

**MATEUS DE ABREU PEREIRA**

**SISTEMA RANK / RANKL E OPG EM CULTURA DE  
FIBROBLASTOS ADULTOS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL HUMANO SOB PRESSÃO CONTÍNUA**

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

**SÃO PAULO**

**2016**

**MATEUS DE ABREU PEREIRA**

**SISTEMA RANK / RANKL E OPG EM CULTURA DE  
FIBROBLASTOS ADULTOS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL HUMANO SOB PRESSÃO CONTÍNUA**

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

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. LYDIAMASAKO FERREIRA  
CO-ORIENTADOR: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE  
Prof.<sup>a</sup>. SILVANA GAIBA**

**SÃO PAULO**

**2016**

Pereira, Mateus de Abreu.

**Sistema RANK/RANKL e OPG em cultura de fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua.**/Mateus de Abreu Pereira. -

- São Paulo, 2016.

xi, 77 f.

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

Título em inglês: System RANK/RANKL and OPG in cultured adult human periodontal ligament fibroblast under pressure continues.

1. Ligamento periodontal. 2. Ligante RANK. 3. Osteoprotegerina 4. Fibroblastos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## **Dedicatória**

*Aos meus pais, DANIEL PEREIRA JUNIOR e ROSE MARY CARDOSO DE ABREU PEREIRA, pela dedicação intensa com os filhos.*

*Aos meus irmãos BARBARA CRISTINA DE ABREU PEREIRA, sempre atenciosa e preocupada e ALEXANDRE DE ABREU PEREIRA, meu amigo e professor, companheiros nos momentos bons e ruins.*

*A BRUNA SILVA DA ROCHA, minha companheira, e a sua família, que esteve sempre comigo, apoiando neste momento importante.*

*Aos meus amigos JOSÉ ANTONIO DE SOUZA, LEOPOLDO CÉSAR DE SOUZA, ANA MARIA PIRES MEYER, SIMONE APARECIDA PAZERO CHICCA PICCIARELLI, ARIIVALDO ROBERTO JUNIOR E NEYLLA IVANA GOMES ROBERTO, ANSELMO AURÉLIO FARIA, ALEJANDRA CORTEZ.*

## **Agradecimento**

*Aos meus amigos e colegas de pesquisa **FÁBIO SCHEMANN-MIGUEL, DELAINE PIRES ROMÃO e MARCO ANTONIO MATTAR**, pela amizade, incentivo e dedicação para que este trabalho tornasse realidade.*

*Aos colegas de laboratório e **PÓS GRADUAÇÃO ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS, ALLAN ZIMMERMANN, MARCELO MELO SOARES, MARCELO OLIVEIRA SANTOS, ROSANA MIEKO YAMAMOTO**, pela convivência, o aprendizado e pelos bons momentos compartilhados durante as apresentações nas reuniões do Laboratório de Cultura de Células as segundas-feiras.*

*À todos os professores do Programa de **PÓS GRADUAÇÃO em Cirurgia Translacional** pelas colaborações durante as apresentações nas reuniões da PG.*

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

## **Agradecimentos Especiais**

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

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, AFILIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA – UNIFESP – ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA, *que foi um verdadeiro mestre neste projeto, sendo paciente e determinado em nos guiar.*

À **Prof.<sup>a</sup>. SILVANA GAIBA**, PESQUISADORA DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE CÉLULAS DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO *por sua incansável colaboração neste trabalho.*

*Meus sinceros agradecimentos.*

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>05</b>
<b>3. LITERATURA.....</b>	<b>07</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>73</b>
<b>FONTES CONSULTADAS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Terceiro molar após a extração dentro do tubo de 15 ml com meio de transporte (meio de cultura Alpha-MEM suplementado com antibióticos e antifúngico).....	33
<b>Figura 2</b> – Raspagem do terço médio das raízes com lamina de bisturi nº 15 dentro do fluxo laminar para a obtenção do fragmento de ligamento periodontal.....	34
<b>Figura 3</b> - Fragmento de tecido periodontal sendo colocado dentro do tubo cônico de 15 ml para lavagem do material coletado.....	35
<b>Figura 4</b> – Modelo de cubo de acrílico com dimensões 2x2x2.....	38
<b>Figura 5</b> – Esfera de aço inoxidável dentro do cubo de acrílico.....	39
<b>Figura 6</b> – Pressão aplicada sobre as células.....	39
<b>Figura 7</b> – Modelo de compressão usado nos grupos experimentais GE3 e GE4.....	40
<b>Figura 8</b> - Preparo para centrifugação inicial.....	41
<b>Figura 9:</b> Separação das 3 fases.....	42
<b>Figura 10:</b> Quantificador de RNA NanoVue GE.....	43
<b>Figura 11:</b> Leitura da extração de RNA.....	43
<b>Figura 12:</b> Detalhe do Termociclador.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores das medianas da expressão gênica da OPG avaliada por qPCR.....	48
<b>Tabela 2:</b> Comparação dos valores de P encontrados na tabela 1.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

GC –	grupo controle
GE1 –	grupo experimental 3 g/cm <sup>2</sup>
GE2 –	grupo experimental 4 g/cm <sup>2</sup>
LPH –	ligamento periodontal humano
PBS –	<i>Phosphate buffered saline</i>
2D –	cultura celular em monocamada
3D –	cultura celular com substrato de colágeno
HBSS –	Hank's Balanced Salt Solution
qPCR-	Real Time Polimerase Chain Reaction
OPG –	Osteoprotegerina
RANK –	Receptor ativador de fator nuclear $\kappa$ B
RANKL -	Receptor ativador de fator nuclear $\kappa$ B Ligante

## RESUMO

**Introdução:** O cultivo de fibroblastos do ligamento periodontal, associada a simulação de cargas de pressão ou tensão sobre a célula, permite analisar as modificações da sua morfologia e identificar proteínas e moléculas formadas e envolvidas neste processo. O sistema formado pelas proteínas receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B Ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) está diretamente ligado a regulação de osteoclastos e a osteoclastogênese, na formação e reabsorção do tecido ósseo. **Objetivo:** Avaliar a expressão do RNAm das proteínas RANK\RANKL e OPG em fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua. **Métodos:** Os fibroblastos foram coletados do ligamento periodontal de 40 terceiros molares inclusos de pacientes adultos e foram cultivados em frascos de culturas até a sexta passagem. As células foram alojadas em placas com 6 poços com 3 mm de diâmetro onde foram submetidos a pressão contínua (3 e 4 g/cm<sup>2</sup>) durante 6 horas em monocamadas. Das amostras, o RNAm foi extraído e avaliado pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real qPCR. **Resultados:** No modelo de pressão contínua utilizando fibroblastos do ligamento periodontal, nos grupos avaliados, não houve a expressão de RANK\RANKL, mas expressaram OPG, tendo sido significativamente maior no grupo experimental 2 (GE2) em comparação com os grupos controle (GC) e experimental 1 (GE1). **Conclusão:** Os fibroblastos adultos de ligamento periodontal humano quando sob pressão contínua não expressaram o RNAm de RANK\RANKL e expressaram o RNAm da Osteoprotegerina.

**Descritores:** 1. Ligamento periodontal. 2. Ligante RANK. 3. Osteoprotegerina 4. Fibroblastos

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido complexo com células, matriz colágena e elementos inorgânicos, sujeito a stress fisiológico contínuo, tendo como controle de sua homeostase reações metabólicas. A osteoclastogênese é o processo de diferenciação celular e está diretamente envolvido em processos inflamatórios patológicos tais como artrites reumatóides e doenças osteoporóticas, periodontites, metástase óssea do câncer, movimentação ortodôntica induzida; e situações fisiológicas como a remodelação óssea em articulações NAKAGAWA *et al.* (1998). Nos últimos anos têm sido realizado inúmeras pesquisas no campo da biologia celular óssea para identificar e demonstrar quais as moléculas estão presentes e quais são realmente importantes no processo de diferenciação dos osteoclastos e como eles são guiados até o processo inflamatório.

O domínio da técnica de cultivo de vários tipos celulares *in vitro* nos últimos anos permitiu analisar modelos estabelecidos que simulam determinadas situações e características próximas das que ocorrem num evento celular *in vivo*. Os aspectos físicos das células sob forças pré-determinadas, a velocidade com que modificações estruturais ocorrem e a sua dinâmica metabólica são complexas, e é exatamente por meio dos modelos experimentais que podemos estudar cada evento de forma a compreendê-los. Os eventos celulares que ocorrem na osteoclastogênese, e as proteínas envolvidas, já foram amplamente estudadas, e alguns modelos já foram desenvolvidos para se ter uma percepção mais próxima da realidade.

Com a utilização de instrumentos de análises precisos, como por exemplo a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), houve a possibilidade de identificar, no caso de células do ligamento periodontal,

aspectos bioquímicos responsáveis por essas modificações, e as moléculas envolvidas em cada etapa. No entanto, o funcionamento completo de todo esse mecanismo ainda é desconhecido HACOPIAN *et al.* (2011) e KOOK, JANG & LEE (2011).

Das moléculas envolvidas no metabolismo do tecido ósseo, destacam-se três: Osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL). Juntas elas executam uma “dança” que coordena todo um sistema de sinalização, recrutamento e ativação ou inativação de osteoclastos e osteoblastos. Osteoprotegerina (OPG), tem sido descrita como um “protetor do osso”, representa uma proteína madura de 380 aminoácidos. É secretada como uma proteína solúvel e é conhecida por ser expressa em vários tecidos, mas principalmente por células de linhagem osteoblástica. Sua principal atividade biológica é a inibição da diferenciação de osteoclastos, e estimular sua apoptose. O receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), que pode ser definido como um peptídeo de 616 aminoácidos, que se adere a superfície celular de precursores de osteoclastos, é expressa por esta célula e outros tecidos como músculo esquelético, fígado e tem a principal função de ativar os osteoclastos se unindo ao receptor de fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) que é um peptídeo de 317 aminoácidos, que é secretado por osteoblastos e uma vez que se une a RANK inibe a apoptose dos osteoclastos. Unido a OPG, RANKL inibe a atividade osteoclástica SIMONET *et al.* (1997); LACEY *et al.* (1998) e NAKAGAWA *et al.* (1998).

A capacidade do tecido músculo-esquelético para responder às mudanças no seu ambiente de função frente a agressões que colocam em risco sua homeostase sem afetar sua capacidade funcional é descrito como lei de Wolff e denominado de mecanotransdução QIN & HU (2014).

