

FABIO SCHEMANN-MIGUEL

**INFLUÊNCIA DA COMPRESSÃO EM
FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO MARCADOS COM
ALDEÍDO DESIDROGENASE**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2018

FABIO SCHEMANN-MIGUEL

**INFLUÊNCIA DA COMPRESSÃO EM
FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO MARCADOS COM
ALDEÍDO DESIDROGENASE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

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

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

COORIENTADORA: Prof^ª. Silvana Gaiba

SÃO PAULO

2018

Schemann-Miguel, Fabio.

Influência da compressão de fibroblastos do ligamento periodontal humano marcados com aldeído desidrogenase/Fabio Schemann Miguel. -- São Paulo, 2018.

XII, 103f.

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

Título em inglês: Influence of compression of human periodontal ligament fibroblasts labeled with aldehyde dehydrogenase.

1. Ligamento periodontal. 2. Aldeído desidrogenase. 3. Fibroblastos. 4. Técnicas de culturas de células. 5. Biomarcadores tumorais.



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO PAULO**



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

Coordenador: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

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

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

COORIENTADORA: Prof^ª. Silvana Gaiba

2018

DEDICATÓRIA

A Deus, pela oportunidade da vida.

Aos meus pais, **MÁRIO MIGUEL FILHO** e **ILSE MONICA SCHEMANN MIGUEL**, pela confiança, segurança, harmonia e exemplo de vida, que é seguido.

À minha esposa amada, meu grande amor **DELAINI PIRES ROMAN MIGUEL**, que sempre me apoiou e orientou com sua sabedoria, alegria e grande beleza.

Aos meus queridos filhos, **LUCCA ROMAN SCHEMANN MIGUEL** e **ENZO ROMAN MIGUEL**, fontes de estímulo, vivacidade, aprendizagem e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **LYDIA MASA KO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, referência na pesquisa mundial, estímulo na busca do conhecimento, líder nata, um exemplo a ser seguido, obrigado por esses anos de convívio e aprendizagem.

Ao meu coorientador, Prof. **ANTONIO CARLOS ALOISE**, Orientador do Programa de Mestrado Profissional em Regeneração Tecidual da Universidade Federal de São Paulo, pesquisador rigoroso, possuidor de grande conhecimento, amigo, incansável na busca pelo conhecimento.

À minha coorientadora, Prof^a. **SILVANA GAIBA**, Pesquisadora do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pessoa de grande conhecimento, doce, incentivadora, dedicada na orientação, domínio e participação efetiva em todas as etapas deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **MIGUEL SABINO NETO**, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo, pela conduta e apoio aos pós-graduandos e docentes.

Ao Prof. **NEIL FERREIRA NOVO**, Pesquisador da Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Santo Amaro e à Prof^a. **IARA JULIANO**, meu muito obrigado pelas orientações.

Aos colegas de Laboratório e Pós-graduação **ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS**, **MARCELO MELO SOARES**, **DELAINI PIRES ROMAN MIGUEL**, **MATEUS DE ABREU PEREIRA**, **MARCO ANTONIO MATTAR** (*in memoriam*) e **FABIANA CRISTINA ZANATA FORTOUL**, obrigado pela convivência e pelos momentos compartilhados.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pelos seus ensinamentos.

Às secretárias do programa de Pós-graduação **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pelo empenho em resolver minhas solicitações e pela paciência com que tratam os pós-graduandos deste programa.

À Biblioteca do Campus São Paulo da Unifesp, nas pessoas de **ANDRÉIA C. F. CARMO** e **ISABEL B. S. MENEZES**, pela ajuda, ensinamento e colaboração inestimável na confecção deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus colegas de laboratório, **DELAINI PIRES ROMAN** e **MATEUS DE ABREU PEREIRA**, pela amizade, convivência, dedicação e conhecimento.

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

Ao Coordenador do Setor de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos, **PÉRSIO BIANCHINI MARIANI**, pela oportunidade de poder trabalhar no ambulatório do HMU, para a aquisição dos dentes usados no experimento.

*“Somos o que repetidamente fazemos,
portanto a excelência não é um feito mas
um hábito.”*

Aristóteles – filósofo grego.

384-322 A.C.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XI
<i>ABSTRACT</i>	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	5
3 LITERATURA.....	7
4 MÉTODO.....	43
5 RESULTADOS.....	55
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO	71
8 REFERÊNCIAS	73
NORMAS ADOTADAS.....	84
APÊNDICES.....	86
FONTES CONSULTADAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG – antígeno

ALDH – aldeído desidrogenase

ALP – fosfatase alcalina

AMP cíclico – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

BSA – albumina sérica bovina

cAMP – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

c-Fos – fator de transcrição

CFU-F – unidades de formação de colônias de fibroblastos

c-Jun – fator de transcrição

CTC – célula-tronco cancerosa

CTsLPH – células-tronco do ligamento periodontal humano

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

FACS – *fluorescence-activated cell sorting*

fluo-3 – corante fluorescente de ligação ao cálcio

GC – grupo controle

GE3 – grupo experimental 3 G

GE4 – grupo experimental 4 G

GO – gene ontologia

GTP – guanosina trifosfato e c (c-Jun e c Fos)

HBSS – solução salina de Hank

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

INF γ – Interferão-gama

LP – ligamento periodontal

LPH – ligamento periodontal humano

LPHC – células humanas do ligamento periodontal

MAPCs – células progenitoras adultas multipotentes

MMPs – matriz de metaloproteinases
MSC – células-tronco mesenquimais
OPG – osteoprotegerina
PBMCs – células mononucleares de sangue periférico
PBS – *phosphate buffered saline*
PGE – prostaglandina E
PGE2 – prostaglandina E2
PHN – pressão hidrostática contínua negativa
PHP – pressão hidrostática contínua positiva
PLGA – ácido polilaticocoglicólico
RT-PCR – reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real
RANKL – receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante
STRO – anticorpo monoclonal
TIMP – inibidor de collagenase
TNF α – fator de necrose tumoral alfa
 α SMA – α actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fragmentos do tecido periodontal. Imagem representativa de 4 mm ² que foram coletados do terço médio da raiz de terceiros molares.	47
Figura 2 – Cubo de acrílico contendo a esfera de aço inoxidável. Imagem representativa do cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm com a esfera de aço inoxidável no seu interior.	49
Figura 3 – Modelo de compressão estática contínua. Cubo de acrílico contendo a esfera de aço inoxidável sobre as células aderidas no centro do poço de uma placa de seis poços.	50
Figura 4 – Células de fibroblastos humanos do ligamento periodontal marcadas com ALDH grupo controle DEAB (GC DEAB), grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2).....	56
Figura 5 – Imunofenotipagem das células de fibroblastos humanos do ligamento periodontal com os anticorpos para CD16, CD31, CD34, CD45, CD73, e CD105.	59

RESUMO

Introdução: Os fibroblastos são as principais células do ligamento periodontal, responsáveis pela sua manutenção, regeneração e função. Fibroblastos do ligamento periodontal foram submetidos a diferentes cargas de pressão e posteriormente marcados por marcador tumoral o aldeído desidrogenase (ALDH) uma enzima que participa na oxidação intracelular de aldeídos e converte o retinol em ácido retinoico. **Objetivo:** Analisar fibroblastos marcados com ALDH derivados do ligamento periodontal humano em modelo de compressão estática contínua. **Métodos:** Foram selecionados dez pacientes, submetidos a extrações dos quatro terceiros molares inclusos por indicação ortodôntica. A amostra consistiu de 4 mm² de tecido periodontal do terço médio das raízes. Os fibroblastos extraídos desse tecido foram cultivados até a sexta passagem e depois marcados com o marcador tumoral (ALDH) e separados em três grupos: Grupo Controle (GC), sem aplicação de carga durante 6 horas; Grupo Experimental 1 (GE1), com aplicação de carga de 3 g/mm² durante o tempo de 6 horas; e Grupo Experimental 2 (GE2) com aplicação de carga de 4 g/mm² durante o tempo de 6 horas. Para a identificação e quantificação, foi utilizado o *kit* comercial Aldefluor[®]. **Resultados:** Os grupos GE1 de 3 g/mm² e GE2 de 4 g/mm² apresentaram menor quantidade de células marcadas por ALDH na comparação com o grupo controle e o grupo GE2 de 4 g/mm² apresentou maior quantidade de células marcadas, em relação ao grupo GE1 de 3 g/mm², todos os resultados com relevância estatística. **Conclusão:** Os fibroblastos periodontais adultos marcados com ALDH diminuíram quando da aplicação de compressão estática contínua.

ABSTRACT

Background: Fibroblasts are the main cells of the periodontal ligament, responsible for their maintenance, regeneration and function. Periodontal ligament fibroblasts were subjected to different pressure loads and later labeled by tumor marker aldehyde dehydrogenase (ALDH), an enzyme that participates in the intracellular oxidation of aldehydes and converts retinol to retinoic acid. Fibroblasts are the main cells of the periodontal ligament, responsible for their maintenance, regeneration and function. Periodontal ligament fibroblasts were subjected to different pressure loads and later labeled by tumor marker aldehyde dehydrogenase (ALDH), an enzyme that participates in the intracellular oxidation of aldehydes and converts retinol to retinoic acid. **Objective:** To analyze ALDH-labeled fibroblasts derived from the human periodontal ligament in a continuous static compression model. **Methods:** Periodontal fibroblast isolated from 4 mm² of periodontal tissue from third molars from ten patients. The cells were cultivated in culture media containing for six passages and then stained with ALDH. Cells from each donor were divided in three groups: Control Group (no “weight”); Experimental Group 1 (EG1) (3 g/mm² for 6 hours) and Experimental Group 2 (EG2) (4 g/mm² for 6 hours). The Aldefluor® commercial kit was used for its identification and quantification. **Results:** The experimental groups showed significant reduction in the number of ALDH stained cells compared to the control group and the EG2 showed the higher number compared to EG1. **Conclusion:** Periodontal fibroblasts marked with ALDH decreased when applying continuous static compression.

1 INTRODUÇÃO

Os ligamentos periodontais estabilizam a posição dos dentes e participam no desenvolvimento e crescimento ósseo alveolar, remodelando-se continuamente. São formados por células com predomínio dos fibroblastos, que têm importante papel no desenvolvimento, função e regeneração nos dispositivos do suporte dental (LEKIC & MCCULLOCH, 1996).

SEO *et al.* (2004) relataram o isolamento bem sucedido e cultivo de fibroblastos extraídos cirurgicamente de terceiros molares inferiores. Desde então, tem-se sucesso na obtenção de fibroblastos de terceiros molares impactados não infectados (ZHANG *et al.*, 2012).

O equilíbrio entre os dentes e o osso alveolar é mantido por meio de remodelação contínua do ligamento periodontal humano (LPH), mesmo após a movimentação dental (SEO *et al.*, 2004; KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006; GAY, CHEN, MACDOUGALL, 2007; MENSING *et al.*, 2011), suportando forças mastigatórias máximas de até 630 N nos homens e 424 N nas mulheres (DE ABREU *et al.*, 2014).

Estímulos biomecânicos específicos por pressão e tensão nas células periodontais induzem uma resposta asséptica inflamatória e, durante os estágios iniciais da movimentação dental, existe um aumento na permeabilidade vascular e infiltração celular de leucócito (LEE *et al.*, 2007; LISBOA *et al.*, 2009).

A reação celular a várias forças para o deslocamento dental e a estabilidade dessa movimentação depende da remodelação das fibras gengivais do ligamento periodontal (BUMANN *et al.*, 1997). A remodelação que ocorre nos tecidos do suporte dental é de fundamental

importância na movimentação dos dentes e células, como os osteoblastos e células do ligamento periodontal, que quando submetidas a forças de compressão e tensão, são capazes de provocar sinais biomecânicos intra e extracelulares. O nível de limiar de pressão obtido nesse tipo de experimento, no qual os fibroblastos começariam a responder, forneceria uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse (NAKAGO-MATSUO, MATSUO, NAKAGO, 1996).

A transformação de sinais mecânicos em respostas químicas e elétricas se denomina mecanotransdução (GILLESPIE & WALKER, 2001). Ela cobre uma grande variedade de meios pelos quais as células e tecidos transformam estímulos de seu ambiente físico em sinais bioquímicos. Nesse processo estão incluídos os esforços de compressão, de cisalhamento, de tração e a rigidez dos tecidos nos quais residem células (FRENCH, 1992).

O modelo de compressão utilizado nesta pesquisa é semelhante ao modelo utilizado nos trabalhos de NISHIJIMA *et al.* (2006), LEE *et al.* (2007) e NAKAJIMA *et al.* (2008), devido à impossibilidade de se estudar a resposta celular frente a pressão diretamente nos fibroblastos do ligamento periodontal *in vivo*.

