millipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa *InCyte Software*.

4.9.4 Análise do ciclo celular

- após o período de fixação das células do terceiro micro-tubo, elas foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas para retirada do sobrenadante;
- o botão de células foi ressuspensado em 200 μ L de reagente Guava

Cell Cycle (Millipore, Belford MA, USA);

- foi acrescentado 100 μ L de PBS e as amostras foram submetidas na análise no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT* (Millipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa *InCyte Software*.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados entre os grupos 2D e 3D foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Os resultados obtidos da avaliação entre os grupos GC, GE3 e GE4 foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas pelo *software SSP* (NY, USA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir foram determinados após a análise do estudo piloto (APÊNDICE I), o qual apontou como grupos mais importantes para a realização do experimento principal os grupos G3 e G4 submetidos a um período de seis horas de compressão.

Quadro 1: Valores individuais da porcentagem de apoptose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).

	2D			3D		
	GC	GE3	GE4	GC	GE3	GE4
1	0,5	0,3	0,7	0,5	0,7	0,8
2	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,8
3	0,7	0,8	0,7	0,4	0,6	0,6
4	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7
5	0,7	0,8	0,6	0,8	0,7	0,8
6	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,8
7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
8	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6
9	0,7	0,7	0,8	0,5	0,6	0,8
10	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8
Média	0,65	0,70	0,70	0,65	0,70	0,80
Mediana	0,65	0,70	0,70	0,65	0,70	0,80
DP	0,08	0,07	0,06	0,12	0,06	0,08

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; GE3: grupo experimental (3g/6h). GE4: grupo experimental (4g/6h).

Quadro 2: Valores individuais da porcentagem de necrose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).

	2D			3D		
	GC	GE3	GE4	GC	GE3	GE4
1	2,80	3,10	4,80	2,60	2,90	4,10
2	2,60	3,10	4,75	2,80	3,10	4,80
3	2,60	2,90	4,10	2,60	3,10	4,75
4	2,60	3,03	4,30	2,56	2,90	4,40
5	2,70	2,98	4,30	2,87	3,00	4,40
6	2,75	3,25	4,20	2,70	3,05	4,89
7	2,60	3,14	4,30	2,91	2,90	4,80
8	2,70	3,10	4,10	2,69	2,95	4,60
9	2,60	2,90	4,10	2,76	2,95	4,80
10	2,70	3,05	4,10	2,60	3,10	4,86
Média	2,66	3,07	4,30	2,70	2,95	4,64
Mediana	2,65	3,04	4,25	2,69	2,87	4,77
DP	0,07	0,10	0,26	0,12	0,08	0,25

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; GE3: grupo experimental (3g/6h). GE4: grupo experimental (4g/6h).

Quadro 3: Valores individuais da porcentagem de viabilidade celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Via Count (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).

	2D			3D		
	GC	GE3	GE4	GC	GE3	GE4
1	96,70	96,70	94,50	96,50	96,50	94,10
2	96,30	96,30	94,50	96,70	96,70	94,20
3	96,60	96,60	94,50	96,90	96,90	94,60
4	96,50	97,01	94,90	96,70	96,80	94,70
5	96,70	96,86	94,10	96,30	96,70	94,50
6	96,40	96,80	94,90	96,60	96,40	94,80
7	96,70	97,02	94,30	96,60	96,80	94,90
8	96,40	96,90	94,50	96,40	96,50	94,30
9	96,50	96,70	94,60	96,80	96,60	94,60
10	96,40	96,50	94,70	96,40	96,70	94,70
Média	96,52	96,73	94,55	96,59	96,66	94,54
Mediana	96,50	96,75	94,50	96,60	96,70	94,60
DP	0,14	0,22	0,24	0,19	0,15	0,26

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; GE3: grupo experimental (3g/6h). GE4: grupo experimental (4g/6h).

Quadro 4: Valores individuais da porcentagem da análise do ciclo, fase sub G0 celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).

	2D			3D		
	GC	GE3	GE4	GC	GE3	GE4
1	17,30	37,70	37,50	18,40	37,40	37,10
2	17,54	40,60	41,67	17,76	37,70	37,50
3	17,30	37,70	37,50	24,67	39,65	45,87
4	18,95	37,23	36,90	25,86	38,70	40,76
5	17,78	38,65	37,80	24,90	39,05	41,34
6	17,54	37,70	37,50	18,65	37,60	44,87
7	18,95	38,05	37,65	17,50	37,40	42,93
8	16,99	37,98	38,01	19,00	37,80	43,62
9	18,01	37,80	36,90	18,65	37,70	44,76
10	17,86	37,90	37,84	20,85	38,10	45,76
Média	17,82	37,75	37,92	20,62	37,56	42,45
Mediana	17,66	38,13	37,57	18,82	38,47	43,27
DP	0,66	0,54	1,36	3,25	0,76	3,20

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; GE3: grupo experimental (3g/6h). GE4: grupo experimental (4g/6h).

Quadro 5: Valores individuais da porcentagem da análise do ciclo celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore).

	2D			3D		
	GC	GE3	GE4	GC	GE3	GE4
1	43,87	49,54	50,00	18,40	50,01	51,21
2	42,45	47,46	51,23	43,78	49,87	51,76
3	41,65	49,54	50,00	43,98	49,54	50,00
4	42,56	49,90	50,00	43,67	50,20	50,00
5	40,65	47,80	51,00	43,87	50,10	50,00
6	43,19	47,50	50,76	44,00	50,00	51,21
7	42,94	48,56	54,54	43,21	49,98	51,34
8	43,76	47,80	51,54	43,87	50,10	52,00
9	42,65	48,10	52,87	43,97	49,80	51,89
10	43,76	49,50	51,87	44,08	50,20	51,65
Média	42,69	48,57	51,38	44,12	49,98	51,10
Mediana	42,65	48,33	51,11	43,85	50,00	51,27
DP	1,06	0,96	1,44	1,92	0,20	0,80

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; GE3: grupo experimental (3g/6h). GE4: grupo experimental (4g/6h).

