

DELAINI PIRES ROMAN MIGUEL

**FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS EM
MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM IL-1
BETA NO MODELO DE FORÇA COMPRESSIVA
ESTÁTICA CONTÍNUA**

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

**SÃO PAULO
2016**

DELAINI PIRES ROMAN MIGUEL

**FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS EM
MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM IL-1 β
NO MODELO DE FORÇA COMPRESSIVA ESTÁTICA
CONTÍNUA**

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

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

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

COORIENTADORA: Prof^a. Silvana Gaiba

SÃO PAULO

2016

Miguel, DelainiPires Roman.

Fibroblastos Periodontais humanos em meio de cultura suplementado com IL-1 β sob força compressiva estática contínua./Delaini Pires Roman

Miguel. -- São Paulo, 2016.

xiv, 95f.

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

Título em inglês: Human periodontal fibroblasts in culture medium supplemented with IL-1 β under static compressive force continues.

1 Periodonto. 2 Ligamento periodontal. 3 IL-1. 4 IL-6. 5 TNF-alfa..

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

Primeiramente à Deus pela oportunidade da vida.

*Aos meus pais, irmã, meu amado esposo **FABIO SCHEMAN MIGUEL**
companheiro de todas as horas, meus filhos **LUCCA ROMAN
SCHEMANN MIGUEL** e **ENZO ROMAN MIGUEL**, razões da minha
vida que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até esta etapa de minha vida.*

Agradecimentos

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 **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 meu coorientador **Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALOISE**, PROFESSOR AFILIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pela paciência, pela ajuda incondicional, pelo incentivo e por acreditar 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.

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.** Obrigada pela convivência e pelos bons momentos compartilhados.

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.

Aos colegas de PÓS GRADUAÇÃO, **FABIO SCHEMANN MIGUEL,** grande companheiro e incentivador, **MARCO ANTONIO MATTAR e MATEUS DE ABREU PEREIRA,** pela amizade, incentivo e dedicação para que este trabalho tornasse realidade.

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.

*“Aprenda como se fosse viver para sempre.
Viva como se fosse morrer amanhã .”*
Santo Isidoro de Sevilha – teólogo espanhol.
560-636

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTAS DE FIGURAS.....	ix
LISTAS DE QUADROS.....	x
LISTAS DE TABELAS.....	xi
LISTAS DE ABREVEATURAS	xii
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	04
3. LITERATURA.....	06
4. MÉTODOS.....	38
5. RESULTADOS.....	54
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	73
8. REFERÊNCIAS.....	75
NORMAS ADOTADAS.....	83
ABSTRACT.....	85
APÊNDICE.....	87
ANEXOS.....	91
FONTES CONSULTADAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Imagem e esquema da região de obtenção do fragmento de ligamento periodontal obtido através da raspagem do terço médio das raízes com lamina de bisturi nº 12 dentro do fluxo laminar.....43
- Figura 2** – Cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm com esfera de aço inoxidável no seu interior.....46
- Figura 3** – Aplicação da carga sobre as células como auxílio de uma pinça.....47
- Figura 4** – Modelo compressivo.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró-inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	55
Quadro 2: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de apoptose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró-inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	57
Quadro 3: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de necrose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró-inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	59
Quadro 4: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de expressão gênica no qPCR de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró-inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho dos <i>Primers</i>	52
Tabela 2: Medianas e desvio padrão da porcentagem da viabilidade de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	56
Tabela 3: Valores de “p” obtidos pela comparação dos grupos em pares baseados na tabela 2.	56
Tabela 4: Medianas e desvio padrão da porcentagem da apoptose de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	58
Tabela 5: Valores de “p” obtidos pela comparação dos grupos em pares baseados na tabela 4.	58
Tabela 6: Medianas e desvio padrão da porcentagem da necrose de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	60
Tabela 7: Tabela 7: Medianas e desvio padrão da porcentagem da expressão gênica da IL-6 dos fibroblastos periodontais cultivados em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por qPCR nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).	62

LISTA DE ABREVIATURAS

GC	grupo controle
GE1	grupo experimental 1
GE2	grupo experimental 2
IL-6	interleucina 6
IL-1	interleucina 1
IL-1 β	interleucina 1beta
LDPH	ligamento periodontal humano
LP	ligamento periodontal
FLDP	fibroblasto do ligamento periodontal
FLDPH	fibroblasto do ligamento periodontal humano
RANK	receptor ativador de fator nuclear kappa
RANKL	receptor ativador de fator nuclear kappa ligante
OPG	osteoprotegerina
TNF-alfa	fator de necrose tumoral - alfa

RESUMO

RESUMO

Introdução: A mecanotransdução pode ser um mecanismo de diferenciação celular para fibroblastos derivados do ligamento periodontal bem como a inflamação local pode também exercer um papel importante na resposta molecular destas células **Objetivo:** Avaliar a viabilidade, apoptose, necrose celular e a expressão gênica da IL-6 e TNF-alfa de fibroblastos periodontais em um meio de cultura suplementado com IL-1 beta no modelo de compressão estática contínua **Métodos:** Quarenta terceiros molares extraídos de 10 pacientes selecionados para obtenção de 4 mm² de tecido periodontal do terço médio das suas raízes. Os fibroblastos foram isolados, cultivados, expandidos até a 6^a passagem e suplementados com meio de cultura pró inflamatório (IL-1beta 5ng/mL). Distribuídos em três grupos conforme a carga aplicada: Grupo Controle sem carga, Grupo Experimental 1 com carga de 3g/6h e Grupo Experimental 2 com carga de 4g/6h. Os grupos foram analisados pelos métodos de Citometria de fluxo e qPCR. **Resultados:** Quanto a viabilidade celular o grupo controle obteve resultados maiores que ambos os grupos experimentais, e não foram verificadas diferenças entre os grupos experimentais. A apoptose celular foi maior no Grupo Experimental 2 quando comparada aos grupos Controle e Experimental 1, não havendo diferenças entre estes. Não foram observadas diferenças nos grupos em relação à necrose celular. Na expressão gênica não detectou-se a expressão de TNF-alfa, constatando a expressão de IL-6 com valores semelhantes nos grupos analisados. **Conclusão:** Fibroblastos periodontais humanos em meio de cultura suplementado com IL-1 beta no modelo de força compressiva estática contínua apresentaram diminuição da viabilidade celular, aumento da apoptose e não apresentaram alterações de necrose e expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa.

Descritores: 1. Periodonto; 2.Ligamento periodontal; 3.IL-1; 4.IL-6; 5.TNF-alfa.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O ligamento periodontal é um tecido conectivo constituído por fibras, principalmente colágenas que são envolvidas por uma matriz gelatinosa juntamente com células, vasos sanguíneos e nervos. A principal célula e unidade funcional do ligamento periodontal é o fibroblasto periodontal. Esta célula pode ser encontrada em diferentes tipos, como o fibroblasto gengival e do ligamento periodontal. Os fibroblastos do ligamento periodontal são fundamentais na homeostase do tecido periodontal e remodelação óssea, desempenhando um papel importante como “construtor, arquiteto, zelador” (LEKIC & MCCULLOCH, 1996, POULSEN & HOLMSTRUP, 1997). Sob condições fisiológicas normais o periodonto recebe várias formas de estímulos mecânicos, as forças oclusais (NAKASHIMA *et al.*, 2009), que vão promover vários mecanismos bem regulados, que envolvem manutenção e remodelação do colágeno das fibras periodontais. Este processo é denominado de mecanotransdução ou seja, as células respondem a estímulos mecânicos com a expressão de substâncias químicas que presumivelmente conduzem a um sistema de sinalização como a expressão de substâncias pró inflamatórias. A interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) como também o sistema RANK, RANKL e a osteoprotegerina (OPG) (YOUSEFIAN, 1995; KOHNO *et al.*, 2002; NISHIJIMA *et al.*, 2006; KOOK, JANG, LEE, 2011; NOTOMI, EZURA, NODA, 2012; ZHU *et al.*, 2013) fazem parte desta sinalização.

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 ou para a remodelação óssea alveolar (LEE *et al.*, 2007).

Os processos inflamatórios são eventos vistos frequentemente no tecido periodontal e interferem no equilíbrio dos mecanismos de equilíbrio entre a formação óssea e da reabsorção óssea. Podemos citar a periodontite que é uma inflamação crônica que leva à perda óssea não desejada como resposta a compostos inflamatórios tais como a interleucina-1beta (IL-1 β). (BLOEMEN *et al.* 2011).

Estudos *in vitro* foram realizados no intuito de aumentar a resposta inflamatória do tecido periodontal com o uso sinérgico da Inteleucina- 1 IL-1 β e IL-6, e demonstraram que, nos tecidos inflamados tendem a ser os responsáveis pela destruição do tecido e que o desequilíbrio induzido pelas citocinas inflamatórias tornou-se um fator importante no entendimento do mecanismo da destruição do tecido periodontal (SAWADA *et al.*, 2010).

Este estudo consistiu da elaboração de um modelo experimental para avaliar a expressão de substancias pró-inflamatórias nos fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano adulto cultivados num meio de cultura suplementado com interleucina IL-1 β e submetidos a uma força compressiva estática contínua.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a viabilidade celular, apoptose celular, necrose celular e a expressão gênica da IL-6 e TNF-alfa em fibroblastos periodontais humanos em meio de cultura suplementado com IL- beta no modelo de compressão estática contínua.

LITERATURA

3.LITERATURA

FRENCH (1992) relatou que a mecanotransdução seria o processo que permitiu que os organismos vivos respondessem aos seus ambientes mecânicos. A gama de sistemas mecanosensitivos foi descrita há quase dez anos e esta avaliação concentrou-se em algumas das mais recentes áreas de pesquisa ativas. A mecanotransdução seria convencionalmente encarada como um processo em três fases: (A) o estímulo seria mecanicamente acoplado ao receptor de célula; (B) a deformação seria transduzida num sinal elétrico, potencial do gerador ou receptor de potencial; (C) o potencial receptor seria codificado em potenciais de ação para transmissão para o sistema nervoso.

SHIMIZU *et al.* (1992) relataram que a interleucina-1 foi uma citocina presente na gengiva, no fluido crevicular de pacientes com periodontite e no ligamento periodontal de dentes movidos experimentalmente, possuindo atividades biológicas múltiplas, incluindo a capacidade de induzir a reabsorção óssea. A interleucina-6 (IL-6) também encontrada na gengiva de pacientes com periodontite, pôde induzir a reabsorção óssea osteoclástica através do seu efeito sobre a osteoclastogênese. Nesse estudo a IL-6 e a sua produção em resposta a expressão do gene recombinante interleucina-1 (IL-1) foram examinadas na cultura de células primárias do ligamento periodontal. A IL-1 recombinante estimulou a produção de IL-6 pelas células do ligamento periodontal em uma dose dependente de tempo. Esse aumento na produção de IL-6 nos fibroblastos do ligamento periodontal foi muito mais elevado

do que nos fibroblastos gengivais de humanos. Hibridação local, usando uma sonda de oligonucleotídeo sintético de DNA referente ao gene da IL-6, revelou que a maioria das células do ligamento periodontal expressaram RNA mensageiro da IL-6 em resposta ao tratamento com interleucina-1 recombinante. A constatação que a IL-6 foi produzida por células do ligamento periodontal e foi regulada pela IL-1 recombinante revelou um mecanismo potencialmente importante para controlar a reabsorção óssea alveolar.

YOUSEFIAN *et al.* (1995) desenvolveram um aparelho para aplicar pressão hidrostática dinamicamente às células do ligamento periodontal (LP) *in vitro*. O objetivo desta investigação foi desenvolver um sistema dinâmico de aplicação de pressão hidrostática positiva e negativa à culturas de células do LP e determinar se foi possível imitar “*in vitro*” as mesmas respostas causadas pela aplicação de tensão e compressão contínua que estas células foram submetidas durante o tratamento ortodôntico “*in vivo*”. Foram colhidas células do LP 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 PHN) respectivamente. A aplicação de PHP entre 0.3 e 30 gm/cm^2 aumentou significativamente a produção de prostaglandinas E (PGE) e de AMP cíclico (cAMP) intracelular. Em contraste, a estimulação por PHN diminuiu significativamente a produção de PGE e o nível intracelular de cAMP. A taxa de proliferação celular aumentou significativamente nas primeiras 24 e 48hs após a estimulação com -30 gm/cm^2 de PHN. Em contrapartida, a estimulação com +30 gm/cm^2 de PHP diminuiu significativamente a taxa de proliferação dessas células a 24 e 48

hs. A estimulação entre +30 a +600 gm/cm^2 aumentou a largura e o comprimento das células e pareceu aumentar a superfície de adesão ao fundo das placas de cultura. Em contraste PHN (entre -30 e -600 gm/cm^2) diminuiu essas dimensões e pareceu reduzir a superfície de fixação. Esses resultados indicaram que este tipo de perturbação mecânica nas células do LP produziram respostas fisiológicas e não foi prejudicial à vitalidade das células. A remodelação que ocorreu nos tecidos de suporte do dente foi de fundamental importância na prática da clínica ortodôntica. Células como os odontoblastos, os condroblastos e as células do LP, foram capazes de traduzir as forças de compressão e tensão aplicadas sobre elas em sinais biomecânicos extra e intracelulares, porém o mecanismo, o padrão e a periodicidade em que elas responderam a essa deformação mecânica ainda não está completamente desvendada.