Como o modelo de compressão estática contínua dos fibroblastos do ligamento periodontal foi aprimorado no laboratório de cultura de células, possibilitou analisar esta célula altamente especializada, e que esta intimamente relacionada com o processo de formação e reabsorção do tecido ósseo (tensão e compressão) e que quando *in vivo* ocorre de maneira simultânea na gonfose, articulação que se encontra o ligamento periodontal, por isso da escolha desta célula.

**OBJETIVO**

## **1. OBJETIVO**

Avaliar a expressão do RNAm das proteínas RANK\RANKL e OPG em fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua.

**LITERATURA**

## 1. LITERATURA

ARCEO *et al.* (1991) relataram que o objetivo principal no tratamento das doenças periodontais é a regeneração dos componentes do tecido mineralizado e tecido conjuntivo mole. As células do periodonto teriam a capacidade de participar ativamente na restauração de tecidos conjuntivos, incluindo tecidos mineralizados quando adequadamente acionadas. Para avaliar melhor a homeostase do periodonto, células do ligamento periodontal (LPD) e células de fibroblastos gengivais (FG), os autores cultivaram e examinaram os níveis de fosfatase alcalina e a capacidade de produzir nódulos mineralizados em cultura, duas características de células semelhantes a osteoblastos *in vitro*. Os níveis de fosfatase alcalina produzidas por estas células foram determinados por um ensaio cinético modificado e a capacidade destas células para produzir nódulos minerais *in vitro* foi avaliada por coloração de Von Kossa e microscopia óptica e eletrônica. Células do LPD tinham níveis significativamente mais elevados de fosfatase alcalina, quando comparadas com os fibroblastos gengivais obtidos a partir do mesmo paciente e da mesma passagem, *in vitro*. As células do LPD, mas não do FG, foram capazes de produzir nódulos minerais, em resultados *in vitro*. Os autores relataram que tais propriedades; isto é, a capacidade de células PDL para iniciar nódulos minerais-like, seriam importantes na concepção de modalidades de terapia direcionadas a estimular a regeneração do periodonto.

YOUSEFIAN *et al.* (1995) desenvolveram um aparelho para aplicar pressão hidrostática dinamicamente nas células do ligamento periodontal (PDL) *in vitro*. O objetivo desta pesquisa foi construir este aparelho e determinar seus efeitos nessas células que foram coletadas do ligamento periodontal humano de pré-molares recém extraídos. As células foram estimuladas mecanicamente em diferentes magnitudes por meio de uma pressão hidrostática contínua positiva ou negativa (PHP ou NHP), respectivamente. A aplicação de PHP entre 0.3 e 30 g/cm<sup>2</sup> aumentou significativamente a produção de prostaglandinas E (PGE) e de AMP cíclico (cAMP) intracelular. Em contraste, a estimulação por NHP diminuiu significativamente a produção de PGE e o nível intracelular de cAMP. A taxa de proliferação celular aumentou significativamente nas primeiras 24 e 48 horas após a estimulação com -30 g/cm<sup>2</sup> de NHP. Em contrapartida, a estimulação com +30 g/cm<sup>2</sup> de PHP diminuiu significativamente a taxa de proliferação dessas células em 24 e 48 horas. A estimulação entre +30 a +60 g/cm<sup>2</sup> aumentou a largura e o comprimento das células e pareceu aumentar a superfície de adesão ao fundo das placas de cultura. Em contraste, NHP (entre -30 e -60 g/cm<sup>2</sup>) diminuiu essas dimensões e pareceu reduzir a superfície de fixação. Esses resultados indicaram que este tipo de perturbação mecânica das células do PDL produzem respostas fisiológicas e não é prejudicial à vitalidade das células.

BRASDA (1997) enfatizou que o entendimento dos fundamentos biológicos da movimentação dentária é crucial para a ortodontia. A identificação dos componentes dos sinais de transdução iniciados após a aplicação de força permitiu a sua manipulação levando a melhores resultados. Para examinar os efeitos da estimulação mecânica no periodonto, células do ligamento periodontal foram isoladas, colocadas em

meio de cultura e caracterizadas. Em contraste com os fibroblastos gengivais, os fibroblastos do periodonto humano exibiram características típicas dos osteoblastos. Para entender o papel da estimulação mecânica, forças ortodônticas relevantes foram simuladas *in vitro*. Os autores obtiveram como resultado que as células do ligamento periodontal humano responderam ao estiramento mecânico por sinais de transdução que provavelmente incluíram pequenas proteínas ligantes de GTP (Guanosina Trifosfato) e fatores de transcrição (c-Jun e c Fos).

SIMONET *et al.* (1997) identificaram uma nova glicoproteína secretada que regula a reabsorção óssea. Esta proteína, denominada osteoprotegerina (OPG), seria um novo membro da super família de receptores de TNF. Segundo os autores, *in vivo*, a expressão hepática de OPG resultaram numa profunda osteopetrose não letal em ratos transgênicos, coincidente com uma redução em fases posteriores da diferenciação de osteoclastos. Esses mesmos efeitos foram observados com a administração de OPG recombinante em camundongos normais. Os autores relataram que OPG bloqueia perda óssea associada à ovariectomia em ratos. Estes dados mostraram que a OPG poderia atuar como um fator solúvel na regulação da massa óssea e implica uma utilidade para a OPG no tratamento da osteoporose associados com o aumento da atividade dos osteoclastos.

LACEY *et al.* (1998) analisaram e identificaram uma molécula ligante para osteoprotegerina, a qual seria uma citocina relacionada com fatores de necrose tumoral (TNF) e que substituiria a necessidade de células estromais, vitamina D<sub>3</sub>, e glucocorticóides no modelo de co-cultura de osteoclastogênese *in vitro*. Neste estudo os autores descreveram que OPG

ligante(OPGL) liga-se a uma célula progenitora hematopoiética única que está comprometida com a linhagem dos osteoclastos e estimula a rápida indução de genes que caracterizam o desenvolvimento de osteoclastos. OPGL ativa diretamente osteoclastos isolados maduros *in vitro*, e a administração de curto prazo em ratos adultos normais resulta na ativação dos osteoclastos associado com hipercalcemia sistêmica. Segundo os autores OPGL é um fator de diferenciação e ativação de osteoclastos, sendo que os efeitos do OPGL estão bloqueados *in vitro* e *in vivo* por OPG, sugerindo que OPGL e OPG seriam os fatores de regulação extracelular essenciais no desenvolvimento dos osteoclastos.

NAKAGAWA *et al.* (1998) descreveram que o fator de diferenciação de osteoclastos (ODF) é um ligante para o fator de inibição da osteoclastogênese / osteoprotegerina (OCIF / OPG), e media um sinal essencial para a osteoclastogênese. A forma solúvel de ODF liga-se diretamente aos progenitores de osteoclastos, o que sugeriu a presença de um receptor ligado à membrana para ODF (ODFR) nas células. Para entender o mecanismo de transdução de sinal mediador de ODF na osteoclastogênese, Os autores clonaram o ODFR molecularmente de uma linha de osteoclastos macrófagos-like das células progenitoras de ratos. A análise da sequência de nucleótidos revelou que ODFR foi idêntica a RANK, um membro recentemente identificado da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que está envolvida na regulação da função de células dendríticas. Um anticorpo poli-clonal contra o domínio extracelular de RANK induziu osteoclastogênese na presença de fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF). Em contraste, tanto um RANK solúvel e fragmento Fab bloquearam a ligação de ODF com RANK e mediadores de osteoclastogênese ODF. Estes resultados indicam que

RANK é o receptor de sinalização essencial para o mediador de osteoclastogênese ODF.

HOFBAUER *et al.* (2000) relataram que embora hormônios e citocinas regulem vários aspectos da formação de osteoclastos, entre os dois últimos efetores estão o ligante de osteoprotegerina (OPG-L) e o fator de diferenciação de osteoclastos (ODF), um membro recentemente clonado da superfamília do fator de necrose tumoral e fator de estimulação de colônias de macrófagos. Os autores relataram que as moléculas OPG-L / ODF seriam produzidas por células de linhagem osteoblásticas e exercem seus efeitos biológicos por meio da ligação ao seu receptor, receptor de ativação de diferenciação de osteoclastos (ODAR) / ativador de receptor de fator nuclear- $\kappa$ B (RANK), em células de linhagem de osteoclastos. Segundo os autores a ligação resulta na rápida diferenciação de precursores de osteoclastos em medula óssea para amadurecer osteoclastos e, a concentrações mais elevadas, o aumento na atividade funcional e a apoptose de osteoclastos maduros é reduzida. Os autores enfatizam que a atividade biológica de OPG-L / ODF é neutralizado pela ligação a osteoprotegerina (OPG) / fator inibidor de osteoclastogênese (OCIF), um membro da superfamília de receptores de TNF, que também é secretado pelas células da linhagem dos osteoblastos.

KANZAKI *et al.* (2002) examinaram como o estresse mecânico afeta a atividade de suporte de osteoclastogênese de células do ligamento periodontal (LPD). Levantou-se a hipótese que a compressão mecânica promove osteoclastogênese através da indução da cicloxigenase 2 (COX-2), promovendo a produção de próstraglandina E2(PGE2), o que resulta no aumento da regulação da expressão de RANKL nas células do LPD. Para

testar esta hipótese, os autores utilizaram um sistema de cultura de células primárias do ligamento periodontal humano. Elas foram compactadas continuamente e, em seguida foram co-cultivadas com células mononucleares de sangue periférico durante 4 semanas. As células do LPD sob estresse mecânico tiveram um aumento de fatores de osteoclastogênese em PBMC. Além disso, a expressão de RNAm de RANKL em células do LPD aumentou com a força de compressão. Curiosamente, a expressão de OPG permaneceu constante ao longo de força de compressão ou com o tratamento de PGE2. Em conclusão, a força de compressão regula a expressão RANKL em células do LPD. Além disso, a expressão de RANKL devido ao stress mecânico em células do LPD era dependente de PGE2. Os autores demonstraram que fibroblastos do LPD, expressaram elevada atividade de fosfatase alcalina, e que podem auxiliar na osteoclastogênese quando sob carga compressiva.