Tabela 1. Valores das médias das porcentagens de apoptose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore)

	Grupos		n	Valor de p
	2D	3D		
GC	0,65±0,08	0,65±0,12	10	0,311
GE3	0,70±0,17	0,70±0,06	10	0,432
GE4	0,70±0,07	0,80±0,08	10	0,387
Valor de P	0,365	0,276		

A avaliação entre 2D e 3D foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e ambos com valores de $p \leq 0.05$ assinalados por (*).

GC 2D: grupo controle monocamada; GC 3D: grupo controle substrato de colágeno; GE3 2D: grupo experimental monocamada 3 g/cm²; GE3 3D: grupo experimental substrato de colágeno 3 g/cm²; GE4 2D: grupo experimental monocamada 4g/cm²; GE4 3D: grupo experimental substrato de colágeno 4 g/cm².

Tabela 2. Valores das médias das porcentagens de necrose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore)

	Grupos		n	Valor de p
	2D	3D		
GC	2,65±0,074	2,69±0,12	10	0,343
GE3	3,04±0,10	2,87± 0,08	10	0,343
GE4	4,25±0,26	4,77±0,25	10	0,412
Valor de P	0,02*	0,03*		

A avaliação entre 2D e 3D foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e ambos com valores de $p \leq 0.05$ assinalados por (*).

GC 2D: grupo controle monocamada; GC 3D: grupo controle substrato de colágeno; GE3 2D: grupo experimental monocamada 3 g/cm²; GE3 3D: grupo experimental substrato de colágeno 3 g/cm²; GE4 2D: grupo experimental monocamada 4 g/cm²; GE4 3D: grupo experimental substrato de colágeno 4 g/cm².

Tabela 3. Valores das médias das porcentagens de viabilidade celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Via Count (Millipore) no citômetro Guava (Millipore)

	Grupos		n	Valor de p
	2D	3D		
GC	96,50±0,14	96,60±0,19	10	0,532
GE3	96,75±0,22	96,15±0,15	10	0,487
GE4	94,50±0,24	94,60±0,26	10	0,452
Valor de P	0,482	0,548		

A avaliação entre 2D e 3D foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e ambos com valores de $p \leq 0.05$ assinalados por (*).

GC 2D: grupo controle monocamada; GC 3D: grupo controle substrato de colágeno; GE3 2D: grupo experimental monocamada 3 g/cm²; GE3 3D: grupo experimental substrato de colágeno 3 g/cm²; GE4 2D: grupo experimental monocamada 4 g/cm²; GE4 3D: grupo experimental substrato de colágeno 4 g/cm².

Tabela 4. Valores das médias das porcentagens do ciclo celular, fase sub G0 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore)

	Grupos		n	Valor de p
	2D	3D		
GC	17,66±0,66	18,82±3,25	10	0,401
GE3	38,13±0,54	38,47±0,73	10	0,581
GE4	37,57±1,36	43,27±3,20	10	0,489
Valor de P	0,02*	0,03*		

A avaliação entre 2D e 3D foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e ambos com valores de $p \leq 0.05$ assinalados por (*).

GC 2D: grupo controle monocamada; GC 3D: grupo controle substrato de colágeno; GE3 2D: grupo experimental monocamada 3 g/cm²; GE3 3D: grupo experimental substrato de colágeno 3 g/cm²; GE4 2D: grupo experimental monocamada 4 g/cm²; GE4 3D: grupo experimental substrato de colágeno 4 g/cm².

Tabela 5. Valores das médias das porcentagens do ciclo celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore)

	Grupos		n	Valor de p
	2D	3D		
GC	42,65±1,06	43,85±0,26	10	0,765
GE3	48,33±,43	50,00±0,20	10	0,321
GE4	51,11±1,44	51,27±0,80	10	0,811
Valor de P	0,124	0,256	0,124	

A avaliação entre 2D e 3D foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e ambos com valores de $p \leq 0.05$ assinalados por (*).

GC 2D: grupo controle monocamada; GC 3D: grupo controle substrato de colágeno; GE3 2D: grupo experimental monocamada 3 g/cm²; GE3 3D: grupo experimental substrato de colágeno 3 g/cm²; GE4 2D: grupo experimental monocamada 4 g/cm²; GE4 3D: grupo experimental substrato de colágeno 4 g/cm².

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O modelo de compressão de células deste estudo está diretamente relacionado com a definição de mecanotransdução. A mecanotransdução foi definida como o estímulo mecânico aplicado à célula, e este estímulo é essencial para a manutenção do metabolismo do osso e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (KANG & ROBLING, 2015). Enquanto a sinalização da mecanotransdução foi considerada importante para a regeneração dos tecidos, sua interpretação continua crítica para determinar respostas celulares específicas tais como sinais mecânicos, como a redução da perda óssea, o aumento da formação óssea e a diferenciação de células osteogênicas (QIN & HU, 2014). Neste estudo foi desenvolvido um modelo de compressão celular para verificar *in vitro* os eventos celulares que acontecem *in vivo* quando a célula é submetida à uma força compressiva. Este modelo de compressão foi elaborado para a aplicação de carga por meio de um sistema mecânico, assim como os modelos de compressão utilizados nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAGIMA *et al.* (2008). Um sistema hidráulico, com nível de compressão que variou de 20 a 50 mm Hg foi utilizado por NAKAGOMATSUO *et al.* (1996) enquanto que outros autores como SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) utilizaram um sistema de compressão celular computadorizado.

O estudo *in vitro* tem sido muito utilizado devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ podem ser obtidos de forma precisa (SANT'ANA *et al.*, 2002). O modelo *in vivo* mais complexo e especializado cujas células

são submetidas à uma carga compressiva durante a função é o ligamento periodontal que é um tecido conjuntivo responsável pela união entre o dente e o osso alveolar. Este tecido é composto de células residentes e denominada de fibroblastos periodontais, que são responsáveis pela produção, reparação e manutenção da matriz celular (ANDERSEN & NORTON, 1991; KOOK, JANG, LEE, 2011). As células do ligamento periodontal promovem a regeneração tecidual por meio de suas habilidades de migração, proliferação e capacidade de se diferenciarem em células osteoblásticas e cementoblásticas, bem como em novos fibroblastos do ligamento periodontal (LEKIC & MCCULLOCH, 1996; ALVES *et al.*, 2015). Os fibroblastos do ligamento periodontal são derivados do folículo dental e se tornam populações de células distintas logo após o começo do desenvolvimento radicular (LEKIC & MCCULLOCH, 1996). Os fibroblastos periodontais em resposta à pressão exercida por forças biomecânicas induzidas, podem iniciar uma cadeia de eventos na movimentação dentária, incluindo a remodelação óssea alveolar (NAKAGO-MATSUO, 1996; LEE *et al.*, 2007). Assim como KOHNO *et al.* (2002), LEE *et al.* (2007), NAKAGIMA *et al.* (2008) e LISBOA *et al.* (2009) usaram modelos compressivos sobre fibroblastos do ligamento periodontal, a principal célula envolvida neste estudo também foi o fibroblasto do periodonto, devido às particularidades da sua estrutura e a dificuldade em executar experimentos *in vivo*.