CARANO & SICILIANI (1996) conceberam neste trabalho um modelo experimental para estudar o comportamento morfológico e metabólico das células humanas, submetidos a cargas mecânicas cíclicas ou estáticas. O modelo uniu fibroblastos humanos em membranas de silicone revestidas de colágeno, as quais foram submetidas a alongamentos contínuos e cíclicos por um motor acoplado a uma estrutura de suporte móvel. O efeito de alongamento contínuo ou cíclico sobre a secreção de colagenase, uma enzima que desempenha um papel importante no processo de movimentação dos dentes, foi medida. Alongamento cíclico dos fibroblastos durante o período de quatro dias (sofreram deformação de 7% do seu comprimento, na função cíclica, com duração de seis minutos, três minutos alongado e três minutos relaxado), aproximadamente dobrou a produção de colagenase em comparação com o controle. O alongamento

contínuo, por outro lado, foi de apenas 50% eficaz no aumento da liberação de enzimas (sofreram deformação de 7% de seu comprimento). Em contraste, a secreção do inibidor de colagenase (TIMP) não foi afetado por qualquer forma de deformação mecânica. Para entender o efeito das forças cíclicas, um estudo morfológico utilizando fibroblastos humanos foi realizado. Verificou-se que houve uma imediata e proporcional deformação das células quando submetidas a alongamento ou a compressão. Após 10-15 minutos, a morfologia das células readaptou-se ao novo ambiente mecânico, causando uma perda da ativação biológica. Isto sugeriu que um novo estímulo mecânico seria necessário para induzir uma nova reação biológica. Concluiu-se que as forças cíclicas eram mais efetivas que as forças contínuas na estimulação dos fibroblastos humanos na produção de colagenase. O comportamento diferencial das células nos variados modos de aplicação de deformação mecânica, poderiam ser encontrados na rápida deformação morfológica para uma nova condição física de substrato.

LEKIC & MCCULLOCH (1996) relataram que os fibroblastos eram as células predominantes do ligamento periodontal com um papel importante no desenvolvimento, função e a regeneração do dispositivo de suporte dental. Processos biológicos iniciados durante a formação do ligamento periodontal contribuíram para as propriedades de longa duração homeostática exibidas por populações de fibroblastos do ligamento periodontal. No desenvolvimento a formação do ligamento periodontal foi provavelmente controlada por um epitélio mesenquimal interagindo com o tecido epitelial mais duro, mas os mecanismos atuais que contribuíram para o desenvolvimento de linhagens celulares no ligamento periodontal são desconhecidos. Os fibroblastos no funcionamento do ligamento

periodontal normalmente migraram ao longo do tecido de fibras de colágeno para o cemento e osso na direção ápice-coroa durante a erupção dentária. Em tecido adulto, experimentos com cinética celular mostraram que fibroblastos do ligamento periodontal compreenderam um sistema de renovação das células em estado estacionário e as células progenitoras poderiam gerar vários tipos diferenciados, células especializadas. As populações de células progenitoras do ligamento periodontal foram enriquecidas em locais adjacentes aos vasos sanguíneos e em espaços contíguos endosteal. No funcionamento normal do tecido periodontal, existiu uma rotação relativamente modesta de células em que a morte de células apoptóticas equilibrou as células de proliferação. Os grandes aumentos na formação de células e células diferenciadas ocorrerem após a aplicação de forças ortodônticas ou ferimentos. E como as células do ligamento periodontal compreendem vários fenótipos celulares, tem sido postulado que após a aplicação de forças ortodônticas ou ferimentos os fenótipos diferentes repovoaram o sítio que em última análise, ditaram a forma e tipo de tecido. Concluíram que os fibroblastos do ligamento periodontal desempenharam um papel essencial na resposta à forças mecânicas nos dentes, pela remodelação e reparação estéril ou danos aos componentes da matriz. Em consideração aos papéis importantes desempenhados por fibroblastos na homeostase do ligamento periodontal elas puderam ser descritas como "o construtor, arquiteto, e zelador "do ligamento periodontal.

NAKAGO-MATSUO, MATSUO, NAKAGO (1996) em seu ensaio expuseram a cultura de fibroblastos do ligamento periodontal à mudança controlada em pressão hidráulica que foram monitoradas constantemente

com um medidor de pressão elétrica (Gauge), e 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 mudança de pressão. Os resultados suportaram mais uma ideia 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 limiar de pressão (27 a 68 g/cm²) obtidos neste experimento que os fibroblastos começaram a responder forneceram uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para clínica ortodôntica.

BRASDA (1997) enfatizou que o entendimento dos fundamentos biológicos da movimentação dentária era 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 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 visaram 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 terceiros molares extraídos por razões não periodontais de três pacientes saudáveis, sem sinais clínicos ou radiográficos de doença periodontal. Posteriormente, as células foram caracterizadas por 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 vimentin, 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 fibroblastos 2, eram derivadas do ligamento periodontal e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos *in vitro*.

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 (FCG) 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 ligamento periodontal humano (LPh). Dez pacientes adolescentes foram incluídos. O FCG 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 LPh 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 significativa 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 LPH 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) avaliaram respostas iniciais e tardias dos genes relacionados ao estresse compressivo nas células do ligamento periodontal (LDP), particularmente, a expressão de interleuquina IL-6, IL-8 e fosfatase alcalina (FAL). As culturas primárias de células do LDP foram cultivadas em gel de colágeno tridimensional e receberam força estática de compressão contínua ($1,76\text{g/cm}^2$). Os genes expressos foram examinados por ensaios de microarranjo (microarray) 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 de cDNA foram analisados posteriormente por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). FAL, IL-6 e IL-8 foram selecionados entre os genes que tiveram alterações significativas de expressão e subsequentemente foram confirmados por RT-PCR quantitativa. A concentração de proteína secretada para IL-6, IL-8 e atividade de FAL foram medidas 72 horas após a aplicação de força compressiva estática contínua. Os níveis de proteína de IL-6 aumentaram significativamente em 72 horas ($p < 0,001$), mas não houve mudança significativa na IL-8 ($p > 0,05$). A atividade de FAL diminuiu 41,5% comparada com o grupo controle ($p = 0,015$). Considerando que a IL-6 foi um potente ativador osteoclástico e que o lado de compressão do LDP durante o movimento ortodôntico mostrou a reabsorção do tecido calcificado, a alteração da expressão de IL-6 e FAL em resposta à força de compressão estática nas células do LDP puderam contribuir para o movimento ortodôntico dentário ou para a remodelação óssea alveolar.

KOYAMA *et al.* (2008) afirmaram que na movimentação ortodôntica, algumas citocinas liberadas por fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos do osso alveolar no lado de pressão puderam alterar o processo normal de remodelação óssea, resultando em uma reabsorção óssea fisiológica. Foi examinado o efeito da força de compressão e interleucina -1 tipo I antagonista do receptor (IL-1ra) na expressão de citocinas inflamatórias que promoveram a formação de osteoclastos, assim como nos seus receptores, em células osteoblásticas Saos-2. No método as células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal bovino, com ou sem força de compressão contínua ($0,5-3,0 \text{ g / cm}^2$) e/ou IL-1ra para até 24 horas. Os níveis de citocinas e seus receptores de expressão de genes foram estimados para determinar os níveis de mRNA usando PCR em tempo real; os níveis de proteína foram determinadas usando ELISA ou coloração imuno-histoquímica. Tiveram como resultados que expressão de IL-1beta, receptor de IL-1, IL-6, receptor de IL-6, receptor de IL-8, IL-11 e fator- α de necrose tumoral (TNF) aumentou em função da força e duração da força de compressão, enquanto que a expressão de IL-8, IL-11 e do receptor do receptor de TNF- α não alteraram com a aplicação de força de compressão. A expressão de citocinas e os seus receptores produzidos por $3,0 \text{ g/cm}^2$ de força de compressão diminuiu com a simultânea adição de IL-1ra e a diminuição foi notável no receptor de IL-8, IL-11 e TNF. Concluíram que o *stress* mecânico induziu a produção de citocinas inflamatórias e seus receptores nos osteoblastos e o fenômeno foi realçado pela a ação autócrina de IL-1b, o qual foi aumentado em quantidade pelo *stress* mecânico.

NAKAGIMA *et al.* (2008) descreveram que o *stress* mecânico ocasionado pelo aparelho ortodôntico induz a substâncias biologicamente ativas. O fator de crescimento de fibroblastos foi uma citocina multifuncional que possuiu vários efeitos nas células fibroblásticas, e fator-2 de crescimento de fibroblasto, desempenhou um papel importante na remodelação do ligamento periodontal. O receptor ativador nuclear fator kappa B ligante (RANKL) foi uma importante proteína envolvida na osteoclastogênese e os autores relataram recentemente que os níveis de RANKL foram aumentados pela força de compressão *in vitro*. Neste 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. No material e métodos uma força de compressão (0,5-4,0g/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 um teste tipo ELISA, enquanto que os níveis de mRNA foram determinados pela reação em cadeia da transcrição de polimerase. Além disso, anti-fator-2 de crescimento de fibroblastos foram adicionados para os meios de cultura das células e mediram a inibição de sRANKL e fator-2 de crescimento de fibroblastos. A força de compressão induziu a um nível mais alto de RANKL e fator -2 de crescimento de fibroblastos no tempo e magnitude 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 pode estar envolvido parcialmente na osteoclastogênese durante o movimento dental.

PALMQVIST *et al.* (2008) explanaram que as interleucinas-6 (IL-6) seriam citocinas pleiotrópicas, um tipo de molécula capaz de estimular a reabsorção óssea e que seria expressa por numerosos tipos de células. No presente estudo os autores testaram a hipótese de que fibroblastos gengivais exerceram um efeito osteotrópico local através da produção de IL-6 e citocinas relacionadas. A expressão de citocinas tipo IL-6, a regulação pela IL-1beta e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) foram estudados em fibroblastos da gengiva não inflamada de indivíduos saudáveis. Foi demonstrado a expressão de RNAm de IL-6, IL-11 e fator inibidor de leucemia (LIF), mas não o RNAm da oncostatina M (OSM). A estimulação de IL-6, RNAm da LIF e de proteínas foram dependestes da concentração da IL-1beta e TNF-alfa. RNAm da IL-11 e de proteínas foram estimuladas de forma dependente pela concentração de IL-1beta. A via de sinalização envolvida em IL-6 e RNAm da LIF estimularam o envolvimento da MAP quinases, mas não de NF-kB. Os resultados suportam a visão de que células residentes podem influenciar a patogênese da doença periodontal através produção osteotropic-6-citocina do tipo IL mediada por ativação de MAP quinases.

KOOK *et al.* (2009) examinaram como as forças mecânicas afetam a natureza dos fibroblastos humanos gengivais para produzir osteoprotegerina e inibir a osteoclastogênese. Os fibroblastos humanos gengivais foram expostos à forças mecânicas por centrifugação durante 90 minutos à uma magnitude de aproximadamente 50g/cm². Os níveis de osteoprotegerina, receptor ativador de fator nuclear -kB ligante(RANKL), interleuquina-1 beta e fator necrótico tumoral alfa foram medidos em vários pontos de tempo após a aplicação da força. O efeito da força

centrífuga na formação de células tipo osteoclásticas também foi determinado utilizando um sistema de co-cultura de fibroblastos humanos gengivais e células da medula óssea. A força centrífuga estimulou a expressão de osteoprotegerina, RANKL interleucina-1beta e fator de necrose tumoral alfa pelas células e a nível proteico produziu uma taxa relativamente alta de RANKL para osteoprotegerina. A interleucina-1 beta e o fator de necrose tumoral-alfa acelerou a produção de osteoprotegerina induzida pela força, e esta foi inibida significativamente pela adição de isótopo de imunoglobulina Ig anti-(interleucina-1Beta); IgG (coelho policlonal). No entanto, a adição de isótopo de Imunoglobulina Ig anti-(fator de necrose tumoral –alfa); IgG1(rato monoclonal) não teve efeito. A força centrífuga também teve um efeito inibitório na formação de osteoclastos. Concluíram que a aplicação de força centrífuga aos fibroblastos gengivais humanos acelerou a produção de osteoprotegerina pelos fibroblastos que estimulou o potencial dos fibroblastos gengivais humanos em reprimir a osteoclastogênese. Contudo os fibroblastos gengivais humano devem ter mecanismos de defesa natural para inibir a reabsorção óssea induzida pelo estresse mecânico.