REDLICH *et al.* (2004) descreveram que a capacidade das fibras elásticas em responder a estímulos mecânicos sugere que essas fibras desempenham um papel central na adaptação fisiológica a estímulos externos, incluindo aplicação de força ortodôntica. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito de pressão externa simulando força ortodôntica em culturas de fibroblastos do tecido do ligamento periodontal humano (hPDLF) e avaliando a expressão gênica de tropoelastina. A simulação de pressão externa foi obtida por centrifugação durante 10, 30, 60, 90 e 120 min dos hPDLF num rotor horizontal de microplacas. Análise semi-quantitativa qPCR do RNAm de tropoelastina foi realizada e  $\beta$ -actina foi utilizada como um controle interno não variável. Enquanto a força centrífuga nos níveis de RNAm da  $\beta$ -actina mostrou quase nenhuma

mudança, os níveis de RNAm da tropoelastina aumentou significativamente para um nível de pico de mais do que quatro vezes depois de 30 min. Posteriormente, aos 60 min, foram mantidos os níveis de RNAm em mais de três vezes. Após 90 minutos, o nível de RNAm reduziu-se ao nível controle. Este estudo demonstrou que tropoelastina foi expresso em hPDLF e que a pressão causou uma significativa maior regulação (*up-regulation*) dependente do tempo. A capacidade de resposta do gene tropoelastina para forças mostrou sua possível importância clínica no movimento dentário ortodôntico. Mais estudos, contudo, serão essenciais a fim de saber se a expressão elevada do gene *in vitro* também seria seguido por síntese da proteína correspondente e deposição *in vivo* na matriz extracelular (ECM) do ligamento periodontal (LPD).

NISHIJIMA *et al.* (2006) realizaram um estudo para determinar os níveis de receptor ativador de fator nuclear de kB ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) no fluido crevicular gengival (GCF) durante os movimentos dentários ortodônticos. Um segundo objetivo foi investigar o efeito da força de compressão na produção de RANKL e de OPG pelas células do ligamento periodontal humano (hPDL). Dez pacientes adolescentes foram incluídos. O GCF foi coletado da margem cervical distal dos dentes experimentais e controle a 0,1, 24 e 168h após a força de retração ser aplicada. Um estudo *in vitro* foi feito para examinar a secreção de RANKL e OPG das células do hPDL após a aplicação de força de compressão (zero, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0 g/cm<sup>2</sup> por 48hs) com cilindros de vidro nas respectivas forças. Foram utilizados *Kits* de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para determinar os níveis de RANKL e níveis de OPG no GCF e no meio condicionado. Como resultado, 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 hPDL de uma forma dependente do tempo e da 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.

NAKAO *et al.* (2007) estudaram a força de compressão intermitente para verificar se esta estimula a reabsorção óssea no tratamento ortodôntico. Este estudo examinou o mecanismo molecular em células do ligamento periodontal de humanos (hPDL) estimulados por uma força intermitente. Células do hPDL foram submetidas a uma força de compressão (2,0 ou 5,0 g /cm<sup>2</sup>) durante 2 a 4 dias. Forças contínuas ou intermitentes foram aplicadas durante todo o dia ou durante 8 horas por dia, respectivamente. No terceiro e quarto dia, o dano celular foi menor com força intermitente do que com força contínua. No quarto dia, expressões de RANKL e IL-1 $\beta$  foram maiores com forças intermitentes do que com força contínua. Um antagonista do receptor de IL-1 inibiu a expressão de RANKL induzida por força compressiva. Estes resultados indicaram que a IL-1 $\beta$  é um fator autócrino de regulação de compressão expressão induzida por RANKL em células PDL, e que a força intermitente pode efetivamente induzir a RANKL em células PDL com menos danos celulares.

NAKAJIMA *et al.* (2008) relataram que o estresse mecânico ocasionado pelo aparelho ortodôntico induz a produção de substâncias biologicamente ativas. Fator de crescimento de fibroblastos é uma citocina multifuncional que possui vários efeitos nas células fibroblásticas, e fator 2 de crescimento de fibroblasto desempenhando um papel importante na remodelação do ligamento periodontal. O receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) é uma importante proteína envolvida na osteoclastogênese e os autores relataram recentemente que os níveis de RANKL foram aumentados pela força de compressão *in vitro*. No presente estudo foram investigados os efeitos da força de compressão no fator 2 de crescimento de fibroblastos e produção de RANKL pelas células do ligamento periodontal humano. Uma força de compressão (0,5 - 4,0 g/cm<sup>2</sup>) foi aplicada nas células do ligamento periodontal humano por 0 - 24 horas, utilizando cilindros de vidro com diferentes pesos. As quantidades de RANKL (sRANKL) solúveis e fator 2 de crescimento de fibroblastos foram medidas usando ELISA enquanto que os níveis de RNAm foram determinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, anti-fator 2 de crescimento de fibroblastos foram adicionados para os meios de cultura de células e mediram a inibição de sRANKL e fator 2 de crescimento de fibroblastos pela *enzyme linked immunosorbent assay*. A força de compressão induziu a um nível mais alto de RANKL e fator 2 de crescimento de fibroblastos no tempo e magnitude da força de uma forma dependente. Tratamento com fator 2 de crescimento anti-fibroblasto inibiu a liberação da sRANKL. Concluíram que o fator 2 de crescimento de fibroblasto poderia estar envolvido parcialmente na osteoclastogênese durante o movimento dental.

TYROVOLA *et al* (2008) revisaram as questões envolvendo reabsorção radicular odontoclásticas, que é um problema clínico significativo em relação à movimentação ortodôntica, e reabsorção das raízes dos dentes decíduos é um fenômeno biológico intrigante. A função coordenada do sistema OPG / RANKL / RANK parece contribuir não só para a remodelação alveolar, mas também para reabsorção durante a movimentação ortodôntica e reabsorção radicular fisiológica. OPG e RANKL estão relacionados com a regulação da homeostase óssea pela sistema OPG /RANKL, e a determinação de suas concentrações poderia ser útil para prever a taxa de remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica, o efeito líquido entre a remodelação óssea e o grau de reabsorção radicular. Por isso, um estudo dos níveis de OPG e RANKL no sangue e no GCF, em relação ao grau de reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica, utilizando animais experimentais saudáveis, e com um design experimental cuidadosamente planejado e organizado, pode ser que seja capaz de responder a essa pergunta.

BLOEMEN *et al.* (2009) investigaram os efeitos da interação célula-célula na expressão de RNAm de moléculas de adesão e moléculas envolvidas na formação de osteoclastos em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e fibroblastos de ligamento periodontal primários humanos, ambas como culturas solitárias e em co-cultura. Analisou ainda a formação de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) positivas, células multinucleadas, e avaliaram suas habilidades de reabsorção óssea. Curiosamente, a expressão do gene da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e de genes relacionados à osteoclastogênese (RANKL, RANK, TNF-a e IL-1b) foi altamente regulada para cima nas co-culturas em comparação com monoculturas e a

sobre-regulação refletiu um aumento sinérgico de 5-10 vezes devido à interação célula-célula direta. A expressão de RNAm no caso de contato célula-célula não foi alterada, o que indica que a adesão heterotípica, entre células de diferentes tipos, é necessária para o aumento na expressão do gene. O estudo indica que a adesão célula-célula entre precursores de osteoclastos e os fibroblastos dos ligamentos periodontais modula significativamente a resposta celular que favorece a expressão de genes de diferenciação de osteoclastos e a formação final de osteoclastos.

YAMAGUCHI (2009) estudou a movimentação ortodôntica descrevendo que a mesma é induzida por estímulos mecânicos e facilitadas pela remodelação do ligamento periodontal (LPD) e osso alveolar. Uma pré-condição para estas atividades de remodelação, e, finalmente, para o deslocamento do dente, é a ocorrência de um processo inflamatório. Esta avaliação abrangeu o conhecimento sobre o papel do receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), do receptor ativador de fator nuclear- $\kappa$ B ligante (RANKL), e a osteoprotegerina (OPG) nas reações dos tecidos periodontais, em resposta aos forças ortodônticas. Foi descoberto que as concentrações de RANKL no fluido crevicular gengival (FCG) aumentou durante o movimento ortodôntico, e a proporção de concentração de RANKL para a de OPG no GCF foi significativamente maior do que em locais de controle. Foi demonstrado *in vivo* a presença de RANKL e RANK em tecidos periodontais durante a movimentação dentária experimental de molares de ratos, e que as células do PDL sob estresse mecânico podem induzir a osteoclastogênese através de regulação positiva da expressão de RANKL durante a movimentação ortodôntica. Considerando a importância de RANK, RANKL e OPG na formação de osteoclastos fisiológico, o autor sugere que é razoável propor que a

sistema de RANKL / RANK / OPG desempenha um papel importante na movimentação ortodôntica.

KIM *et al.* (2009) Estudaram se as células do ligamento periodontal humano (hPDL) poderiam produzir RNAm relacionados a osteoclastogênese e examinou como cargas compressivas afetam a sua expressão em células do hPDL. Células do PDL foram obtidas a partir de pré molares extraídos para o tratamento ortodôntico. A força de compressão foi ajustada, aumentando o número de vidros. As células foram submetidas a uma força de compressão de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 ou 4,0 g / cm<sup>2</sup> para 0,5, 1,5, 6, 24 ou 48 horas. A análise de transcrição reversa na reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) foi realizada para examinar os níveis de M-CSF, IL-1 $\beta$ , RANKL, a expressão do RNAm de OPG. células humanas sob carga compressiva demonstraram um aumento de M-CSF, IL-1 $\beta$  e expressão de RNAm RANKL com uma força de até 2 g / cm<sup>2</sup> e de modo dependente do tempo. No entanto, a expressão do RNAm de OPG foi constante, independentemente do nível e duração do estresse. A carga compressiva contínua induziu a expressão do RNAm de citocinas osteoclastogênicas incluindo M-CSF, RANKL, IL-1 $\beta$  em células PDL. Juntamente com um nível de RNAm de OPG inalterada, estes resultados sugerem que a osteoclastogênese induzida por tensão de compressão *in vivo* é parcialmente controlado por M-CSF, RANKL e expressão de IL-1 $\beta$  em células PDL.

KOOK *et al.* (2009) apresentaram neste estudo que mais células semelhantes a osteoclastos foram induzidas nas co-culturas de células da medula óssea com ligamento periodontal do que os fibroblastos gengivais, e este foi consideravelmente maior quando anticorpo anti-osteoprotegerina

foi adicionada às co-culturas. Os níveis de RNAm de receptor ativador de factor nuclear kappa B ligante foram aumentados em ambas as populações, quando eles foram cultivados com dexametasona e vitamina D3. As forças centrífugas inibiram a osteoclastogênese de ambas as populações, e este foi provavelmente relacionado com a sobre-regulação de OPG induzida pela força. Estes resultados sugerem que os fibroblastos do ligamento periodontal são naturalmente melhores na indução dos osteoclastos em relação aos fibroblastos gengivais, e que a força centrífuga inibiu a osteoclastogênese através dos fibroblastos periodontais e da produção de OPG.