O espaço do ligamento periodontal pode conter células capazes de se diferenciarem em osteoblastos e cementoblastos (GAY, CHEN, MCDOUGALL, 2007).

A marcação celular por meio dos antígenos de superfície *cluster designations* (CD) foram abundantemente experimentados (GINESTIER *et al.*, 2007) e os determinantes antigênicos da superfície celular responsáveis pela geração da resposta imune podem variar de acordo com o estado metabólico da célula, com as condições utilizadas no experimento e as

quantidades de passagens no cultivo celular *in vitro* (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010; ROEHRICH *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Assim devido a esses fatores citados uma busca por um marcador que atuaria dentro da célula e não na membrana celular foi utilizado.

Um marcador de célula tumoral vem sendo utilizado como uma alternativa para identificação de células mesenquimais, o aldeído desidrogenase (ALDH), que é uma enzima citosólica, participante da oxidação intracelular de aldeídos, convertendo o retinol em ácido retinóico, a vitamina A (MACHADO *et al.*, 2016). Atua principalmente na fase final de indiferenciação das células (CAI, WEISS, RAO, 2004) e, segundo DOUVILLE, BEAULIEU, BALICKI (2009) e MACHADO *et al.* (2016), o ALDH pode identificar uma subpopulação de células progenitoras em tecidos tumorais e normais.

As células do ligamento periodontal representam uma terapia baseada em células promissoras na odontologia reconstrutiva para o tratamento do periodonto danificado, e essa população de células no ligamento periodontal é responsável pela sua homeostase. Na literatura científica recente não foi encontrada a resposta aos efeitos mecânicos de pressão nas células do ligamento periodontal humano adulto, marcadas com ALDH no modelo de pressão de força compressiva estática contínua.

2 OBJETIVO

2. Objetivo

Analisar fibroblastos periodontais humanos derivados do ligamento periodontal humano em modelo de compressão estática contínua marcados com aldeído desidrogenase.

3 LITERATURA

GRIGG (1986) relatou que a mecanorrecepção pode ser vista como uma série de processos mecânicos e iônicos sequenciais que ocorrem nos órgãos finais mecanossensíveis e nos terminais dos nervos que os inervam. Os estímulos atuam sobre um transdutor após serem transmitidos através de algum material com uma combinação de propriedades elásticas e viscoelásticas. Os canais que se abrem sob carga de membrana foram recentemente descritos em células musculares e são apresentados como um modelo para transdução. Quando abertos, esses canais são específicos de cátions. Os íons passando por canais de transdutor despolarizam uma zona de iniciação na célula. Em muitos mecanorreceptores, o início do potencial de ação resulta na ativação de uma bomba de Na^+ eletrogênica na zona de iniciação, que modifica o limiar para potenciais de ação subsequentes. Os potenciais de ação iniciados nos muitos ramos de um único axônio sensorial interagem no ponto de ramificação do axônio. Os fatores acima, juntos ou separadamente, são responsáveis pelas respostas dinâmicas e de adaptação observadas nos mecanorreceptores.

ANDERSEN & NORTON (1991) explanaram que os tecidos conjuntivos respondem às forças mecânicas e que, no movimento dentário ortodôntico, o ligamento periodontal (LP) é a fonte de uma população de células pleuropotenciais, que traduz informações de perturbação mecânica em uma série de eventos celulares. Estes incluem proliferação, reparação, diferenciação e mudança de forma. Os autores construíram e testaram uma

máquina simples e adaptável que utilizava membranas para cultivo celular, e que, por meio do estiramento dessas membranas, permitiu examinar mudanças ou eventos moleculares no núcleo da célula, membrana celular e no citoesqueleto de qualquer célula. Concluíram que essas respostas às forças clinicamente simuladas aplicadas a um sistema *in vitro* podiam ser medidas.

FRENCH (1992) relatou que a mecanotransdução seria o processo que permitia que os organismos vivos respondessem aos seus ambientes mecânicos. A gama de sistemas mecanossensitivos foi descrita há quase dez anos. A mecanotransdução seria convencionalmente considerada como um processo em três fases: (A) o estímulo seria mecanicamente acoplado ao receptor de célula; (B) a deformação seria transduzida num sinal elétrico, o potencial do gerador, ou receptor de potencial; (C) o potencial receptor seria codificado em potenciais de ação para transmissão para o sistema nervoso.

YOUSEFIAN *et al.* (1995) desenvolveram um aparelho com capacidade para aplicar pressão hidrostática dinâmica às células do ligamento periodontal humano (LPH) *in vitro*. O objetivo desta pesquisa foi utilizar esse aparelho e determinar seus efeitos nas células do LPH. Foram utilizadas células do LPH de pré-molares recentemente extraídos. As células foram estimuladas mecanicamente por esse aparelho em diferentes magnitudes de pressão hidrostática contínua positiva ou negativa (PHP ou PHN), respectivamente. A aplicação de PHP entre 0,3 e 30 g/cm²

aumentou significativamente a produção de prostaglandinas E (PGE) e de AMP cíclico (cAMP) intracelular. Em contraste, a estimulação por PHN 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^2 de PHN. Em contrapartida, a estimulação com $+30 \text{ g/cm}^2$ de PHP diminuiu significativamente a taxa de proliferação dessas células em 24 e 48 horas. A estimulação entre $+30$ a $+60 \text{ g/cm}^2$ aumentou a largura e o comprimento das células e pareceu aumentar a superfície de adesão ao fundo das placas de cultura. Em contraste, PHN (entre -30 e -60 g/cm^2) diminuiu essas dimensões e pareceu reduzir a superfície de fixação. Esses resultados indicaram que esse tipo de estímulo mecânico das células do LPH produz respostas fisiológicas e não é prejudicial à vitalidade das mesmas.

CARANO & SICILIANI (1996) elaboraram um estudo *in vitro* baseado no efeito de forças contínuas e intermitentes em fibroblastos humanos. Um modelo experimental foi elaborado para estudar o comportamento morfológico e metabólico das células humanas, submetidas a cargas mecânicas cíclicas ou estáticas. O modelo envolveu unir fibroblastos humanos em membranas de silicone revestidas de colágeno, os quais foram submetidos a alongamentos contínuos e cíclicos por um motor acoplado a uma estrutura de suporte móvel. O efeito de alongamento contínuo ou cíclico sobre a secreção de colagenase, uma enzima que desempenha um papel importante no processo de movimentação dos dentes, foi medida. Alongamento cíclico dos fibroblastos, durante um período de 4 dias, com deformação de 7% do seu comprimento, na função

cíclica, com duração de 6 minutos, 3 minutos alongado e 3 minutos relaxado, aproximadamente dobrou da produção de colagenase, em comparação com o controle. O alongamento contínuo, por outro lado, foi apenas 50% eficaz no aumento da libertação de enzimas (sofreram deformação de 7% de seu comprimento). Em contraste, a secreção do inibidor de colagenase (TIMP) não foi afetada por qualquer forma de deformação mecânica. Para entender o efeito das forças cíclicas, um estudo morfológico utilizando fibroblastos humanos foi realizado. Os autores verificaram que com alongamento ou compressão houve uma imediata e proporcional deformação das células. Após 10-15 minutos, a morfologia das células readaptou-se ao novo ambiente mecânico, causando uma perda da ativação biológica. Isso sugeriu que um novo estímulo mecânico foi necessário para induzir uma nova reação biológica. Os autores concluíram que as forças cíclicas foram mais efetivas que as forças contínuas na estimulação dos fibroblastos humanos na produção de colagenase. O comportamento diferencial das células nos variados modos de aplicação de deformação mecânica poderia ser encontrado na rápida deformação morfológica para uma nova condição física de substrato.

LEKIC & MCCULLOCH (1996) relataram que os fibroblastos foram as células predominantes do ligamento periodontal (LP) e tiveram desempenhos importantes no desenvolvimento, função e regeneração do dispositivo de suporte dental. Processos biológicos iniciados durante a formação do ligamento periodontal contribuíram para as propriedades de longa duração homeostáticas exibidas por populações de fibroblastos do ligamento periodontal. Em tecido adulto, experimentos com cinética celular

mostraram que fibroblastos do LP compreenderam um sistema de renovação das células em estado estacionário e as células progenitoras puderam gerar vários tipos diferenciados, células especializadas. As populações de células progenitoras do LP aumentaram em locais adjacentes aos vasos sanguíneos e em espaços contíguos endósteos. No funcionamento normal do tecido periodontal, existiu uma rotação relativamente modesta de células, em que a morte de células apoptóticas equilibrou as células de proliferação. O grande aumento na formação de células e células diferenciadas ocorreu após a aplicação de forças ortodônticas ou ferimentos. Os autores concluíram que os fibroblastos do LP desempenharam um papel essencial na resposta às forças mecânicas nos dentes, pela remodelação e reparação estéril ou danos aos componentes da matriz. Em consideração aos papéis importantes desempenhados por fibroblastos na homeostase do LP, elas puderam ser descritas como “o construtor, arquiteto e zelador” do ligamento periodontal.

NAKAGO-MATSUO, MATSUO, NAKAGO (1996) fizeram um experimento na qual os fibroblastos do ligamento periodontal foram expostos a mudança controlada de pressão hidráulica e foram monitorados constantemente com um medidor de pressão elétrica (*gauge*) e a concentração de cálcio intracelular foi medida em tempo real, por um corante fluorescente de ligação ao cálcio (fluo-3). A elevação da pressão hidráulica, para um nível que variou de 20 a 50 mm Hg, induziu a elevação transitória da concentração de cálcio intracelular em cerca de 10% dos fibroblastos observados, indicando que essas células poderiam responder à mudança de pressão. Os resultados suportaram a ideia de que os

fibroblastos do ligamento periodontal, em resposta à pressão exercida pela força ortodôntica, poderiam iniciar uma cadeia de eventos na movimentação ortodôntica, incluindo remodelação óssea alveolar. O nível de limiar de pressão (27 a 68 g/cm²) obtido nesse experimento, no qual os fibroblastos começaram a responder, forneceria uma base bioquímica para determinar a magnitude ideal de estresse para clínica ortodôntica.

BASDRA (1997) enfatizou que 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, cultivadas em meio de cultura e caracterizadas. Em contraste com os fibroblastos gengivais, os fibroblastos do periodonto humano exibiram características típicas dos osteoblastos. Para entender o papel da estimulação mecânica, forças ortodônticas relevantes foram simuladas *in vitro*. Para isso, as células do ligamento foram colocadas em meio de cultura em placas de Petri com fundo flexível, o que permitiu ser esticado através de um modelo convexo, de forma que as células aderentes também foram estiradas. O resultado desse experimento demonstrou que as células do ligamento periodontal humano responderam ao estiramento mecânico por sinais de transdução que provavelmente incluíram pequenas proteínas ligantes de GTP (guanosina trifosfato) e fatores de transcrição (c-Jun e c-Fos).

BUMANN *et al.* (1997) explanaram os processos de remodelação dinâmica no ligamento periodontal humano (LPH), que foram a reação de células LPH a diferentes forças ortodônticas. Eles ocorreram principalmente por degradação e síntese dos tipos de colágeno I, III, V, VI, XII e XIV. Objetivaram quantificar os tipos específicos de colágeno no LPH, a partir de zonas de tensão e compressão dos dentes experimentais. Síntese de colágeno dos tipos I, III, V e VI foi quantificado nessas zonas, usando o teste ELISA. A aplicação de forças ortodônticas nos dentes experimentais mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) da síntese de todos os tipos de colágeno na zona de compressão, em oposição à zona de tensão. A síntese de colágeno na zona de compressão dos dentes experimentais não foi significativamente diferente na mandíbula, quando comparada com a maxila. Além disso, a distribuição proporcional de diferentes tipos de colágeno também não foi significativamente diferente nos fibroblastos do LPH de qualquer zona de dentes experimentais da maxila ou da mandíbula. O metabolismo do colágeno em resposta à estimulação ortodôntica parece ser maior nas zonas de compressão e menor nas zonas de tensão. Tais descobertas indicaram que, além da reabsorção óssea, a remodelação tecidual foi muito ativa nas zonas de compressão, após o desaparecimento das áreas hialinizadas. Esses achados constituíram um modelo para futuros estudos sobre o metabolismo do colágeno durante o movimento dentário estimulado por ortodontia.

GILLESPIE & WALKER (2001) descreveram a mecanotransdução como a conversão celular de um estímulo mecânico em um sinal elétrico, que revelou ser característica vital do ambiente de um organismo. De

células ciliadas e mecanorreceptores de pele em vertebrados, até cerdas receptoras em moscas e receptores tácteis em vermes, células sensíveis mecanicamente são essenciais na vida de um organismo. A escassez dessas células e a singularidade de seus mecanismos de transdução conspiraram para a caracterização molecular lenta dos conjuntos que realizam a mecanotransdução. Mas os progressos recentes, tanto nos invertebrados quanto nos vertebrados, começam a revelar as identidades das proteínas essenciais para a transdução.