NAKASHIMAN *et al.* (2009) afirmaram que o sistema de fibras elásticas compreende as fibras de oxitalânicas e fibras elásticas, diferindo nos seus teores relativos de microfibrinas e elastina. O ligamento periodontal humano contém fibras denoxitalânicas (microfibrinas puras). Os ligamentos periodontais são continuamente expostos a várias forças funcionais, como no movimento dental e forças oclusais. Há relatos que feixes de microfibrina se unem em resposta a uma tensão mecânica em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal, avaliadas em termos da

sua positividade para 15 fibrilina-1 (o principal componente das microfibrinas). No entanto o mecanismo de coalescência das microfibrinas não ficou claro. A hipótese deste estudo foi verificar se a molécula de fibrilina-1 ligante, fibrulina-5, contribuem para a formação de fibras de oxytalan sob tensão mecânica. No material e métodos utilizaram fibroblastos do ligamento periodontal que foram submetidos ao estiramento a fim de examinar os efeitos da fibrulina-5 na formação de fibras de oxytalan em células e camadas. Células do ligamento periodontal foram tranfectadas com pequena interferência de RNA para fibrulina-5, em seguida examinaram as fibras de oxytalan usando imunofluorescência e microscopia eletrônica. Como resultados, a imunofluorescência mostrou que microfibrinas fibrilina-1-positiva aglutinaram como resultado do alongamento, quando comparadas com células que não foram submetidas ao alongamento. O alongamento aumentou a expressão do gene fibrulina-5 e deposição de proteína. A análise da imunofluorescência e microscopia de imunomarcção eletrônica revelou que a supressão da fibrulina-5 inibiu a coalescência das microfibrinas sob condições de estiramento. Os autores concluíram que os resultados sugeriram que a fibrulina-5 aumentou em resposta às forças de tensão pôde controlar a formação de feixes de microfibrinas no ligamento periodontal.

LISBOA *et al.* (2009) relataram que as forças compressivas ortodônticas no ligamento periodontal promovem a expressão de mediadores pró-inflamatórios e da matriz metaloproteinase responsáveis pela movimentação dentária. O tempo de atuação nas células periodontais e o aumento da quantidade de esforço mecânico (stress) 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 cuja vantagem da centrifugação como um método para simular forças ortodônticas em cultura de células, diferentemente de outros métodos, foi devido a sua possibilidade única de tratar as células com um aumento constante de forças mecânicas durante um certo período de tempo. 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 metaloproteinase-2 de matriz de 72-KDA 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. O dados parecem indicar que a quantidade de esforço mecânico regula os níveis de secreção da matriz metaloproteinase2. Além disso, a centrifugação tal como um modelo para simular força ortodôntica, pode ser usado como uma simples e confiável método, para estudar o papel desempenhado pelas matrizes de metaloproteinases no ligamento periodontal, quando submetidos a forças mecânicas que ocorrem durante a movimentação dentária.

YAMAGUCHI (2009) afirmou que a movimentação ortodôntica dental foi induzida por estímulo mecânico e facilitada pela remodelação do ligamento periodontal (PDL) e osso alveolar. Uma pré-condição para essa

atividade remodeladora, e conseqüentemente para o deslocamento dental, foi a ocorrência de um processo inflamatório. A análise abrangeu os conhecimentos sobre o papel do receptor ativador do fator-kappa nuclear (RANK), receptor ativador do fator-kappa nuclear ligante (RANKL), e osteoprotegerina (OPG) nos tecidos de reação periodontal, em respostas às forças ortodônticas. Os resultados obtidos mostraram que concentrações de RANKL no líquido crevicular gengival (GCF) aumentou durante o movimento ortodôntico, e a proporção de concentração do RANKL para a da osteoprotegerina (OPG) foi significativamente maior do que nos sítios de controle. Estudos *in vivo* mostraram a presença de RANKL e RANK nos tecidos periodontais durante experimentos com movimentação de molares de ratos, e que células do ligamento periodontal (PDL) sob força mecânica puderam induzir osteoclastogênese através da regulação do RANKL expressão durante a movimentação ortodôntica. Concluiu que RANK, RANKL e sistema OPG desempenharam um papel importante no movimento dentário ortodôntico, e que as forças ortodônticas alteraram os níveis de RANK, RANKL e OPG no líquido crevicular gengival (GCF) durante a movimentação ortodôntica. A taxa de movimentação dental foi significativamente aumentada pela transferência do gene RANKL. Também foi relatado que a compressão do ligamento periodontal nos casos graves de reabsorção radicular podem produzir uma grande quantidade de RANKL e aumenta a regulação da osteoclastogênese. Portanto o RANK, RANKL e sistema OPG forneceram um elo importante entre remodelação óssea, movimento dental ortodôntico e reabsorção radicular, durante a movimentação ortodôntica.

MICHEL LE GALLA & JULIEN SASTREB (2010) relataram 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 expressas por esse processo, ativam outros mensageiros que diferenciam, ativam e inibem a variedade celular envolvida na movimentação dentária, que é a base de todo tratamento ortodôntico. Os fenômenos fisiológicos ativados por esse processo são complexos, envolvendo remodelação dos tecidos dentais e periodontais. O movimento dentário na ortodontia resulta da resposta biológica frente a quebra do balanço fisiológico do complexo dentofacial. O objetivo de todos esses fenômenos celulares foi restaurar a quebra de equilíbrio momentâneo causado pela força ortodôntica. Durante os últimos anos, os estudos sobre os movimentos dentários não ficaram restritos ao entendimento de como as células se comportam, e foram aprofundados para explorar o impacto e a regulação molecular dos fenômenos que envolvem inúmeras substâncias como o ácido aracdônico, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias (CSF), citocinas e neurotransmissores. Do ponto de vista técnico, os avanços no campo dos metais utilizados na ortodontia disponibilizaram uma grande variedade de fios que permitem a aplicação de forças ótimas. Do ponto de vista biológico, a resposta tecidual observada durante o movimento ortodôntico depende de inúmeros fatores que podem ser tanto relacionado ao tratamento (tipo de movimento, duração da aplicação de força, tipo de tratamento) ou da constituição dos tecidos (tipo de osso, formato das raízes). O objetivo deste artigo 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.

BLOEMEN *et al.* (2011) relataram que o equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção óssea em doenças inflamatórias seria frequentemente perturbada, e que a periodontite, uma inflamação crônica leva à perda óssea não desejada, como uma resposta a compostos inflamatórias tais como a interleucina-1 β (IL-1beta). Esta perda óssea excessiva refletiu em um aumento da formação de osteoclastos em atividade. A formação de osteoclastos foi um processo de múltiplos passos impulsionado pela osteoclastogese com as células de suporte, tais como fibroblastos de ligamento periodontal. Os fatores inflamatórios puderam induzir osteoclastogênese, provavelmente também afetando o fibroblasto do ligamento periodontal. Neste estudo investigou-se a pré-cultura de fibroblastos de ligamento periodontal com IL-1beta afetados com a osteoclastogênese. Os fibroblastos foram pré-cultivados com IL-1beta e / ou dexametasona, um composto anti-inflamatório utilizado, antes de serem co-cultivados com células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). Pré-cultura contendo IL-1beta (1-100ng/mL) resultou num aumento número de PBMC aderentes, bem como um aumento da expressão de mRNA da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), de colônias de macrófagos fator de estimulação (M-CSF) e IL-1beta. Pré-cultura com IL-1beta também causou a retração de fibroblastos e uma formação aumentada de TRACP⁺ células multinucleadas. Os dados sugeriram que a estimulação de fibroblastos com IL-1beta obtiveram efeito de longa duração, que

conduziu a um aumento significativo da osteoclastogênese. Estes resultados forneceram novas perspectivas para a compreensão da perda óssea excessiva na periodontite.

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 deste 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 humano (FLDPh). 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 minutos de forma contínua. Isto também foi realizado ininterruptamente, três vezes, durante 30 minutos e seis vezes durante 15 minutos. A codificação de RNAm para Col-I, MMP-1, e TIMP-1 foram quantificados utilizando RT-PCR. Os níveis de RNAm de Col-I e MMP-1 foram aumentados quando força contínua foi aplicada durante 30 minutos e 60 minutos, respectivamente. A força interrompida não causou efeitos significantes nos 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 LP 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. Os autores relataram 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-alfa) em resposta à compressão. Experimentos adicionais mostraram a presença de células TCD4-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-alfa 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-alfa, ou do receptor de TNF. Coletivamente, os resultados sugeriram que FLDP 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.

SCHERES & CRIEAARD (2012) estudaram que os danos causados pela periodontite nos tecidos resultam principalmente a partir de respostas do hospedeiro a microorganismos bucais. Os fibroblastos podem

desempenhar um papel importante nestas respostas, na qual os fibroblastos gengivais não toleram o lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* (PG), um patógeno responsável pela periodontite, o que pode explicar em parte a persistência de inflamação. No entanto, além de lipopolissacarídeo, o PG possuem numerosas características de virulência que prejudicam as respostas do hospedeiro. Neste estudo trabalharam com a hipótese de que os fibroblastos responderiam a um desafio bacteriano de PG (expostas varias vezes) poderia ser afetada e investigaram se a resposta inflamatória dos fibroblastos gengivais a PG foram alteradas, quando os fibroblastos tinham encontrado PG anteriormente. Em consecutivo dias, fibroblastos gengivais humanos primários foram expostos duas vezes por 6 horas com PG, ou fibroblastos foram pré-incubados durante 24 horas com uma menor concentração de PG vivo e novamente exposto durante 6 horas com uma concentração mais elevada. Os fibroblastos em todas as exposições à PG tiveram como resposta liberação de interleucina-8 e quimioatrativa de monócitos 1 sendo que na segunda exposição essa liberação foi mais fraca em fibroblastos que tinham sido contestados com PG antes. Esta diminuição nas respostas podem corresponde a uma maior expressão de um antagonista do receptor de interleucina. As respostas dos fibroblastos a um segundo desafio não foram influenciadas por pré-incubação de 24 horas. Redução de expressão de quimiocinas como respostas após exposições consecutivas a PG indicam que os fibroblastos gengivais tem resposta afetada quando deparam com uma infecção bacteriana anterior. Em periodontite, a redução da quimioquina como resposta pode prejudicar a quimiotaxia e desembaraço de microrganismos orais, levando a respostas inflamatórias prolongada e dano aos tecidos.

EL-AWADY *et al.* (2013) avaliaram se fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLP) mantinham-se homeostáticos a respostas de força de compressão fisiológica durante periodontite crônica. Utilizaram seis linhagens celulares que foram estabelecidas à partir de indivíduos com saúde periodontal (H-FLP) e outros seis foram cultivadas de pacientes diagnosticados com periodontite crônica (D-FLP) na qual foi aplicada força de compressão de 150 psi a H-D-FLP, durante três horas em dois dias consecutivos. Após a compressão, comparações entre H e D-FLP foram realizadas através de análise da expressão do gene IL-6, proteases e 84 alvos relacionados com inflamação utilizando PCR em tempo real. Obtiveram como resultados que a compressão de H-FLP resultou em um aumento significativo apenas no MMP-1 RNAm. Em contraste, a mesma força de compressão sobre D-FLP produziu significativo aumento da expressão de MMP-1, -7, -9 e -16. Além disso, a compressão de H-FLP resultou em hiper-regulação de IL-6, enquanto a compressão de H-FLP foi hiper-regulada significativamente. A compressão do H-FLP ligeiramente supra-regulada em três genes e significativamente hipo regulou 15 genes relacionados com a inflamação, enquanto o mesmo tratamento fortemente hiper regulou 21 genes relacionados com a inflamação para D-FLP. Os autores concluíram que estes resultados sugeriram uma diferença fundamental na resposta inflamatória do periodonto saudável contra FLP doentes sob compressão fisiológica. A manutenção de tais características *in vitro* sugeriu que estas células puderam estar relacionadas pela persistência da inflamação e susceptibilidade localizada na periodontite crônica.

