



Pós-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA - UNIFESP



RELATÓRIO FINAL DE PÓS DOUTORADO
DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA

Aluno: Antonio Carlos Aloise

Supervisora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Programa CAPES: PNPd- Programa Nacional de Pós Doutorado

Título: Efeito da Mecanotransdução na Viabilidade, Necrose e Apoptose de Células-Tronco derivadas da Polpa dos Dentes Decíduos Esfoliados Humanos

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório descreverá os resultados finais compreendidos no período de dezembro de 2015 a fevereiro de 2020. O projeto envolvendo o estudo do efeito da Mecanotransdução na Diferenciação de Células-Tronco derivadas da Polpa dos Dentes Decíduos Humanos, foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina- Universidade Federal de São Paulo na área de concentração “Regeneração Tecidual Ecto e Mesodérmica, linha de pesquisa “Cultura de Fibroblastos”.

Foi objetivo deste projeto a aquisição de conhecimento científico, integração das atividades de ensino, pesquisa e extensão, com o objetivo de aprender e contribuir na formação de novos pesquisadores e alunos de iniciação científica, aperfeiçoamento, mestrado e doutorado.

2. APRESENTAÇÃO CIENTÍFICA

A polpa do dente humano contém uma população de células-tronco multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares distintas *in vitro*, como odontoblastos e adipócitos (GRONTHOS et al. 2000; GRONTHOS et al. 2002; MIURA et al. 2003). As células da polpa mantém uma alta taxa de proliferação mesmo após subcultura extensiva e compartilham diversos marcadores com células derivadas da medula óssea.

Têm se demonstrado que estímulos biomecânicos específicos por pressão e tensão nas células periodontais induzem a uma resposta asséptica inflamatória, e durante os estágios iniciais da movimentação dental, existe um aumento na permeabilidade vascular e infiltração celular de leucócitos (TEIXEIRA et al., 2010). A reação celular a várias forças para o deslocamento dental e a estabilidade dessa movimentação, dependem da remodelação das fibras gengivais do ligamento periodontal (BUMANN et al., 1997). A remodelação que

ocorre nos tecidos do suporte dental tem sido demonstrada como de fundamental importância na movimentação dos dentes, e células como os osteoblastos e células do ligamento periodontal quando submetidas a forças de compressão e tensão, são capazes de traduzir em sinais biomecânicos intracelulares e extracelulares. O nível de limiar de pressão obtidos neste tipo de experimento, no qual os fibroblastos começaram a responder, forneceria uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para clínica ortodôntica (NAKAGO-MATSUO, MATSUO & NAKAGO, 1996).

As células derivadas da medula óssea podem se diferenciar em tecido conjuntivo ou mesenquimal, possuindo a capacidade de reparar tecidos danificados (PITTENGER et al., 1999). Estudos com células-tronco têm avaliado os efeitos da regeneração de tecidos de cartilagem e osso nas articulações temporomandibulares, a regeneração dos tecidos periodontais, e de regeneração óssea em defeitos de câncer bucal, utilizando células-tronco e terapia genética (HASEGAWA et al., 2005). As células tronco podem ser classificadas como células mesenquimais (MCs, referindo-se às células tronco mesenquimais, no estágio pré-natal) ou células-tronco mesenquimais (MSCs, referindo-se às células tronco mesenquimais após o nascimento).

As MSCs adultas são frequentemente usadas para pesquisas, e desempenham um papel importante na remodelação do tecido fisiológico e induzem a regeneração dos tecidos danificados (SLOAN & SMITH, 2007). As células tronco pluripotentes humanas induzidas puderam ser geradas com êxito de fibroblastos gengivais adultos e do ligamento periodontal humano (WADA et al., 2011). As células-tronco do ligamento periodontal representam uma terapia baseada em células promissoras na odontologia reconstrutiva para o tratamento do periodonto danificado. Pesquisadores têm tentado identificar e divulgar as suas características.

Na década de 1980, as células que exibiram tamanho pequeno, proporção de núcleo/citoplasma celular elevado, e lenta divisão, foram relatadas por estar localizadas em regiões adjacentes aos vasos sanguíneos, e essas células foram sugeridas como células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) (GOULD, 1983).

Estudos recentes têm sugerido que o espaço do ligamento periodontal, podem conter as células tronco mesenquimais, que são capazes de se diferenciarem em osteoblastos, cementoblastos e produção de tecidos minerais e de fibroblastos que formam o tecido conjuntivo fibroso (MAO et al., 2006). Os ligamentos periodontais surgiram como potenciais fontes importantes de células tronco mesenquimais indiferenciadas, mesmo em adultos, na qual a aquisição dessas células era limitada à medula óssea e fáscia.

Trabalhos relataram o isolamento bem sucedido e diferenciação de células indiferenciadas tronco mesenquimais extraídos cirurgicamente de terceiros molares inferiores. Desde então, se obtém sucesso na obtenção de células tronco mesenquimais de terceiros molares impactados não infectados e de tecido da polpa dental (GRONTHOS et al., 2000). Existe uma população de células indiferenciadas no ligamento periodontal responsável pela sua homeostase. Assim na literatura científica recente não foi encontrado a resposta das células tronco derivada dos fibroblastos do ligamento periodontal humano adulto com o modelo de pressão de força compressiva estática contínua.

Nos últimos anos vêm sendo observado um aumento no número de publicações científicas com uso de células-tronco mesenquimais provenientes da polpa dental. Em recente publicação DAVIES et al. (2014) puderam que células-tronco derivadas da polpa dental possuem maior potencial para produção de níveis elevados de matriz mineralizada.

Descrição das Atividades Realizadas

O presente projeto previa a pesquisa científica avaliando o comportamento de dois tipos celulares quando estimulados por mecanotransdução para a capacidade de diferenciação e atividade de ensino e treinamento de alunos de pós graduação envolvidos com o tema.