KANZAKI *et al.* (2002) avaliaram como o estresse mecânico afetou a atividade de apoio à osteoclastogênese de células do LPH. As células do LPH foram comprimidas continuamente e depois cultivadas com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), durante quatro semanas. As células do LPH sob estresse mecânico aumentaram a osteoclastogênese de PBMCs. Além disso, a expressão de RANKL nas células do LPH aumentou com a força compressiva, em paralelo com a mudança no número de osteoclastos. Os autores concluíram que as células do LPH sob força compressiva exibiram aumento significativo da produção de prostaglandina E2 (PGE2), em comparação com células do LPH de controle. A expressão de osteoprotegerina (OPG) permaneceu constante ao longo da força compressiva ou do tratamento com PGE2.

SANT'ANA *et al.* (2002) relataram que os estudos *in vitro* para análise da viabilidade de procedimentos que visem à regeneração periodontal possibilitaram o controle do microambiente e a homogeneidade

dos tipos celulares envolvidos. O objetivo desse estudo foi estabelecer e caracterizar uma linhagem contínua de células derivadas de ligamento periodontal (LP) humano. Essas células foram obtidas através da técnica do “explante” de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de terceiros molares extraídos por razões não periodontais de três pacientes saudáveis, sem sinais clínicos ou radiográficos de doença periodontal. Posteriormente, as células foram caracterizadas através de microscopia de luz (contraste de fase), padrão de crescimento, testes imuno-histoquímicos, histoquímicos e enzimáticos, para confirmação da sua natureza. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para anticorpos contra vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anticitoqueratina (AE1/AE3), actina de músculo liso e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados *in vitro* pelas células foi confirmada pelo teste de von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas de LP e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos *in vitro*.

CAI, WEISS, RAO (2004) indicaram um conjunto de genes de células-tronco que poderiam servir como marcadores de células-tronco universais. Um dos marcadores metabólicos que foi descrito foi o aldeído desidrogenase (ALDH). Os resultados, usando o substrato fluorescente de ALDH, “Aldefluor”, forneceu evidências de que a atividade ALDH foi alta nas células-tronco neurais, que ela não foi tóxica, e que esse método pode ser usado para identificar células-tronco neurais. A atividade ALDH foi

usada para identificar células-tronco hematopoiéticas e progenitores de sangue do cordão umbilical. Resultados preliminares sugeriram que a marcação por Aldefluor identificou também outras populações de células-tronco. Essa descoberta forneceu um procedimento simples de seleção não tóxica para isolar as células-tronco em qualquer fase de desenvolvimento. Os autores sugeriram que a marcação com ALDH pode distinguir entre células-tronco e células mais diferenciadas e pode ser considerada um marcador de genes de células-tronco.

KRISHNAN & DAVIDOVITCH (2006) relataram que as mudanças na remodelação dos tecidos periodontais são consideradas essenciais para o movimento dentário ortodôntico. A tensão do tecido induzida pela força produz alterações locais na vascularização, bem como celulares e extracelulares. Houve a reorganização da matriz, levando à síntese e liberação de vários neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento, fatores estimulantes de colônia e metabolismo do ácido araquidônico. Pesquisas da biologia básica do movimento dental forneceram informações detalhadas sobre as reações no nível molecular, celular e reações em nível tecidual, em relação às forças ortodônticas. Essas pesquisas destacaram os desenvolvimentos recentes nas células, reações moleculares, teciduais e genéticas, em resposta à força ortodôntica. Revisaram os processos nos ossos, ligamentos periodontais e remodelação gengival em resposta à força ortodôntica. Os autores concluíram que pacientes com características morfológicas semelhantes possuem perfis bioquímicos variáveis, ressaltando a importância das ciências biológicas na movimentação dental.

GINESTIER *et al.* (2007) escreveram sobre a aplicação biológica na pesquisa das células-tronco sobre câncer de mama, limitada pela falta de métodos simples para identificação e isolamento de células-tronco normais e malignas. Utilizando sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo*, mostraram que células epiteliais mamárias humanas normais e cancerígenas com maior atividade de aldeído desidrogenase (ALDH) possuíam propriedades de células-tronco/progenitoras. Essas células continham uma subpopulação do epitélio da mama normal com a maior potencial de diferenciação de linhagem e maior capacidade de crescimento em um modelo de xenotransplante. Em carcinomas de mama, a alta atividade de ALDH identifica a fração celular tumorgênica, capaz de autorrenovação e de geração de tumores, que recapitulam a heterogeneidade do tumor parental. Em uma série de 577 carcinomas de mama, a expressão de ALDH1 detectada pela imunocoloração correlacionou-se com um mau prognóstico. Esses achados ofereceram uma nova e importante ferramenta para o estudo de células-tronco normais e malignas e facilitaram a aplicação clínica de conceitos de células estaminais.

MOREB (2008) relatou que vários genes do aldeído desidrogenase foram identificados em diversos tecidos. Aldeído desidrogenase classe 1A1 (ALDH1A1) foi identificado como sendo altamente expresso em tecido embrionário, bem como em células estaminais adultas isoladas a partir da medula óssea, cérebro, mama e possivelmente outros tecidos. O recente interesse na ideia de células-tronco cancerosas (CTC) resultou da atividade do aldeído desidrogenase como um marcador para as células-tronco. A separação de células viáveis com elevada atividade de ALDH tornou-se

relativamente fácil com a disponibilidade do ensaio de base da citometria de fluxo. Os autores examinaram os dados disponíveis em relação à importância da atividade ALDH nas células tronco normais e malignas, e as implicações de diagnósticos e potenciais terapêuticos, e obtiveram o potencial a ser utilizado terapeuticamente, especificamente como alvo no CTC.

NAKAJIMA *et al.* (2008) relataram que o estresse mecânico ocasionado pelo aparelho ortodôntico induziu substâncias biologicamente ativas. Fator de crescimento de fibroblastos foi uma citocina multifuncional que possuiu 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) foi uma importante proteína envolvida na osteoclastogênese e os autores relataram recentemente que os níveis de RANKL foram aumentados pela força de compressão *in vitro*. No presente estudo foram investigados os efeitos da força de compressão no fator-2 de crescimento de fibroblastos e produção de RANKL pelas células do ligamento periodontal humano. Uma força de compressão (0,5-4,0 g/cm²) foi aplicada nas células do ligamento periodontal humano por 0-24 horas. As quantidades de RANKL (sRANKL) solúveis e fator-2 de crescimento de fibroblastos foram medidas usando ELISA, enquanto os níveis de mRNA foram determinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, antifator-2 de crescimento de fibroblastos foi adicionado nos 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 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 antifibroblasto inibiu a liberação da sRANKL. Concluíram que o fator-2 de crescimento de fibroblasto poderia estar envolvido parcialmente na osteoclastogênese durante o movimento dental.

DOUVILLE, BEAULIEU, BALICKI (2009) afirmaram que as células-tronco foram relatadas em uma variedade de tecidos, até naqueles nos quais o padrão de rotatividade das células foi baixo, como no tecido cerebral e nas glândulas mamárias de repouso. Há também evidências de que os tumores foram derivados a partir delas e foram mantidos por uma população rara de células-tronco desreguladas. No entanto, discrepâncias nos marcadores utilizados teriam abrandado a caracterização funcional dessas células estaminais somáticas. Para contornar esse problema desafiador, os pesquisadores utilizaram o aldeído desidrogenase isoforma 1 (ALDH1) como marcador de células-tronco universais com propriedades comuns a todos os tipos de células-tronco. Com essa linha, a medição do aldeído desidrogenase isoforma 1 (ALDH1) mostrou atividade potencial promissora como um marcador universal para a identificação e isolamento de células estaminais a partir de múltiplas fontes. A seguir os autores revisaram os dados disponíveis nos relatórios de utilização da atividade ALDH1 como um meio para identificar e isolar células-tronco e células-tronco cancerosas, com um foco especial na glândula mamária e no câncer de mama.

JIANG *et al.* (2009) relataram que o tumor contém uma pequena população de células estaminais cancerígenas (CSC) responsáveis por sua manutenção e recaída. A análise dessas CSCs pode levar a estratégias prognósticas e terapêuticas efetivas para o tratamento de pacientes com câncer. Os autores relataram a identificação de CSCs de células de câncer de pulmão humano usando o teste de Aldefluor, seguido de análise de triagem de células ativada por fluorescência. As células de câncer isoladas com atividade relativamente alta de aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) exibiram características *in vitro* de CSCs, incluindo capacidades de proliferação, autorrenovação e diferenciação, resistência à quimioterapia e expressando o marcador de superfície CSC CD133. Experimentos *in vivo* mostraram que as células positivas para ALDH1 puderam gerar tumores que recapitulam a heterogeneidade das células cancerosas parentais. A análise imuno-histoquímica de 303 espécimes clínicos de três coortes independentes de pacientes com câncer de pulmão e controles mostraram que a expressão de ALDH1 foi positivamente correlacionada com o estágio e grau de tumores pulmonares e relacionada a um prognóstico ruim para pacientes com câncer de pulmão em estágio inicial. ALDH1 foi, portanto, um marcador tumoral do pulmão associado a células-tronco. Essas descobertas ofereceram uma nova importante ferramenta para o estudo de CSC pulmonares e forneceram um potencial fator prognóstico e terapêutico objetivo para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão.

LISBOA *et al.* (2009) certificaram que as forças compressivas ortodônticas no ligamento periodontal promoveram a expressão de mediadores pró-inflamatórios e da matriz metaloproteinase responsáveis pela movimentação dentária. A quantidade de tempo atuando nas células

periodontais e o aumento da quantidade de esforço mecânico (estresse) causados pelas forças ortodônticas foram considerados reguladores dos níveis de metaloproteinases (MMPs) no tecido periodontal. Para estudar a possibilidade de regulação na atividade das metaloproteinases 2, 3, 7, 9, e 10 pela simulação de forças ortodônticas, culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano foram centrifugadas (141 g) durante 30, 60, 90, e 120 minutos, simulando forças ortodônticas. A viabilidade celular, quantificação de proteínas e atividade das metaloproteinases por zimografia foram avaliados em 24, 48 e 72 horas após a centrifugação nas células lisadas e crescimento médio. A atividade da 72-k da matriz metaloproteinase 2 foi reduzida em 24 horas, independentemente da duração da centrifugação, e em 48 horas, em células centrifugadas durante 30 minutos somente. Diminuição da quantidade de proteína total nas lisadas foi vista em 48 e 72 horas, sem qualquer alteração na viabilidade celular. Os dados indicaram que a quantidade de esforço mecânico regulou os níveis de secreção da matriz metaloproteinase. Além disso, a centrifugação, tal como um modelo para simular força ortodôntica, pode ser usada como um simples e confiável método para estudar o papel desempenhado pelas matrizes de metaloproteinases no ligamento periodontal, quando submetidas às forças mecânicas que ocorrem durante a movimentação dentária.

KRISHNAMURTHY *et al.* (2010) relataram que estudos recentes demonstraram que as células-tronco cancerígenas desempenham um papel importante na patologia biológica de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). No entanto, pouco se sabe sobre as interações

funcionais entre células tumorais de câncer de cabeça e pescoço (CSC) e células estromais circundantes. Os autores utilizaram a atividade do aldeído desidrogenase (ALDH) e a expressão do CD44 para classificar células estaminais putativas da HNSCC humana primária. A implantação de 1.000 CSC (ALDH⁺ CD44⁺ Lin⁻) levou a tumores em 13 (de 15) ratos, enquanto 10.000 células-tronco sem câncer (NCSC; ALDH⁻ CD44⁻ Lin⁻) resultaram em 2 tumores em 15 camundongos. Esses dados demonstraram que ALDH e CD44 selecionaram uma subpopulação de células que foram altamente tumorgênicas. A capacidade de autorrenovação foi confirmada pela observação de que as células ALDH⁺ CD44⁺ Lin classificadas a partir de HNSCC humano formaram mais esferoides (orosferas) em 3-D matrizes de agarose ou placas de fixação ultrabaixas do que controles, e foram passadas em série *in vivo*. Observaram que cerca de 80% das CSC estavam localizadas nas proximidades (dentro de um raio de 100 µm) de vasos sanguíneos em tumores humanos, sugerindo a existência de nichos perivasculares em HNSCC. Estudos *in vitro* demonstraram que os fatores segregados de células endoteliais promoveram a autorrenovação de CSC, como demonstrado pela regulação positiva da expressão do Bmi-1 e pelo aumento do número de orosferas, em comparação com os controles. Notavelmente, a ablação seletiva do endotélio associado ao tumor, nas células transduzidas de forma estável com um interruptor de morte artificial baseado em caspase (iCaspase-9), causaram uma marcada redução na fração de CSC em tumores de xenoenxerto. Coletivamente, essas descobertas indicaram que a sinalização iniciada por células endoteliais poderia aumentar a sobrevivência e autorrenovação das células-tronco cancerígenas da cabeça e pescoço.