LIU *et al.* (2013) estudaram se queratinócitos gengival e fibroblastos gengivais respondem diferentemente a ativação de citocinas pró

inflamatórias. Isto irá nos permitir compreender a resposta inflamatória crônica no processo da doença periodontal. Queratinócitos e fibroblastos gengivais foram isolados e tratados com diferentes concentrações de IL-1beta e a avaliação quantitativa do PCR em tempo real foi realizada para avaliar as expressões induzidas de hBD-1, hBD-2 e hBD-3. A resposta a inflamação induzida foi comparado entre as células epiteliais e fibroblastos gengivais. Os inibidores da proteína quinase p38 (MAPK) e o factor nuclear kappa B (NF-kB) foram aplicados para explorar o mecanismo molecular durante a indução de hBDs em ambas as células. Os resultados encontrados mostraram que as expressões de hBDs pelas células epiteliais e fibroblastos gengivais foram diferentes para as diferentes concentrações de IL-1beta. A expressão de RNAm de hBDs nos fibroblastos gengivais foi mais sensível em comparação aos queratinócitos para diferentes concentrações de IL-1beta. Os hBD-1 e hBD-3 expressos nestas duas células foram sub-regulada por IL-1beta e expressão hBD-2 foi regulada para cima. A citocina inflamatória IL-1beta teve efeito sobre a expressão dupla hBDs. Conclusões: As células epiteliais gengivais e fibroblastos responderam de forma diferente a ação inflamatória da citocina IL-1beta que indicaram diferentes papéis desempenhados pelas duas células no hospedeiro de defesa. O efeito duplo de IL-1beta na expressão hBDs pode contribuir para a regulação defensiva negativa na doença periodontal.

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 em comparação aos osteoblastos quando submetidos à

aplicação de força mecânica. 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 (methyl thiazolyl tetrazolium) que é um ensaio colorimétrico para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, 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%. A 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.

KANJANAMEKANANT, LUCKPROM, PAVASANT (2013) escreveram que o estresse mecânico foi um fator importante na manutenção da homeostase no periodonto. A interleucina-1 beta (IL-1beta) e adenosine trifosfato (ATP) foram considerados mediadores inflamatórios potentes. Nos macrófagos, do receptor P2X7 ATP-ativado esteve envolvido no processamento e liberação da IL-1beta, em trabalhos anteriores demonstraram a expressão induzida por estresse mecânico de osteopontina e RANKL através do receptor ATP / P2Y1 em células do ligamento periodontal humano (LPH). Este estudo foi concebido para examinar o efeito da tensão mecânica sobre a expressão de IL-1beta em células HPDL, bem como o mecanismo e envolvimento de ATP ao receptor P2 purinérgico. No métodos utilizaram células LPH cultivadas que foram ativadas com compressão contínua. A expressão de IL-1 β foi analisada em ambos os níveis de RNAm e proteína, utilizando RT-PCR e ELISA, respectivamente. A viabilidade celular foi examinada utilizando o ensaio de MTT que é um ensaio colorimétrico para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas. O ATP foi também utilizado para estimular células do ligamento periodontal humano. Inibidores, antagonistas e a técnica do pequeno RNA de interferência (siRNA) foram utilizados para investigar o papel de ATP e os subtipos P2 específicos responsáveis pela indução de IL-1beta juntamente com o mecanismo intracelular. Nos resultados obtiveram que o esforço mecânico pôde aumentar a expressão de IL-1beta através do liberação de ATP em células do ligamento periodontal humano. O ATP sozinho também foi capaz de aumentar a expressão da IL-1beta. A indução de IL-1beta foi marcadamente inibida pelos inibidores e pela siRNA alvejando o receptor de P2X7. A expressão da IL-1beta ATP-estimulada foi igualmente diminuída pelos inibidores de

cálcio intracelulares. Concluíram que o trabalho indicou claramente a capacidade das células do ligamento periodontal humano para responder diretamente a estimulação mecânica. Os resultados deram idéia do papel importante dos receptores de ATP / P2 purinérgicos, bem como a sinalização de cálcio intracelular, em inflamação induzida pelo stress mecânico através de regulação positiva do pró-inflamatória citocinas, IL-1beta, em células do ligamento periodontal humano.

SAWADA *et al.* (2013) descreveram que a IL-1beta e IL-6 são citocinas pró inflamatórias sendo as mais potentes envolvidas em doenças inflamatórias como a periodontite. Este estudo foi desenvolvido para avaliar o sinergismo dos efeitos da IL-1beta e IL-6 sobre a inflamação gengival na cultura de fibroblastos gengivais (FGHs). FGHs foram tratados com IL-1beta ou IL-6/solúvel IL-6R (sIL-6R), e o RNA total e o lisado celular total foram recolhidas para examinar a expressão de gp130 conhecido como um transdutor de sinal de IL-6, utilizando qRT-PCR e *Western blotting*. IL-1beta mediou IL-6 a produtividade em FGHs e foi examinada utilizando o método de ELISA. Em seguida, FGHs foram tratados com IL-6/sIL-6R, após pré-tratamento de IL-1beta, e os sinais intracelulares foram examinados usando Ocidentalblotting. Por fim, vários RNAm em expressões FGHs tratado com IL-6/sIL-6R após pré tratamento de IL-1beta foram examinadas utilizando qRT-PCR e método de ELISA. IL-1beta aumentou significativamente a expressão de gp130 e IL-6 em FGHs. IL-6 não aumentou a produção de sIL-6R em FGHs. A inflamação gengival é regulada por FGHs e afetada pela IL-1beta e IL-6/sIL-6R sinergicamente através da indução da expressão de gp130, resultando na progressão da periodontite.

JACOBS *et al.* (2014) afirmaram que a carga mecânica foi um potencial ativador da inflamação capaz de estimular fatores para destruição periodontal e do osso alveolar. O propósito deste estudo foi investigar a resposta inflamatória e síntese de proteinases pelos fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPHs) dependente em diferentes intensidade de esforço de tensão estática (ETS). Utilizaram no método *in vitro* FLPHs que foram ativados com diferentes STS (1, 5, e 10%). A expressão dos genes do ciclo-oxigenase (COX-2) e interleucina (IL)-6 foram analisados por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa. Produção de IL-6, a prostaglandina E2 (PGE2), da metaloproteinase de matriz (MMP)-8, e inibidores de tecido de metaloproteinases de matriz (TIMP)-1 tecidual foram medidos por ELISA. O RANKL foi detectado por coloração imunocitoquímica. Obtiveram como resultados que 10% ETE levaram a aumento da expressão do gene de IL-6 e de COX-2 (34,4 vezes) em FLPHs, e 1 e 5% de ETE reduziu ligeiramente a expressão do gene de IL-6. A síntese de IL-6 foi significativamente reduzida de 1% STS e estimulada por 10% ETE. Dez por cento ETE induziu significativamente a produção de PGE2. RANKL não foi detectável em qualquer força do ETE. A síntese de MMP-8 mostrou valores significativamente superiores apenas em 10% de ETE, TIMP-1 foi estimulada por 5 e 10% de ETE, resultando em maior proporção de TIMP-1 / MMP-8 em 5% ETE. Os autores concluíram que a elevação de ETE foi um potente indutor da inflamação periodontal e MMP-8, enquanto a baixa ETE mostrou um efeito anti-inflamatório. A ETE moderada gerou a maior proporção de TIMP-1 / MMP-8, levando a adequadas condições de formação da matriz extracelular. Este estudo apontou que a força desempenhou um papel fundamental para alcançar a movimentação

ortodôntica sem induzir a inflamação periodontal e ativando a regeneração da matriz extracelular.

QIN & HU (2014) enfatizaram que enquanto a sinalização da mecanotransdução foi essencial para a regeneração de tecidos, ainda continua crítica a determinação de 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 seriam 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 microRNA. Estes dados e discussões destacaram o processo ainda altamente complexo e coordenado de mecanotransdução na regeneração do tecido ósseo.

KANG & ROBLING (2015) confirmaram que a carga mecânica foi essencial para a manutenção do metabolismo normal do osso e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Os mecanismos celulares que controlariam a mecanotransdução não estariam completamente definidos, mas várias vias principais já foram identificadas. Foi discutido o papel dos vários componentes da cascata de sinalização intracelular 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 foi principalmente aumentar a formação óssea. Lrp6 também regula a massa óssea, mas a sua ação pôde 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 pôde 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 seriam 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.

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 (methyl thiazolyl tetrazolium) 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). A osteopontina, a metaloproteinase de matriz e inibição do tecido de metaloproteinase de inibição tecidual 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. A osteocalcina não sofreu alteração após a aplicação das forças compressivas. A maior relação de RANKL e 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 metaloproteinase 8 e 1. As altas forças compressivas 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.

TSUGE, NODA, NAKAMURA (2016) examinaram a reação dos tecidos no início da zona de tensão do ligamento periodontal (LP) durante a movimentação ortodôntica do dente. Os primeiros molares superiores de ratos foram movidos para vestibular com aparelhos fixos. O LP na zona de

tensão foi examinado histológico, imuno-histoquímicamente e em nível molecular, após 24h, três dias e sete dias. Após a aplicação de força ortodôntica durante 24 horas as fibras presentes no espaço periodontal foram esticadas e o espaço periodontal apareceu consideravelmente ampliado. Três dias após aplicação da força, o espaço periodontal ampliado tinha se estreitado levemente, o arranjo do ligamento periodontal foi relaxado, e os vasos sanguíneos não pareciam alongados. Uma camada considerável de osteóide foi formado sobre a superfície do osso. O total de áreas de secção transversal do LP em grupos experimentais eram significativamente maiores do que o grupo de controle. O total de áreas transversais dos vasos sanguíneos não foram significativamente diferentes entre os grupos. Observou-se significativamente elevadas expressões de IL-1beta não só nas células endoteliais e células de todo o vaso sanguíneo, mas também nos fibroblastos em todo o LP da zona de tensão 24horas após a aplicação de força ortodôntica. Após três e 7 dias de aplicação de força, estes mostraram tendências para retornar aos níveis de controle. Os resultados sugerem que a reação no início da zona de tensão do LP durante o movimento dentário consiste em duas fases: em primeiro lugar, inflamação e, segundo, a rápida recuperação e renovação do LP com a formação óssea.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este foi um estudo primário, experimental, prospectivo, analítico, controlado, aleatorizado e de centro único.

4.2 AUTORIZAÇÕES

Este estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob o protocolo 933972 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) (APENDICE 1). Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica e do PPG Cirurgia Translacional da Unifesp (Responsável e Coordenação: Profa. DRA. Lydia Masako Ferreira) que está localizado na Rua Pedro de Toledo, 781, 11º andar.

4.3 AMOSTRAS

Os fragmentos de ligamento periodontal humano foram coletados de 10 pacientes submetidos à extração de terceiros molares inclusos por indicação ortodôntica.

4.4 SELEÇÃO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A CIRURGIA DOS TERCEIROS MOLARES

4.4.1 Critérios de inclusão

Candidatos de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 30 anos, não tabagistas, com os quatro terceiros molares inclusos com indicação clínica de remoção dos mesmos.

4.4.2 Critérios de não inclusão

Candidatos que apresentavam terceiros molares com necessidade de desgaste coronário ou odontosecção no ato cirúrgico, com processos inflamatórios e infecciosos locais, com alterações patológicas locais (cistos, granulomas), com história de doenças sistêmicas e em uso de medicamentos.

4.4.3 Critério de exclusão

Quando não foi possível a obtenção de 4 mm² de ligamento periodontal, na contaminação da cultura de células e na não confluência das garrafas.

4.5 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CULTIVO DOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

4.5.1 Obtenção do ligamento periodontal

A obtenção do ligamento periodontal deu-se pela raspagem radicular do terço médio da raiz 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 e realizada 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) incisão com lâmina de bisturi 15; 5) descolamento muco-periosteó com sindesmoto; 6) osteotomia por caneta de alta rotação com broca 703; 7) remoção do dente impactado com elevador reto; 8) colocação do dente removido imediatamente no cubo cônico de transporte; 9) toailete da cavidade com soro fisiológico 0,9%; 10) sutura por pontos simples (3 a 5 pontos) com fio de seda 3-0, agulhado, com agulha triangular. Para o pós-operatório foi prescrito antibiótico por sete dias (Amoxicilina 500mg) e antiinflamatório hormonal por três dias (Dexametasona 4mg). As suturas foram removidas sete dias após as extrações.