Atividades de Ensino e Treinamento

Aulas ministradas:

I.1. Tema: Tipos de modelo in vitro / Infraestrutura laboratorial / Cuidados operacionais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2016)

I.2. Tema: Desenvolvimento de Técnicas Minimamente Invasivas e Biomateriais Resistência de biomateriais / Scaffolds / Bioengenharia tecidual / Biocompatibilidade [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2016)

I.3 Tema: Análise crítica de artigos experimentais in vitro e in vivo [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2016)

I.4 Tema: Indicações dos modelos animais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. (2017)

Tema: Tipos de modelo in vitro / Infraestrutura laboratorial / Cuidados operacionais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2017)

I.5. Tema: Desenvolvimento de Técnicas Minimamente Invasivas e Biomateriais Resistência de biomateriais / Scaffolds / Bioengenharia tecidual / Biocompatibilidade [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2017)

I.6 Tema: Análise crítica de artigos experimentais in vitro e in vivo [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2017)

- I.7 Tema: Indicações dos modelos animais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. (2018)
- I.8 Tema: Atualidades em células-tronco. [Disciplina de Terapia Celular realizado pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. (2018)
- I.9 Tema: Terapia Celular nas Reconstruções ósseas . [Mestrado em Implantodontia realizado pelo programa de pós graduação em Odontologia da Faculdade São Leopoldo Mandic. Carga Horária: 4 horas (2018)
- I.10 Tema: Desenvolvimento de Técnicas Minimamente Invasivas e Biomateriais Resistência de biomateriais / Scaffolds / Bioengenharia tecidual / Biocompatibilidade [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2019)
- I.11 Tema: Análise crítica de artigos experimentais in vitro e in vivo [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora (2019)
- I.12 Tema: Indicações dos modelos animais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. (2019)
- I.13 Tema: Atualidades em células-tronco. [Disciplina de Terapia Celular realizado pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. (2019)
- I.14 Tema: A utilização de células-tronco derivadas da polpa dental na reconstrução óssea. [Disciplina de Terapia Celular realizado pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional-Unifesp] Carga horária: 1 hora. (2019)

Treinamento dos Alunos na Cultura de Células:

- II-1 Fábio Schemann Miguel- Graduado em 1988 no curso de odontologia
- II.2 Delaini Miguel. Graduada em 1989 no curso de odontologia

- II.3 Marco António Mattar. Graduado em 1993 no curso de odontologia
- II.4 Mateus Abreu de Pereira. Graduado em 2002 no curso de odontologia
- II.5 Andrea Castilho. Graduada em 2001 no curso de odontologia
- II.6 Fábio Simões. Graduado em 1999 no curso de odontologia
- II.7 Fernando Biocalti Chiantia. Graduado em 1995 no curso de odontologia
- II.8 Andrea Baptista Coelho. Graduada em 1999 no curso de odontologia
- II.9 Ellen Fagnani. Graduada em 2000 no curso de odontologia
- II.10 José da Conceição Carvalho Junior. Graduado em 2002 no curso de medicina

Organização de Reuniões do Grupo de Pesquisa

III.1 Foram organizadas reuniões semanais todas as segundas-feiras das 13:00 as 15:00 durante o período de Dezembro de 2016 até o presente momento. Participaram desta reunião todos os alunos de pós-graduação (mestrado e doutorado) com projetos em cultura de células diretamente relacionados com a metodologia utilizada neste projeto de pós-doutorado, alunos de graduação (Medicina e Odontologia) e residentes médicos da Cirurgia Plástica da EPM-Unfesp. As reuniões possuíam a seguinte estrutura:

a-Apresentação de Projeto com resultados e discussão (1 hora)

b-Apresentação de Artigo Científico com discussão (30 min)

c-Apresentação de Seminário com discussão (30 min)

Organização de Curso

Foi realizado em 2019 um curso teórico prático com 20 horas/aula sobre cultura de células. O curso teve o título “Atualidades no Cultivo de Células” participaram deste curso 20 alunos, sendo 10 graduandos do curso de Medicina, 3 graduandos do curso de Enfermagem e 7 residentes de Cirurgia Plástica da Unifesp.

Coorientações Concluídas de Alunos

A coorientação foi relativa a projetos com metodologia desenvolvida à partir da ideação deste estudo.

VI.1 Fábio Scheman Miguel. Título da tese: Células tronco derivadas do ligamento periodontal sob modelo de compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.5 Delaini Miguel. Título da tese: Modelo de Indução inflamatória em fibroblastos periodontais adultos submetidos a compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.6 Marco Mattar. Título da tese: Cultura tridimensional de fibroblastos periodontais adultos submetidos a uma compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.7 Mateus Abreu. Título da tese: Sistema RANKL/RANK em fibroblastos periodontais adultos submetidos a compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.8 Andrea Castilho. Título da tese: Revisão De Literatura: Aspectos Biológicos No Ligamento Periodontal E Osso Alveolar Associado A Compressão In Vitro. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.9 Fábio Alessandro Simões. Título da tese: Características Mecânicas das Membranas De Quitosana E Xantana Porosas. orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.10 Fernando Biocalti Chiantia. Título: Membrana De Quitosana E Xantana Na Regeneração Do Tecido Periosteal Em Defeito Crítico Na Calvária De Rato. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.11 Andrea Cristina Baptista Coelho de Faria. Título: Expressão Gênica De Rank/Rankl/Opg Em Uma Cultura Tridimensional De Fibroblastos Periodontais Humanos em Membranas De Quitosana E Xantana Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.12 Ellen Fagnani. Título: Influencia da Leptina na viabilidade de Fibroblastos Periodontias Humanos. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.13 Mateus de Abreu Pereira. Título: Carga Compressiva na Expressão Gênica Do Sistema Rank\Rankl E Opg Em Fibroblastos Do Ligamento Periodontal Humano Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.14 José da Conceição Carvalho Júnior. Título: Fração Estromal Vascular Associada A Matriz Dermica Acelular na Cicatrização De Feridas Cutâneas Em Coelhos Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

Participações na Disciplina e Programa de Pós Graduação

VII.1 Coordenação e Organização das reuniões científicas do grupo de pesquisa do laboratório de cirurgia translacional da disciplina de Cirurgia Plástica Unifesp/EPM realizadas às segundas-feiras das 10::00h as 12:00h com periodicidade quinzenal no período de Dezembro de 2015 até o presente momento.