Para reconstituir o ambiente *in vivo*, as células devem aderir e crescer adequadamente nos arcabouços tridimensionais (3D) facilitando assim o contato célula-célula e a expressão do fenótipo esperado (MINUTH, 1998). As células utilizadas sobre um substrato de colágeno demonstraram um comportamento semelhante ao de células *in vivo* em

relação à sua morfologia, síntese protéica, expressão de enzimas e regulação do crescimento celular (MUELLER-KLIESER, 1997; CHEVALLAY & HERBAGE, 2000). As células cultivadas em matriz 3D (géis, substrato e arcabouços de colágeno) representam mais de perto a estrutura natural e função dos tecidos *in vivo* no que diz respeito à fisiologia, forma da célula e seu ambiente, aspectos tais que desempenham um papel importante em muitos processos biológicos tais como crescimento, metabolismo, desenvolvimento, diferenciação e expressão gênica (XU *et al.*, 2009), apesar de existirem poucos modelos tridimensionais para estudar os aspectos celulares e moleculares das células do ligamento periodontal humano sob compressão estática (HECKLER *et al.*, 2013). O colágeno é sintetizado pelos fibroblastos e representa cerca de 20-30% das proteínas totais do corpo, sendo a mais abundante no organismo (BUMANN *et al.*, 1997). Na engenharia tecidual, os arcabouços mais utilizados tem sido os de colágeno devido à sua excelente biocompatibilidade, associada às suas características biológicas, tais como biodegradabilidade e fraca antigenicidade (LEE *et al.*, 2007). O colágeno desempenha um papel importante na formação de tecidos e órgãos, e está envolvido em várias expressões funcionais das células. Devido a isso tem sido amplamente utilizado em aplicações na área da saúde (LISBOA *et al.*, 2009). Os géis de colágeno são capazes de tomar qualquer forma desejada e mostraram uma distribuição celular uniforme, o que permitiu a síntese homogênea de componentes da matriz extracelular (SAMINATHAN *et al.* (2013). O comportamento das células em substratos de colágenos indicaram que esta proteína provoca influência na morfologia, migração, adesão e diferenciação celular, alterando ainda o perfil de progressão do fenótipo celular (LI *et al.*, 2013). Neste estudo foi utilizado o substrato de

colágeno bovino, PureCol®, que é um colágeno Tipo I. O colágeno Tipo I é um componente estrutural principal da pele, ossos, tendões e outros tecidos conjuntivos fibrosos, e difere de outros colágenos pela baixa hidroxilação da lisina e da composição de hidratos de carbono baixo. Esta solução avançada de colágeno, o PureCol®, possui cerca de 97% de colágeno Tipo I com o restante sendo constituído por colágeno Tipo III. Outros autores como HECKLER *et al.* (2013) utilizaram o PureCol® e KURESHI *et al.* (2015) e ALVES *et al.* (2015) empregaram em suas pesquisas soluções de colágeno Tipo I.

Na literatura não houve consenso quanto à aplicação de carga e tempo ideais para a aplicação de forças compressivas em fibroblastos periodontais, devido a diferença metodológica entre os estudos. NAKAGOMATSUO *et al.* (1996) aplicaram uma carga em fibroblastos periodontais por meio de um sistema hidráulico e elevaram a pressão, para um nível que variou de 20 a 50 mm Hg e observaram que estas células poderiam responder à mudanças de pressão e fornecer uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para a movimentação dos dentes, diferentemente deste estudo, que utilizou um sistema mecânico onde a pressão utilizada foi gerada pela pressão direta e contínua. Nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAGIMA *et al.* (2008) foram utilizadas forças compressivas na cultura de fibroblastos periodontais humanos para a investigação da produção de RANKL e Osteoprotegerina utilizando forças compressivas que variaram de 0 à 4 g/cm² por um período de 0 – 48 horas. Nestes dois trabalhos os resultados mostraram que a magnitude da força de compressão e o tempo estão diretamente relacionados com o aumento da produção de RANKL. Essas duas pesquisas foram utilizadas para a determinação dos valores mínimos e máximo dos tempos e as cargas

utilizadas neste estudo, pois mesmo já tendo sido discutida a relação entre carga e tempo de compressão admitiu-se que cada modelo laboratorial de compressão possuiu suas particularidades e que esses dois parâmetros deveriam ser estudados novamente no modelo proposto. LI *et al.* (2013), utilizaram um substrato 3D (arcabouço) para realizar a compressão de células periodontais aplicando forças de 25 g/cm² durante 6, 24 e 72h. Os autores identificaram os genes indutores de osteoclastogênese, inibidores de osteoclastogênese e outros reguladores de remodelação óssea. Neste estudo, para efeito de comparação, com relação a cultura em monocamada foi utilizado uma carga menor que a utilizada por LI *et al.*, (2013) e isto pode ser o fator responsável pelo resultado de não ter conseguido encontrar diferenças entre os grupos 2D e 3D na avaliação dos nossos parâmetros. A utilização do colágeno como substrato foi utilizada também por ALVES *et al.*, (2015) os quais concluíram que cultura de fibroblastos periodontais cultivados em gel de colágeno mantiveram as suas características fenotípicas distintas. SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) utilizaram em seus estudos cargas que variaram de 0,7 a 5,2 cN/mm² com tempo entre 6 e 12 horas.