HOFFMAN, GRASHOFF, SCHWARTZ (2011) relataram que as respostas celulares a forças mecânicas foram cruciais no desenvolvimento embrionário e na fisiologia do adulto, e estiveram envolvidas em inúmeras doenças, incluindo a aterosclerose, hipertensão, osteoporose, distrofia muscular, miopatias e câncer. Essas respostas foram mediadas por produção de carga pelas estruturas subcelulares, tais como a membrana plasmática, complexo de células aderidas e o citoesqueleto. Um trabalho recente demonstrou que essas estruturas são dinâmicas, ao sofrer estímulos e movimento, mesmo quando aparentemente estáveis. Observaram que a transdução de forças em sinais bioquímicos ocorreu dentro do contexto desses processos. Essa estrutura ajudou a explicar como as forças de variável intensidade ou de características dinâmicas regularam diferentes vias de sinalização.

KOOK, JANG, LEE (2011) relataram que fibroblastos do ligamento periodontal sentem e respondem a estímulos mecânicos e participaram da reabsorção óssea alveolar durante o tratamento ortodôntico. Este estudo examinou como o fibroblasto do ligamento periodontal influenciou a osteoclastogênese de macrófagos derivados da medula óssea, após a aplicação de tensão ou força de compressão. Investigaram também se linfócitos poderiam ser um estimulador primário da ativação osteoclástica durante remodelação óssea alveolar. Descobriram que as forças mecânicas inibiram a diferenciação osteoclástica de macrófagos derivados da medula óssea em coculturas com fibroblastos do ligamento periodontal, com os fibroblastos produzindo predominantemente osteoprotegerina (OPG), em vez de receptor ativador do fator nuclear-kappaB (NF-kB) ligante

(RANKL). Em particular, o fibroblasto do ligamento periodontal aumentou a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) em resposta à compressão. Coletivamente, os resultados sugeriram que os fibroblastos do ligamento periodontal puderam secretar níveis relativamente altos de TNF- α no lado de compressão do que no lado de tensão e esse desequilíbrio conduz a expressão de RANKL, ativando CD4, o que facilitou a reabsorção óssea durante a movimentação dentária ortodôntica.

MA & ALLAN (2011) relataram que células-tronco normais e células-tronco cancerígenas (CSCs) compartilham propriedades semelhantes, em que ambas possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos celulares. Nas áreas de células-tronco normais e de células-tronco cancerígenas havia necessidade de um marcador universal que pudesse identificar eficazmente e isolar essa rara população de células para caracterizá-las e usar essa informação para pesquisa e propósitos terapêuticos. Verificou-se que certas isoenzimas do aldeído desidrogenase (ALDH) foi capaz de desempenhar esse papel como um marcador para ambas as células-tronco, normais e do câncer. ALDH tem sido identificada como uma enzima importante na proteção das células-tronco hematopoiéticas normais, e agora foi também amplamente utilizada como um marcador para identificar e isolar diversos tipos de células -tronco normais e CSCs. Além disso, provas emergentes com ALDH1 sugeriram que não só é um marcador para as células-tronco, mas também pode desempenhar papéis funcionais importantes relacionadas com a autoproteção, diferenciação e expansão. Os autores discutiram o papel que a ALDH desempenhou nas células-tronco normais e CSCs, com

foco em ALDH1 e ALDH3A1 e concluíram que as isoenzimas ALDH, juntamente com outros caminhos importantes que regulam as células estaminais normais e cancerígenas, facilitarão o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para melhorar o estado atual do transplante de medula óssea, remédios regenerativos e tratamento do câncer.

TANAKA *et al.* (2011) afirmaram que as células do ligamento periodontal (LPH) têm um importante papel na regeneração periodontal. O objetivo desse estudo foi investigar as características das células do ligamento periodontal obtidas pelo método de crescimento e digestão enzimática. Proliferação celular, atividade de formação de colônias e capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos foram comparadas. Expressão gênica das células do LPH, células-tronco mesenquimais e fibroblastos foram também investigados pela transcrição reversa da reação em cadeia polimerase. A produção de procolágeno tipo I e peptídeo (PIP) foi medida usando o *kit* de ensaio de enzima lincada imunoabsorvente (ELISA). Os resultados mostraram que as células do LPH cultivadas pelo método de enzimas digestivas mostraram uma taxa mais alta de proliferação, atividade formadora de colônias e capacidade de diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito que aquelas células do LPH pelo método de crescimento. O CD166, um dos marcadores das células-tronco mesenquimais, resultou um pouco mais alto no método de digestão enzimática que no crescimento, enquanto que a expressão gênica para colágeno tipo 1 α 1 e colágeno tipo 3 foram mais alto nas células do LPH por crescimento. Além disso, LPH por crescimento exibiram mais alta produção de PIP que as células do LPH por digestão enzimática. Na

conclusão, células obtidas do LPH por crescimento e digestão enzimática mostraram características diferentes. O método de digestão enzimática produziu células com mais alta taxa de proliferação e propriedades semelhantes a células-tronco mesenquimais, enquanto que as células com propriedades semelhantes a fibroblastos foram coletadas no método de crescimento. Propriedades das células do LPH por diferentes métodos de cultura podem fornecer informações para criar novos usos terapêuticos de células do LPH.

URIBE *et al.* (2011) desenvolveram um modelo de cultura orgânico ortodôntico em camundongos e examinaram a mudança na indução precoce em marcadores de diferenciação de osteoblastos no interior do ligamento periodontal (LPH) e osso alveolar. No método, mandíbulas de camundongos transgênicos de 4-12 semanas de idade foram dissecadas ou hemidissecadas. Uma mola ortodôntica convencional superelástica de 25 gramas foi colada do incisivo até primeiro molar em um lado da mandíbula; o outro lado serviu de controle. As mandíbulas dissecadas foram cultivadas por seis horas e então foram analisadas histologicamente por proliferação e expressão proteica fluorescente (BrdU *immunostaining*). Adicionalmente, em um modelo *in vivo* os mesmos métodos foram aplicados para 3.6 Coll1-GFP *transgenic mice*. Como resultados, *in vitro*, após seis horas de ativação ortodôntica, um aumento significativo foi notado em 3.6Coll1-GFP e BSP-GFP-*positive cells* dentro do lado de tensão do ligamento periodontal, quando comparado com o controle sem ativação. No lado de compressão, uma diminuição significativa nas células positivas para 3.6 Coll1-GFP *mice* foi observado no LPH, comparado com o controle

sem ativação. *In vivo*, as mesmas tendências foram encontradas. Na conclusão, este modelo orgânico *in vitro* de cultura para movimentação de dentes mandibulares, junto com a tecnologia de camundongos transgênicos, forneceu uma poderosa ferramenta para delineamento inicial de evento celular e molecular do movimento dental ortodôntico.

GASPARETTO *et al.* (2012) relataram que a atividade do aldeído desidrogenase (ALDH) foi um marcador muito utilizado para células-tronco hematopoiéticas (HSCs) de humanos, mas sua relevância e papel em células-tronco hematopoiéticas de murinos permaneceu obscuro. Os autores descobriram que as células da medula de murinos com um elevado nível de atividade de ALDH obtidas por coloração com Aldefluor (células ALDHbr) não continham HSCs ou células progenitoras conhecidas. Em contraste, com HSCs de murinos altamente enriquecidas definidas pelo CD48LEPCR + e outros fenótipos contendo duas subpopulações, uma que mancha vagamente com Aldefluor (ALDHdim) e uma que mancha em nível intermediário (ALDHint). As células CD48LEPCR + ALDHdim estavam praticamente todas em G0 e níveis de enxerto com rendimento elevado através de ambas as vias intravenosa e intraóssea. Em contraste, o CD48L e células EPCR + ALDHint estão virtualmente todos em G1, têm pouco potencial de enxerto intravenosa e ainda podem enxertar no longo prazo, após o transplante intraósseo. Esses dados demonstraram que a coloração com Aldefluor da medula murina não fracionada não identificou HSCs conhecidas ou células progenitoras. No entanto, vários níveis de coloração com Aldefluor, quando combinado com CD48 e detecção de EPCR, podem identificar novas populações da medula de murino,

incluindo uma altamente enriquecida população de descanso de HSCs e uma população HSC até então desconhecida no G1 com um defeito de enxerto intravenoso.

HECKLER *et al.* (2013) afirmaram que existem poucos modelos tridimensionais (3-D) para estudar os aspectos celulares e a regulação molecular do movimento dental ortodôntico (OTM). O objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo 3-D *in vitro* para estudar a carga mecânica nos fibroblastos do ligamento periodontal humano (hLPHF). hLPHF foram cultivados dentro de géis de colágeno para formar um LPHF análogo. A caracterização dessa cultura de géis de colágeno revelou que o gel suportou a proliferação celular, viabilidade e o surgimento de um possível fenótipo contrátil, replicando a condição constricta do LPH humano *in vivo*. Desenvolveu-se um modelo 3-D que incorporou a cultura em gel de colágeno unida mecanicamente a duas extremidades, para movimentar a extremidades das placas. A movimentação da extremidade da placa permitiu a tração estática ou carga de compressão dos hLPHF semeados em géis de colágeno. Testes preliminares mostraram que esse modelo 3-D imitou a tensão no LPH semelhante à observada durante a OTM. Portanto o modelo 3-D da OTM ofereceu uma promessa para uso como um sistema de modelo em futuros estudos para melhorar o entendimento dos efeitos da OTM no LPH.

JACOBS *et al.* (2013) investigaram a diferenciação osteogênica de fibroblastos do ligamento periodontal humano (LPH) dependendo da força

aplicada de tensão mecânica, em comparação com osteoblastos (HOB). Material e métodos: LPH e HOB foram ativados com diferentes forças (1%, 5% e 10%) de tensão estática mecânica (SMS) durante 12 horas *in vitro*. A viabilidade foi verificada por MTT e apoptose por ensaio de TUNEL. A expressão gênica do ciclina D1, colágeno tipo I (COL-I), fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina, osteoprotegerina (OPG) e ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL) foram investigados, usando RT-PCR. A síntese de OPG e RANKL foi medida por ELISA e atividade de ALP por ensaio colorimétrico. Resultados: 10% de SMS levaram a uma diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas de células, mas não aumentaram a taxa de apoptose. O RT-PCR mostrou um maior aumento da expressão de ciclina D1 para LPH e BOB, quando aplicada 5% de SMS, e HOB mostrou o dobro da expressão do gene COL-I. LPH e HOB mostraram uma síntese dependente da força de OPG e atividade de ALP, enquanto HOB demonstraram uma diminuição na síntese de OPG e a atividade de ALP, quando aplicada 10% de SMS. Conclusão: a diferenciação osteogênica de LPH correlaciona-se com o aumento da força de SMS. HOB mostrou diminuição de atividade com SMS mais alta, demonstrando potencial de danos à remodelação óssea, devido à alta força de tensão. SMS até 5% proporcionou as melhores condições para a formação óssea no local da tensão do movimento dental.

Li *et al.* (2013) os autores estabeleceram um modelo para o tecido do ligamento periodontal humano (LPH) que pode imitar o comportamento biológico do LPH sob compressão estática, no movimento ortodôntico. O estudo teve como objetivo investigar o perfil do andamento da expressão

gênica no modelo do tecido do ligamento periodontal sob compressão. Método: o modelo tecidual do LPH foi estabelecido através de cultura 3-D de células humanas do ligamento periodontal (LPHCs), num *scaffold* de folha porosa fina de ácido polilaticocoglicólico (PLGA), que foi submetido a 25 g/cm² de compressão estática durante 6, 24 e 72 h, respectivamente. Depois disso, o perfil de expressão gênica foi investigado utilizando o ensaio *microarray*, seguido por via de sinalização e análise do gene ontologia (GO). Em tempo real, verificação de RT-PCR foi feita em 15 genes identificados de interesse. Resultados: através dos genes identificados com expressão diferenciada, houve numerosos indutores da osteoclastogênese, inibidores da osteoclastogênese e outros potenciais reguladores da remodelação óssea. Após a compressão prolongada, a proliferação celular foi significativamente inibida. Conclusão: os achados expandiram o entendimento dos papéis do LPH sob compressão estática no movimento ortodôntico.