VII.2 Participação das reuniões do programa de pós-graduação em Cirurgia Translacional Unifesp/EPM realizada às segundas-feiras das 15:30 as 17:30 com periodicidade semanal no período de dezembro de 2015 até o presente momento

VII.3 Elaboração do relatório final do projeto de graduação da disciplina de cirurgia plástica Unifesp/EPM durante o período de Dezembro de 2015 até janeiro de 2020.

VII.4 Elaboração do manual de atendimentos ambulatoriais de pacientes da disciplina de cirurgia plástica da Unifesp/EPM durante o período de dezembro de 2015 até janeiro de 2020.

VII.5 Elaboração do manual de orientação da residência médica da disciplina de cirurgia plástica da Unifesp/EPM durante o período de Dezembro de 2015 até janeiro de 2020.

Atividades de Pesquisa

2. MÉTODO

Os dentes decíduos utilizados na obtenção das células foram provenientes de 7 (sete) pacientes jovens de ambos os gêneros entre as idades de 10 e 12 anos que na ocasião da doação estavam para perder o seu dente decíduo devido ao processo fisiológico da dentição. Uma vez diagnosticado a situação de perda iminente por parte do cirurgião dentista responsável pelo paciente, o dente decíduo foi coletado pelo profissional ou pelo responsável do paciente sem necessidade de procedimento operatório utilizando-se apenas uma gaze estéril. Todos os responsáveis legais pelos pacientes assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dentes esfoliados coletados, foram acondicionados em um tubo cônico de 5 ml contendo uma solução de clorexidina a 2% e imediatamente transportados para o laboratório de cultura de células da disciplina de cirurgia

plástica da Unifesp-EPM até 48 horas após a sua coleta. Os procedimentos a seguir foram realizados dentro das dependências do laboratório:

- Acondicionamento do dente esfoliado em um tubo tipo cônico 15 mL, com meio de cultura DMEM enriquecido com antibióticos para que possa ser transportado em um prazo de até 48 h até o laboratório onde foi realizado o seu processamento.
- Uma vez dentro do fluxo laminar o dente foi inicialmente lavado sucessivas vezes com solução de PBS + penicilina e estreptomicina, seguindo o protocolo de cultura no qual prevê o uso de câmara biológica com controle ISO 5 durante toda as etapas de manipulação do dente, polpa e células extraídas da cavidade pulpar.
- O dente então foi ser seccionado, utilizando-se um alicate de pressão, após o rompimento da camara pulpar do dente, com o auxilio de curetas de dentina numero 4 o tecido pulpa foi removido e inserido em um placa de petri de 100mm;
- A polpa extraída foi submetida a um processo de digestão, por meio do uso de collagenase tipo I por 15 minutos. Apos este tempo foi adicionado ao tbo 5 mL de meio de cultura DMEM e a solução foi submetida à centrifugação (1500 RPM / 10min) para obtenção do *pellet* celular;
- O *pellet* formado foi lavado com solução de PBS pH 7,4 e transportado para uma garrafa de 25 cm² em meio de cultura DMEM para a expansão das células;
- A garrafa devidamente identificada e selada, foi levada a uma estufa de CO₂ a temperatura de 37 C sendo o meio de cultura trocado a cada 48 horas;
- O acompanhamento do processo de expansão deverá ser realizado diariamente até que fosse atingido 65 a 75% da confluência para que pudesse ser feita a passagem das células;
- Atingida a confluência as células foram soltas da garrafa pelo método da tripsina+EDTA, contadas em contador automático pelo método de exclusão do Azul de Tripan. Apos a contagem as células foram transferidas para criotubos de 2 ML com 1,5 mL de meio de cultura DMEM e levadas ao freezer -80C, apos 5 dias os criotubos foram transferidos para tanques de nitrogênio liquido para

armazenamento a -160°C , permanecendo congeladas até o início do experimentos.

O descongelamento das células para uso nos experimentos foi na proporção de um criotubo para uma garrafa de 75 cm². Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de Alpha-MEM com 10% SFB inativado. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por 6 minutos. O sobrenadante contendo DMSO foi desprezado e o pellet de células, ressuspenso em 15 mL de meio de cultura para Alpha-MEM.

Grupos Experimentais

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

G1 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 1,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G2 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 2,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G3 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 3,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G4 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 4,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G5 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 5,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas);

G6 (2×10^5 células submetidas à uma pressão de 6,0 g/cm² por 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas).

Fase I: Caracterização das células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados (CTPDE)

a) Ensaios de Diferenciação

Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP®) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 µM insulina e 1 µM de dexametasona (Sigma Aldrich®) por 15 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences). Após 30 minutos a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com o 0,5% de corante Oil Red O (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1µg/ml do corante (4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride (DAPI) (Sigma Aldrich®) em PBS (0,1% de BSA (Sigma Aldrich®) e 0,2 % de saponina, Calbiochem®) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS- Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, New York).

Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 50µM de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®), 0,1µM de dexametasona e 10⁻²M de β glicerofosfato (BAKER ANALYZED™ Reagent) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado

2 ml de uma solução fixadora paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 minutos a solução fixadora será removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de 40 mM de alizarina vermelha sódica (pH 4.1) (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1µg/ml do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements

Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 µM insulina, 0,1 µM de dexametasona, 50µM de ácido ascórbico e 10ng/ml TGF-β1 (Cell Signaling Technology®) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora formalina 0,4% em PBS paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução 0,1% de azul de Toluidina (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no

microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements .

b) Imunofenotipagem

As células da terceira passagem foram utilizadas para a caracterização imunofenotípica. As células foram tripsinizadas e a suspensão celular foi centrifugada (100 g, 6 min). As células foram coradas com anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofococianina (APC) ou ficoeritrina (PE): CD14-FITC, CD16-PE, CD31-FITC, CD34-APC, CD44-APC, CD45-FITC, CD73-PE , CD90-APC, CD105 e CD117-PE-APC (BD Biosciences, EUA). Um total de 5×10^5 células foram ressuspensas em 0,2 ml de PBS e incubadas com os anticorpos FITC-, PE-ou APC- conjugado, durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Goiaba easyCyte, Millipore), para identificação de determinados canais de fluorescência de cada um dos anticorpos.