Após o ato operatório, os dentes foram imediatamente acondicionados em tubos cônicos estéreis de 15 ml contendo 5 ml de solução de transporte composta por meio de cultura Alpha-MEM

suplementado com 1% de antibióticos e antifúngico (5000U penicilina e 5000µg estreptomicina + 25µg anfotericina-B) (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA).

O transporte dos tubos com os dentes extraídos para Laboratório de Cultura de Células e Célula Tronco da Disciplina de Cirurgia Plástica e do PPG Cirurgia Translacional da Unifesp deu-se no período máximo de seis horas após o ato operatório. Estes tubos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo o suficiente para cobrir os tubos, para que o transporte fosse realizado corretamente.

4.5.2 Isolamento e cultivo dos fibroblastos derivados do ligamento periodontal

Os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil), seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade dos materiais e das soluções utilizadas. Primeiramente os dentes foram lavados por duas vezes com solução salina balanceada de Hank's (HBSS – Sigma Aldrich CA, USA) e 1% de antibióticos, em seguida foi feita a raspagem do terço médio da raiz de todos os terceiros molares para a obtenção dos fragmentos de ligamento periodontal (Figura 1). Para a raspagem da raiz utilizou-se um cabo de bisturi nº 3 (Duflex S.A., Rio de Janeiro, RJ) e lâmina cirúrgica nº 15 (Feather Safety, Razor Co., Ltd., Osaka, Japão).

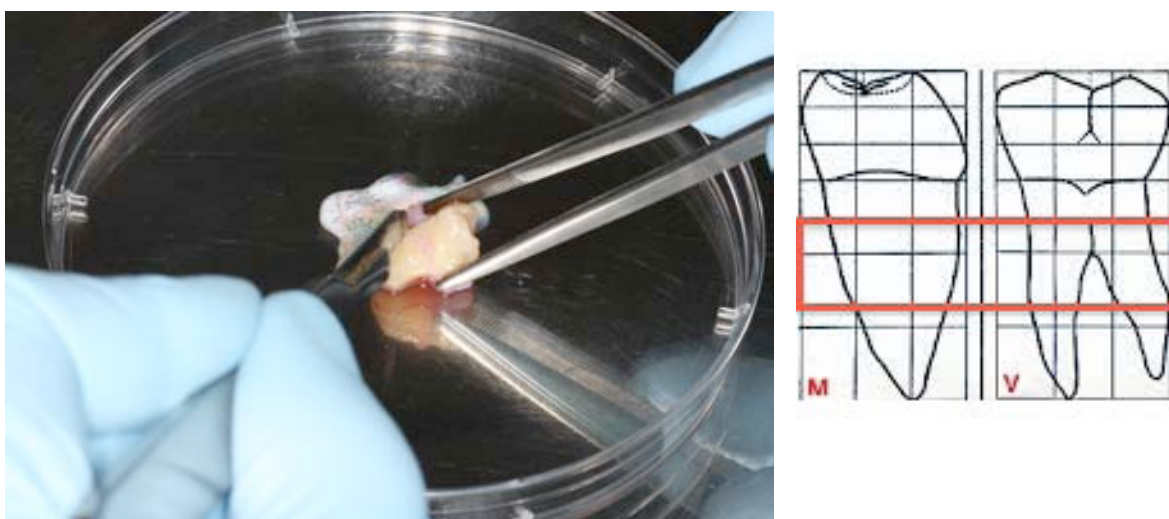


Figura 1 – Imagem e esquema da região de obtenção do fragmento de ligamento periodontal obtido através da raspagem do terço médio das raízes com lamina de bisturi nº 12 dentro do fluxo laminar.

Os quatro terceiros molares (superiores e inferiores) foram coletados de todos os pacientes e a quantidade de raízes raspadas estavam relacionadas à obtenção da quantidade pré-fixada de 4 mm² tecido periodontal. Utilizou-se para aferição da quantidade de tecido periodontal uma placa milimetrada de 2x2 mm.

O tecido periodontal coletado foi inserido em um tubo cônico de 15 mL (Corning, MA, USA) contendo 4 mL de HBSS e então lavado por agitação manual por quatro vezes em quatro tubos diferentes, cada período de agitação de 45 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 de 300 rpm utilizando a agitadora orbital (Tecnal TE 420, São Paulo, Brasil) à 37°C por 30 minutos. A solução de collagenase e dispase foi neutralizada com a adição de 5 mL de meio de cultura Alfa-MEM (Lab Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% se

Soro Fetal Bovino (SFB-Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1% de antibióticos e antifúngico (denominado Alfa-MEM completo). Após este período o tecido remanescente foi descartado e a solução foi transferida para um 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 ressuspensão em 5 mL de meio de cultura Alfa-MEM completo e uma contagem de células viáveis foi realizada utilizando-se um contador de células automático (InvitrogenTM - Countess, Seul, Korea).

A solução contendo o meio de cultura e as células do ligamento foi inserida em garrafas de cultura que permaneceram à uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂ (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil). O meio de cultura foi trocado à cada 48 horas até atingir 80% de subconfluência. Quando a subconfluência 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).

Na quinta passagem foi realizado o congelamento das células utilizando-se o meio de cultura Alfa-MEM com 50% SFB inativado, 1% de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albumina Sérica Bovina, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA). A solução de congelamento foi transferida para criotubos (Ciencor, Aton, São Paulo, Brasil) com uma densidade de 1×10^6 células/mL. Os criotubos foram imediatamente colocados em gelo a 4°C e transferidos para o freezer a -20°C, onde permaneceram por 60 minutos. A seguir, foram transferidos para o freezer a -80°C, onde permaneceram por 48 horas e, armazenados

no nitrogênio líquido, onde as células foram mantidas a -196°C até a realização dos experimentos. Para o descongelamento o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de Alfa-MEM completo. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por 6 minutos. O sobrenadante contendo DMSO foi desprezado e o botão de células, ressuspense em 15 mL de meio de cultura de Alfa-MEM completo. Foi realizado o cultivo das células por 48 horas para que elas pudessem aderir à placa. Em seguida as células foram tripsinizadas e contadas de forma que houvesse 2×10^5 em 200 μL de meio de cultura.

4.6 MEIO DE CULTURA PRÓ – INFLAMATÓRIO

A indução da inflamação no meio de cultura foi realizada, com a suplementação de 5ng/ml de IL-1beta recombinante humana (R&D Systems Minesota, USA) (suplementação de 100 μL de IL-1beta para 900 μL de meio Alfa-MEM completo), 1 hora antes de cada experimento (Swada *et al*, 2010). Toda a citação do meio de cultura será realizada utilizando-se o nome arbitrario de Meio de Cultura Pró Inflamatorio.

4.7 APLICAÇÃO DA COMPRESSÃO ESTÁTICA CONTÍNUA

Utilizou-se para o ensaio de compressão a densidade de 2×10^5 células/poço diluídas em 200 μL de meio Alfa-MEM completo e/ou meio pró-inflamatório. A semeadura das células deu-se no centro do poço permanecendo assim por 10 minutos para fixação. A seguir o volume de meio de cultura no poço foi completado até alcançar 2 mL. As células foram pré-incubadas durante seis horas em meio de cultura pró-

inflamatório e aplicado o modelo de compressão.

O modelo de compressão estática contínua utilizado consistiu de um cubo de acrílico com as dimensões de 2x2x2 cm onde dentro deste cubo foi inserida uma esfera de aço inoxidável para que se pudesse manipular o peso (Figura 2). Posteriormente o cubo com a esfera de aço foi colocado, imediatamente sobre as células (Figura 3) no centro de cada poço (Figura 4) da placa de cultura de seis poços. Após a compressão as células foram removidas do substrato utilizando-se o método de Tripsinização e levadas para a avaliação dos resultados.



Figura 2 – Cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm com esfera de aço inoxidável no seu interior.

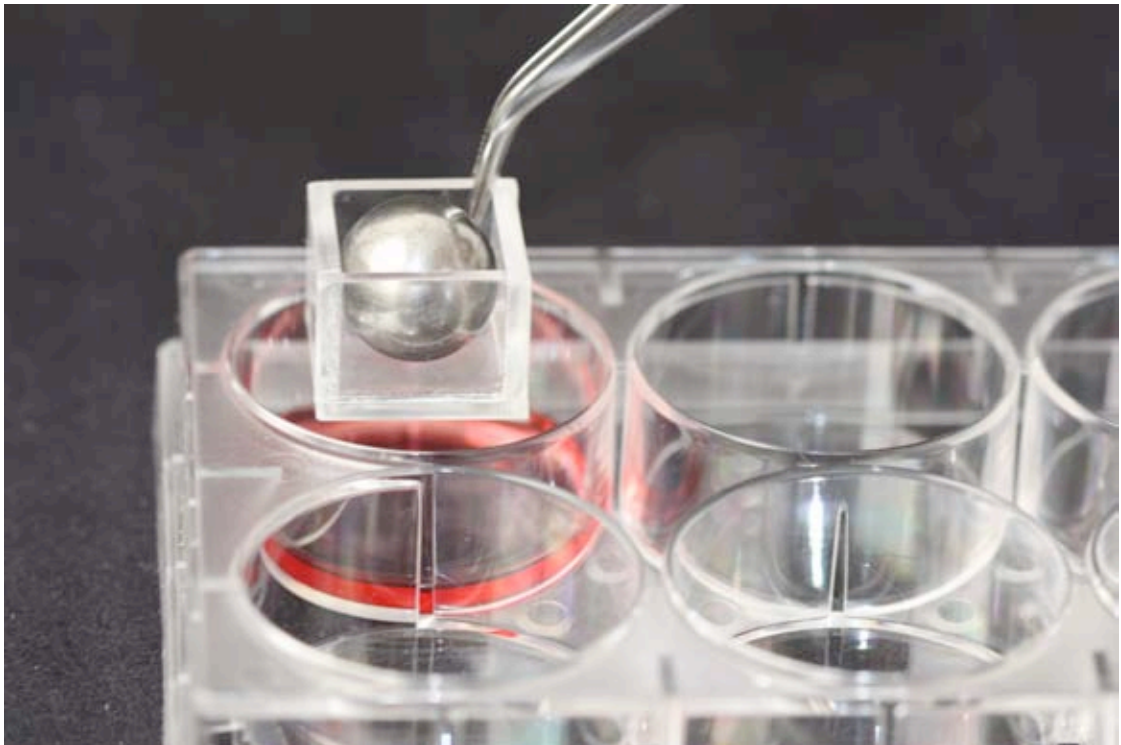


Figura 3 – Aplicação da carga sobre as células com o auxílio de uma pinça.

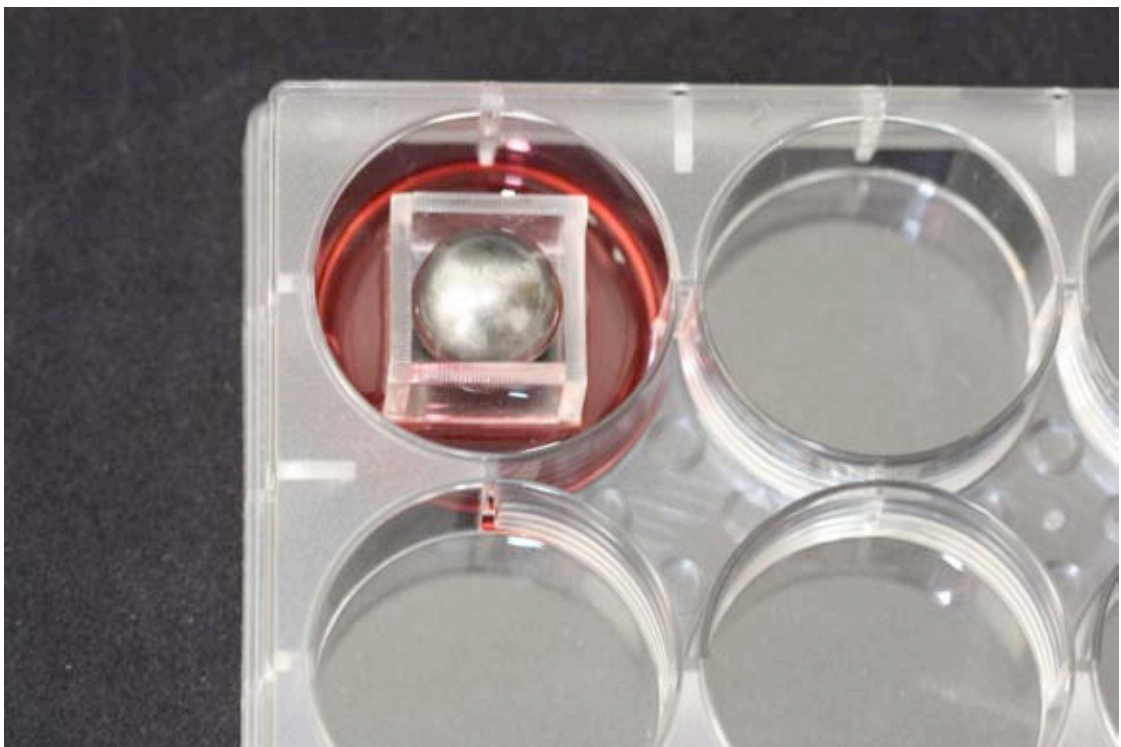


Figura 4 – Modelo compressivo.