LE GALL & SASTRE (2010) estudaram os princípios fundamentais envolvidos na remodelação óssea. As forças aplicadas pelos aparelhos ortodônticos são convertidas em sinais celulares através da deformação das paredes ósseas e da reação inflamatória que elas provocam. Sucessivamente, as numerosas citocinas que são criadas por esse processo, ativam outros mensageiros que diferenciam, ativam e inibem a variedade celular envolvida na movimentação dentária e que são indispensáveis na realização de movimentos dentários rápidos e harmoniosos, respeitando os limites fisiológicos para evitar as repercussões indesejadas (reabsorção e anquilose radicular) ou recidivas. Concluíram que os recentes avanços na área da biologia tem levado à um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na movimentação ortodôntica. Dependendo do estado da movimentação dentária, diferentes interações célula-célula e célula-matriz extracelular ocorrem, e estas determinam a forma de remodelação do osso e do ligamento.

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. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da força centrífuga na transcrição de colágeno tipo I (Col-I), matriz de metaloproteinase-1 (MMP-1), e inibidor de tecido de genes de metaloproteinase-1 (TIMP-1) em fibroblastos do ligamento periodontal (PDL) humano. Fibroblastos humanos obtidos a partir do PDL foram cultivados e submetidos à forças centrífugas ( $36,3 \text{ g/cm}^2$ ) de 30, 60 e 90 min de forma contínua. Isto também foi realizado ininterruptamente, três vezes, durante 30 min e seis vezes durante 15 min. A codificação 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 min e 60 min, respectivamente. A força interrompida teve quase nenhum efeito em genes Col-I, MMP-1 e TIMP-1. Estes resultados indicaram que as forças contínuas tiveram um efeito maior na indução da expressão de genes durante o processo de remodelação de PDL em comparação com as forças interrompidas com curto períodos de descanso.

KOOK, JANG & LEE (2011) relataram que fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) sentem e respondem à estímulos mecânicos e participam da reabsorção óssea alveolar durante o tratamento ortodôntico. Este estudo examinou como o PDLF 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 descobriram que as forças mecânicas inibiram a

diferenciação osteoclástica de BMM em co-culturas com PDL, com PDL produzindo predominantemente osteoprotegerina (OPG), em vez de receptor ativador do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligante (RANKL). Em particular, o FLP aumentou a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em resposta à compressão. TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , ou do receptor de TNF- $\alpha$ . Coletivamente, os resultados sugeriram que FLP podem secretar níveis relativamente altos de TNF- $\alpha$  no lado de compressão do que no lado de tensão e este desequilíbrio conduz a expressão de RANKL, ativando CD4<sup>+</sup> células T, o que facilitou a reabsorção óssea durante a movimentação dentária ortodôntica.

Li *et al.* (2011) elaboraram um modelo tridimensional com tecido de ligamento periodontal humano (hPDL) usando uma folha fina de ácido láctico-co-glicólico que serviu como *scaffold*. Após sujeitos ao aumento da compressão estática de 5 - 35 g/cm<sup>2</sup>, durante 6 horas, a expressão de RNAm de RANKL foi significativamente regulada para cima pela força  $\geq$  25 g/cm<sup>2</sup> no modelo. Depois de ter sido submetido a compressão estática de 25 g/cm<sup>2</sup> para 6 - 72 horas, a expressão de RNAm de PTHrP, IL-11, IL-8, e FGF-2, potenciais indutores de osteoclastogênese, foi significativamente expressa no modelo, o que foi adicionalmente verificado pela compressão de PDL humana *in vivo*. No entanto, quando fibroblastos gengivais humanos foram substituídos por células PDL no modelo, quase nenhum dos indutores de osteoclastogênese foram expressos por forças de compressão. Os resultados forneceram novas evidências de que OPG também é um gene mecanorresponsivo em hPDL, e sua regulação negativa

imediatamente após a compressão pode contribuir para a indução da osteoclastogênese. Este modelo de tecido pode servir como uma ferramenta eficaz para o estudo da resposta mecânica do ligamento periodontal.

MAYAHARA *et al.* (2012) compararam a diferença funcional em osteoclastogênese entre células do ligamento periodontal humanos (hPDL) e osteoblastos humanos normais (HOB) sobre a aplicação da PGE2 produzida por HPDLs em resposta ao estresse mecânico. Foi examinada a expressão de RANKL, osteoprotegerina, e fatores estimulantes de colônias de macrófagos após 48 horas. Em seguida, para confirmar se o RANKL produzido por tratamento de PGE2 induz osteoclastogênese ou não. Quando exposto a PGE2 a expressão aumenta significativamente para RANKL em comparação com HOBs ou HPDLs. Com acréscimo de PGE2 resultou em expressão significativamente menor de osteoprotegerina em HOB comparado com hPDL. Os resultados sugerem que os osteoblastos podem influenciar fortemente a estimulação de osteoclastogênese através de RANKL, induzida por PGE2 nos tecidos periodontais, em comparação com PDL.

JACOBS *et al.* (2013) enfatizaram que no tratamento ortodôntico a força correta de tensão mecânica tem um papel importante na remodelação óssea durante a movimentação dos dentes. O objetivo deste estudo foi o de investigar a diferenciação osteogênica de fibroblastos do ligamento periodontal humano submetidos à aplicação de força mecânica comparando com osteoblastos. No experimento *in vitro* fibroblastos e osteoblastos foram expostos às diferentes forças (1% = 0,7 cN/mm<sup>2</sup>, 5% = 3 cN/mm<sup>2</sup> e 10% = 5,2 cN/mm<sup>2</sup>) de pressão mecânica estática durante 12 horas. A viabilidade celular foi avaliada por MTT e a apoptose por meio do ensaio

de TUNEL. A expressão do gene de ciclina, fosfatase alcalina, colágeno I, osteocalcina, osteoprotegerina (OPG) e RANKL foram investigados utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A síntese de OPG e RANKL foi medida pelo ensaio de ELISA e a atividade da fosfatase alcalina por meio do ensaio colorimétrico. Em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano, na aplicação de 10% de força de compressão estática o PCR mostrou maior aumento da expressão para OPG comparado com RANKL, assim como quando aplicada uma força de compressão de 5%. Os fibroblastos e os osteoblastos mostraram-se dependentes da força na síntese de Osteoprotegerina e atividade da fosfatase alcalina, enquanto os osteoblastos demonstraram uma diminuição na síntese de osteoprotegerina e da atividade da fosfatase alcalina quando aplicada força compressiva de 10%. Diferenciação osteogênica de fibroblastos correlacionou-se com o aumento da força de compressão. Osteoblastos mostraram diminuição da sua atividade quando foram submetidos às forças mais altas, demonstrando um potencial comprometimento na remodelação óssea. Forças compressivas de 5% proporcionaram melhores condições para a formação óssea durante e após a movimentação mecânica dos dentes.

KIM *et al.* (2013) realizaram um estudo para elucidar o envolvimento da via integrina-FAK (quinase de adesão focal) na expressão de RNAm do fator estimulante de colônias de macrófagos induzida por estresse compressivo M-CSF), factor de necrose tumoral (TNF) -a, ativador do receptor do factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) e para confirmar ainda mais o papel do complexo integrina-FAK como mecanorreceptores em células do ligamento periodontal. As células foram obtidas a partir de pacientes que têm primeiros pré-molares saudáveis

extraídos para fins ortodônticos. Células do PDL cultivadas foram divididas em três grupos: o grupo controle no qual estresse compressivo foi administrado; o grupo de controle negativo em que a compressão foi administrado após a transfecção de siRNA de controle negativo; e grupo knockdown FAK em que o estresse mecânico foi administrado após o tratamento com FAK siRNA. A carga compressiva (2 g / cm<sup>2</sup>) teve durações de tempo de (0,5, 2, 6, 24, 48 h). O RNA total foi colhido após o experimento e a análise de PCR em tempo real foi realizado para determinar a expressão de RNAm nos níveis de FEC-M, TNF-a, RANKL e OPG. Além disso, o sobrenadante foi analisado por ELISA para detectar as concentrações de citoquina correspondente. As células do grupo de controle e o grupo de controle negativo expressaram níveis de RNAm mais elevados de M-CSF, TNF-a, e RANKL, mas um nível inferior do RNAm de OPG. Células knockdown FAK mostraram níveis mais baixos na expressão de RNAm de M-CSF, TNF-a, e RANKL, mas um nível de expressão de RNAm de OPG maior do que a do controle. O nível de expressão de RNAm de OPG em células knockdown FAK era ainda mais elevada do que a de linha de base. Os resultados de ELISA mostrou padrão semelhante de variação da concentração de citoquinas.

SAMINATHAN, VINOOTH & CAO (2013) afirmaram que houve inúmeras tentativas de se construir um modelo *in vitro* do ligamento periodontal incorporando-se células do ligamento em vários polímeros, sejam sintéticos ou naturais, sendo o colágeno o mais comumente utilizado. O principal objetivo deste trabalho foi o de projetar e caracterizar as construções tridimensionais, semeando células do ligamento periodontal em películas de *hydrogel* de gelatina de hialuronano (80-100 µm) num formato capaz de ser deformada mecanicamente. Arcabouços com

ligamento periodontal humano foram cultivados usando ou não fatores de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), que é mitógeno para fibroblastos e capaz de direcionar a diferenciação de células progenitoras do ligamento periodontal, e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-2) que é mitógeno para células do ligamento periodontal, em culturas estáticas e culturas mecanicamente ativas submetidas às forças cíclicas de 12% em 0.2 Hz a cada minuto, 6 horas por dia, numa unidade de força no Flexcell FX-4000. Os seguintes parâmetros foram medidos: número de células e viabilidade celular verificadas por microscopia confocal de varredura; proliferação celular com ensaio MTS; a expressão de um painel de 18 genes utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) usando o SYBR® Green Master Mix; ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA. Embora inicialmente distribuídas aleatoriamente, as células se organizaram em uma bicamada no 7º dia; células apoptóticas mantiveram-se constantes à cerca de 5% do total. CTGF/FGF-2 estimularam a proliferação celular em culturas estacionárias, mas valores de quantidades relativas sugeriram efeitos modestos sobre a expressão gênica. Com relação aos genes de RANKL e OPG, OPG foi mais expresso sem a adição de fatores de crescimento em relação a RANKL. Concluíram que os arcabouços de tecido tridimensionais são mais complexos que os sistemas de cultura em monocamada, e sugeriram algumas suposições a respeito do crescimento celular, diferenciação e dobra da matriz baseada em culturas bidimensionais que podem ser aplicadas às células em matrizes tridimensionais.