Aplicação da Compressão Estática Contínua

Para o ensaio de compressão foi utilizada a densidade de 2×10^5 células/poço diluídas em 200 μ l de meio Alfa-MEM, semeadas no centro dos poços em um a placa de seis poços. As células foram pré-incubadas durante seis horas em meio de cultura contendo meio Alfa-MEM antes da aplicação da compressão estática. Após este período, o peso foi aplicado sobre as células durante seis horas na incubadora, ou seja, elas foram continuamente comprimidas, utilizando uma compressão uniforme, baseadas num modelo de compressão estática contínua.

Este modelo consistiu de um cilindro de aço inoxidável do tipo 304 com várias alturas (HB Usinagem LTDA, São Paulo Brasil) com diâmetro de 27 mm colocado no centro de cada poço da placa de cultura imediatamente sobre as células.

Avaliações

Viabilidade celular

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

Necrose celular

- as células foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300 g por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS. A lavagem da suspensão de células foi repetida novamente;
- as células foram ressuspensas em 300 microlitros de PBS e distribuídas em três microtubos de 1,5 mL;
- foi adicionado 100 microlitros do reagente Guava Nexin (Milipore, Belford MA, USA);
- no segundo tubo e no terceiro tubo as células foram fixadas em 200 microlitros de etanol 70% e incubadas a 4°C por um período de 12 horas;
- os microtubos 1 e 2 contendo as células e o reagente foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz;

- foi acrescentado 200 microlitros de PBS e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT (Milipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa InCyte Software.

Apoptose celular

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

Análise do ciclo celular

- após o período de fixação das células do terceiro micro-tubo, elas foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas para retirada do sobrenadante;
- o pellet de células foi ressuspendido em 200 microlitros de reagente Guava Cell Cycle (Milipore, Belford MA, USA);
- foi acrescentado 100 microlitros de PBS e as amostras foram submetidas na análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT (Milipore, Belford MA, USA) e analisadas no programa InCyte Software.

Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Os resultados obtidos da avaliação entre os grupos GC, GE3 e GE4 foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras

independentes. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas pelo software SSP (NY, USA).

Resultados

Fase I- Caracterização das Células-Tronco Derivadas da Polpa de Dentes Decíduos Exfoliados

Diferenciação Adipogênica

Diferenciação adipogênica foi avaliada utilizando Oil Red O. Após 2 semanas de indução adipogênica as células nas culturas células-tronco da polpa dental adotaram uma forma mais arredondada e exibido gotículas intracelulares. Estas gotículas foram marcadas pelo Oil Red O indicando ser de origem lipídica .

Diferenciação Condrogênica

Diferenciação condrogênica foi avaliada por meio da coloração azul de Alcian. Após 2 semanas de indução as células exibiram uma mudança radical no padrão de crescimento e formação de nódulos e sulcos com uma alta densidade de células e matriz extracelular. Através da coloração com azul de Alcian, a matriz extracelular mostrou ser composta por sulfatados glicoaminoglicanos, indicando uma síntese contínua de tecido de cartilagem semelhante.

Diferenciação Osteogênica

Após 2 semanas de cultura, as células induzidas com meio de indução osteogênica exibiram agrupamentos com alta densidade celular e grandes quantidades de matriz extracelular. Sendo marcadas positivamente pela Alizarina Vermelha.

Análise da Imunofenotipagem

As populações de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados avaliadas apresentaram expressão (> 95%) para o CD73 e os marcadores CD105 e CD90 e não mostraram expressão (<5%) para os marcadores CD14, CD34 e CD45.

Fase II- Resultados das Avaliações

Apoptose

Quadro 1 Valores encontrados da porcentagem de apoptose celular na cultura de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos (CT-DD) no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Nexin (Milipore) no citômetro Guava (Milipore) –

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

GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Necrose

Quadro 2. Valores encontrados da porcentagem de necrose células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos (CT-DD) no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Nexin (Milipore) no citômetro Guava (Milipore) –

	Tempos				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0.1	2,80	3,50	3,80	3,90
G1		2,80	3,70	3,70	3,80
G2		3,10	3,60	3,60	3,90
G3		3,10	3,50	3,50	3,50
G4		4,80	4,80	4,90	4,90
G5		4,87	4,85	4,85	4,85
G6		4,90	4,90	4,90	4,90

GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

Viabilidade Celular

Quadro 3. Valores encontrados da porcentagem da viabilidade celular de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos (CT-DD) no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Via Count (Milipore) o citômetro Guava (Milipore) –

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

GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g)

Ciclo Celular Fase Sub-G0

Quadro 5. Valores encontrados da porcentagem do ciclo celular, fase sub-G0, na cultura de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos (CT-DD) no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Guava Cell Cycle (Milipore) no citômetro Guava (Milipore) –

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	8,26	17,30	24,46	25,78	34,53
G1		35,19	55,91	50,00	27,64
G2		36,36	21,74	43,22	16,96
G3		37,70	19,81	30,77	26,47
G4		37,50	34,91	34,65	21,25
G5		45,00	32,28	35,71	25,48
G6		57,60	34,97	38,93	33,71

GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

FASE G0-G1

Quadro 6. Valores encontrados da porcentagem do ciclo celular, fase G0-G1 na cultura de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos (CT-DD) no modelo de compressão verificadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Cell Cycle (Milipore) no citômetro Guava (Milipore) -

	Tempos				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	61,56	43,87	45,67	49,27	53,85
G1		41,67	50,43	44,15	58,18
G2		48,93	50,72	42,80	57,69
G3		49,54	54,77	59,02	56,26
G4		50,00	47,12	60,38	52,50
G5		37,03	52,79	50,00	54,16
G6		58,62	57,75	60,53	50,82

GC: grupo controle; G1: (1g); G2: (2g); G3 (3g); G4 (4g); G5: (5g); G6: (6g).