4.8 DESENHO DO EXPERIMENTO

4.8.1 Experimento

Para o experimento foram formados três grupos: Grupo Controle (GC) contendo meio de cultura pró-inflamatório sem compressão, Grupo Experimental 1 (GE1) contendo meio de cultura pró-inflamatório sob ação da compressão de 3g/6h e Grupo Experimental 2 (GE2) contendo meio de cultura pró-inflamatório sob ação da compressão de 4g/6h.

4.9 AVALIAÇÕES

4.9.1. - Viabilidade celular

Para a análise da viabilidade celular no citômetro de fluxometro 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 e a lavagem do botão de células foi repetida novamente. As células foram ressuspensas em 300 µL de PBS e distribuídas em três microtubos de 1,5 mL. No primeiro foi adicionado 100 µL do reagente Guava Via Count (Millipore, Belford MA, USA). No segundo tubo e no terceiro tubo as células foram fixadas em 200 µL de etanol 70% e incubadas a 4C° por um período de 12 horas. Os microtubos 1 e 3 contendo as células e o reagente foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Foi acrescentado 200 µL 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*.

4.9.2 - Apoptose celular

Para a análise da apoptose no citômetro de fluxometro 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 e 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. No primeiro 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*.

4.9.3 - Necrose celular

Para a análise da necrose celular no citômetro de fluxometro 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 e 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. No primeiro tubo 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*.

4.9.5 Expressão Gênica – IL-6 e TNF-alfa

A expressão dos genes IL-6 e TNF-alfa foi realizada com aparelho termociclador para uma análise qPCR, que avalia a expressão de RNA mensageiro do gene em questão em tempo real, utilizando um método em que a partir de uma molécula de RNA se recria uma cópia de DNA, ou DNA codificante (DNAc) e com ciclos de aumento e diminuição gradativos da temperatura consegue-se amplificar o RNA primário em uma expansão geométrica. A vantagem do PCR em tempo real é a possibilidade de quantificar de maneira precisa os ácidos ribonuclêicos e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

Quando o ciclo da reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T), ponto que permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência.

Extração do RNA total

Nos tubos com as amostras de tecido foi acrescido 500 μ L TRIzol (Life Technologies). Primeiro foi realizado a homogeneização da amostra manualmente com o uso de uma pipeta, removendo e recolocando o material no tubo, desta maneira promovemos uma maior lise celular.

Após essa homogeneização acrescentamos 100 μ L de Clorofórmio (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA), agitamos o tubo com auxílio do agitador hipersônico *vortex* (Labnet VX-200) por quinze segundos cada tubo. As amostras descansaram por três minutos.

Terminado o tempo de descanso, as amostras foram levadas para uma centrifuga universal (HERMLE – LaborTechnik - Wehingen, Alemanha) para a separação das fases. Foi centrifugado a 12000 RPM por quinze minutos a 4°C. A centrifugação separou a mistura em uma fase

orgânica vermelho contendo lipídios, açúcares, proteínas e fibras, uma interfase esbranquiçada, contendo o DNA, e uma fase aquosa superior incolor contendo RNA. A fase aquosa superior incolor foi transferida para um tubo limpo com auxílio de uma pipeta de 200 μ L para tubos eppendorf de 2 ml e acrescido de 250 μ L de Isopropanol (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA). A interfase e a fase orgânica foram descartadas.

Após dois minutos de descanso os tubos foram levados novamente para centrifuga a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. Terminado a centrifugação o isopropanol foi descartado, realizou-se uma lavagem do sedimento de RNA aderido no fundo do tubo, adicionando 1 ml de etanol a 75% em água bidestilada isenta de nucleose, agitando em seguida os tubos vigorosamente.

Os tubos foram novamente levados para a centrifuga a 12000 rpm por cinco minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos abertos por dez minutos para uma secagem a temperatura ambiente. O RNA foi então ressuspenseo com acréscimo de 50 μ L de água bidestilada isenta de nucleose.

A leitura das concentrações de RNA foi realizado com o equipamento *Gene Quant II Nano Vue* (GE Healthcare UK).

As amostras foram congeladas a -20°C para posterior condução do PCR.

Reações do Real Time – PCR

Como controle endógeno da reação de PCR utilizou-se a Beta-Glucuronidase, também denominado normalizador GUSB, que garantiu uma leitura confiável do RNA mensageiro.

Os *primers* (Tabela 1) foram desenhados através do software Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, UK). O composto utilizado foi

o *SYBR® Green* (Applied Biosystems, Foster City – CA, EUA). O *SYBR® Green* se liga a fita de DNAc e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Para a reação de qPCR foi utilizada a tecnologia SYBR Green, na qual o número de cópias amplificadas de um determinado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo equipamento, oriunda da liberação de fluorocromo. Este fluorocromo encontra-se ligado à dupla fita formada pela associação de uma sonda específica e o DNAc na região do gene de interesse

As reações foram conduzidas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 1: Desenho dos *Primers*

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (5' -3')	Temp. de Anelamento (°C)	Número no Banco de Genes
TNF-alfa	ACGAGCTGAACAGGAACAACGT CACCAGCAAGAAGAAGCCTTTG	57	NM 3107916.3
IL-6	TGGCTGCAGGACATGACAACT TAGCCAGAAGAACCAATGCCC	65	NM 6863047.1

Sequência dos Primers de TNF-alfa e IL-6; Tempo de anelamento; Número no bando de gênes.

4.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos da avaliação entre os grupos GC, GE1 e GE2 foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e aplicado o teste de Wilcoxon para análise em pares se determinar em quais grupos a diferença estava presente. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas pelo *software SSP* (NY, USA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi realizada utilizando o Kit Guava Via Count e o resultado obtido esta apresentado no Quadro 1 e na Tabela 2.

Quadro 1: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	Grupos		
	GC	GE1	GE2
1	90,70	88,90	90,00
2	90,06	89,50	90,00
3	90,60	89,30	89,60
4	90,10	88,95	88,90
5	90,10	90,00	90,00
6	90,17	90,00	89,50
7	90,15	89,90	89,50
8	90,01	88,90	89,30
9	90,10	89,20	89,50
10	90,10	88,90	90,00
Média	90,20	89,35	89,63
Mediana	90,10	89,25	89,55
DP	0,22	0,44	0,36

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h);
GE2: grupo experimental (4g/6h); DP: desvio padrão.

Tabela 2: Medianas e desvio padrão da porcentagem da viabilidade de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (CG), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	GC	GE1	GE2	n	P
% células	90,20 ± 0,22	89,35 ± 0,44	89,63 ± 0,36	10	0,001*

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h). GE2: grupo experimental (4g/6h). Teste de Kruskal Wallis com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

Tabela 3: Valores de “p” obtidos pela comparação dos grupos em pares baseados na tabela 2.

	GC	GE1
GE1	0,001*	
GE2	0,001*	0,132

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental(3g/6h); GE2: grupo experimental (4g/6h). Teste de Mann-Whitney com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

Apoptose celular

A apoptose celular foi realizada utilizando o Kit Nexin e o resultado obtido esta apresentado no Quadro 2 e na Tabela 4.

Quadro 2: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de apoptose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	Grupos		
	GC	GE1	GE2
1	0,2	0,1	0,3
2	0,1	0,1	0,2
3	0,2	0,1	0,2
4	0,3	0,2	0,3
5	0,1	0,2	0,4
6	0,2	0,1	0,1
7	0,2	0,2	0,3
8	0,1	0,2	0,2
9	0,2	0,1	0,3
10	0,1	0,1	0,3
Média	0,17	0,14	0,26
Mediana	0,2	0,1	0,3
DP	0,06	0,04	0,08

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h);
GE2: grupo experimental (4g/6h); DP: desvio padrão.

Tabela 4: Medianas e desvio padrão da porcentagem da apoptose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	GC	GE1	GE2	n	P
% células	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,04	0,26 ± 0,08	10	0,006*

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h). GE2: grupo experimental (4g/6h). Teste de Kruskal Wallis com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

Tabela 5: Valores de “p” obtidos pela comparação dos grupos em pares baseados na tabela 4.

	GC	GE1
GE1	0,306	
GE2	0,021*	0,003*

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h). GE2: grupo experimental (4g/6h). Teste de Mann-Whitney com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

Necrose celular

A necrose celular foi realizada utilizando o Kit Nexin e o resultado obtido esta apresentado no Quadro 3 e na Tabela 6.

Quadro 3: Média, Mediana e Desvio Padrão da porcentagem de necrose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	Grupos		
	GC	GE1	GE2
1	9,03	9,50	9,40
2	8,80	9,03	8,95
3	8,90	8,99	9,11
4	9,10	8,93	9,21
5	9,12	9,60	9,04
6	8,99	9,01	9,05
7	9,10	9,20	9,16
8	9,01	9,05	9,21
9	9,05	8,96	9,17
10	8,93	9,07	9,21
Média	9,00	9,13	9,15
Mediana	9,02	9,04	9,15
DP	0,10	0,21	0,11

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h);
GE2: grupo experimental (4g/6h); DP: desvio padrão.

Tabela 6: Medianas e desvio padrão da porcentagem da necrose celular de fibroblastos periodontais em meio de cultura pró inflamatório modelo de compressão estática contínua verificadas por citometria de fluxo nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	GC	GE1	GE2	n	P
% células	9,00 ± 0,10	9,31 ± 0,21	9,15 ± 0,11	10	0,06

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h). GE2: grupo experimental (4g/6h). Teste de Kruskal Wallis com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

TNF-alfa

Avaliação da expressão gênica por qPCR do RNA mensageiro da proteína TNF-alfa não foi expressa ou foi expressa em níveis não detectáveis pelo método utilizando SYBR® Green.

IL-6

Leitura de expressão gênica no qPCR para a avaliação da expressão de IL-6 e os resultados apresentados no Quadro 4 e Tabela 7.

Quadro 4: Média, Mediana e Desvio padrão da porcentagem de expressão gênica no qPCR da IL-6 de fibroblastos periodontais meio de cultura pró-inflamatório no modelo de compressão estática contínua nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	Grupos		
	GC	GE1	GE2
1	26,07	24,84	26,78
2	26,31	26,79	26,91
3	26,42	27,3	27,05
4	26,33	27,01	26,89
5	26,03	26,5	26,79
6	26,57	26,92	27,00
7	26,35	26,56	26,48
8	27,01	26,81	26,99
9	26,90	27,02	26,75
10	27,00	26,9	26,98
Média	26,47	26,9	26,92
Mediana	26,48	26,9	26,93
DP	0,16	0,08	0,04

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h); GE2: grupo experimental (4g/6h); DP: desvio padrão.

Tabela 7: Medianas e desvio padrão da porcentagem da expressão gênica da IL-6 dos fibroblastos periodontais cultivados em meio de cultura pró inflamatório no modelo de compressão estática contínua verificadas por qPCR nos Grupos Controle (GC), Experimental 1 (GE1) e Experimental 2 (GE2).

	GC	GE1	GE2	N	P
%	26,48 ± 0,16	26,90 ± 0,08	26,93 ± 0,04	10	0,11

GC: grupo controle; GE1: grupo experimental (3g/6h). GE2: grupo experimental (4g/6h).