QIN & HU (2014) enfatizaram que enquanto a sinalização da mecanotransdução foi comprovada essencial para a regeneração de tecidos, continua crítica para determinar respostas celulares específicas tais como

sinais mecânicos e mecanismos subjacentes. O fluxo de fluido dinâmico induzido por carga mecânica tem sido demonstrado que têm potencial para regular a adaptação óssea e reduzir a sua perda. Vias de mecanotransdução são de grande interesse na elucidação da produção de sinais mecânicos e tais efeitos observados incluíram redução da perda óssea, aumento da formação óssea e diferenciação de células osteogênicas. O objetivo desta revisão foi desenvolver uma compreensão molecular dos processos de mecanotransdução em regeneração tecidual podendo fornecer novos *insights* sobre a fisiologia óssea. Foi discutido o potencial de carga mecânica utilizada para induzir o fluxo de fluido ósseo dinâmico, regulação de adaptação óssea e otimização de parâmetros de estimulação em vários níveis de carga. O potencial de carga mecânico para regular a microcirculação também foi discutida. Estes dados e discussões destacaram o processo ainda altamente complexo e coordenado de mecanotransdução na regeneração do tecido ósseo.

SOKOS, EVERT, de VRIES (2014) afirmaram em uma revisão de literatura que o dente não pode se deslocar no osso alveolar sem a presença do ligamento periodontal. Aplicando-se diferentes tipos de forças mecânicas nos fibroblastos do ligamento periodontal pode resultar em uma modulação na sua habilidade de produzir molécula que são associadas a osteoclastogênese. A amplificação dessas forças, tende a causar um aumento na expressão gênica de RANKL, dependendo do tempo e força aplicados, por meio de um aumento na produção de prostaglandina-E2, mas sem efeitos nos níveis de OPG. A síntese de RANKL foi hipo-expressa e de OPG hiper-expressa em resposta a 1 hora de forças de tensão e compressão, o que levou a uma redução de células osteoclásticas. Concluiu que, com relação a formação osteoclástica, os fibroblastos do ligamento

periodontal possuem um duplo papel significativo na remodelação do osso alveolar. Em condições fisiológicas pode sintetizar altos níveis de OPG comparado a RANKL, que possui um efeito inibitório na osteoclastogênese. Quando o equilíbrio fisiológico é perturbado, seja por forças mecânicas ou infecção bacteriana, a produção de moléculas que estimulam a osteoclastogênese é aumentada, levando possivelmente ao aumento de osteoclastos.

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/mm<sup>2</sup> e 4 cN/mm<sup>2</sup> durante 12 horas para simular forças moderadas e altas respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a taxa de apoptose pelo ensaio do TUNEL. As expressões dos genes da fosfatase alcalina, osteocalcina, osteoprotegerina e RANKL foram analisadas usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Osteopontina, matriz metaloproteinase e inibição do tecido de metaloproteinase foram quantificados pelo ensaio ELISA. A força de 4 cN/mm<sup>2</sup> (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/mm<sup>2</sup> nos fibroblastos e após 4 cN/mm<sup>2</sup> nos osteoblastos. Osteocalcina não sofreu alteração após a aplicação das forças compressivas. A maior relação de RANKL/Osteoprotegerina foi medida após a aplicação de 2 cN/mm<sup>2</sup> 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.

## **MÉTODOS**

## **1. MÉTODOS**

### **4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

- Primário
- Experimental
- Longitudinal
- Prospectivo
- Centro Único
- Aleatorizado

### **1.2 AMOSTRAS**

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

### **4.3 SELEÇÃO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A CIRURGIA DOS TERCEIROS MOLARES**

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 30 anos, não tabagistas, com os quatro terceiros molares

inclusos (intra-ósseos) com indicação clínica e ortodôntica de remoção dos mesmos, sem história de doenças e sem uso de medicamentos.

#### **4.3.2 Critérios de não inclusão**

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

#### **4.3.3 Critérios de exclusão**

Impossibilidade de se adquirir 4 mm<sup>2</sup> de ligamento periodontal, contaminação da cultura de células e a não confluência das garrafas.

### **4.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL**

#### **4.4.1 Obtenção do ligamento periodontal humano**

O ligamento periodontal foi obtido por meio da raspagem radicular de terceiros molares inclusos descartados após serem extraídos de pacientes atendidos no ambulatório odontológico do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos. As cirurgias foram realizadas pelo próprio pesquisador. A técnica operatória foi padronizada para todos os pacientes da seguinte forma: 1) antissepsia extra oral com Clorexidina à 4% e antissepsia intra oral com Clorexidina à 0,12%, 2) colocação dos campos operatórios esterilizados, 3) anestesia local com Alphacaine 100 à 2% com Epinefrina 1:100.000 1,8 ml, com seringa carpule, agulha 27G 4) incisão com bisturi lamina 15, 5) descolamento muco-periósteo com

sindesmótomo, 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) toaleta 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.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, acondicionou-se os dentes em tubos cônicos estéreis de 15 ml (Figura 1) contendo 5 ml de solução de transporte com: meio de cultura Alpha-MEM suplementado com 1% de antibióticos e antifúngico (5000U penicilina e 5000µg estreptomicina + 25µg anfotericina-B) (Gibco, Gibco Industries Inc.,



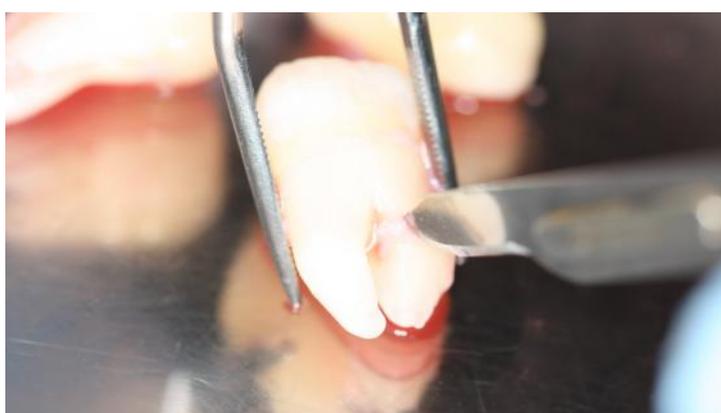
**Figura 1** – Terceiro molar após a extração dentro do tubo de 15 ml com meio de transporte, meio de cultura Alpha-MEM suplementado com antibióticos e antifúngico.

Os tubos com os dentes extraídos foram transportados para o Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da

Unifesp até no máximo, seis horas após o ato operatório. Os tubos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo para que o transporte fosse realizado corretamente.

#### **4.4.2 Isolamento e cultivo dos fibroblastos derivados do ligamento periodontal**

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil), seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas. Os dentes foram lavados por quatro vezes com solução salina balanceada de Hank's (HBSS –Sigma Aldrich CA, USA) e 1% de antibióticos. Os fragmentos de ligamento periodontal de todos os dentes foram obtidos por raspagem do terço médio da raiz (Figura 2) utilizando um cabo de bisturi nº 3 (Duflex S.A., Rio de Janeiro, RJ) e uma lâmina cirúrgica nº 15 (Feather Safety, Razor Co., Ltda., Osaka, Japão).



**Figura 2** – Raspagem do terço médio das raízes com lâmina de bisturi nº 15 dentro do fluxo laminar para a obtenção do fragmento de ligamento periodontal.

De todos os pacientes foram coletados os quatro terceiros molares

(superiores e inferiores), e a quantidade de raízes raspadas estavam relacionadas à obtenção da quantidade pré-fixada de tecido periodontal, no caso, 4 mm<sup>2</sup>. Para aferição da quantidade de tecido periodontal utilizou-se uma placa milimetrada.

O tecido periodontal coletado foi inserido em um tubo cônico de 15 ml (Corning, MA, USA) (Figura 3) contendo 4 ml de HBSS e então por agitação manual foi lavado por quatro vezes em quatro tubos diferentes, cada período de agitação foi em média de 45 segundos.



**Figura 3** – Fragmento de tecido periodontal sendo colocado dentro do tubo cônico de 15 ml para lavagem do material coletado.

Na sequência o tecido periodontal foi inserido em um tubo cônico de 15 ml contendo 5 ml de meio de cultura, 1 mL de colagenase 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 foram então submetidas 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 colagenase e dispase foi neutralizada com a adição de 5 ml de meio de cultura Alfa-MEM (Lab

Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1% de antibióticos e antifúngicos, denominado Alfa-MEM completo. Após este período o tecido remanescente foi descartado e a solução foi transferida para um outro tubo de 15 ml e submetida a uma centrifugação com os seguintes parâmetros: 100g de força centrífuga por seis minutos à temperatura ambiente (Centrífuga Fanem Excelsa II, São Paulo, Brasil).

O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspendido em 5 ml de meio de cultura Alpha-MEM completo e uma contagem de células viáveis foi realizada utilizando-se contador de células automático (Invitrogen - Countess, Seul, Korea). A solução contendo o meio de cultura e as células do ligamento foi inserida em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, MA, USA). As garrafas foram levadas à uma incubadora e permaneceram à uma temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil). O meio de cultura foi trocado à cada 48 horas até atingir 80% de confluência. Quando a confluência de 80% foi atingida, que em média durou entre 30 a 40 dias, foram realizadas cinco subculturas nas quais utilizou-se tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA).

O congelamento das células na quinta passagem foi realizado utilizando-se o meio de cultura Alpha-MEM com 50% SFB inativado, 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 1x10<sup>6</sup> células/ml. Os criotubos foram imediatamente

colocados em gelo a 4°C e transferidos para o congelador a -20°C, onde permaneceram por 1 hora. A seguir, foram transferidos para o *freezer* -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.

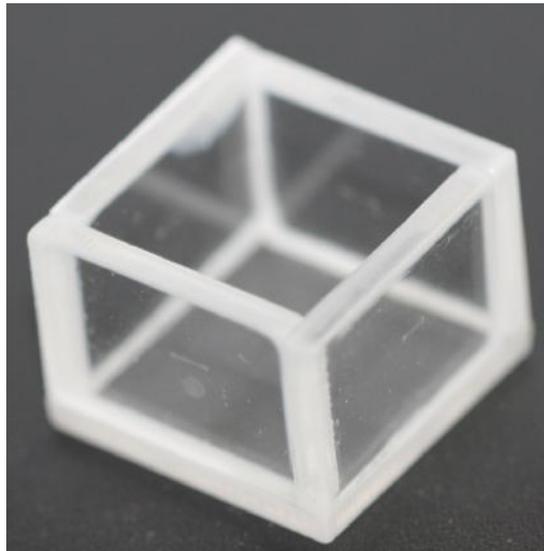
Para o descongelamento, o conteúdo do crio tubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de Alfa-MEM completo. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por 6 minutos. O sobrenadante contendo DMSO foi desprezado e o botão de células, ressuspenso em 15 ml de meio de cultura para Alfa-MEM completo. Foi realizado o cultivo das células por até 48 horas para que elas pudessem aderir e ficar na placa. Após, elas foram tripsinizadas e contadas de forma que houvesse  $2 \times 10^5$  em 200 µl de meio de cultura.