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

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

Grupos	n
GC	0,65±0,08
GE3	0,70±0,17
GE4	0,70±0,07
Valor de P	0,365

A avaliação foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada com valores de $p \geq 0.05$ assinalados por (*)

GC : grupo controle; GE3: grupo experimental 3g/cm²; GE4 : grupo experimental 4g/cm²

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

Grupos		n
GC	2,65±0,074	7
GE3	3,04±0,10	7
GE4	4,25±0,26	7
Valor de P	0,20	

A avaliação foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada com valores de $p \geq 0.05$ assinalados por (*)

GC : grupo controle; GE3: grupo experimental 3g/cm²; GE4 : grupo experimental 4g/cm²

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

Grupos		n
GC	96,50±0,14	7
GE3	96,75±0,22	7
GE4	94,50±0,24	7
Valor de P	0,482	

A avaliação foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada com valores de $p \geq 0.05$ assinalados por (*)

GC : grupo controle; GE3: grupo experimental 3g/cm²; GE4 : grupo experimental 4g/cm²

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

Grupos		n
GC	37,66±0,66	7
GE3	38,13±0,54	7
GE4	37,57±1,36	7
Valor de P	0,34	

A avaliação foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada com valores de $p \geq 0.05$ assinalados por (*)

GC : grupo controle; GE3: grupo experimental 3g/cm²; GE4 : grupo experimental 4g/cm²

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

	2D	n
GC	42,65±1,06	7
GE3	48,33±,43	7
GE4	51,11±1,44	7
Valor de P	0,124	0,124

A avaliação foi realizada pelo teste de Wilcoxon, as avaliações entre os grupos foi realizada com valores de $p \geq 0.05$ assinalados por (*)

GC : grupo controle; GE3: grupo experimental 3g/cm²; GE4 : grupo experimental 4g/cm²

Discussão

Uma fonte apropriada de células, embora melhorado com a utilização de suportes biocompatíveis é muitas vezes um fator limitante na reconstrução de tecidos. Uma alternativa interessante, é a utilização de células mesenquimais adultas a partir de tecidos autólogos obtidos por meio de técnicas específicas envolvendo diferenciação celular (O'Brien 2010 MOSTAFA et al. 2011). A ideia é a se conseguir o fornecimento necessário, evitando os problemas associados com a rejeição dos procedimentos de enxertia e tratamento imunossupressor subsequente. Atualmente, esses métodos só foram aplicados em pesquisa e ainda são muito limitados, envolvendo apenas alguns tipos de células e com diferentes graus de sucesso (Lázaro et al, 1995;. HORWITZ et al, 1999; KRAMPERA et al, 2007). Entre os problemas mais comuns que envolvem a cultura de células estão as dificuldades inerentes da cultura de células, a validação dos fenótipos de células diferenciadas, bem como o controle de qualidade de diferenciação.

Fenótipos celulares são indiretamente definidos pelo seu padrão específico de expressão de genes que regulam a diferenciação e envolvem a passagem de um padrão de expressão gênica para outro (BEN-tabou de-LEON e DAVIDSON, 2007). Alguns fatores de transcrição incluídos em nossa análise, são necessários para o desenvolvimento de tecidos específicos e controlam o fenótipo. (LANDER et al, 2001;. PEI, 2009).

Durante os últimos anos, tem havido um intenso debate sobre os mecanismos por trás do fenômeno da plasticidade das células-tronco e há uma variedade de diferentes hipóteses sobre o assunto (EISENBERG & Eisenberg, 2003; JIN & Greenberg, 2003; CAMARGO et al., 2004).

Ainda há muito a ser aprendido sobre a capacidade dos fibroblastos normais da derme humana FBs para mudar seu fenótipo. A plasticidade celular inerente dos FBs humanos tem sido estudada por outros grupos e os nossos resultados fornecem mais uma prova para esta afirmação (Young et al, 1995; Toma et al, 2001; Bartsch et al, 2005; Chen et al, 2007; Takahashi et al, 2007; Lowry et al, 2008). Futuros estudos com foco em outras linhagens celulares podem mostrar quão extenso é o potencial de diferenciação dos FB. Estudos que incidem sobre a estabilidade da mudança fenotípica após a indução, tanto in vitro e in vivo, são necessários. No entanto, os resultados aqui apresentados, mostram que um dos tipos celulares mais básicos no corpo humano pode diferenciar-se em pelo menos outros três tipos de células diferentes.

O modelo de compressão de células deste estudo está diretamente relacionado com a definição de mecanotransdução. A mecanotransdução foi definida como o estímulo mecânico aplicado à célula, e este estímulo é essencial para a manutenção do metabolismo do osso e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (KANG & ROBLING, 2015). Enquanto que a sinalização da mecanotransdução foi considerada importante para a regeneração dos tecidos, sua interpretação continua crítica para determinar respostas celulares específicas tais como sinais mecânicos como a redução da perda óssea, o aumento da formação óssea e a diferenciação de células osteogênicas (QIN & HU, 2014). As implicações terapêuticas com ênfase no relacionamento entre as vias de mecanotransdução, que se referem aos mecanismos pelos quais forças mecânicas são convertidas em estímulos bioquímicos tem sido estreitamente relacionadas com inflamação e fibrose e desempenham um papel crítico na formação de cicatrizes (DUSCHER et al., 2014).

Neste estudo foi desenvolvido um modelo de compressão celular para verificar in vitro os eventos celulares que acontecem in vivo quando a célula é submetida à uma força compressiva. Devido à alta complexidade de estabelecer

estudos in vivo com relação às células do ligamento periodontal humano, as avaliações realizadas in vitro possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares do fibroblasto do ligamento periodontal permitindo analisar, por exemplo, a produção de vacinas e a biologia das células tumorais (MacDONALD, 1990; URIBE, 2011). O estudo in vitro tem sido muito utilizado devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ podem ser obtidos de forma precisa (FRESHNEY, 1990).

O modelo in vivo mais complexo e especializado cujas células são submetidas à uma carga compressiva durante a função é o ligamento periodontal. Este tecido é composto de células residentes e denominada de fibroblastos periodontais, que são responsáveis pela produção, reparação e manutenção da matriz celular (ANDERSEN & NORTON, 1991; KOOK, JANG & LEE, 2011). As células do ligamento periodontal promovem a regeneração tecidual por meio de suas habilidades de migração, proliferação e capacidade de se diferenciarem em células osteoblásticas e cementoblásticas, bem como em novos fibroblastos do ligamento periodontal (LEKIC & MCCULLOCH, 1996; ALVES et al., 2015).