Teste de Kruskal-Wallis com o valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo e assinalado com *.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O tecido ósseo é um tecido complexo, composto de matéria orgânica e inorgânica, e por sofrer constantemente ação de forças compressivas e tensionais, há o trabalho de uma complexa rede metabólica que irá promover a sua homeostase. Esta rede metabólica nada mais é do que um conjunto de sequências de reações químicas na qual uma reação fornece o substrato da reação seguinte e são essas reações que vão controlar o equilíbrio deste tecido. Este processo é denominado de mecanotransdução e tem por definição o mecanismo através do qual a célula converte um estímulo mecânico em atividade química. (FRENCH, 1992).

Os estímulos mecânicos na mecanotransdução são essenciais para a manutenção do metabolismo e equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (KANG & ROBLING, 2015). Na literatura consultada pôde-se observar que os estímulos mecânicos ou a mecanotransdução nos fibroblastos derivados do ligamento periodontal, pode levar à produção e liberação de moléculas capazes de regular e normalizar a homeostase óssea local (LE GALL & SASTRE 2010, QIN & HU 2014).

Neste estudo desenvolveu-se um modelo de compressão celular baseado na mecanotransdução para verificar *in vitro* os eventos celulares que acontecem *in vivo* quando a célula é submetida à uma força compressiva. Os estudos *in vitro* tem sido muito utilizados 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 (FRESHNEY, 1990; SANT'ANA *et al.*, 2002).

O modelo de compressão deste estudo 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). Modelos diferentes de compressão celular foram usados em outros estudos, como o sistema hidráulico de compressão utilizado por NAKAGO-MATSUO *et al.* (1996), o modelo de NAKAO *et al.* (2007) o qual aplicava a carga compressiva alterando a quantidade de meio de cultura nos frascos (quanto maior o volume, maior o peso sobre as células) e o modelo de compressão celular computadorizado utilizado por outros autores como SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) onde para o estímulo de tensão e compressão utilizaram o aparelho Flexell compression Plus System (Hillsborough, USA).

O sistema mecânico de compressão neste estudo para a aplicação de carga deu-se através da utilização de cubos de acrílico preenchidos com esferas de aço colocados diretamente sobre as células. Quando comparamos os métodos de carga compressiva por aumento de volume de meio de meio de cultura (NAKAO *et al.*,2007) com a aplicação de carga diretamente sobre a célula (NISHIJIMA *et al.*,2006 e NAKAGIMA *et al.*,2008) este último parece ser mais preciso, no entanto quando comparados os métodos que utilizam equipamentos específicos (Flexell compression Plus System) para a medir a aplicação de tensão e compressão (SAMINATHAN *et al.*,2013, JACOBS *et al.*,2013 e NETTELHOFF *et al.*,2015), com o método de aplicação direta da carga sobre a célula, como o empregado neste estudo, este pode ser menos preciso.

O ligamento periodontal é um tecido humano complexo e especializado cujas células são submetidas à cargas compressivas durante a função. Ele é o tecido conjuntivo responsável pela união entre o dente e o osso alveolar e é composto de células residentes e denominadas de

fibroblastos periodontais, e são responsáveis pela produção, reparação e manutenção da matriz celular (ANDERSEN & NORTON, 1991; KOOK, JANG, LEE, 2011). Estas 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 (células presentes no ligamento periodontal responsáveis pela produção de cimento) bem como em novos fibroblastos do ligamento periodontal (LEKIC & MCCULLOCH, 1996; ALVES *et al.*, 2015).

Em resposta à pressão exercida por forças biomecânicas induzidas, os fibroblastos periodontais podem iniciar uma cadeia de eventos na movimentação dentária incluindo a remodelação óssea alveolar (NAKAGO-MATSUO, 1996; LEE *et al.*, 2007). Devido às particularidades da sua estrutura e a dificuldade em executar experimentos *in vivo*, este estudo, assim como os estudos de KOHNO *et al.* (2002), LEE *et al.* (2007), NAKAGIMA *et al.* (2008) e LISBOA *et al.* (2009), utilizou modelo compressivo sobre os fibroblastos do ligamento periodontal.

O ligamento periodontal sob condições fisiológicas normais é submetido a várias formas de estímulos mecânicos denominadas de forças oclusais (NAKASHIMA *et al.*, 2009), e como esperado em qualquer sistema biológico que recebe rotineiramente estímulos biomecânicos repetitivos, vão ocorrer vários mecanismos bem regulados, que envolvem manutenção e remodelação do colágeno das fibras periodontais, juntamente com a incorporação e calcificação das suas extremidades (fibras de Sharpey) (MCCULLOCH *et al.*, 2000). Essas atividades integradas e mecanicamente ativas tem como foco central os fibroblastos do ligamento periodontal.

Isso acontece pois quando estas células são submetidas a estímulos mecânicos presumivelmente conduzem a um sistema de sinalização com a expressão de substâncias pró inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF-alfa e sistema RANK RANKL onde a molécula de RANKL tem um papel fundamental pois é ela quem sinaliza para o início da cascata da osteoclastogênese, que é um dos fenômenos que ocorre no processo de homeostase na gonfose que corresponde a manutenção da espessura do ligamento periodontal em toda sua extensão pela ação dos fibroblastos (HAVEMOSE-POULSEN & HOLMSTRUP, 1997, MCCULLOCH *et al.*, 2000).

Presumivelmente esse sistema de sinalização conduz a expressão de substâncias pró inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF-alfa e sistema RANK, RANKL e a OPG. (YOUSEFIAN, 1995; KOHNO *et al.*, 2002; NISHIJIMA *et al.*, 2006; KOOK, JANG, LEE, 2011; NOTOMI, EZURA, NODA, 2012; ZHU *et al.*, 2013) e em resposta à essa cadeia de eventos observa-se a movimentação dentária, incluindo remodelação óssea alveolar (NAKAGO-MATSUO *et al.*, 1996).

Baseado em estudos realizados com modelos de compressão (NISHIJIMA *et al.*, 2006; NAKAGIMA *et al.*, 2008) e modelos que envolveram indução da inflamação (SAWADA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013) este estudo desenvolveu um modelo de compressão estática contínua, concebido para estudar o comportamento de fibroblastos cultivados derivados do ligamento periodontal humano adulto submetidos a uma força compressiva estática contínua cultivados num meio de cultura pró inflamatório com a intenção de produzir *in vitro* uma situação normalmente vista na fisiologia.

A interleucina IL-1beta foi utilizada em outros estudos para induzir a inflamação em meio de cultura como no trabalho de SAWADA *et al.* (2013) os quais utilizaram a concentração de 1ng/mL para induzir a inflamação em fibroblastos gengival humanos cultivados e nos estudos de LIU *et al.* (2013) que usaram as concentrações de 0,1ng/mL, 1,0ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL e 150ng/mL de IL1beta para a indução da inflamação para comparar as respostas celulares através dos testes RT-qPCR e ELISA de queratinócitos cultivados com fibroblastos periodontais onde os resultados mostraram que os fibroblastos são bem mais sensíveis que os queratinócitos.

Utilizou-se neste estudo a concentração de 5ng/mL de IL-1beta para o desenvolvimento de um meio de cultura pró inflamatório para os fibroblastos periodontais humanos. Esta concentração de 5ng/mL de IL-1 beta foi definida após realização de um estudo piloto para determinar qual concentração seria utilizada no estudo. Foram aplicadas as avaliações por citometria de fluxo para viabilidade e morte celular no meio de cultura nas concentrações de 2,5ng/mL ,5ng/mL e 10ng/mL. Os resultados permitiram entender que com a concentração de 5ng/mL foi possível obter níveis elevados de viabilidade celular quando comparado a concentração de 10ng/mL. A concentração de 2,5 ng/ml e 5ng/ml obtiveram resultados mais próximos. Neste caso a nossa opção foi utilizar a concentração de 5ng/ml para induzir o meio de cultura.

Neste estudo foi utilizada análise de viabilidade celular para análise da verificação de células viáveis (capazes de realizar funções como metabolismo, crescimento, reprodução, responder a estímulos e adaptabilidade) após serem submetidas à um meio pró inflamatório sob compressão estática contínua, ou seja, avaliar se após estes estímulos de

compressão em meio inflamatório elas mantiveram a capacidade de exercer suas funções.

Foram encontradas diferenças significantes quando comparamos o grupo GC com GE1 e o GC com o GE2, porém não houve diferença estatística quando comparamos o grupo GE1 com GE2. Os resultados demonstraram que a aplicação de carga, neste modelo, levou a uma diminuição da viabilidade. Estes achados estão de acordo com os de JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) que estimularam os fibroblastos com cargas mecânicas pesadas. E estão discordantes dos resultados do trabalho de que estimularam os FLP com aplicação de força mecânica e com o trabalho de YOSEFIAN *et al.* (1995) que estimularam os FLP com força hidráulica, e que tiveram como resultados do estudo preservação da viabilidade celular. Desta forma podemos concluir que o meio de cultura pró inflamatório com a presença de IL-1beta influencia a viabilidade celular negativamente na razão direta à aplicação de carga leve considerando-se o mesmo tempo de ação. Nos estudos de YOSEFIAN *et al.* (1995) apenas a variável pressão não influenciou a viabilidade das células e neste estudo o meio de cultura pró inflamatório influenciou, fato este que pode ser reconhecido no ambiente fisiológico do fibroblasto periodontal.

A morte celular programada ou apoptose é importante no desenvolvimento embrionário, na renovação celular e em muitos aspectos da manutenção dos mecanismos imunológicos de defesa. O termo foi introduzido por Kerr em 1965, onde denominou que a morte celular que não ocorre por condições traumáticas seria denominada apoptose (origem grega que significa “as quedas das folhas”). Ocorre ordenadamente e com gasto de energia para sua execução. E em condições normais participa do

controle da proliferação e diferenciação celular. Este tipo de morte celular está mais diretamente relacionada com o mecanismo interno ou programação. É um processo de morte celular programada, responsável pela remoção de células e tecidos alterados ou dispensáveis, exercendo um importante papel na manutenção da estrutura dos órgãos e tecidos, impedindo a proliferação de células injuriadas e/ou desnecessárias que podem comprometer o correto funcionamento tecidual e a homeostase do organismo.

Na avaliação da morte celular por apoptose foi utilizado no presente trabalho o *Kit* Guava Nexin. Não observou-se diferença significativa quando comparamos o GC com o GE1 entretanto, houve um aumento da apoptose quando comparamos o grupo GC com o GE2 e quando comparamos o GE1 como GE2 houve diferença significativa. A aplicação da carga de 4g/mm^2 promoveu o aumento da apoptose celular que foi maior do que no grupo controle e maior do que no GE1. Estes achados diferem dos resultados de JACOBS *et al.* (2013) e NETTELHOFF *et al.* (2015) onde a estimulação dos FLP deu-se pela aplicação de força mecânica e com o trabalho de YOSEFIAN *et al.* (1995) que estimularam os FLP com força hidráulica cujos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação a apoptose celular. Isto pode ter ocorrido porque em nosso estudo houve estímulo de IL-1beta no meio de cultura o que pode ter sido o responsável pelo aumento da apoptose no grupo GE2.

O processo da morte celular seguida de autólise (degradação dos compartimentos celulares realizadas pelas enzimas da própria célula, liberadas pelos lisossomas após a morte celular) é denominado de necrose. Os agentes agressores produzem necrose por redução de energia, produção de radicais livres, ações sobre enzimas e agressão à membrana

citoplasmática. Necrose é o conjunto de alterações morfológicas que se seguem à morte celular em um organismo vivo e é sempre patológica. As membranas das células necróticas perdem a sua integridade, ocorrendo extravasamento de substâncias contidas nas células. Isto tem importância clínica pois algumas delas são especialmente abundantes em determinados tipos celulares. Estas substâncias podem ser detectadas e interpretadas como evidência de morte celular.

Neste modelo a análise da necrose celular foi utilizada para se medir a influência tanto da compressão quanto da utilização de Il-6 no meio de cultura, em relação à morte traumática dos fibroblastos periodontais. Com relação à avaliação da morte celular por necrose foi utilizado nesse trabalho o citometro de fluxo Guava EasyCyte HT e o *Kit* Guava Nexin para verificar a necrose celular das amostras e então analisadas utilizando o programa *InCyteSoftware*. Nesse trabalho não houve diferença estatística entre os grupos GC, GE1 e GE2 quando analisado a morte celular por necrose o que está de acordo com os estudos de JACOBS *et al.* (2013), NETTELHOFF *et al.* (2015) e YOSEFIAN *et al.* (1995).