#### **4.5 APLICAÇÃO DA COMPRESSÃO ESTÁTICA CONTÍNUA**

Para o ensaio de compressão foi utilizada a densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço diluídas em 200 µl de meio Alfa-MEM completo. A semeadura das células foi sempre realizada de forma que o meio de cultura contendo as células fosse depositado no centro do poço e assim permanecesse por 10 minutos para fixação e na sequência o volume de meio de cultura no poço era completado até alcançar 2 ml. As células foram pré-incubadas durante seis horas em meio de cultura contendo com Alfa-MEM completo antes da aplicação da pressão. Depois, o peso foi aplicado sobre as células durante 6 horas na incubadora, ou seja, elas foram continuamente comprimidas utilizando uma compressão uniforme,

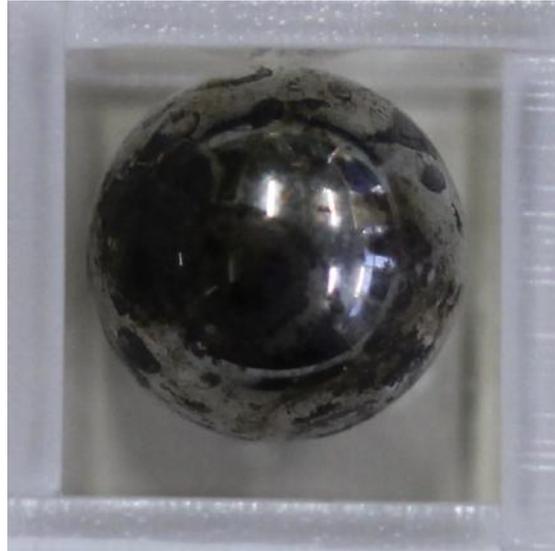
baseadas num modelo de compressão estática contínua para experiências *in vitro* (Figura 6).

Este modelo consistiu de um cubo de acrílico com as dimensões de 2x2x2 cm colocado no centro de cada poço da placa de cultura imediatamente sobre as células (Figura 4).

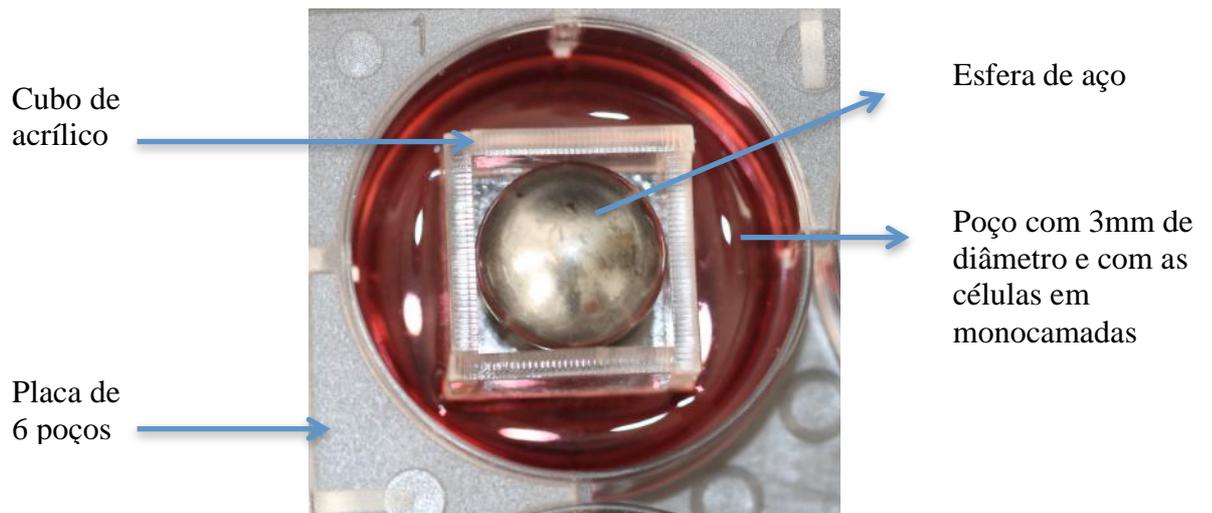


**Figura 4** – Modelo de cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2cm.

Dentro do cubo foram inseridas esferas de aço inoxidável para que se pudesse manipular o peso (Figura 5).



**Figura 5**– Esfera de aço inoxidável dentro do cubo de acrílico.



**Figura 6**– Pressão aplicado sobre as células.

Após a compressão, pelo método de tripsinização as células foram removidas da placa e levadas para a avaliação dos resultados.

## 4.6 DESENHO DO EXPERIMENTO

### 4.6.1 Experimento

Estudo realizado com as células derivadas de dez doadores de forma a obter as informações pertinentes às variáveis estudadas (Figura 7):

- Grupo Controle (GC) (sem compressão por 6 horas);
- Grupo Experimental 1 (GE1) ( $3,0 \text{ g/cm}^2$  por 6 horas);
- Grupo Experimental 2 (GE2) ( $4,0 \text{ g/cm}^2$  por 6 horas);



**Figura 7**– Modelo de compressão usado nos grupos experimentais GE3 e GE4, cada placa de 6 poços.

As cargas de  $3 \text{ g/cm}^2$  e  $4 \text{ g/cm}^2$  foram obtidas em um estudo piloto.

#### **4.7 AVALIAÇÕES**

Para avaliação dos resultados foi utilizado o método de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) que avalia a expressão de moléculas, utilizado com aparelho termociclador. A partir de uma molécula de RNA se recria uma cópia de DNA, ou DNA codificante (cDNA), 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 nucleicos e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

#### 4.7.1 EXTRAÇÃO DO RNA

Nos tubos com as amostras de tecido foi acrescentado 500 µl 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 acrescentou 100 µl de Clorofórmio (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA), o tubo foi agitado com auxílio do agitador hipersônico *vortex* (Labnet VX-200) por 15 segundos cada tubo.

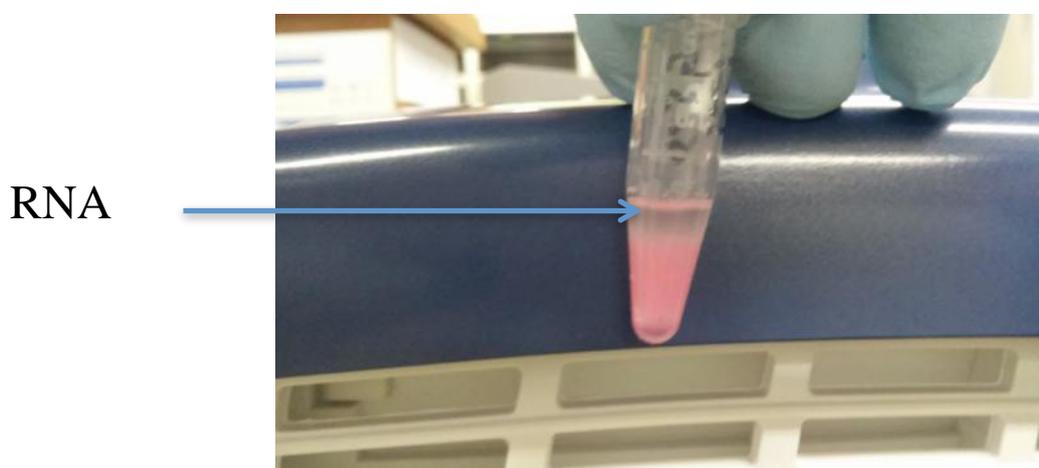
Após um intervalo de 3 minutos, as amostras foram levadas para uma centrífuga universal (HERMLE – LaborTechnik - Wehingen, Alemanha) para a separação das fases (Figura 8).



**FIGURA 8:** Preparo para centrifugação inicial, ajuste da rotação, temperatura e tempo.

A amostra foi centrifugada a 12000 RPM por 15 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 (Figura 9). A fase aquosa superior incolor foi transferida para um tubo estéril com auxílio de uma pipeta de 200 $\mu$ l para tubos eppendorfde 2 ml e acrescido de 250 $\mu$ l de Isopropanol (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA). A interfase e a fase orgânica foram descartadas.



**Figura 9:** Extração do RNA.

Após um intervalo de 2 minutos, os tubos foram levados novamente para centrifuga a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. Terminado a centrifugação o Isopropanol foi descartado, e prosseguiu-se com a lavagem do sedimento de RNA aderido no fundo do tubo, adicionando 1 ml de etanol a 75% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%], agitando em seguida os tubos vigorosamente.

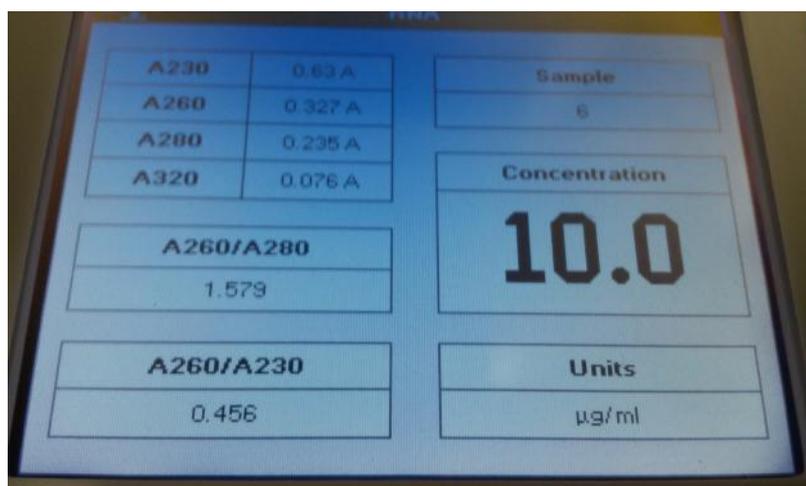
Os tubos foram novamente levados para a centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos abertos por 10 minutos para uma secagem a temperatura

ambiente. O RNA foi então ressuspensão com acréscimo de 50 µl de água DEPC.

A leitura das concentrações de RNA foi realizado com o equipamento *Gene Quant II Nano Vue* (GE Healthcare UK) (Figuras 10 e 11).