ROEHRICH *et al.* (2013) narraram que a alta atividade de aldeído desidrogenase (ALDH) tem sido associada a células-tronco e progenitoras em vários tecidos. O sangue do cordão umbilical humano e medula óssea com células *ALDH-bright* (ALDH^{br}) mostraram atividade angiogênica em estudos pré-clínicos e têm mostrado serem seguros em ensaios clínicos em pacientes com doença cardiovasculares isquêmicas. A presença de células ALDH^{br} no coração não foi avaliada até agora. Caracterizaram as células ALDH^{br} isoladas de corações de ratos. Um por cento das células não miocíticas de corações neonatais e adultos eram ALDH^{br}. Células ALDH^{muito-br} foram mais frequentes em corações neonatais do que nos

adultos. As células ALDH^{br} foram mais frequentes nos átrios do que nos ventrículos. A expressão de transcritos isoenzima ALDH1A1 foi maior em células ALDH^{muito-br}, intermediária em células ALDH^{br} e mais baixa nas células ALDH^{dim}. A expressão de ALDH1A2 foi maior nas células ALDH^{muito-br}, intermediária nas células ALDH^{dim} e mais baixa nas células ALDH^{br}. A expressão ALDH1A3 e ALDH2 foi detectável em células ALDH^{muito-br} e ALDH^{br}, ao contrário das células ALDH^{dim}, embora em níveis inferiores, em comparação com ALDH1A1 e ALDH1A2. As células ALDH^{br} recentemente isoladas foram enriquecidas para células que expressaram antígeno de células-tronco 1, CD34, CD90, CD44 e CD106. As células ALDH^{br}, ao contrário das células ALDH^{dim}, puderam ser cultivadas em cultura por mais de 40 passagens. Eles expressaram α -actinina sarcomérica e puderam ser diferenciadas ao longo de múltiplas linhagens mesenquimais. Contudo, a proporção de células ALDH^{br} diminuiu com a passagem celular. Os autores concluíram que a população ALDH^{br} derivada do coração, enriquecida com células progenitoras, exibiu características semelhantes às progenitoras-*like* mesenquimais e pôde ser expandida em cultura.

DE ABREU *et al.* (2014) avaliaram e correlacionaram a eficiência mastigatória (ME) e a força máxima de mordida (MBF) em indivíduos adultos de ambos os sexos com oclusão normal. O estudo foi realizado em um centro de pesquisa universitário. O ME e o MBF foram avaliados em 55 adultos (27 homens e 28 mulheres) com oclusão normal. Todos os sujeitos mastigaram quatro cápsulas de fuchsin (duas na região molar direita e duas na região molar esquerda) por quinze ciclos de mastigação

com intervalo de três minutos entre as cápsulas. A concentração de fuchsin nas cápsulas foi determinada por espectrofotometria e estratificada por gênero e lado de mastigação. A força de mordida (BF) foi medida três vezes na região molar direita e duas na região molar esquerda; o valor mais alto das três medidas em cada lado foi tomado como o MBF. Os resultados indicaram ME maior nas mulheres (lado direito, $1,17 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$; lado esquerdo, $1,20 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$) do que nos homens (lado direito, $0,92 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$; lado esquerdo, $0,89 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$). O MBF foi maior nos homens (lado direito, $632 \pm 174 \text{ N}$; lado esquerdo, $627 \pm 170 \text{ N}$), em comparação com as mulheres (lado direito, $427 \pm 140 \text{ N}$; lado esquerdo, $420 \pm 112 \text{ N}$). Não foram encontradas diferenças significativas na eficiência de mastigação e BF entre os lados para ambos os sexos. Os autores concluíram que as mulheres apresentaram ME mais elevado, enquanto os homens apresentavam o MBF mais alto, sem correlação entre esses dois parâmetros entre os gêneros.

QIN & HU (2014) enfatizaram que enquanto a sinalização da mecanotransdução foi 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 ter potencial para regular a adaptação óssea e reduzir a perda óssea. Vias de mecanotransdução seriam de grande interesse na elucidação da produção de sinais mecânicos, e tais efeitos observados incluíram redução da perda óssea, aumento da formação óssea e diferenciação de células osteogênicas. O objetivo dessa 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 discutido. Atenção foi atribuída ao potencial das vias celulares e moleculares em resposta a uma carga, incluindo osteócitos associados com a sinalização Wnt, elevação das células estaminais, supressão de células adipócitas, bem como funções de Lrp5 e microARN. Esses dados e discussões destacaram o processo ainda altamente complexo e coordenado de mecanotransdução na regeneração do tecido ósseo.

ZHANG *et al.* (2014) explanaram que foram detectados níveis elevados de atividade de aldeído desidrogenase (ALDH) em várias células progenitoras e estaminais. Portanto, a fluorescência de Aldefluor, que representa precisamente a atividade ALDH, tem sido amplamente utilizada para identificação, avaliação e isolamento de células-tronco e progenitoras. Recentemente, a atividade ALDH foi detectada no pâncreas de rato embrionário e adulto, especificamente nas células adultas do centroacinar e no ducto terminal, supostamente portador de células progenitoras endócrinas e exócrinas no pâncreas adulto. No entanto, a atividade de ALDH e a fluorescência de Aldefluor não foram examinadas em células beta. Os autores relataram um aumento dinâmico no número de células beta Aldefluor⁺ durante a gravidez. Curiosamente, quase todas essas células beta Aldefluor⁺ foram positivas para Ki-67, sugerindo que elas estão em um ciclo celular ativo (fases G1, S e M). Para determinar com precisão em

que fases as células beta ativaram a atividade do ALDH e, assim, tornaram-se Aldefluor⁺, comancharam com insulina um marcador de proliferação, *phosphohistone3* (PHH3, um marcador para células que proliferam em fase M) e bromodesoxiuridina (BrdU, um marcador de células que proliferam em fase S). Os dados mostraram poucas células beta Aldefluor⁺ que foram positivas para PHH3 ou BrdU, sugerindo que as células beta ativaram ALDH e se tornaram Aldefluor⁺ quando entraram na fase G1 do ciclo celular ativo, mas puderam diminuir a marcação por ALDH quando elas saíram da fase G1 e entraram na fase S. Os dados revelaram assim uma possível alteração na atividade ALDH das células beta proliferativas durante a gravidez, que forneceram um novo método de isolamento e análise de proliferação de células beta. Além disso, os dados também sugeriram que foi necessário ter cuidado sobre a interpretação dos dados de rastreamento de linhagens com Aldefluor no pâncreas.

BISWAS, MANIVANNAN, SRINIVASAN (2015) descreveram um modelo de mecanotransdução em dois estágios da sensibilidade vibrotátil de limite próximo, válida em 10 Hz para alguns kHz, com base em descobertas recentes de canais de íons ativados por estiramento e tensão na área receptiva do corpúsculo de Pacini. O modelo baseia-se no comportamento não linear e estocástico dos canais iônicos representados como fontes de carga dependentes carregados com impedância de membrana. Simula a resposta neural do corpúsculo de Pacini, considerando as propriedades morfológicas e estatísticas do potencial de receptores e do potencial de ação, com a ajuda de um modulador de frequência de pulso de relaxamento adaptativo.

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

NETTELHOFF *et al.* (2015) investigaram e compararam *in vitro* as alterações em fibroblastos do ligamento periodontal humano e osteoblastos, após a aplicação de força de compressão, utilizando dois diferentes tipos de cargas. Os fibroblastos e osteoblastos foram expostos às forças compressivas computadorizadas (*Compression Plus System Flexcell – FX-*

3000) com uma magnitude de 2 cN/mm^2 e 4 cN/mm^2 durante 12 horas, para simular forças moderadas e altas, respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a taxa de apoptose pelo ensaio do TUNEL. As expressões dos genes da fosfatase alcalina, osteocalcina, osteoprotegerina e RANKL foram analisadas usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Osteopontina, matriz metalaproteinase e inibição do tecido de metaloproteinase foram quantificadas pelo ensaio ELISA. A força de 4 cN/mm^2 (força alta) diminuiu a viabilidade celular, especialmente nos osteoblastos, mas não induziu o aumento da apoptose. A expressão do gene de fosfatase alcalina aumentou depois de mais de 2 cN/mm^2 nos fibroblastos e após 4 cN/mm^2 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^2 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. Forças compressivas altas em ortodontia devem ser evitadas para prevenir alterações nos tecidos, enquanto que a força compressiva moderada permitiu a remodelação do tecido ósseo e movimentação dentária.

MACHADO *et al.* (2016) detectaram células que expressaram o marcador de células-tronco ALDH1 (aldeído desidrogenase 1) na polpa de dentes humanos permanentes e investigaram a expressão de ALDH1 em células de polpa dentárias isoladas. O tecido de polpa foi coletado e processado para imuno-histoquímica para detectar ALDH1, células STRO-

1 e CD90-positivas. Além disso, células foram isoladas e analisadas por citometria de fluxo para atividade ALDH1 e para os marcadores de superfície celular CD44, CD73, CD90, STRO-1 e CD45. As células foram também examinadas para a capacidade de multidiferenciação. Dentro dessas células, uma subpopulação celular ALDH1⁺ foi selecionada e avaliada para a capacidade de multidiferenciação. As análises de imunohistoquímica mostraram que as células marcadas por ALDH1, CD90 e STRO-1-positivo estavam localizadas principalmente nas áreas perivasculares das fibras nervosas das polpas dentárias. Células da quinta passagem tiveram alta expressão para CD44, CD73 e CD90, enquanto que a expressão foi moderada para STRO-1 e ALDH1, quando observada pela análise de citometria de fluxo. Nas mesmas passagens, as células foram capazes de diferenciarem-se em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. A subpopulação celular ALDH1⁺ também demonstrou habilidade na diferenciação multilinhagem. Os autores concluíram que as células-tronco da polpa dental residiram nas vizinhanças de vasos sanguíneos e fibras nervosas, indicando a possível existência de mais de um nicho de células-tronco em polpas dentárias. Além disso, ALDH1 foi expresso por células de polpa dentárias isoladas, que tinham características das células estaminais mesenquimais. O ALDH1 pode ser usado como um marcador de células-tronco da polpa dental.

TOMITA *et al.* (2016) relataram que o genoma humano contém supostamente 19 genes funcionais para aldeído desidrogenase (ALDH), que codificam enzimas críticas para a desintoxicação endógena e substratos exógenos através de NAD (P)⁺oxidação dependente. ALDH1 tem três

isótopos principais, ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3, e foi um marcador de células-tronco normais de tecido e células-tronco cancerosas, em que está envolvida na autorrenovação, diferenciação e autoproteção. As experiências com células de murinos e humanas indicaram que a atividade ALDH1, predominantemente atribuída ao isótopo ALDH1A1, foi específica para tecido e câncer. Alta atividade ALDH1 e ALDH1A1 superexpressão foram associadas com prognóstico baixo de câncer, embora altos níveis ALDH1 e ALDH1A1 nem sempre se correlacionaram com fenótipos altamente malignos e resultados clínicos baixos. Concluíram que ALDH1A1 foi considerado um marcador para as células-tronco e células-tronco cancerosas e pode desempenhar um papel funcional em termos de autoproteção, diferenciação e expansão das populações de células-tronco. A modulação de ALDH1A1 também pode desempenhar um papel chave na regulação do crescimento e diferenciação de células normais e células de câncer, também influenciando alguns aspectos do fenótipo câncer e do prognóstico.

ATHIRASALA, HIRSCH, BUXBOIM (2017) explanaram que o núcleo celular foi uma característica da evolução eucariótica, na qual a expressão gênica foi regulada e o genoma foi replicado e reparado. No entanto, além de processos moleculares complexos, o núcleo também evoluiu para atender a tarefas físicas que utilizaram suas propriedades ópticas e mecânicas. A mecanotransdução nuclear das forças aplicadas externamente e a rigidez extracelular foi facilitada pela conectividade física do ambiente extracelular, do citoesqueleto e da matriz nucleoesquelética das lâminas e da cromatina. Os elementos de mecanosensor nuclear

converteram a tensão aplicada em pistas bioquímicas que ativaram os caminhos com sinais de transdução e, portanto, visões mecanicistas sobre como as forças foram detectadas a partir de dentro, isto é, no núcleo no qual a tomada de decisão do destino celular foi feita.

DE SOUZA *et al.* (2017) examinaram recursos alternativos naturais, como água de coco, própolis e clara de ovo, como possíveis meios de armazenamento para dentes avulsionados e a capacidade desses recursos como meios de armazenamento para manter a viabilidade do ligamento periodontal humano de fibroblastos (LPHFs) e a eficácia destes com a variação da temperatura. Compararam a eficácia desses três produtos com a solução de sal equilibrada de Hank e o leite. O objetivo desse estudo foi avaliar os LPHF que foram mantidos a 5°C e 20°C em leite desnatado (SMilk), leite integral (WMilk), solução de sal equilibrada de Hank (HBSS) preparada, *save-a-tooth* HBSS do sistema (Salvar), água de coco natural (Coco), própolis e clara de ovo (Ovo) por 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h, por meio da análise de sal de tetrazólio por teste colorimétrico (MTT). Os resultados indicaram que a 5°C, o SMilk e WMilk foram melhor que HBSS na manutenção da viabilidade celular, a partir de 24 h em diante; em 20°C, o HBSS foi o melhor meio de armazenamento a 96 e 120 h. Em ambas as temperaturas, a partir das 6 h, o coco, o própolis e a clara de ovo foram menos efetivos do que o SMilk, o WMilk e o HBSS. Em geral, os desempenhos da água de coco, o própolis e a clara de ovo não foram influenciados pela temperatura de armazenamento. Contudo a menor temperatura prejudicou a eficácia do HBSS a partir de 24 h e favoreceu SMilk e WMilk, de 96 e 48 h em diante, respectivamente. Concluíram que

o SMilk foi o melhor meio de armazenamento, seguido por WMilk e HBSS. Água de coco, própolis e clara de ovo puderam ser indicados para a conservação do LPHF em até 3 horas. A menor temperatura (5°C) prejudicou a eficácia do HBSS e favoreceu o SMilk e WMilk.