Neste estudo foi proposto a utilização de cargas que variavam de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g/cm² por um período de tempo que oscilou entre 6, 12, 24 e 30 horas tanto para compressão em culturas celulares com o objetivo de verificarmos qual a carga e o período de tempo que produziriam a maior viabilidade celular, menor morte celular por apoptose e necrose além de permitir a verificação do ciclo celular. O resultados permitiram a observação dos seguintes fenômenos: a) em relação aos intervalos de tempo de compressão estudados não houve diferença estatística entre eles entre si, entretanto todos foram diferentes em relação ao controle, desta forma poderíamos optar por manter as células sob compressão no menor intervalo, ou seja, seis horas; b) os resultados dos grupos G3 e G4, 3 g/cm² e 4 g/cm², respectivamente, deveriam ser considerados para o experimento principal, pois no grupo G3 os resultados ficaram muito próximos do grupo controle, mantendo assim os níveis de morte celular baixos e o nível de células viáveis mais alto, e no caso do G4 observou-se uma tendência de maior necrose e menor viabilidade em relação a G3, mas

nenhuma diferença em relação a G5 e G6, 5 g/cm² e 6 g/cm², respectivamente. Como não foi possível verificar, por meio destes resultados, qual carga/área seria a mais influente no estudo principal (G3 ou G4) a estratégia adotada foi a de se conduzir os experimentos com ambas, e assim poder analisar se com uma amostra significativamente maior estes resultados se manteriam.

Na literatura não houve um consenso quanto à aplicação de carga e tempo ideais para a aplicação de forças compressivas em fibroblastos periodontais, devido a diferença metodológica entre os estudos. NAKAGOMATSU et al. (1996) aplicaram uma carga em fibroblastos periodontais por meio de um sistema hidráulico e aplicaram a elevação desta pressão, para um nível que variou de 20 a 50 mm Hg e observaram que estas células poderiam responder à mudanças de compressão e fornecer uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para a movimentação dos dentes, diferentemente deste estudo, o do nosso utilizou um sistema mecânico onde a pressão utilizada foi gerada pela compressão direta e contínua. Nos estudos de NISHIJIMA et al. (2006) e NAKAGIMA et al. (2008) foram utilizadas forças compressivas na cultura de fibroblastos periodontais humanos para a investigação da produção de RANKL e Osteoprotegerina utilizando forças compressivas que variaram de 0 à 4 g/cm² por um período de 0 – 48 horas. Nestes dois trabalhos os resultados mostraram que a magnitude da força de compressão e o tempo estão diretamente relacionados com o aumento da produção de RANKL. Estas duas pesquisas foram utilizadas para a determinação dos valores mínimos e máximo dos tempos e as cargas utilizadas neste estudo, pois mesmo já tendo sido discutida a relação entre carga e tempo de compressão admitiu-se que cada modelo laboratorial de compressão possuiu suas particularidades e que estes dois parâmetros deveriam ser estudados novamente no modelo proposto. LI et al. (2013), utilizaram um substrato 3D para realizar a compressão de células periodontais aplicando forças de 25 g/cm² durante 6, 24 e 72h. Os autores identificaram os genes indutores de osteoclastogênese, inibidores de osteoclastogênese e outros reguladores de remodelação óssea. Neste estudo, para efeito de comparação, em relação a cultura em monocamada foi utilizado uma carga menor que a utilizada por LI et al., (2013) e isto pode ser o fator responsável pelo resultado de não ter conseguido encontrar

diferenças entre os grupos 2D e 3D na avaliação dos nossos parâmetros. A utilização do colágeno como substrato foi utilizada também por Alves et al., (2015) os quais concluíram que cultura de fibroblastos periodontais cultivados em gel de colágeno mantiveram as suas características fenotípicas distintas.

Neste estudo onde a proposta de um modelo de compressão estática contínua possuiu a intenção de produzir *in vitro* uma situação normalmente vista na fisiologia, as análises foram realizadas no sentido de se obter alguns scores como por exemplo: menor necrose, nível de apoptose e viabilidade igual ao controle. O estudo da morte celular por apoptose e/ou necrose foi instituído pois estes fenômenos estão diretamente relacionados à fisiologia e patologia celular. A morte celular programada ou apoptose é importante no desenvolvimento embrionário e fetal, na renovação das células e em vários aspectos da maturação dos mecanismos imunológicos de defesa, e parece ter um papel fundamental na regulação do tamanho e da forma tecidual. Ocorre de forma ordenada e necessita de gasto de energia para a sua execução. Em condições normais, a apoptose participa do controle da proliferação e diferenciação celular (BARCINSKI, 1998). Se a morte celular for seguida de autólise (degradação dos compartimentos celulares realizadas pelas enzimas da própria célula, liberadas pelos lisossomas após a morte celular), o processo recebe o nome de necrose. Os agentes agressores produzem necrose por redução de energia, produção de radicais livres, ações sobre enzimas e agressão à membrana citoplasmática (SCHIER, 1988).

Na avaliação da morte celular por apoptose foi utilizado o Kit Guava Nexin e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT pelo programa InCyte Software. Nos grupos estudados: controle e experimentais as diferenças não foram significantes. Não houve diferenças nos valores de apoptose na análise dos resultados dos grupos G3 e G4.

Com relação à avaliação da morte celular por necrose foi utilizado o kit Guava Nexin e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT e analisadas no programa InCyte Software. Não houve diferença no resultado da necrose celular.

A avaliação da viabilidade celular teve como objetivo a verificação de células viáveis após submetidas à compressão estática contínua. Foi utilizado o

reagente Guava Via Count e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava EasyCyte HT e analisadas no programa InCyte Software. A viabilidade celular no modelo de compressão ficou acima de 94% em todos os grupos. A viabilidade celular mostrou-se consistente com as observações de outros estudos (SAMINATHAN, VINOOTH & CAO, 2013; ALVES et al., 2015).