**Figura 10:** Quantificador de RNA NanoVue GE ®.



**Figura 11:** Leitura da extração de RNA.

As amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior condução do PCR.

#### 4.7.2 Reações do Real Time – PCR

Como controle endógeno da reação de PCR foi utilizado a Beta-Glucuronidase, também denominado normalizador GUSB.

Os *primers* foram desenhados através do software Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, UK). O composto utilizado foi o SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City – CA, EUA). 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.

As reações foram conduzidas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) (Figura 12).



**Figura 12:** Detalhe do Termociclador.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados entre GC, GE1 e GE2 foi realizada pelo teste de Friedman e os resultados obtidos da avaliação entre os grupos GC, GE1 e GE2 em pares foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Sendo os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas pelo *software SSP* (NY, USA).

## **RESULTADOS**

## 1. RESULTADOS

### 5.1 RANKL

Avaliação da expressão gênica por qPCR do RNA mensageiro da proteína receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) não foi expressa ou foi expressa em níveis não detectáveis pelo método utilizando SYBR® Green.

### 5.2 RANK

Avaliação da expressão gênica por qPCR do RNA mensageiro da proteína receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) não foi expressa ou foi expresso em níveis não detectáveis pelo método utilizando o *SYBR® Green*.

### 5.3 OPG

Após a realização da leitura de expressão gênica no qPCR, foi realizada a avaliação da expressão da osteoprotegerina e os resultados apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1:** Valores das medias da leitura de expressão gênica dos grupos CONTROLE, G1 e G2.

Paciente	Controle	G1	G2
1	25,19	25,79	26,46
2	25,51	25,75	26,36
3	25,52	25,93	26,50
4	25,17	25,76	26,43
5	25,53	25,65	26,27
6	25,51	25,79	26,65
7	25,83	25,81	26,37
8	25,67	25,84	26,28
9	25,53	25,91	26,43
10	25,51	25,90	26,51
Média	25,50	25,81	26,42
Mediana	25,51	25,80	26,43
DP	0,20	0,09	0,12

A análise comparativa entre os grupos Controle, G1 G2 foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon conforme demonstrada na tabela 1 e 2.

**Tabela1-** Valores das medianas da expressão genica da OPG avaliada por qPCR.

	GC	G1	G2	P
OPG	25,51±0,20	25,80±0,09	26,46±0,11	0,001*

GC: grupo controle células sem compressão e avaliadas por 6 horas; G1: grupo com compressão de 3g/cm por 6 horas e G2: grupo com compressão de 4g/cm por 6 horas

Teste de Friedman onde os valores de  $p < 0,05$  foram assinalados por \*

**Tabela 2-** Comparação dos valores de P encontrados na tabela 1.

	GC	G1
G1	0,007*	
G2	0,005*	0,005*

GC: grupo controle células sem compressão e avaliadas por 6 horas; G1: grupo com compressão de 3g/cm por 6 horas e G2: grupo com compressão de 4g/cm por 6 horas.

Teste de Wilcoxon onde os valores de  $p < 0,05$  foram assinalados por \*.

**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

O osso é um tecido complexo com células, matriz colágena e elementos inorgânicos. Tem como principal função a sustentação e proteção dos órgãos internos, e está sob constante influência de cargas fisiológicas, quer seja de tensão e/ ou compressão. A elaboração de um modelo para análise da compressão celular está baseado no princípio da mecanotransdução *in vivo*. Este fenômeno é conhecido por ser um estímulo mecânico onde a célula responde com necrose, apoptose ou diferenciação. No caso do fibroblasto derivado do ligamento periodontal, a mecanotransdução leva a uma produção e liberação de moléculas capazes de regular e normalizar a homeostase óssea local KANZAKI *et al.* (2002), LE GALL & SASTRE (2010) e QIN & HU (2014).

Na construção de um modelo experimental de mecanotransdução a escolha da célula alvo, não pode levar em conta apenas o tipo de célula, mas também tem de levar em conta o tecido da qual ela é oriunda. No caso dos fibroblastos os estudos de ARCEO *et al.* (1991), REDLICH *et al.* (2004) NAKAO *et al.* (2007) e MAYAHARA *et al.* (2012), demonstraram que os fibroblastos derivados do tecido gengival possuíam comportamentos diferente dos fibroblastos do ligamento periodontal, inclusive no que concerne ao estímulo para formação óssea como a neoformação de nódulos minerais pelos fibroblastos periodontais.

Algumas de proteínas reguladoras da função celular dos osteoclastos diretamente ligadas a osteoclastogênese, como a osteoprotegerina (OPG) que pode ser entendida como uma molécula “para proteger o osso” a qual é de linhagem osteoblástica, o receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) e o receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B ligante

(RANKL) SIMONET *et al.* (1997), LACEY *et al.* (1998), NAKAGAWA *et al.* (1998), HOFBAUER *et al.* (2000) expressas em células precursoras de osteoclastos, induzem a eventos-chave incluindo multinucleação das células.

Estudos de NAKAO *et al.* (2007), corroboram com os resultados de outros estudos NISHIJIMA *et al.* (2006), KOOK *et al.* (2009), YAMAGUCHI (2009) e KOOK, JANG & LEE (2011) os quais sugeriram que os fibroblastos do ligamento periodontal quando sob estresse podem secretar maiores níveis de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no lado de compressão, causando este desequilíbrio que conduz a expressão de RANKL, facilitando a reabsorção óssea durante a movimentação dentária e a análise de expressões imuno-histoquímicas demonstraram que algumas dessas expressões formaram-se para manutenção da homeostase do ligamento periodontal quando sob a influência de forças de tensão.

Em um estudo utilizando ratos transgênicos que possuíam a expressão hepática da Osteoprotegerina, SIMONET *et al.* (1997) verificaram que houve um aumento generalizado da densidade óssea em vertebrae e ossos longos, além de achados histológicos que confirmaram grave osteopetrose com presença de trabeculado na cartilagem circundada por ossos na diáfise media de osso femoral, um local comumente preenchido de elementos hematopoiéticos. LACEY *et al.* (1998) identificaram o ligante de OPG, OPGL, que demonstrou ser um potente indutor de reabsorção óssea *in vivo*.

O RANKL solúvel é liberado da membrana plasmática por conversor de metaloprotease-desintegrina-TNF- $\alpha$ , sendo que o RANKL solúvel e o RANKL aderido a membrana regulam a osteoclastogenese e a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é a receptora solúvel de atração do RANKL que pode suprimir a ligação entre RANK e RANKL e

bloquear os seus efeitos sobre a osteoclastogênese e a reabsorção óssea HOFBAUER *et al.* (2000), NISHIJIMA *et al.* (2006),

Tem sido sugerido que as mudanças na relação RANKL/OPG poderia afetar o processo de remodelação óssea. O aumento dessa razão sugeriu reabsorção óssea e o decréscimo indicou a possibilidade da formação óssea TYROVOLA *et al.* (2008), YAMAGUCHI (2009). Outros estudos realizados tanto em animais quanto *in vitro* demonstraram que forças contínuas nos fibroblastos do ligamento periodontal humano e animal tiveram um maior efeito na indução de expressão de genes responsáveis pelo processo de remodelação dessas células, situação diferente foi demonstrado em estudos com forças interrompidas SOKOS, EVERTS & DE VRIES (2014) concluindo-se que uma estimulação contínua induziu uma diferenciação de osteoclastos dentro da medula óssea e sua consequente migração para dentro do ligamento periodontal.

Existem evidências que células cultivadas em monocamadas (2D) podem expressar níveis diferentes de marcadores e ou de genes do que quando são cultivadas em um modelo tridimensional KANZAKI *et al.* (2002), KIM *et al.* (2009), KOOK *et al.* (2009). Não foi encontrado consenso na literatura quanto à aplicação de carga e tempo ideais para a aplicação de forças compressivas em fibroblastos periodontais, devido a diferença metodológica entre os estudos. Nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAGIMA *et al.* (2008), foram utilizadas forças compressivas na cultura de fibroblastos periodontais humanos para a investigação da produção de RANKL e OPG com forças compressivas variando de 0 à 4 g/cm<sup>2</sup> por um período de 0 – 48 horas. Nestes dois estudos os resultados mostraram que a magnitude da força de compressão e o tempo estão diretamente relacionados com o aumento da produção de RANKL.

Com relação ao método para estímulo da osteoclastogênese foram

descritos a aplicação de carga através da centrifugação das células cultivadas como em REDLICH *et al.* (2004), HACOPIAN *et al.* (2011), a compressão das células com pesos nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006), NAKAJIMA *et al.* (2008), KIM *et al.* (2009), LI *et al.* (2011), MAYAHARA (2012).

Em seu estudo NAKAO *et al.* (2007) aplicaram a carga compressiva alterando a quantidade de meio de cultura nos frascos, ou seja, quanto maior o volume maior seria o peso sobre as células. De outra forma, em seus estudos KOOK, JANG & LEE (2011), SAMINATHAN *et al.* (2013), JACOBS *et al.* (2013), e NETTHELHOFF *et al.* (2015) utilizaram um aparelho específico para simulação do estímulo de tensão e compressão em cultura de células Flexcell compression Plus System (Hillsborough, USA). Apenas no estudo de BLOEMEN *et al.* (2009). avaliou a expressão de moléculas relacionadas a osteoclastogênese em meio de cultura sem aplicação de uma carga compressiva.

Neste estudo, o modelo para compressão baseou-se nos modelos de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAJIMA *et al.* (2008), e foram utilizados cubos preenchidos com esferas de aço diretamente sobre as células. Com relação aos métodos de carga compressiva por aumento de volume de meio, a aplicação de carga diretamente sobre a célula parece ser mais previsível, porém na comparação com os métodos que empregam um equipamento específico para simular e medir tensão e compressão, o método de aplicação direta da carga como o empregado neste estudo é possivelmente menos preciso.

Nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006) experimentos aplicando-se uma carga compressiva direta, houve um aumento significativo no grupo

experimento de RANKL e uma expressão maior de OPG no grupo controle com o tempo de 48 horas, NAKAJIMA *et al.* (2008) do que com 24 horas.

Li *et al.* (2011) em um modelo de compressão tridimensional, verificaram que o RNAm de RANKL foi expresso positivamente a partir de 25 g/cm<sup>2</sup> de 6 a 24 horas, mas não expressou até chegar a 72 horas e que o RNAm de OPG foi expresso a partir de 24 horas. Eles justificaram a pouca expressão de RANKL após 72 horas, sugerindo que outros indutores participam para a promoção prolongada de osteoclastogênese. Concluíram que OPG é um gene que responde a estímulos mecânicos e foi pouco expresso após a compressão, o que *in vivo* contribui para osteoclastogênese.