LEE *et al.* (2018) avaliaram *save-a-tooth* (SAT), uma solução baseada em HBSS, EMT *toothsaver* (EMT) feito de *special cell culture medium* (SCCM), que é uma versão modificada do Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contém conservantes especiais, e *Hank's balanced salt solution* (HBSS), por sua capacidade na influência na viabilidade e na proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano (HLPFs). Os HLPF primários foram semeados em 96 placas de cultura de células de poço e expostas a SAT, EMT, HBSS e água (controle negativo) por 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas à temperatura ambiente (22°C). Após cada exposição de tempo, a viabilidade celular foi medida através da quantificação trifosfato de adenosina (ATP), utilizando um corante luminescente. A capacidade proliferativa também foi quantificada usando o Ensaio PrestoBlue após 12 ou 24 horas de armazenamento em cada meio. A morfologia das células, após 12 horas de armazenamento, também foi investigada através de um *kit* para viabilidade/citotoxicidade ao vivo/morto, juntamente com microscopia de fluorescência. Como resultados, obtiveram que não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos HBSS, SAT e EMT até 6 h. O SAT foi eficaz na manutenção da viabilidade celular apenas até 12 h e, em seguida, tornou-se prejudicial para HLPF; após 24 horas, a eficácia do SAT na manutenção da viabilidade celular foi semelhante à da água

($p > 0,05$). Entre todos os meios de testados, apenas EMT poderia manter a capacidade proliferativa de HLPHF significativamente maior do que o controle negativo, isto é, água ($p < 0,05$), após armazenamento de 24 h. Concluíram que EMT manteve a proliferação e a capacidade dos HLPHFs após armazenamento de 24 horas.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo é primário, experimental, prospectivo, controlado, aberto e realizado em centro único.

Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob o protocolo n. 411.270 de 04/10/2013 (APÊNDICE 2), obedecendo a Resolução n. 196/96, contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos; a concordância da participação no estudo foi previamente feita pelos participantes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE 3). Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Cultura de Células e Engenharia Tecidual da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, que está localizado na Rua Pedro de Toledo, 781, 11º andar, frente, cuja responsável é a Profª Drª Lydia Masako Ferreira.

4.2 CASUÍSTICA

Terceiros molares inclusos (intraósseos), extraídos por indicação ortodôntica de dez pacientes, totalizando quarenta terceiros molares, forneceram fragmentos de tecido do ligamento periodontal que foram isolados e cujos fibroblastos foram cultivados.

4.2.1 Critérios de inclusão

Participaram deste estudo pacientes do gênero masculino e feminino, com idades entre 18 e 30 anos, não tabagistas, com os quatro terceiros molares totalmente intraósseos (inclusos), com indicação clínica de extração, sem história de doenças e sem uso de medicamentos.

4.2.2 Critérios de não inclusão

Pacientes que apresentavam processos infecciosos locais e inflamatórios, alterações patológicas restritas, como cistos e granulomas, alterações de ordem sistêmicas e terceiros molares que, para sua remoção, necessitavam de desgaste coronário ou odontosecção, não foram considerados candidatos à participação neste estudo.

4.2.3 Critério de exclusão

Quando não se atingia confluência nas garrafas, havia contaminação na cultura de células e insucesso em se obter 4mm² de ligamento periodontal.

4.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

4.3.1 Obtenção do ligamento periodontal humano

Terceiros molares inclusos descartados, após serem extraídos de pacientes atendidos no ambulatório odontológico do Hospital Municipal de Urgências de Guarulhos, foram raspados ao nível do terço médio radicular, para obtenção do ligamento periodontal. O próprio pesquisador realizou as cirurgias. A padronização da técnica operatória feita para todos os pacientes consistiu das seguintes etapas: a) antissepsia extraoral com clorexidina a 4% e antissepsia intraoral com clorexidina a 0,12%; b) utilização dos campos operatórios esterilizados; c) dois tubetes de anestesia local com alphacaine 100 a 2%, com epinefrina 1:100.000; d) exodontia dos terceiros molares; e) suturas por pontos separados com fio de seda 3-0, agulhado, com agulha triangular. Antibiótico por sete dias, duas vezes ao dia (amoxicilina 500mg) e anti-inflamatório hormonal por três dias, uma vez ao dia (dexametasona 4 mg) foram prescritos no pós-operatório. A remoção das suturas foi realizada sete dias após as extrações. Após o procedimento cirúrgico, os dentes extraídos foram acondicionados em tubos cônicos estéreis de 15 ml, contendo 5 ml de solução de transporte (solução de Hank's), com meio de cultura Alpha-MEM suplementado com 1% de antibióticos e antifúngico (Alpha-MEM completo: 5000U penicilina + 10000µg estreptomicina + 25µg anfotericina-B – Gibco, Gibco Industries Inc., EUA).

O transporte dos terceiros molares extraídos e acondicionados em tubos com os meios específicos foram levados para o Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, em até

seis horas após a sua coleta, e mantidos refrigerados (4°C). A câmara de fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil) foi utilizada para elaboração de todos os procedimentos de cultivo celular. Os dentes foram lavados por quatro vezes com solução de Hank's (HBSS – Sigma Aldrich CA, USA) e antibióticos (5000U penicilina + 10000µg estreptomicina + 25µg anfotericina-B – Gibco, Gibco Industries Inc., EUA). Os fragmentos de todos os dentes foram obtidos por raspagem do terço médio da raiz utilizando um cabo de bisturi nº 3 (Duflex S.A., Rio de Janeiro, RJ) e uma lâmina cirúrgica nº 15 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltd., Beiqiao Town, Suzhou City-China).

Os 4 mm² de tecido periodontal foram coletados de todos os pacientes que forneceram os quatro terceiros molares (superiores e inferiores). Para aferição da quantidade de tecido periodontal, utilizou-se uma placa milimetrada de 2x2 mm (Figura 1).

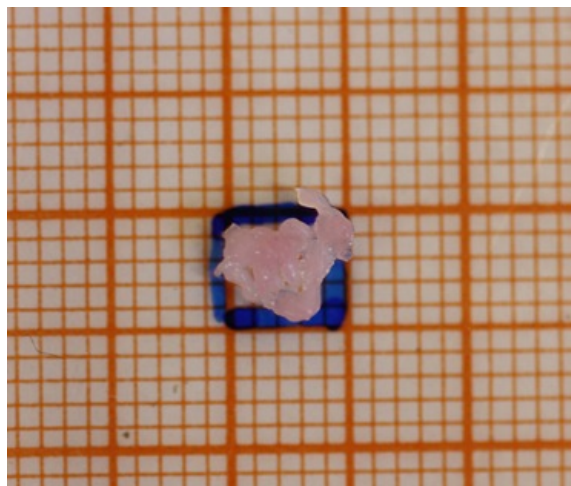


Figura 1 – Fragmentos do tecido periodontal. Imagem representativa de 4 mm² que foram coletados do terço médio da raiz de terceiros molares.

O tecido periodontal coletado foi colocado em um tubo cônico de 15 ml (Corning, MA, USA), contendo 4 ml de solução de HBSS com antibióticos e antifúngico, lavado por 4 vezes em 4 tubos diferentes, sob agitação manual por 30 segundos. Na sequência, o tecido periodontal foi colocado em um tubo cônico de 15 ml, contendo 5 ml de meio de cultura contendo 1mg/ml de colagenase tipo II (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1 mg/ml de dispase (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA), sob aquecimento (37°C por 30 minutos), utilizando uma agitadora orbital TE-420 (Tecnal Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil). Após esse procedimento, foram adicionados 5 ml de meio de cultura Alpha-MEM (Lab Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) para neutralizar a ação das enzimas (colagenase e dispase). O tecido remanescente foi descartado e a solução foi transferida para um outro tubo de 15 ml, e centrifugada (Centrífuga Fanem Excelsa II, São Paulo, Brasil) a 100 g por seis minutos, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspensão em 5 ml de meio de cultura Alpha-MEM completo e a contagem do número de células foi realizada utilizando-se o contador de células automático (Invitrogen - Countess, Seul, Korea). A solução contendo as células do ligamento foi mantida em garrafa de cultura de 25 cm³ (Corning, MA, EUA) na incubadora CO₂ (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil) a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de O₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, até atingir 80% de confluência. Após 20 dias em média, foi atingida a confluência e as células foram tripsinizadas, utilizando tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) e subcultivadas. O congelamento das células foi realizado na quinta passagem, com uma densidade de 1x10⁶ células/ml, utilizando-se o meio de cultura Alpha-MEM com 50% SFB inativado, 0,1% 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) e armazenados em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos.

4.3.2 Aplicação da compressão estática contínua

Cubos de acrílico foram utilizados como modelo de compressão, com dimensões de 2x2x2cm, colocados no centro de cada poço da placa de cultura, sobre as células, contendo uma esfera de aço inoxidável para obtenção da massa de 12 g ou 16 g, semelhante ao modelo proposto por NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAJIMA *et al.* (2008) (Figura 2).

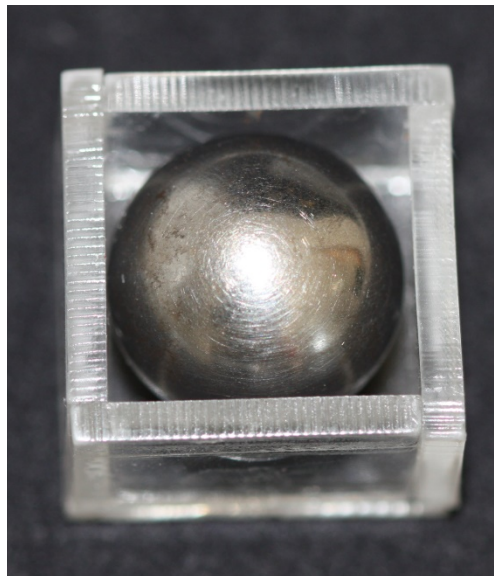


Figura 2 – Cubo de acrílico contendo a esfera de aço inoxidável. Imagem representativa do cubo de acrílico com dimensões de 2x2x2 cm com a esfera de aço inoxidável no seu interior.

A concentração de 2×10^5 células/poço diluídas em 200 μ l de meio de cultura foi utilizada no ensaio de compressão. As células contidas no meio de cultura foram sempre depositadas no centro do poço da placa de seis poços, ficando por 10 minutos para fixação, e logo em seguida o volume do meio de cultura no poço foi completado, até alcançar 3,0 ml. Antes da aplicação da pressão, as células foram pré-incubadas durante 6 horas em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino, e só após esse procedimento o peso foi aplicado sobre as células (Figura 3), durante 6 horas na incubadora; assim, elas foram continuamente comprimidas, utilizando uma compressão uniforme, baseadas nesse modelo de compressão estática contínua para experiências *in vitro*.

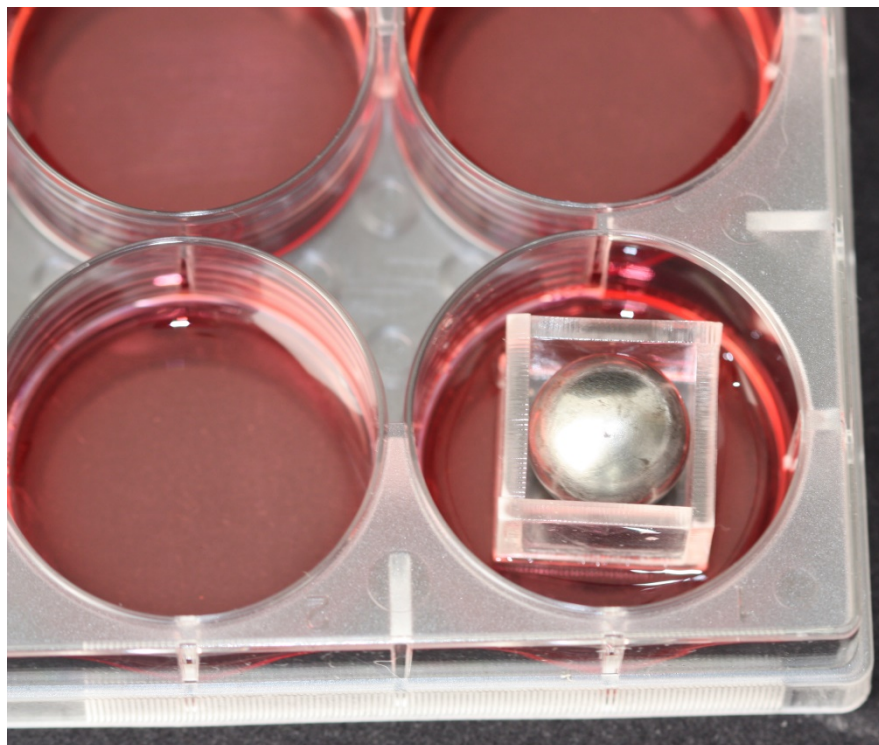


Figura 3 – Modelo de compressão estática contínua. Cubo de acrílico contendo a esfera de aço inoxidável sobre as células aderidas no centro do poço de uma placa de seis poços.