Foram também avaliadas a expressão gênica de substâncias pró inflamatórias a IL-6 e TNF-alfa que juntamente com a IL-1 e sistema RANK/RANRL fazem parte do processo da osteoclastogenese, na qual a molécula de RANKL tem um papel fundamental pois é ela quem sinaliza para o início da cascata da osteoclastogenese (HAVEMOSE-POULSEN & HOLMSTRUP 1997; MCCULLOCH *et al.* 2000).

Os resultados das análises qPCR para expressão de IL-6 mostraram um aumento nos níveis de IL-6, porém esta expressão foi igual entre todos os grupos avaliados GC, GE1 e GE2, resultados que se assemelham ao obtidos nos estudos realizados por LEE *et al.* (2007), PAMQVIST *et al.*

(2008) que obtiveram com a aplicação de força mecânica e força mecânica hidráulica respectivamente e sem suplementação de IL-1 β , um aumento da expressão da IL-6. Os resultados assemelham-se também com os resultados obtidos por SHIMIZU *et al.* (1992) que estimularam os FDP com IL1-beta sem aplicação de força.

Nos resultados da análise qPCR do TNF-alfa não foram encontrados níveis detectáveis, o que vai de acordo com os resultados obtidos por KYAMA *et al.* (2008) que estimularam os fibroblastos com compressão mecânica e observaram que não houve expressão de TNF-alfa. Os resultados diferiram dos resultados de LEE *et al.* (2007) que observaram um aumento do TNF-alfa com aplicação de força hidráulica e sem uso de IL-1 β . Os resultados também discordaram dos resultados de PALMQVIST *et al.* (2008) que apenas com a indução com o uso de IL-6 obtiveram um aumento na expressão de TNF-alfa e com o trabalho de KOOK *et al.* (2009) que com a aplicação de força mecânica observou um aumento na expressão de TNF-alfa. Neste estudo os resultados obtidos divergem dos encontrados na literatura que pode ser atribuído às diferenças na metodologia dos estudos.

Como perspectivas temos a utilização deste mesmo modelo com estimulação de cargas maiores para que se possa afirmar que a carga influencia realmente na expressão de moléculas pró inflamatórias.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Fibroblastos periodontais humanos em meio de cultura suplementado com IL-1 beta no modelo de força compressiva estática contínua apresentaram diminuição da viabilidade celular, aumento da apoptose e não apresentaram alterações de necrose e expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa.

REFERÊNCIAS

9.REFERÊNCIAS

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

Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. IL-1b Favors Osteoclastogenesis Via Supporting Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2011;(112):1890-7

Carano A., Siciliani G. Effects of continuous and intermitente forces on human fibroblasts in vitro. *Euorpean Journal Orthodontic* 1996;(18):19-26

D'Angelo F, Tiribuzi R, Armentano I, Kenny JM, Martino S, Orlacchio A. Mechanotransduction: Tuning Stem Cells Fate. *J Funct Biomater* 2011;2(2):67-87

El-Awady AR, Lapp CA, Gamal AY, Sharawy MM, Wenger KH, Cutler CW, Messer RLW. Human periodontal ligament fibroblast responses to compression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2013;(40):661–72

Fischer M, Rikeit P, Knaus P, Coirault C. YAP-Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Front. Physiol.* 2016;(7):41

French AS, Mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 1992;(54):135-52

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):643-49

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

Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P. Mechanical stress-induced interleukin-1beta expression through adenosine triphosphate/P2X7 receptor activation in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2013; (48):169-76

Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P. Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P. P2X7 receptor–Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*. 2014; (49):595-02

Kang KS, Robling AG. New Insights into Wnt-Lrp5/6- β -Catenin Signaling in Mechanotransduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;(5):246

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. *J of Orthodontics*. 2002; (29):129-35

Kook S., Jang Y., Lee J.. Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through

TNF- δ -mediated activation of CD4+Tcells. J. of Cell. Biochemistry 2011;(112):2891-01

Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, Shimizu N, Maeno M. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. Archives of Oral Biology. 2008;(53):488-96

Lee Y., Nahm D., Jung Y., Choi J., Kim S., Cho M., Kim M., Chae C., Kim C.. Differential gene expression. Of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. J Periodontal 2007;(3):446-52

Le Gall M., Sastre J.The fundamentals of tooth movement. Int Orthod 2010;(8):1-13

Lekic P.; Mcculloch C.A.G.. Periodontal Ligament Cell Populations: The Central Role of Fibroblasts in Creating a Unique Tissue. Res The Anat Rec 1996; (245):327-41

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):511-22

Li Liu, Hailun Gu, Huimin Liu, Yongliang Jiao, Keyu Li, Yue Zhao, Li An, Jun Yang.Protective Effect of Resveratrol against IL-1 β -Induced Inflammatory Response on Human Osteoarthritic Chondrocytes Partly via

the TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway: An “*in Vitro* Study”. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:6925-40

Lisboa RA, Lisboa FA, Castro Santos, Andrade MV, Cunha Melo Jr. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast cultures submitted to simulated orthodontic force. *In Vitro Dev Cell Dev Biol.* 2009 Dec;45(10):614-21

Michel Le Galla & Julien Sastre. The fundamentals of tooth movement. *Int Orthod* 2010;8(1):1-13

Nakagima R.; Yamaguchi M.; Kojima T.; Takano M.; Kasai K.. Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand production by periodontal ligament cells *in vitro*. *J Periodont Res* 2008; (43):168-73

Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2007;86(7):623-28

Nakago-Matsuo C., Matsuo T., Nakago T.. Intracellular calcium Response to hydraulic pressure in human periodontal ligament fibroblasts. *Orthod Dentofac Orthop* 1996;(109):244-8

Nakashima K.; Tsuruga E.; Hisaganam Y.; Ishikawa H.; Sawa Y.. Stretching stimulates fibulin-5 expression and controls microfibril bundles in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2009; (44):622-27

Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblast and osteoblast. *Clin Oral Invest.* 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 Res* 2006:63-70

Notomi T, Ezura Y, Noda M. Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. *J of Biological Chemistry.* 2012; 287(42):350-57

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1982;(9):290-96

Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hänström L, Lerner UH. IL-1 α and TNF Regulate IL-6-type Cytokines in Gingival Fibroblasts.; *J Dent Res* 2008;87(6):558-63

Poulsen & Holmstrup. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):217-36

Qin YX, Hu M. Mechanotransduction in musculoskeletal tissue regeneration: effects of fluid flow, loading, and cellular-molecular pathway. *Biomed Res Int.* 2014;(86):341

Saminathan A, Vinoth KJ, Low HH, Cao T, Meikle MC. Engineering three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan-gelatin hydrogel films and a mechanically active environment. *J Periodontal Res.* 2013;48(6):790-801

Sant'ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Culture and characterization of human derived periodontal ligament cells. *Rev. Fac. Odontol Bauru,* 2002;(10):134-40

Scheres & Crieaard .Gingival fibroblast responsiveness is differentially affected by *Porphyromonas gingivalis*: implications for the pathogenesis of periodontitis. *Mol Oral Microbiol.* 2013 Jun;28(3):204-18

Sawada S., Chosa N., Ishisaki A. e Naruishi K.. Enhancement of gengival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Bio Res* 2013, 34(1):31-40

Shimizu N, Ogljra N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, Iwasawa T, Takiguchi H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop.*1997;58(1):2-15. *Archs Oral Bid.* 1992;37(9):743-48

Tsuge, Node, Nakamura. Early tissue reaction in the tension zone of PDL during orthodontic tooth movement. *Archs Oral* 2016 May;65:17-25

Yamaguchi M.. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod. Craniofac Res* 2009; (12):113-09

Yousefian J.; Firouzian F.; Shanfeld J.; Ngan P.; Lanese R.; Zeev davidovitch. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *AM J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108;(4):402-09

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. *J.Cell. Physiol.* 2013;(228):207-15

NORMAS ADOTADAS

10.NORMAS ADOTADAS

ISO – International Standardization Organization

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

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

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

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>

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The mechanotransduction may be a cellular differentiation mechanism for fibroblasts that are derived from the periodontal ligament as well as local inflammation may also play an important role in the molecular response of these cells. **Objective:** Evaluate the viability, apoptosis, necrosis and gene expression of proinflammatory markers in a continuous static compression model using a proinflammatory cell culture. **Methods:** We selected 10 patients that were submitted to third molars extractions to obtain 4 mm² of periodontal tissue of the middle third of their roots. Fibroblasts were isolated and expanded until the 6th passage and cultured in proinflammatory culture (IL-1 β 5 ng / mL) and after this three groups were formed according to the applied load: Control Group (CG), no charge; Experimental Group 1 (SG1), continuous static compression of 3g/6h and Experimental Group 2 (SG2) continuous static compression 4g/6h. **Results:** The cell viability control group had higher results both experimental groups, and was not observed differences between experimental groups. The cell apoptosis was higher in the experimental group 2 compared to the control and experimental groups 1, with no differences between them. No differences were observed between the groups in relation to cell necrosis. In gene expression not detected in the TNF-alpha expression, but IL-6 expression, this expression equal among all groups. **Conclusion:** Human periodontal fibroblasts in culture medium supplemented with IL-1 beta in continuous static compressive force model showed decreased cell viability, increased apoptosis and necrosis showed no changes and gene expression of IL-6 and TNF-alpha.

APENDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de Ligamento Periodontal Humano (TCLE)

O senhor(a) está sendo convidado a participar voluntariamente da pesquisa intitulada de Fibroblastos Periodontais humanos em meio de cultura suplementado com IL-1 β sob força compressiva estática contínua. Este estudo é de responsabilidade da pesquisadora Delaini Pires Roman Miguel, aluna de Mestrado do PPG em Cirurgia Translacional da UNIFESP.

É um experimento *in vitro* (em laboratório) com o objetivo de avaliar a proliferação e diferenciação de células, no caso, fibroblastos (células) do ligamento periodontal que é o tecido que sustenta o dente dentro do osso da mandíbula e da maxila. Esta pesquisa tem por objetivo obter informações para um melhor entendimento do cultivo de fibroblastos periodontais (células presentes na pele e na gordura do corpo humano), e que podem de alguma maneira ajudar no tratamento e na recuperação do tecido ósseo humano”.

O seu ato operatório transcorrerá normalmente, sem nenhuma alteração, nenhum prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será coletada o tecido que for retirada durante a cirurgia e que seria desprezado (porque já não tem mais utilidade), para ser enviada ao laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Não há benefício direto para o participante, nem tão pouco desconfortos e riscos.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Delaini Pires Roman Miguel que pode ser

encontrado no endereço (*Rua Pedro de Toledo, 781 – 11º andar, frente*) telefone(5579.2583). Se você tiver alguma sugestão ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a todos os pacientes a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e deixar de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento nesta Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

É assegurado a todos os pacientes o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, bastando para isto que entre em contato com o Delaini Pires Roman Miguel no endereço (*Rua Pedro de Toledo, 781 – 11º andar, frente*) telefone (5579.2583).

Não há despesas (pagamentos) pessoais para o participante em nenhuma fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga através do orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Existe um compromisso do pesquisador de utilizar as informações e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo

Modelo De Força Compressiva Estática Contínua Na Inflamação Induzida Em Cultura De Fibroblastos Periodontais Humanos

Eu discuti com o Delaini Pires Roman Miguel sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são as intenções do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. 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.

Delaini Pires Roman Miguel

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLAMAÇÃO INDUZIDA EM CULTURA DE FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS SOB DE FORÇA COMPRESSIVA ESTÁTICA CONTÍNUA.

Pesquisador: Delaini Pires Roman Miguel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18958813.5.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 385.734

Data da Relatoria: 05/09/2013

Apresentação do Projeto:

CONFORME PARECER DO CEP. 347578 DE 2/8/2013

Apresentação de respostas às pendências apontadas no parecer acima

Objetivo da Pesquisa:

CONFORME PARECER DO CEP. 347578 DE 2/8/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

CONFORME PARECER DO CEP. 347578 DE 2/8/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CONFORME PARECER DO CEP. 347578 DE 2/8/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram atendidas as pendências conforme solicitado:

carta de ciência do responsável pelo ambulatório odontológico do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos

o estudo foi excluído da Área temática.

Recomendações:

sem recomendações.

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	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 385.734

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendencias adicionais, projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O parecer do relator foi acatado pelo colegiado.

SAO PAULO, 05 de Setembro 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:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

FONTES CONSULTAS

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_arttext&pid=S0102-865020050000800005.