Este estudo, que foi baseado na proposta de um modelo de compressão estática contínua, possuiu a intenção de produzir *in vitro* uma situação normalmente vista na fisiologia, as análises foram realizadas no sentido de se obter alguns *scores* como por exemplo: menor necrose, nível de apoptose e viabilidade igual ao controle. A interpretação da morte celular por apoptose e/ou necrose foi instituído pois estes fenômenos estão diretamente relacionados à fisiologia e patologia celular. A morte celular programada ou apoptose é importante no desenvolvimento embrionário e

fetal, na renovação das células e em vários aspectos da maturação dos mecanismos imunológicos de defesa, e parece ter um papel fundamental na regulação do tamanho e da forma tecidual. Ocorre de forma ordenada e necessita de gasto de energia para a sua execução. Em condições normais, a apoptose participa do controle da proliferação e diferenciação celular. Se a morte celular for seguida de autólise (degradação dos compartimentos celulares realizadas pelas enzimas da própria célula, liberadas pelos lisossomas após a morte celular), o processo recebe o nome de necrose. Os agentes agressores produzem necrose por redução de energia, produção de radicais livres, ações sobre enzimas e agressão à membrana citoplasmática .

Na avaliação da morte celular por apoptose foi utilizado o *Kit* Guava Nexin e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT pelo programa *InCyte Software*. Nos dois grupos de cultura, em monocamadas e com substrato de colágeno, e na avaliação entre os grupos controle (GC) e grupos experimentais GE3 e GE4 não houve diferença estatística nos valores da apoptose. No trabalho NETTELHOFF *et al.* (2015) foi utilizado o ensaio do TUNEL e mesmo com o aumento da carga compressiva, o índice de apoptose não aumentou. Este estudo e os estudos de SAMINATHAN *et al.* (2013) e JACOBS *et al.* (2013) também confirmaram os mesmos achados.

Com relação à avaliação da morte celular por necrose foi utilizado o *kit* Guava Nexin e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT e analisadas no programa *InCyte Software*. Na avaliação entre os grupos controle (GC), experimental três (GE3) e experimental quatro (GE4) com relação a necrose houve maior necrose no GE4 quando comparado com os GC e GE3. Entre o GC e GE3 não houve

diferença estatística. Isto significou que quanto menor a carga de compressão, menor o índice de morte celular por necrose. Foi constatado por HECKLER *et al.* (2013) que células cultivadas nos géis de colágeno apresentaram índice menor de células mortas por necrose, porém, neste estudo, não houve diferença estatística entre os grupos monocamada e substrato quanto aos valores de necrose.

A avaliação da viabilidade celular teve como objetivo a verificação de células viáveis após submetidas à compressão estática contínua. Foi utilizado o reagente Guava Via Count e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT e analisadas no programa *InCyte Software*. No grupo com cultivo em monocamada (2D) e substrato de colágeno e nos grupos controle, GE3 e GE4 a viabilidade no modelo de compressão ficou acima de 94%. A viabilidade celular mostrou-se consistente com as observações de outros estudos como os de SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013), ALVES *et al.* (2015) e NETTELHOFF *et al.* (2015) que utilizaram o ensaio MTT para sua verificação. Com relação à avaliação entre os grupos GC, GE3 e GE4 não houve diferença estatística entre os mesmos diferentemente dos resultados obtidos por URIBE *et al.* (2011), SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) que verificaram que com o aumento da carga houve menor viabilidade. HECKLER *et al.* (2013) e ALVES *et al.* (2015) avaliaram a viabilidade, morte celular e proliferação em culturas celulares em monocamadas e com substrato de colágeno. Asseguraram que houve maior viabilidade e menor morte celular no modelo 3D, porém neste estudo não houve diferença estatística entre as culturas monocamada e com substrato quando da avaliação da viabilidade.

Num organismo pluricelular, os mecanismos de divisão celular são essenciais para permitir a embriogênese e o crescimento. Além disso, a divisão celular assegura a reparação tissular ou celular após um ferimento que tenha promovido uma perda de células. Mas, mesmo no estado basal em um adulto, permanentemente, células morrem e é imperativa sua substituição. A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula do organismo sofre modificações cíclicas que conduzem à divisão celular e à formação de duas células filhas. Ele está dividido em quatro fases: a fase G1 (G para *gap*, que significa intervalo) durante a qual a célula cresce devido às sínteses protéicas, a fase S (Síntese) quando a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M (M para mitose) que representa a divisão celular propriamente dita. O ciclo celular foi avaliado utilizando-se o reagente Guava Cell Cycle na fase sub G0 e na fase G0-G1 tanto na cultura em monocamada como na cultura com substrato de colágeno englobando os grupos controles e experimentais. Na fase sub G0 há uma maior quantidade de fragmentos, debris das células, restos de DNA e fragmentos de membranas. Esses fragmentos não são considerados como células. Entre os grupos monocamada e substrato não houve diferença estatística, mas entre os grupos GC, GE4 houve diferença com maior quantidade de restos celulares no GE4. Entre o GC e o GE3 também houve diferença estatística. Estes valores estão relacionados com o aumento da necrose quando aplicada uma carga maior. Se aumentou o índice de necrose com aplicação de uma carga maior houve também um aumento de fragmentos celulares com o aumento da carga. Já na fase G0-G1 não houve diferença estatística entre os grupos monocamada e substrato e na avaliação entre os grupos GC, GE3 e GE4 também não houve diferença.

PERSPECTIVAS

A utilização deste modelo de pressão estática contínua pode ser indicada na avaliação funcional das células quanto à expressão de mediadores pré-inflamatórios.

Na avaliação dos genes envolvidos na pressão estática (RANK, RANKL e OPG).

Na utilização de pesos maiores para a verificação das alterações celulares.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Dentro das limitações e simplicidade da metodologia deste estudo, foi possível concluir que:

- não houve diferença entre os grupos quanto a utilização ou não do substrato de colágeno;
- não houve diferença entre os grupos quanto a porcentagem da viabilidade celular;
- o grupo com 4 g/cm^2 apresentou maior porcentagem de necrose;
- na avaliação da fase sub G0 do ciclo celular houve diferença entre os dois grupos experimentais e o grupo controle.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Alves LB, Mariguela VC, Grisi MFM, Souza SLS, Novaes Júnior AB, Taba Júnior M, Oliveira PT, Palioto DB. Expression of osteoblastic phenotype in periodontal ligament fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel, *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(2);206-214.