Após a compressão, as células foram tripsinizadas e levadas para a avaliação dos resultados.

4.3.3 Grupos

As células cultivadas (sexta passagem), obtidas dos 10 doadores deste estudo, foram semeadas com uma concentração de 2×10^5 células/ml no centro de cada poço de uma placa de seis poços e distribuídas nos seguintes grupos:

- Grupo Controle (GC) - não foi submetido ao modelo de compressão estática contínua.
- Grupo Experimental 1 (GE1) - foi submetido ao modelo de compressão estática contínua utilizando a carga de $3,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas.
- Grupo Experimental 2 (GE2) - foi submetido ao modelo de compressão estática contínua utilizando a carga de $4,0 \text{ g/cm}^2$ por 6 horas.

4.4 AVALIAÇÕES

4.4.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, técnica usada na análise qualitativa e quantitativa de células em suspensão, que pode verificar o tamanho, a

complexidade e características estruturais e funcionais de partículas biológicas, foi utilizada para as avaliações dos resultados deste experimento, as quais foram realizadas pelo citômetro de fluxo Guava Easy Cyte HT, que conta com um laser de excitação (azul) e três cores fluorescentes (verde, amarelo e vermelho). É um aparelho que depende de um número mínimo de células, que passam uma a uma por um capilar. Há um computador instalado com um *software* (InCyte Software), cujas informações foram processadas por meio de gráficos. Neste estudo foi utilizado o *kit* Aldefluor e os CDs: CD16, CD31, CD34, CD45, CD73 e CD105, para a marcação da população de células progenitoras.

4.4.2 Aldefluor[®]

Para identificar e quantificar as células dos fibroblastos do ligamento periodontal, utilizamos o *kit* comercial Aldefluor[®] (Stemcell Technologies) que identifica as células que expressam a enzima aldeído desidrogenase (ALDH⁺). Essas células com alta atividade tornam-se fluorescentes quando são expostas ao substrato ALDH do *kit* e dessa forma podem ser detectadas utilizando o fluorocromo verde (520-540nm) de um citômetro de fluxo. Como esse substrato entra passivamente nas células, é possível que seja convertido pela enzima ALDH endógena, ficando retido no interior das células viáveis, tornando-as fluorescentes. O efluxo desse substrato é bloqueado pelo dimetilaminobenzaldeído (DEAB), que é um inibidor da atividade do ALDH e, portanto, utilizado como controle negativo.

As células foram ressuspensas na concentração de 1×10^6 células/ml, utilizando a solução tampão do *kit* comercial Aldefluor. Foram separados

dois tubos de 5 ml próprios para citometria de fluxo e identificados como teste e controle. No tubo controle foram adicionados 5 μ l de DEAB e no tubo teste foram colocadas as células previamente separadas na concentração anteriormente descrita, e então acrescentados 5 μ l da solução ALDH homogeneizado, e rapidamente coletados 500 μ l dessa solução, e dispensados no tubo controle. Os tubos foram então incubados por 40 min a 37°C, protegidos da luz.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5min, desprezado o sobrenadante e ressuspensos em 300 μ l da solução tampão do *kit* Aldefluor. As amostras foram distribuídas numa placa de 96 poços, específica para o citômetro de fluxo Guava, e então analisadas.

4.4.3 Imunofenotipagem

Após o descongelamento e expansão das células, elas foram tripsinizadas, a suspensão centrifugada a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de PBS. Esse procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células, foi repetido 2 vezes. Após a segunda lavagem, foram ressuspensas em 600 μ l de PBS e distribuídas em 6 tubos de citometria de 5 ml. Foi acrescentado em cada tubo um dos seguintes anticorpos: CD16PE-CY7(-), CD31-APC(-), CD34-APC(-), CD45-FITC(-), CD73-PE(+) e CD105-PE(+) e os tubos contendo as células e os anticorpos foram incubados durante 20 min, em temperatura ambiente e protegidos da luz. A seguir foram acrescentados 200 μ l de PBS e as amostras foram submetidas a análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte

HT(Millipore, Belford, Massachusetts, EUA) e analisadas pelo programa InCyte Software

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados entre os grupos foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney U Test, para comparação entre dois grupos. Em todos os testes, a hipótese nula (H_0) sendo testada é de que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados. O nível de significância assumido para decidir sobre todos os testes foi de 5%, ou seja, 95% de confiança.

5 RESULTADOS

5.1 ALDEFLUOR

Para verificar as células marcadas com a enzima ALDH foi utilizada a citometria de fluxo. O ensaio foi realizado no citômetro de fluxo Guava (easyCyte HT) e analisado pelo programa InCyte Software. A Figura 4 representa os dados obtidos de um dos doadores com as células selecionadas na cor preta em R1. Pode-se verificar em vermelho o deslocamento das células analisadas para o interior da região selecionada para análise (R2) do grupo controle DEAB (controle negativo), grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2).

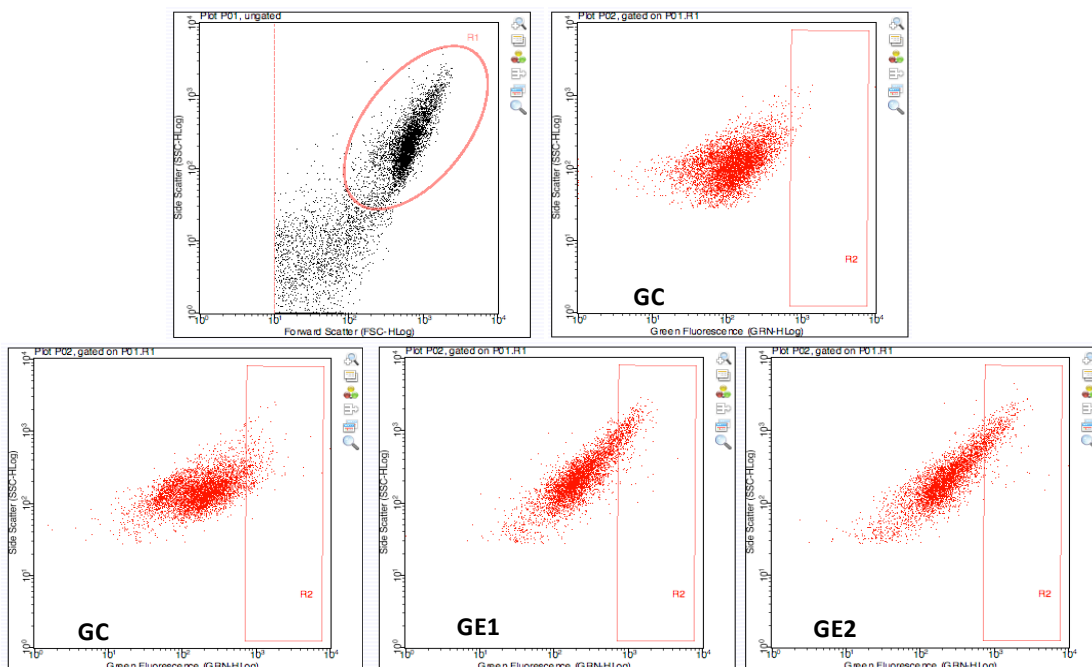


Figura 4 – Células de fibroblastos humanos do ligamento periodontal marcadas com ALDH grupo controle DEAB (GC DEAB), grupo controle (GC), grupo experimental 1 (GE1) e grupo experimental 2 (GE2).

Para cada doador foi determinado o número de células que estavam marcadas com a enzima ALDH e os valores estão representados individualmente na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores individuais das médias das porcentagens da expressão de ALDH na cultura de fibroblastos do ligamento periodontal no modelo de compressão estática contínua, verificados por citometria de fluxo, utilizando o *kit* Aldefluor.

Paciente	GC	GE1	GE2
1	1,45	1,02	2,20
2	2,22	1,69	2,77
3	2,41	0,08	0,90
4	7,40	0,61	3,08
5	4,67	1,76	2,92
6	5,15	0,29	0,49
7	9,60	0,99	4,72
8	6,00	2,09	4,17
9	6,37	1,14	0,79
10	8,06	0,74	1,81
Média	5,33	1,04	2,38
Mediana	5,58	1,00	2,49
Desvio Padrão	2,69	0,65	1,42

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

Os valores descritos na Tabela 1 foram analisados e estão representados na Tabela 2, onde podemos verificar que houve diferença entre os grupos analisados com significância.

Tabela 2 – Valores de “p” obtidos pela comparação dos grupos em pares, baseados na Tabela 1.

Grupos	p
GC vs GE1	0,0004*
GC vs GE2	0,0156*
GE1 vs GE2	0,0284*

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

5.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Para realizar a imunofenotipagem foi utilizado a citometria de fluxo e as células foram marcadas com os anticorpos CD16, CD31, CD34, CD45, CD73 e CD105. A Figura 5 representa os dados obtidos de um dos doadores. Pode-se verificar o deslocamento da população localizada na região R6 (negativa) para a região R7 (positiva). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT, utilizando o programa InCyte Software e os valores obtidos em porcentagem estão apresentados na Tabela 3.

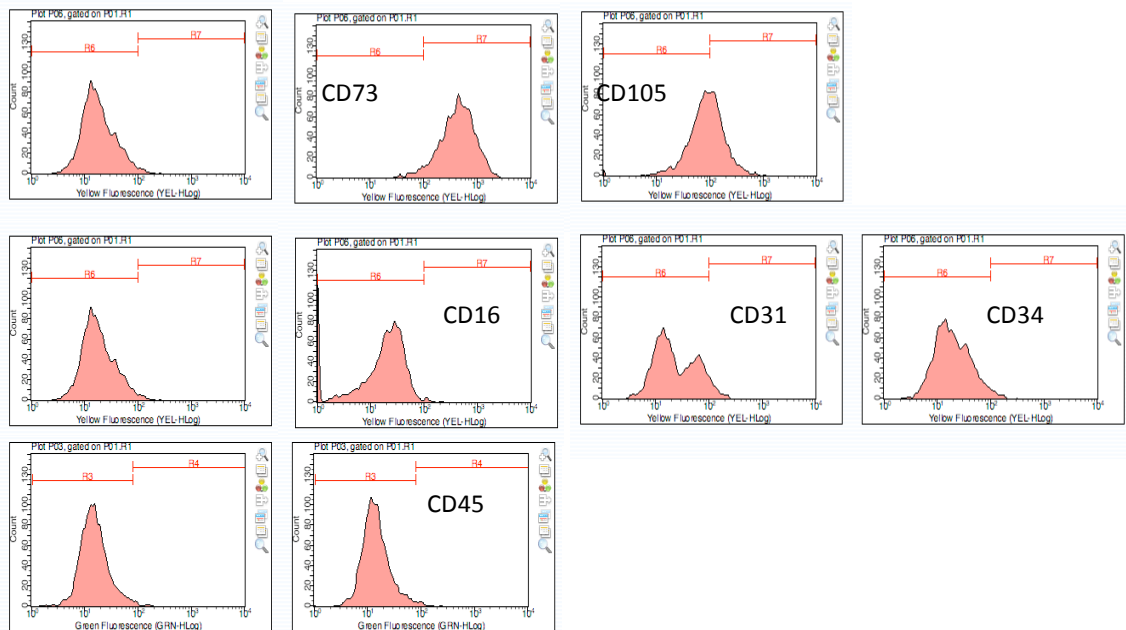


Figura 5 – Imunofenotipagem das células de fibroblastos humanos do ligamento periodontal com os anticorpos para CD16, CD31, CD34, CD45, CD73 e CD105.

Tabela 3 – Expressão em porcentagem da imunofenotipagem da cultura de células de fibroblastos do ligamento periodontal.