Em um estudo de aplicação direta de força sobre as células JACOBS *et al* (2013) utilizaram uma carga estática contínua, similar a utilizada neste estudo, onde puderam verificar que tanto no seu grupo controle (GC) como nos grupos experimentais (G1 e G2) houve a expressão de OPG. Neste estudo a expressão de OPG tanto no grupo controle como nos grupos experimentais G1 e G2 apresentaram diferença estatística entre os grupos para a expressão gênica. O comportamento da expressão de OPG do nosso estudo foi o mesmo do estudo de JACOBS *et al.* (2013), e com o aumento da carga em 1g/cm<sup>2</sup> do grupo G1 (3g/cm<sup>2</sup>) para G2 (4g/cm<sup>2</sup>) tendo sido suficiente para detectar diferenças na expressão de OPG. Do ponto de vista apenas das quantidades de carga compressiva em g/cm<sup>2</sup>, sem levar em conta a análise estatística pode-se observar também que a expressão de OPG foi maior no grupo G2, o que poderia ser entendido como uma possível tendência de aumento na expressão de OPG relacionado com este aumento.

MAYAHARA *et al.* (2012), verificaram que após 24 horas e com uma carga de 2.0g/cm<sup>2</sup> a expressão de RANKL foi indetectável. Já a expressão de RNAm de OPG foi significativamente maior no grupo fibroblastos do ligamento periodontal do que quando comparado com o grupo osteoblastos humanos, sugerindo que as células do ligamento periodontal tem um papel muito mais potente em inibir a osteoclastogenese através da ligação OPG-RANKL. Os resultados deste estudo apresentam similaridade com os estudos de MAYAHARA *et al.* (2012), onde foi indetectável a expressão de RANK/RANKL mas pode-se observar aumento dos níveis de OPG.

KOOK, JANG & LEE (2011), demonstraram que OPG foi naturalmente mais expresso que RANKL na cultura *in vitro* após carga compressiva, e sugeriram que os fibroblastos do ligamento periodontal seria mais propensos a expressar OPG, mas não apresentando diferença significativa entre os níveis de OPG e RANKL quando avaliados por imunohistoquímica. Esse mesmo resultado foi encontrado em SAMINATHAN *et al* (2013), que verificaram uma maior expressão de OPG tanto em um meio sem fatores de crescimento quanto em um meio na presença desses fatores.

Na elaboração de um modelo experimental a escolha do tipo de célula determina os parâmetros de avaliação ARCEO *et al.* (1991), YOUSEFIAN *et al.* (1995), BASDRA (1997), SIMONET *et al.* (1997), LACEY *et al.*(1998). Neste estudo os fibroblastos derivados do ligamento periodontal *in vivo* tem um papel de controle da osteoclastogenese por meio da expressão da osteoprotegerina (NISHIJIMA *et al.* (2006), NAKAJIMA *et al* (2008), KIM *et al.* (2009), LI *et al.* (2011), MAYAHARA *et al.* (2012). Neste estudo os resultados demonstraram este

mesmo comportamento nas células cultivadas. O que leva a compreender que o nível de carga utilizado neste estudo bem como, a aplicação dessa carga diretamente sobre as células conseguiu simular a fisiologia periodontal quando esta sob a influência de uma carga considerada leve.

As perspectivas deste estudo seguem a mesma direção da literatura consultada a qual consegue detectar a presença de marcadores da osteoclastogenese como o sistema RANK/RANKL em fibroblastos do ligamento periodontal na utilização de cargas consideradas elevadas. A identificação das vias de sinalização molecular fazem parte também das nossas perspectivas.

**CONCLUSÃO**

## **7. CONCLUSÃO**

Os Fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua expressaram o RNAm da Osteoprotegerina e não expressaram o RNAm de RANK/RANKL.

## **REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

- Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human Periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol.* 1991; 62: 499-503.
- Basdra EK. Biological reactions to orthodontic tooth movement. *J OrofacOrthop.* 1997; 1: 2-15.
- Bloemem V, Schoenmaker T, De Vries T, Everts V. Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors. *J Cell Physiol.* 2009; 222:565-73.
- 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: 643-9.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 2-12.
- Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, Walter C, Wehrbein H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Arch Oral Biol.* 2013; 58: 896-904.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under stress induce osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand up-regulation via prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 210–20.

Kim JW, Lee KS, Nahm JH, Kang YG. Effects of compressive stress on the expression of IL-1 $\beta$ , RANKL and OPG mRNA in periodontal ligament cells. *Korean J Orthod.* 2009; 39(4): 248-56.

Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. *Crit Revin Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(1): 61-72.

Kook SH, Jang YS, Lee JC, Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF- $\alpha$ -mediated activation of CD 4+ T cells. *J Cell Biochem.* 2011;112: 2891-901.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation. *Cell.* 1998; 93: 165-76.

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

Li Y, Zheng W, Liu JS, Wang J, Yang P, Li ML, Zhao ZH. Expression of osteoclastogenesis inducers in a tissue model of periodontal ligament under compression. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 115-20.

Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N. Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE<sub>2</sub>. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 1377-84.

Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K,

Morinaga T, Higashio K. Rank is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 253: 395-400.

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

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

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 Investig.* 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 Craniofac Res.* 2006; 9: 63-70.

Qin YX, Hu M. Mechanotransduction in musculoskeletal tissue regeneration: effects of fluid flow, loading, and cellular-molecular pathways. *Biomed Res Int.* 2014; 14: 1-12.

Redlich M, Roos HA, Reichenberg E, Zaks B, Mussig D, Baumert U, Golan I, Palmon A. Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 119-24.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes MT, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-19.

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: 790-801.

Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblast in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res*. 2014; 1-8.

Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci*. 2008; 50(4): 367-76.

Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2009. 12: 113-9.

Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, Ngan P, Lanese R, Davidovitch Z. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995; 4: 402-9.

**NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

ISO – International Standardization Organization

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

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

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

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

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

Exe/decserver/?Isis Script<sup>+</sup>./cgi-bin/decserver/decserver

Xis&interface\_language=p&previous\_page=homepage&previou\_task=NULL&task=star

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

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

Michaelis A. Dicionário inglês-português 25<sup>a</sup> ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997

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

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

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

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Introduction:** The culture of periodontal ligament fibroblasts associated with simulation of pressure or tension on the cell allows analysis in its morphology and form, identify proteins and molecules involved in this process. The system formed by the protein Nuclear Factor Activator Receptor  $\kappa$ B (RANK) \ Nuclear factor Activator Receptor  $\kappa$ B Ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) are directly linked to the regulation of osteoclast and osteoclastogenesis, formation and / or bone resorption.

**Objective:** Evaluate the fibroblasts of RANK \ RANKL and OPG in adult fibroblasts of human periodontal ligament under continuous pressure.

**Methods:** The tissue was collected from periodontal ligament of 40 third molars of adult patients who were grown in culture flasks until the sixth passage. The cells were placed on plates with 6 wells with a 3 mm diameter which were subjected to the continuous pressure (3 to 4 g / mm<sup>2</sup>) for 6 hours in monolayers. From the samples, the mRNA was extracted and evaluated by method Polymerase Chain Reaction Real-Time (qPCR).

**Results:** In the continuous pressure model by using the fibroblasts of the periodontal ligament, in all the groups there was no expression of RANK \ RANKL, and all groups expressed OPG, and was significantly higher in the experimental group 2 (EG2) compared to control (CG) and experimental group 1 (EG1) (P = 0.005).

**Conclusion:** The adult fibroblast from human periodontal ligament when under continuous pressure not expressed mRNA RANK \ RANKL and osteoprotegerin mRNA was expressed.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Convido o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa: **Sistema RANK/RANKL e OPG em cultura de fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua** sob a responsabilidade do pesquisador Mateus de Abreu Pereira, a qual pretende coletar informações importantes para um melhor entendimento do cultivo de células do ligamento periodontal humano.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da cirurgia dos terceiros molares inclusos, cuja a mesma transcorrerá normalmente, sem nenhuma alteração, prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será coletado o tecido que for retirado durante a cirurgia e que seria descartado (porque não está não tem mais utilidade) para ser enviado ao Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

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

Se depois de consentir em sua participação o Sr. (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa> o (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas

sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço (***Rua Pedro de Toledo, 781 – 11º andar, frente***), pelo telefone 11(5579.2583), ou poderá entrar em contato com o o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – e-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br)

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

As informações que li ou que foram lidas para mim foram suficientes, descrevendo o estudo: **Sistema RANK/RANKL e OPG em cultura de fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua**, Eu conversei com o Mateus de Abreu Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Todas as intenções do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes ficaram claros para mim. Também ficou claro que a minha participação neste estudo é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar se houver algum dano pessoal relacionado diretamente à este estudo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a sua realização, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal    Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
-----

Assinatura da testemunha    Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo    Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**ANEXOS**

## ANEXOS

<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP/ HOSPITAL SÃO PAULO</b>		
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>		
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>		
<b>Título da Pesquisa:</b> Sistema RANK/RANKL e OPG em cultura tridimensional de fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano sob pressão contínua.		
<b>Pesquisador:</b> Mateus de Abreu Pereira		
<b>Área Temática:</b>		
<b>Versão:</b> 2		
<b>CAAE:</b> 18413513.1.0000.5505		
<b>Instituição Proponente:</b> Escola Paulista de Medicina		
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio		
<b>DADOS DO PARECER</b>		
<b>Número do Parecer:</b> 378.850		
<b>Data da Relatoria:</b> 30/08/2013		
<b>Apresentação do Projeto:</b> Conforme parecer do CEP, 347575 de 2/8/2013		
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Conforme parecer do CEP, 347575 de 2/8/2013		
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Conforme parecer do CEP, 347575 de 2/8/2013		
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Conforme parecer do CEP, 347575 de 2/8/2013		
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> respostas de pendências- apresentação de carta de ciência do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos		
<b>Recomendações:</b> sem inadequações.		
<b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> sem inadequações - projeto aprovado		
<b>Endereço:</b> Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14		
<b>Bairro:</b> VILA CLEMENTINO		<b>CEP:</b> 04.023-061
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SÃO PAULO	
<b>Telefone:</b> (11)5539-7162	<b>Fax:</b> (11)5571-1062	<b>E-mail:</b> cepunifesp@unifesp.br
Página 01 de 02		

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 378.850

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PARECER ACATADO PELO COLEGIADO

SÃO PAULO, 30 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**maria del carmen janeiro perez**  
**(Coordenador)**

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

FONTES CONSULTADAS

## FONTES CONSULTADAS

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

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