Num organismo pluricelular, os mecanismos de divisão celular são essenciais para permitir a embriogênese e o crescimento. Além disso, a divisão celular assegura a reparação tissular ou celular após um ferimento que tenha promovido uma perda de células. Mas, mesmo no estado basal em um adulto, permanentemente, células morrem e é imperativa sua substituição (POIRIER et al., 2003). A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que à conduzem à divisão celular e à formação de duas células filhas. Ele está dividido em quatro fases: a fase G1 (G para gap, que significa intervalo) durante a qual a célula cresce devido às sínteses protéicas, a fase S (S para síntese) durante a qual a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M (M para mitose) que representa a divisão celular propriamente dita (BRUCE et al., 2002).

O ciclo celular foi avaliado utilizando-se o reagente Guava Nexin na fase sub G0 e na fase G0-G1 tanto na cultura em monocamada como na cultura com substrato de colágenos englobando os grupos controles e experimentais. Na fase sub G0 na cultura de células-tronco derivadas da polpa dental no modelo de compressão foi verificado que não houve diferenças significativas entre a proliferação celular.

Conclusão

O estímulo compressivo mecanotransdutor aplicado sobre a cultura de células-tronco derivadas da polpa dental de dentes decíduos esfoliados, não alterou as taxas de viabilidade, apoptose, necrose e ciclo celular.

Literatura Citada

Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab.* 2014; Epub ahead of print.

Gurevitch O, Kurkalli BGS, Prigozhina T, Kasir J, Gaft A, Slavin S. Reconstruction of cartilage, bone and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem cells.* 2003;21: 588-97

Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng.* 2003;9(1):95-103.

Kale S, Long MW. Osteopoiesis the early development of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000;New York,N.Y.,10:259-71

La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G, Tirino V, Laino L. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent.* 2014;42:761-768

Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal. *Haematologica.* 2005;90:360-81.

Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, Guzzardella G, Martini L, Cenacchi A, Di Maggio N, Sangiorgi L, Fornasari PM, Mercuri M, Giardino R, Donati D. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;(435):62-8.

Rickert D, Sauerbier S, Nagursky H, Menne D, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(3):251-8. Erratum in: *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(7):777.

Sauerbier S, Stricker A, Kuschnierz J, Bühler F, Oshima T, Xavier SP, Schmelzeisen R, Gutwald R. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(2):215-23.

Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 May 21. doi: 10.1002/term.1899. [Epub ahead of print]

Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(4):509-15.

Vacanti CA, Kim W, Vacanti D, Mooney B, Vacanti JP. Tissue engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc.* 1993;25(1):1019-21

Tholpady SS, Freyman TF, Debiie C, Ogle RC. Tensional Forces Influence Gene Expression and Sutural State of Rat calvariae In Vitro. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120:601- 11

Vlasselaer P, Borreman B, Gorp U. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor- β synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol.* 1994;124(4):569-77

Reys JM, Fermanian S, Yang F, Zhou S, Herretes S, Murphy DB, Elisseeff JH & Chuck RS. Metabolic changes in mesenchymal stem cells in osteogenic medium measured by autofluorescence spectroscopy. *Stem Cells.* 2006;24:1213-17

Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T, Tanaka J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials*. 2004;26:2559-66

Reddi AH & Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *PNAS*. 1972;69(6):1601-5

Junker JP, Sommar P, Skog M, Johnson H, Kratz G. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs*. 2010;191:105-118.

Rakar J, Lonnquist S, Sommar P, Junker J and Kratz G. Interpreted gene expression of human dermal fibroblasts after adipo-chondro and osteogenic phenotypic shifts. *Differentiation*. 2012;84:305-13

Entenmann G & Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol*. 1996;270:1011-6.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.

Kutt H & Tsaltas TT. Staining properties of oil red O and a method of partial purification of the commercial product. *Clin Chem*. 1959;5: 149-160.

Mason RM. Observations on the glycosaminoglycans of aging bronchial cartilage studied with Alcian Blue. *Histochem J*. 1971;3:421-34.

Goldstein DJ & Horobin RW. Surface staining of cartilage by Alcian blue, with reference to the role of microscopic dye aggregates in histological staining. *Histochem J*. 1974; 6: 175- 184.

Mostafa NZ, Vludag H, Varkey M, Dederich DN, Doschak MR and El-Bialy TH. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *The Open Dentistry Journal*. 2011;139-45

Magnusson P & Farley JR. Differences in sialic acid residues among bone alkaline phosphatase isoforms: a physical, biochemical, and immunological characterization. *Calcif Tissue Int*. 2001; 71: 508–518.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for the therapeutic use. *Bone Marrow Transpl*. 1995;16:557–64.

Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transf*. 2007;5:120–129.

Sommar P, Pettersson S, Ness C, Johnson H, Kratz G, Junker JP. Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatin microcarriers. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2003;63:1036–46.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3: 778–784.

Hee C, Jonokas MA & Nicoll SB. Influence of three dimensional scaffold on the expression of osteogenic markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials*. 2006;27:875-84

Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, Siddiqui MM, Schuch G, Pohl HG, Fuhr J, Perin L, Soker S, Atala A. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells and Dev*. 2005;14:337–348.

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008;17:925–32.

Sorrell, JM. & Caplan, AI. Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *International Rev Cell Mol Bio*. 2009;276:161–214.

Ben-Tabou de-Leon, S., Davidson, EH. Gene regulation: gene control network in development. *Ann Rev Bio Biomol Struct*. 2007;36:191–202

Lander, E.S. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409: 860–921.

Pei, D. Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J Biol Chem*. 2009;284:3365–69.

Zuk, PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13: 4279–4295.

Zuk, PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2007; 7: 211–228.

Heydarkhan-Hagvall, Schenke-Layland SK, Yang JQ, Heydarkhan S, Xu Y, Zuk PA, MacLellan WR, Beygui RE. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 187: 263–274.

Eisenberg LM & Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003; 69: 209–218.

Camargo, F.D., S.M. Chambers, M.A. Goodell. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif.* 2004; 37: 55–65.

Kostenuik PJ, Halloran BP, Morey-Holton ER, Bikle DD.J. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells. *Am J. Physiol.* 1997; 273:E1133

Kostenuik PJ, Harris J, Halloran BP, Turner RT, Morey-Holton ER, Bikle DD. Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insulin-like growth factor-I. *J. Bone Miner. Res.* 1999;3:14,-21

Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T, Penninger JM, Beissert S, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006;12:1372–9.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Localization of RANKL (Receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* 1999;25:525–34

Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005;280:24618–26.