Andersen KL, Norton LA. A Device for the application of known simulated orthodontic forces to human cells *in vitro*. *J. Biomechanics.* 1991 7;649-654.

Basdra EK. Biological reactions to orthodontic tooth movement. *J. Orofac. Orthop.* 1997; 1;2-15.

Bumann A., Carvalho R. S., Schwarzer C. L., Yen E. H. K. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *European Journal of Orthodontics* 1997; 19;29-37.

Carano A, Siciliani G. Exposed effects of continuous and intermitente forces on human fibroblast *in vitro*. *European Orthodontic Society.* 1996; 18;19-26.

Chen FM; Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue engineering. Part B, Reviews.* 2010;16; 219-55.

-
- Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2000;38; 211-218.
- Daley WP; Peters SB; Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*. 2008;121; 255-264.
- Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Strain dependent Up-regulation of Ephrin- B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 43;651-664.
- Duscher D, Maan ZN, Wong VW, Rennert RC, Januszyk M, Rodrigues M, Hu M, Whitemore AJ, Whittam AJ, Longaker MT, Gurtner GC. Mechanotransduction and fibrosis. *J Biomech*. 2014; 4;1997-2005.
- Griffith LG; Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002; 295;1009-1014.
- Hacopian N, Hosseinzadeh-Nik T, Ghahremani MH, Rahimi HR, Ostad SN. Effects of continuous and interrupted forces on gene transcription in periodontal ligament cells *in vitro*. *Acta Medica Iranica*. 2011;10;643-649.
- Heckler AF, Mirzaei Z, Pereira I, Simmons CA, Gong S-G. Development of a three-dimensional in vitro model system to study orthodontic tooth movement. *Archives of Oral Biology*. 2013; 58;498-510.

-
- Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, Walter C, Wehrbein H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Archives of Oral Biology*. 2013; 58;896-904.
- Kang KS, Robling AG. New insights into Wnt-Lrp5/6 – beta-catenin signaling in mechanotransduction. *Frontiers in Endocrinology*. 2015; 5:1-5.
- Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *Journal of Orthodontics*. 2002; 29;129-135.
- Kook SH, Jang YS, Lee JC. Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF-mediated activation of CD 4 + T cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112;2891-2901.
- Kureshi AK, Afoke A, Wohlert S, Barker S, Brown RA. 3D culture model of fibroblast-mediated collagen creep to identify abnormal cell behavior. *Biomech Model Mechanobiol*. 2015; 16;1-9.
- Lee YH, Nahm DS, Jung YK, Choi JY, Kim SG, Cho M, Kim MH, Chae CH, Kim SG. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *Journal Periodontol*. 2007;41;446-452.
- Le Gall M, Sastre J. The fundamentals of tooth movement. *International Orthodontics*. 2010; 8;1-13.

Lekic P, McCulloch CAG. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *The Anatomical Record*. 1996; 245:327-341.

Li Y, Li M, Tan L, Huang S, Zhao L, Tang T, Liu J, Zhao Z. Analysis of time-course gene expression profiles of a periodontal ligament tissue model under compression. *Archives of Oral Biology*. 2013; 58:511-522.

Lisboa RA, Lisboa FA, Santos GC, Melo Andrade MV, Cunha-Melo JR. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast submitted to simulated orthodontic force. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*. 2009; 45:614-621.

MacDonald C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol*. 1990; 10:155-178.

Minuth WW, Sittinger M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell and tissue Research*. 1998; 291:1-11.

Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American Journal of Physiology*. 1997; 273:1109-1123.

Nakagima R, Yamaguchi M, Kojima T, Nakano M, Kasai K. Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand production by periodontal ligament cells *in vitro*. Journal of Periodontal Research. 2008; 43;168-173.

Nakago-Matsuo C, Matsuo T, Nakago T. Intracellular calcium response to hydraulic pressure in human periodontal ligament fibroblasts. AM J Ortho Dentofac Orthop. 1996; 109;244-248.

Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblast and osteoblast. Clinical Oral Investigations. 2015; 9;1-9.

Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells *in vitro*. Orthod Craniofacial. 2006; 9;63-70.

Notomi T, Ezura Y, Noda M. Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. Journal of Biological Chemistry. 2012; 287(42);350-357.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 1982;9;290-296.

-
- Qin YX, Hu M. Mechanotransduction in musculoskeletal tissue regeneration: effects of fluid flow, loading, and cellular-molecular pathways. *BioMed Research International*. 2014; 14;1-12.
- Redlicha M, Roosb HA, Reichenbergb E, Zaksb B, Mussigc D, Baumertc U, Golanc I, Palmon A. Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. *Archives of Oral Biology*. 2004; 49;119-124.
- Saminathan A, Vinoth KJ, Low HH, Cao T, Meikle MC. Engineerig three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan-gelatin hydrogel films and a mechanically active environment. *J Periodont Res*. 2013;48;790-801.
- Sant'ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Culture and caracterization of human derived periodontal ligament cells. *Rev. Fac. Odontol Bauru*, 2002;10;134-140.
- Shen T, Qiu L, Chang H, Yang Y, Jian C, Xiong J, Zhou J, Dong S. Cyclic tension promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *J Clin Exp Pathol*. 2014; 7;7872-7880.
- Tan L., Ren Yijin., Wang J., Jiang L., Cheng H., Sandham A., Zhao Z. Osteoprotegerin and ligand of receptor activator of Nuclear factor. *Angle Orthodontist*. 2009; 2;292-298.

Uribe F, Kalajzic Z, Bibko J, Nanda R, Olson C, Rowe D, Wadhwa S.

Early effects of orthodontic forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. *Angle Orthodontist*. 2011; 2;284-291.

Xu T, Molnar P, Gregory C, Das M, Boland T, Hickman JJ.

Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials*. 2009; 30;4377-4383.

Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, Ngan P, Lanese R, Davidovitch Z. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1995; 4;402-409.

Zentner A., Heaney T. G., Serfl H. G. Proliferative response of cells of the dentogingival junction to mechanical stimulation. *European Journal of Orthodontics*. 2000; 639-648.

Zhu Y, Shang L, Chen X, Kong X, Liu N, Bai Y, Fang J, Dang J, Wang X, Jin Y. Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption. *Journal of Cellular Physiology*. 2013; 228;207-215.

Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells International*. 2015; 20; 101-111.

NORMAS ADOTADAS

ISO – International Standardization Organization

ISO – Technical. Comit/Scientific Comit TC 150/SC 7?WG123

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM F 2150-02. American Society Test Materials Forms C7/123

BIREME – Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde DeCS: descritores em ciências da saúde

Disponível em <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660>

Exe/decserver/?Isis Script⁺./cgi-bin/decserver/decserver

Xis&interface_language=p&previous_page=homepage&previous_task=NULL&task=star

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss. Versão Monusuário 2009. São Paulo: Objetiva; 2009

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [online]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2010 Apr, cited 2011 Jan 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>

Michaelis A. Dicionário inglês-português 25^a ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2008.

PubMed.gov. U.S.National Library of Medicine – National Institutes of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Sociedade Brasileira de Anatomia. Nômina Anatômica. 5ª ed. Rio de Janeiro (BR): Medsi; 2001.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: In vitro studies of models are considered as gold standard for cell analysis activities aimed mimetics of the dynamics of cells in vivo, even when the cell samples are subjected to static compression. Cells when grown in a substrate represent the natural structure and function of tissues in vivo with respect to physiology, cell shape and its environment.

Objective: To evaluate the viability and cell death in the pressure model continues the culture of fibroblasts derived from human periodontal ligament. **Methods:** We selected 10 patients who underwent extractions of 4 the 3rd molars included for orthodontic indication. The sample consisted of 4 mm² of periodontal tissue of the middle third of the roots. The same was grown to the 6th passage, then the cells were divided into two groups: the Control Group (CG) with culture monolayer and the substrate without application of force for 6h and Experimental Group (EG3, EG4) with growing monolayer and substrate 3 of load application and 4 g/cm² for 6 hours. **Results:** Both the CG when the EG3 and EG4, monolayer and substrate showed no statistical difference in cell viability and apoptosis values. With increasing load the EG4 indicated greater necrosis than the CG and EG3. **Conclusion:** There was no difference in the use of collagen substrate in the culture of periodontal fibroblasts in all evaluated parameters, but there was a higher necrosis with increasing load on the intra-group evaluation.

Key words: Periodontal ligament, Cell survival, Apoptosis, Cell culture techniques.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

ESTUDO PILOTO

Estudo realizado com as células derivadas de três doadores, de forma a padronizar as variáveis do estudo principal.

Foram formados os seguintes grupos experimentais:

Experimento A (monocamada):

GC 2D (grupo controle 2D com células sem compressão avaliadas por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G1 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $1,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G2 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $2,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G3 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $3,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G4 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $4,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G5 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $5,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G6 2D (2×10^5 células submetidas à uma compressão de $6,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas).

Experimento B (substrato de colágeno):

GC 3D (grupo controle com células sem compressão avaliadas por 6 horas; 12 horas; 24 horas e 30 horas));

G1 3D (células submetidas à uma compressão de 1,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G2 3D (células submetidas à uma compressão de 2,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G3 3D (células submetidas à uma compressão de 3,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G4 3D (células submetidas à uma compressão de 4,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G5 3D (células submetidas à uma compressão de 5,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G6 2D (células submetidas a uma compressão de 6,0 g/cm² por 6 horas; 12 horas; 24 horas e 30 horas).

RESULTADOS: ESTUDO PILOTO

AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

Quadro 6. Valores encontrados da porcentagem de Apoptose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 1

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	0.5	0.7	0.5	0.7	0.1	0.5	0.6	0.6	0.6
G1		0.4	0.8	0.5	0.7		0.6	0.7	0.6	0.7
G2		0.6	0.6	0.6	0.8		0.7	0.8	0.7	0.8
G3		0.3	0.8	0.8	0.7		0.7	0.9	0.9	0.8
G4		0.7	0.6	0.9	0.7		0.8	0.8	0.7	0.8
G5		0.7	0.8	0.7	0.7		0.7	0.9	0.9	0.8
G6		0.8	0.7	0.8	0.7		0.8	0.8	0.7	0.8

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 7. Valores encontrados da porcentagem de Apoptose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 2

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	0.5	0.6	0.6	0.6	0.1	0.7	0.6	0.7	0.9
G1		0.6	0.7	0.6	0.7		0.6	0.7	0.6	0.7
G2		0.7	0.8	0.7	0.8		0.4	0.8	0.7	0.8
G3		0.4	0.8	0.7	0.8		0.4	0.8	0.7	0.8
G4		0.6	0.7	0.8	0.9		0.6	0.7	0.8	0.9
G5		0.7	0.9	0.9	0.8		0.8	0.9	0.8	0.7
G6		0.8	0.8	0.7	0.8		0.7	0.9	0.8	0.8

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 8. Valores encontrados da porcentagem de Apoptose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 3

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	0.7	0.6	0.7	0.9	0.1	0.4	0.8	0.7	0.8
G1		0.5	0.7	0.6	0.8		0.6	0.7	0.6	0.7
G2		0.6	0.7	0.8	0.9		0.6	0.7	0.6	0.7
G3		0.8	0.7	0.9	0.7		0.6	0.7	0.8	0.9
G4		0.7	0.7	0.8	0.8		0.6	0.7	0.8	0.9
G5		0.8	0.9	0.8	0.7		0.7	0.9	0.9	0.8
G6		0.7	0.9	0.8	0.8		0.8	0.8	0.7	0.8

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

AValiação da Necrose

Quadro 9. Valores encontrados da porcentagem de Necrose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 1

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	2,80	3,50	3,80	3,90	0.1	2,60	2,90	3,40	3,7
G1		2,80	3,70	3,70	3,80		2,60	3,10	3,70	3,8
G2		3,10	3,60	3,60	3,90		2,70	3,30	3,60	3,9
G3		3,10	3,50	3,50	3,50		2,90	3,50	3,50	3,5
G4		4,80	4,80	4,90	4,90		4,10	3,95	4,90	4,9
G5		4,87	4,85	4,85	4,85		4,40	4,15	4,85	4,85
G6		4,90	4,90	4,90	4,90		4,60	4,48	4,90	4,9

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 10. Valores encontrados da porcentagem de Necrose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 2