3. Produção Científica Vinculada

Paralelamente aos experimentos descritos acima foi possível desenvolver também um outro projeto: “Utilização de células tronco derivadas da medula óssea e do tecido adiposo associadas ao enxerto xenógeno na reparação de defeitos ósseo críticos na calvária de coelhos”. Este projeto teve como objetivo

verificar a ação de células tronco da medula óssea e derivadas do tecido adiposo em um modelo de regeneração óssea já consagrado pela literatura o qual envolve o enxerto ósseo xenógeno com e sem cobertura de uma membrana de colágeno também xenógena. Os resultados esperados irão contribuir para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a utilização da terapia celular na regeneração óssea.

Descrição dos estudos desenvolvidos com metodologia vinculada ao desenvolvimento deste projeto:

1. Sistema Rank/Rankl E Opg Em Cultura De Fibroblastos Adultos Do Ligamento Periodontal Humano Sob Pressão Contínua (2016) [Mestrado]. Aluno: Mateus de Abreu Pereira
2. Fibroblastos Periodontais Humanos Em Meio De Cultura Suplementado Com Il-1 Beta No Modelo De Força Compressiva Estática Contínua. (2016) [Mestrado]. Aluna: Delaini Pires Roman Miguel
3. Células Mesenquimais Adultas Derivadas De Tecido Adiposo Na Regeneração Por Distração Osteogênica Da Mandíbula De Colehos Submetida A Radiação Ionizante (2016) [Doutorado]. Aluno: Marcelo Mello Soares.
4. Características Mecânicas das Membranas De Quitosana E Xantana Porosas. (2018) [Mestrado]. Aluno: Fábio Alessandro Simões.
5. Revisão De Literatura: Aspectos Biológicos No Ligamento Periodontal E Osso Alveolar Associado A Compressão In Vitro. (2018) [Mestrado]. Aluna: Andrea Castilho Soares De Azevedo.
6. Influência Da Compressão Na Marcação De Fibroblastos Do Ligamento Periodontal Com Aldh+ . (2018) [Doutorado]. Aluno: Fabio Schemann Miguel.
7. Membrana De Quitosana E Xantana Na Regeneração Do Tecido Periosteal Em Defeito Crítico Na Calvária De Rato. (2019) [Doutorado]. Fernando Biocalti Chiantia
8. Expressão Gênica De Rank/Rankl/Opg Em Uma Cultura Tridimensional De Fibroblastos Periodontais Humanos em

Membranas De Quitosana E Xantana. (2019) [Doutorado]. Andrea Cristina Baptista Coelho De Faria

9. Carga Compressiva Na Expressão Gênica Do Sistema Rank\Rankl E Opg Em Fibroblastos Do Ligamento Periodontal Humano. (2019) [Doutorado] Mateus De Abreu Pereira
10. Fração Estromal Vascular Associada A Matriz Dermica Acelular na Cicatrização De Feridas Cutâneas Em Coelhos. (2019) [Doutorado]. José Da Conceição Carvalho Junior

4. Publicações Relacionadas

M. M. SOARES ; H. SEGRETO ; A. ALOISE ; L. M. FERREIRA . Adipose Derived Stem Cell on the Regeneration of Irradiated Mandible of Adult Rabbit Submitted to Distraction Osteogenesis. JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY , v. 6, p. 113-122, 2018.

5. Artigos Enviados

A)

Ms. No.: ECR-19-1513

Title: Light compressive force up-regulates OPG gene expression in periodontal ligament cells

Corresponding Author: Professor Antonio Carlos Aloise

Authors: Mateus A Pereira, Ph.D student; Silvana Gaiba, Ph.D; Lydia M Ferreira, Ph.D

Dear Professor Aloise,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: ECR-19-1513

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author at <https://ees.elsevier.com/yexcr/>.

Thank you for submitting your work to Experimental Cell Research. Please let me know if you have any questions or concerns.

Kind regards,

Experimental Cell Research

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

B)

1436246: Manuscript Approved

De: "Stem Cells International" <priyanka.ramalingam@hindawi.com>

Para: pmoy@dentistry.ucla.edu amoshaverinia@dentistry.ucla.edu

aca.orto@uol.com.br priyanka.ramalingam@hindawi.com

Dear Prof.. Antonio Aloise,

This is regarding Research Article 1436246 titled "Aldehyde dehydrogenase (ALDH) as an alternative marker for undifferentiated periodontal ligament cells after compressive force application " by Fábio Schemann-Miguel, Antonio Carlos Aloise, Silvana Gaiba França and Lydia Masako Ferreira. The initial screening process has been finished and the manuscript is now approved. Since the manuscript is authored by the Special Issue's Guest Editors, it will be handled by one of the Editorial Board members. If the manuscript is accepted, it will be published in the Special Issue.

Best regards,

Priyanka Ramalingam

Editorial Office

Hindawi

<http://www.hindawi.com>

C)

7-Dec-2019

Dear Prof. Aloise:

Your manuscript entitled "Development of a Light Compressive Force Model to study the human periodontal ligament fibroblasts mechanotransduction "in vitro"." by Mattar, Marco; Gaiba, Silvana; Aloise, Antonio; Ferreira, Lydia, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Cell Biology International.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is CBIN.20180935.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin>.

Thank you for submitting your manuscript to Cell Biology International.

Sincerely,

Cell Biology International Editorial Office

[automatic email - ref: SE-6-a]

D)

CLINICS - Manuscript ID CLINICS-2019-1687.R2

Enviada em:

30/03/2020 | 21:24

Recebida em:

30/03/2020 | 21:24

30-Mar-2020

Dear Dr. CARVALHO JUNIOR:

Your manuscript entitled "ACELLULAR DERMAL MATRIX IN SKIN WOUND HEALING IN RABBITS – HISTOLOGICAL AND HISTOMORPHOMETRIC ANALYSES" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in CLINICS.

Your manuscript ID is CLINICS-2019-1687.R2.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/clinics-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/clinics->

[scielo.](#)

Thank you for submitting your manuscript to CLINICS.

Sincerely,

Luiz Felipe Pinho Moreira

Editor, CLINICS

<https://www.clinicsjournal.com>