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	2,60	3,10	3,50	3,30	0.1	2,80	3,50	3,80	3,90
G1		2,70	3,50	3,70	3,20		2,80	3,70	3,70	3,80
G2		3,00	3,40	3,70	3,10		3,10	3,60	3,60	3,90
G3		3,10	3,60	3,50	3,40		3,10	3,50	3,50	3,50
G4		4,75	4,80	4,90	4,95		4,80	4,80	4,90	4,90
G5		4,90	4,80	4,95	4,90		4,87	4,85	4,85	4,85
G6		4,90	4,80	4,90	4,85		4,90	4,90	4,90	4,90

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 11. Valores encontrados da porcentagem de Necrose Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 3

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	2,60	2,90	3,40	3,70	0.1	2,60	3,10	3,50	3,30
G1		2,60	3,10	3,70	3,80		2,70	3,50	3,70	3,20
G2		2,70	3,30	3,60	3,90		3,00	3,40	3,70	3,10
G3		2,90	3,50	3,50	3,50		3,10	3,60	3,50	3,40
G4		4,10	3,95	4,90	4,90		4,75	4,80	4,90	4,95
G5		4,40	4,15	4,85	4,85		4,90	4,80	4,95	4,90
G6		4,60	4,48	4,90	4,90		4,90	4,80	4,90	4,85

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Quadro 12. Valores encontrados da porcentagem da Viabilidade Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Via Count (Millipore) o citômetro Guava (Millipore) – Paciente 1

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	99,9	96,70	96,70	96,70	96,80	99,8	96,50	96,80	96,80	96,60
G1		96,80	96,80	96,80	96,50		96,80	96,50	96,50	96,80
G2		96,30	96,80	96,80	96,80		96,70	96,80	96,80	96,30
G3		96,60	96,70	96,70	96,70		96,70	96,70	96,70	96,70
G4		94,50	94,20	94,20	94,60		94,30	94,60	94,60	94,50
G5		94,40	94,30	94,30	94,25		94,30	94,25	94,30	94,35
G6		94,30	94,30	94,30	94,40		94,30	94,40	94,40	94,40

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 13. Valores encontrados da porcentagem da Viabilidade Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Via Count (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 2

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	99,8	96,30	96,80	96,80	96,30	99,80	96,70	96,70	96,80	96,70
G1		96,80	96,80	96,50	96,60		96,50	96,80	96,60	96,50
G2		96,60	96,70	96,80	96,50		96,80	96,80	96,30	96,80
G3		96,60	96,70	96,70	96,80		96,80	96,70	96,50	96,80
G4		94,50	94,20	94,60	94,40		94,60	94,20	94,40	94,60
G5		94,30	94,35	94,25	94,45		94,25	94,35	94,45	94,25
G6		94,30	94,30	94,40	94,40		94,40	94,30	94,40	94,40

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 14. Valores encontrados da porcentagem da Viabilidade Celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Via Count (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 3

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	99,8	96,60	96,70	96,50	96,40	99,80	96,90	96,60	96,40	96,30
G1		96,80	96,50	96,80	96,60		96,50	96,80	96,60	96,80
G2		96,50	96,80	96,70	96,30		96,90	96,80	96,30	96,30
G3		96,60	96,70	96,70	96,70		96,70	96,70	96,80	96,50
G4		94,50	94,60	94,20	94,40		94,60	94,20	94,40	94,50
G5		94,37	94,25	94,35	94,45		94,25	94,95	94,95	94,37
G6		94,20	94,60	94,70	94,20		94,95	95,30	95,40	95,10

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

FASE SUB-G0

Quadro 15. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase sub-G0, na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 1

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	8,26	17,30	24,46	25,78	34,53	9,76	18,40	25,01	24,90	34,50
G1		35,19	55,91	50,00	27,64		32,70	54,86	49,98	26,90
G2		36,36	21,74	43,22	16,96		37,30	27,69	44,00	17,30
G3		37,70	19,81	30,77	26,47		37,40	20,65	32,00	26,50
G4		37,50	34,91	34,65	21,25		37,10	35,08	34,00	22,70
G5		45,00	32,28	35,71	25,48		44,90	33,98	36,00	26,00
G6		57,60	34,97	38,93	33,71		56,98	35,94	39,00	34,00

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 16. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase sub-G0 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 2

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	11,54	17,54	25,81	25,01	25,78	13,65	17,76	24,67	25,78	34,76
G1		33,34	34,86	36,60	32,50		36,23	55,87	51,00	28,21
G2		38,65	27,90	27,69	43,22		36,36	22,67	43,09	17,01
G3		40,65	29,65	30,87	30,77		37,70	19,67	31,97	27,87
G4		41,67	37,08	35,08	35,56		37,50	35,87	35,23	24,34
G5		46,98	39,28	37,65	38,65		45,00	33,61	37,54	27,98
G6		57,09	50,94	49,08	56,87		57,60	35,78	39,41	34,87

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 17. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase sub-G0 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit* Guava Cell Cycle (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 3

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	16,91	17,30	24,46	25,78	34,53	13,76	24,67	25,78	25,78	34,53
G1		35,19	28,39	32,83	34,87		25,87	31,01	39,87	37,64
G2		36,36	31,74	43,22	38,76		29,67	43,22	43,22	39,96
G3		37,70	39,81	38,77	39,01		39,67	40,77	30,77	38,47
G4		37,50	44,91	44,65	39,76		45,87	44,65	44,65	39,25
G5		45,00	44,28	45,71	40,97		47,51	45,71	45,71	41,48
G6		57,60	53,60	50,76	43,87		45,88	48,63	48,93	43,71

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

FASE G0-G1

Quadro 18. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit Cell Cycle* (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 1

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	61,56	43,87	45,67	49,27	53,85	62,45	43,78	50,03	48,78	49,54
G1		41,67	50,43	44,15	58,18		41,50	59,87	43,76	54,67
G2		48,93	50,72	42,80	57,69		47,65	51,98	41,56	56,32
G3		49,54	54,77	59,02	56,26		50,01	53,72	49,99	55,43
G4		50,00	47,12	60,38	52,50		51,21	57,65	49,87	51,45
G5		37,03	52,79	50,00	54,16		50,76	54,67	48,76	53,65
G6		58,62	57,75	60,53	50,82		58,88	59,76	56,78	52,65

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 19. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit Cell Cycle* (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 2

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	64,65	42,45	54,87	43,21	43,76	63,98	43,98	44,44	40,83	41,87
G1		42,45	53,65	43,76	54,87		47,67	43,97	45,32	48,76
G2		47,68	42,34	41,89	56,91		48,93	49,72	47,29	54,39
G3		47,46	56,74	60,02	55,43		49,87	50,73	53,87	55,82
G4		51,23	53,65	61,21	53,64		51,76	53,92	56,98	56,83
G5		38,36	57,98	50,00	54,67		57,02	57,82	58,76	59,87
G6		57,92	56,84	61,43	54,84		59,98	60,32	62,76	63,09

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Quadro 20. Valores encontrados da porcentagem do Ciclo Celular, fase G0-G1 na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o *Kit Cell Cycle* (Millipore) no citômetro Guava (Millipore) – Paciente 3

	2D					3D				
	0h	6h	12h	24h	30h	0h	6h	12h	24h	30h
GC	62,87	41,65	42,34	49,27	53,85	67,54	43,67	48,65	49,12	49,65
G1		41,67	43,76	44,15	58,18		41,67	62,60	44,15	50,43
G2		48,93	50,72	42,80	57,69		48,93	50,72	42,80	52,65
G3		49,54	54,77	59,02	56,26		49,54	54,77	59,02	53,87
G4		50,00	47,12	60,38	52,50		50,00	47,12	60,38	54,97
G5		37,03	52,79	50,00	54,16		37,03	52,79	50,00	55,58
G6		58,62	57,75	57,43	56,98		58,62	57,75	59,78	57,65

2D: cultura em monocamada; 3D: cultura em substrato de colágeno; GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

O estudo piloto foi idealizado para a obtenção de informações que não foram encontradas na literatura vigente, com a finalidade de obtermos a carga e o tempo de compressão ideais para se utilizar no experimento principal. Para isto foi proposto a utilização de cargas que variavam de sem carga, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g/cm² por um período de tempo que oscilou entre 6, 12, 24 e 30 horas tanto para pressão em culturas celulares em monocamada como em culturas celulares usando o substrato de colágeno com o objetivo de verificarmos qual a carga e o período de tempo que produziriam a maior viabilidade celular, menor morte celular por apoptose e necrose além de permitir a verificação do ciclo celular. O estudo piloto permitiu a observação dos seguintes fenômenos: a) em relação aos intervalos de tempo de pressão estudados não houve diferença estatística entre si, entretanto todos foram diferentes em relação ao controle, desta forma poderíamos optar por manter as células sob pressão no menor intervalo, ou

seja, seis horas; b) não houve diferença nos resultados das variáveis analisadas entre os grupos de fibroblastos cultivados em monocamada ou sobre o substrato de colágeno; c) os resultados dos grupos G3 e G4, 3 g/cm² e 4 g/cm², respectivamente, deveriam ser considerados para o experimento principal, pois no grupo G3 os resultados ficaram muito próximos do grupo controle, mantendo assim os níveis de morte celular baixos e o nível de células viáveis mais alto, e no caso do G4 observou-se uma tendência de maior necrose e menor viabilidade em relação a G3, mas nenhuma diferença em relação a G5 e G6, 5 g/cm² e 6 g/cm², respectivamente. Como não foi possível verificar por meio do estudo piloto, qual carga/área seria a mais influente no estudo principal (G3 ou G4), a estratégia adotada foi a de se conduzir os experimentos com ambas, e assim poder analisar se uma amostra significativamente maior estes resultados se manteriam.

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Convido o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa: **Modelo de compressão contínua na cultura de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano**, sob a responsabilidade do pesquisador Marco Antonio Mattar, a qual pretende coletar informações importantes para um melhor entendimento do cultivo de células do ligamento periodontal humano.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da cirurgia dos terceiros molares inclusos, cuja a mesma transcorrerá normalmente, sem nenhuma

alteração, prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será coletado o tecido que for retirado durante a cirurgia e que seria descartado (porque não está não tem mais utilidade) para ser enviado ao Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Se você aceitar participar, estará contribuindo para ajudar no tratamento e na recuperação do tecido ósseo humano.

Se depois de consentir em sua participação o Sr. (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa> o (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço (***Rua Pedro de Toledo, 781 – 11º andar, frente***), pelo telefone 11(5579.2583), ou poderá entrar em contato com o o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br

Todas as informações e os materiais coletados serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa.

As informações que li ou que foram lidas para mim foram suficientes, descrevendo o estudo: **Modelo de compressão contínua na cultura de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano**. Eu conversei com o Marco Antonio Mattar sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Todas as intenções do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de

esclarecimentos permanentes ficaram claros para mim. Também ficou claro que a minha participação neste estudo é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar se houver algum dano pessoal relacionado diretamente à este estudo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a sua realização, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)


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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXOS

ANEXO 1

FOLHA DE APROVAÇÃO - Parecer 378.852 de 31/08/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP/ HOSPITAL SÃO PAULO		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Titulo da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PRESSÃO CONTÍNUA NA CULTURA TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.		
Pesquisador: Marco Antonio Mattar		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 19048213.5.0000.5505		
Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 378.852		
Data da Relatoria: 30/08/2013		
Apresentação do Projeto:		
Conforme parecer do CEP. 347582 de 2/8/2013		
Objetivo da Pesquisa:		
Conforme parecer do CEP. 347582 de 2/8/2013		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Conforme parecer do CEP. 347582 de 2/8/2013		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Conforme parecer do CEP. 347582 de 2/8/2013		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Pendências atendidas.		
Carta do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos apresentada.		
Recomendações:		
sem recomendações adicionais		
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:		
sem pendências		
Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br		

Página 01 de 02

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 378.852

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

parecer acatado pelo colegiado

SAO PAULO, 30 de Agosto de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572. 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras [serial online] 2005; 20 Suppl. 2:02-9. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-865020050000800002&script=sci_arttext.

Nahas FX, Ferreira LM. A arte de redigir um trabalho científico [online]. Acta Cir Bras. 2005;20(2):17-7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S0102-865020050000800005.