CD	Expressão	Porcentagem
16	Negativo	<5%
31	Negativo	<5%
34	Negativo	<5%
45	Negativo	<5%
73	Positivo	>95%
105	Positivo	>15%

CD: cluster designation; PE: phycoerythrin FITC: fluorescein isothiocyanate; APC: allophycocyanin

6 DISCUSSÃO

As células presentes no ligamento periodontal são as seguintes: células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, mastócitos, cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos. O fibroblasto é a principal célula do ligamento periodontal e está envolvido na síntese e degradação do colágeno, proporcionando um alto índice de renovação para esse tecido (LEKIC & MCCULLOCH, 1996).

Os fibroblastos, como principais constituintes do tecido conjuntivo, produzem componentes fibrilares e macromoleculares da matriz extracelular nas suturas, no ligamento periodontal, no periósteo, no ligamento articular e em outros tecidos conectivos (CARANO & SICILIANI, 1996).

Os fibroblastos utilizados na pesquisa vieram do ligamento periodontal localizado no terço médio das raízes de terceiros molares inclusos de doadores de idades na faixa de dezoito a trinta anos. Não foram incluídos doadores com idade menor que dezoito anos, pois a formação das raízes dos terceiros molares poderiam não estar com pelo menos a metade ou dois terços formados, dificultando a obtenção de 4 mm² ou mais de tecido periodontal, e foi adotada a idade máxima de até trinta anos, pois não queríamos uma diferença de idade muito alta. Ademais, segundo o trabalho de ZHANG *et al.* (2012), doadores de 62,6 mais ou menos 6,8 anos (55,8 a 69,4 anos) tiveram a capacidade pluripotencial diminuída em relação aos pacientes doadores jovens.

Para obtenção dos fibroblastos do ligamento periodontal, optou-se pela digestão enzimática por colagenase tipo II (3 mg/ml) e dispase (1 mg/ml), ao invés do método de crescimento (explante) pois, segundo o

trabalho de TANAKA *et al.* (2011), o método por digestão produziu células com maior taxa de proliferação, quando comparadas ao método por crescimento, e ainda por ser necessário menor tempo para a obtenção das células. Já no trabalho de SONG *et al.* (2012), utilizou-se o método por crescimento e concluíram que esse método foi eficaz para a obtenção de fibroblastos.

Os fibroblastos como principais células do ligamento periodontal motivaram sua escolha como as células a serem submetidas a mecanotransdução neste experimento.

A mecanotransdução abrange a rica variedade de maneiras pelas quais as células e tecidos convertem estímulos de seu ambiente físico em sinais bioquímicos. Essas sugestões incluem a tração, os esforços de compressão e de cisalhamento, a rigidez ou o módulo de elasticidade dos tecidos nos quais residem células (ATHIRASALA, HIRSCH, BUXBOIM, 2017). Em relação à manutenção do metabolismo do osso e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, a mecanotransdução é essencial (KANG & ROBLING, 2015).

O mecanismo básico de mecanotransdução envolve a conversão de sinais mecânicos em sinais elétricos ou químicos. Nesse processo, um canal iônico bloqueado mecanicamente faz com que seja possível, por som, pressão ou movimento, causar uma mudança na excitabilidade das células sensoriais especializadas e neurônios sensoriais (GILLESPIE & WALKER, 2001; QIN & HU, 2014). A estimulação de um mecanorreceptor faz com que os canais iônicos mecanicamente sensíveis possam abrir e produzir uma corrente de transdução que altera o potencial da membrana da célula (GRIGG, 1986). Tipicamente, o estímulo mecânico é filtrado no meio de transporte, antes de chegar ao local de mecanotransdução (BISWAS, MANIVANNAN, SRINIVASAN, 2015). As respostas celulares são

variáveis, quando submetidas à mecanotransdução e dão origem a uma variedade de alterações e sensações.

Mecanotransdução é um dos vários mecanismos pelos quais as células convertem estímulo mecânico para a atividade eletroquímica (D'ANGELO *et al.*, 2011). Essa forma de transdução sensorial é responsável por uma série de sentidos e processos fisiológicos no corpo, incluindo propriocepção, tato, equilíbrio e audição (HOFFMAN, GRASHOFF, SCHWARTZ, 2011).

Nos fibroblastos oriundos do ligamento periodontal, a mecanotransdução provoca a produção e liberação de moléculas com capacidade de regular e normalizar a homeostase óssea local (KANZAKI *et al.*, 2002). Sua interpretação continua crítica para determinar respostas celulares específicas, tais como os sinais mecânicos, na redução da perda óssea, no aumento da formação óssea e a diferenciação de células osteogênicas (QIN & HU, 2014).

Devido à impossibilidade de se estudar *in vivo*, a resposta celular dos fibroblastos frente a pressão no ligamento periodontal, foram criados diferentes tipos de modelos para simular essa situação *in vitro*.

Encontramos na literatura diferentes tipos de modelos de pressão, como o utilizado por LISBOA *et al.* (2009), que empregou a força centrífuga nos fibroblastos periodontais para avaliar os níveis de atividade da metaproteinase 2. O modelo de cultura em órgão de rato, idealizado por URIBE *et al.* (20011), empregou a pressão de molas sobre dentes em mandíbulas de ratos, que após a dissecação e preparo das células, foram avaliadas. Modelos por pressão hidrostática foram usados para avaliação de fibroblastos do ligamento periodontal humano, nos trabalhos de YOUSEFIAN *et al.* (1995) e NAKAGO-MATSUO, MATSUO, NAKAGO (1996). Outro tipo de modelo, que utilizava membranas de silicone que

eram distendidas ciclicamente, foi adotado nos trabalhos de CARANO & SICILIANI (1996), BASDRA (1997) e JACOBS *et al.* (2013).

O modelo de compressão celular utilizado neste trabalho, para examinar *in vitro* a força de compressão sobre as células, foi composto por cubos de acrílico de dimensão de 2x2x2cm. O peso foi constituído por esferas de aço de 12 g e 16 g, que foram introduzidas dentro de cada cubo, criando uma carga de compressão de 3 g/cm² e 4 g/cm² respectivamente. Esses cubos foram colocados dentro das placas de seis poços. No centro de cada poço existiam 2x10⁵ células já fixadas e pré-incubadas, semelhante ao modelo de compressão utilizado no trabalho de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAJIMA *et al.* (2008). NISHIJIMA *et al.* (2006) utilizaram força compressiva de 0,5 a 3,0 g/cm² por 48 horas e NAKAJIMA *et al.* (2008) aplicaram força compressiva de 0,5 a 4,0 g/cm² por 24 horas. Esse sistema mecânico permitiu a aplicação de carga e foi utilizado neste estudo, pois encontrou-se nele a facilidade de confecção, baixo custo e grande aplicabilidade.

O modelo de compressão hidráulico composto por um sistema controlado de pressão, no qual a pressão hidráulica é regulada automaticamente, como no trabalho de NAKAGO-MATSUO, MATSUO, NAKAGO. (1996), empregou força compressiva de 20 a 50 mm de Hg. Modelos de compressão computadorizada foram utilizados no trabalho de JACOBS *et al.* (2013), no qual o estiramento estático mecânico foi de 1% a 0,7 cN/mm², 5% a 3 cN/mm² e 10% a 5,2 cN/mm², todos por 12 horas; de SAMINATHAN *et al.* (2013), que utilizaram 12% de estiramento estático mecânico por 6 horas; e de NETTELHOFF *et al.* (2015), que utilizaram 5% a 2 cN/mm² e 10% a 4 cN/mm², ambos por 12 horas. O estudo *in vitro* tem sido utilizado pela facilidade de padronização da amostra e controle preciso da tensão de CO₂, temperatura, pressão osmótica e de O₂ (SANT'ANA *et*

al., 2002). Dependendo do modelo utilizado, forças e tempos distintos foram empregados (NISHIJIMA *et al.*, 2006; LEE *et al.* 2007 e NAKAJIMA *et al.* 2008).

As cargas de 3 g/cm² e 4 g/cm² adotadas nesta pesquisa vieram do estudo piloto que foi idealizado para a obtenção de informações que não foram encontradas na literatura vigente, com a finalidade de se obter a carga e o tempo de compressão ideais para utilizar no experimento principal. Para isso, foi proposta a utilização de cargas que variavam de sem carga, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g/cm², por um período de tempo que oscilou entre 6, 12, 24 e 30 horas, para pressão em culturas celulares em monocamada, com o objetivo de verificar qual a carga e o período de tempo que produziriam a maior viabilidade celular, menor morte celular por apoptose e necrose, além de permitir a verificação do ciclo celular. O estudo piloto permitiu a observação dos seguintes fenômenos: a) em relação aos intervalos de tempo de pressão estudados, não houve diferença estatística entre si, entretanto todos foram diferentes em relação ao controle e, dessa forma, poderíamos optar por manter as células sob pressão no menor intervalo, ou seja, seis horas; b) os resultados dos grupos 3 g/cm² e 4 g/cm², respectivamente, deveriam ser considerados para o experimento principal, pois no grupo 3g/cm² os resultados ficaram muito próximos do grupo controle, mantendo assim os níveis de morte celular baixos e o nível de células viáveis mais alto; no caso do 4g/cm², observou-se uma tendência de maior necrose e menor viabilidade em relação ao grupo 3g/cm², mas nenhuma diferença em relação ao grupo de 5g/cm² e 6 g/cm², respectivamente. Como não foi possível verificar por meio do estudo piloto qual carga/área seria a mais influente no estudo principal (3g/cm² ou 4g/cm²), a estratégia adotada foi a de conduzir os experimentos com ambas,

e assim poder analisar se em uma amostra significativamente maior, esses resultados se manteriam.

Semelhantemente, o trabalho de NISHIJIMA *et al.* (2006) utilizou cargas de 0,5 g/cm² a 3 g/cm², sendo 3 g/cm² sua carga máxima e 0,5 g/cm² a mínima, passando por 1,0 g/cm² e 2,0 g/cm², o que talvez explique seu tempo de 48 horas, bem maior que as 6 horas adotadas no presente estudo. No trabalho de NAKAJIMA *et al.* (2008) utilizaram-se cargas de 0,5 a 4,0 g/cm² com tempo de 24 horas, novamente tempos maiores, porém com cargas iguais ou menores, quando comparadas ao trabalho aqui realizado.

Quanto à expressão do antígeno de superfície utilizado em imunologia e hematologia (imunofenotipagem) para identificação celular, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propôs que as células deveriam expressar uma taxa maior ou igual a 95% das seguintes *cluster designations* (CD): CD105 (conhecido como endoglina), CD73 (conhecido como ecto 5' nucleotidase) e CD90 (conhecido como Thy-1), bem como que novos marcadores de superfície poderiam ser identificados no futuro e levar a modificações desses critérios.

Na pesquisa feita, os fibroblastos foram caracterizados apenas por meio da imunofenotipagem para avaliação da sua capacidade de marcação, isto é, como esses fibroblastos reagiram com esse tipo de marcação. Foram utilizados seis marcadores de membrana (CD): dois para marcação de células sanguíneas, CD16 e CD31, o primeiro com especificação para neutrófilos e leucócitos, e o segundo para plaquetas e células endoteliais; dois CDs para marcação de células hematopoiéticas, CD34 e CD45; e, por fim, mais dois CDs para marcação de células mesenquimais, CD73 e CD105. Tivemos expressão maior que 95% no CD73 e expressão em torno de 45% no CD105. Esse resultado inferior a 95% foi encontrado também

no estudo de NAGATOMO *et al.* (2006), com expressão de 27% em MSC do ligamento periodontal, SILVERIO *et al.* (2010), que obtiveram a expressão de 11,06% em MSC do ligamento periodontal em adultos, e VASANDAN *et al.* (2013), para MSC do ligamento periodontal em torno de 6,13%. NAGATOMO *et al.* (2006) sugeriram que essa baixa expressão positiva poderia estar relacionada às células que estão em direção ao processo de diferenciação osteogênica. Os outros dois autores explicaram a baixa expressão positiva do CD105 pelo método utilizado, porém tivemos 95% de marcação para o CD73, característico de células mesenquimais.

Os resultados obtidos neste trabalho foram a expressão menor que 5% em relação ao CD16 característico para células sanguíneas, CD31 característico para células endoteliais e plaquetas, CD34 e CD45, característicos para células hematopoiéticas.

No trabalho realizado, utilizou-se um marcador de células tumoral para marcação dos fibroblastos do ligamento periodontal cultivados sob pressão estática contínua, pois as propriedades funcionais das células residentes no tecido para seu isolamento prospectivo, independentemente da expressão do marcador de superfície celular, foram intensamente testadas, já que os epitopos da superfície celular podem variar com o estado metabólico da célula, as condições experimentais utilizadas e as sucessivas passagens das células cultivadas *in vitro* (GINESTIER *et al.*, 2007; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010; ROEHRICH *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

Vários estudos utilizaram diferentes marcadores para identificação das células do ligamento periodontal, como no trabalho de FUJITA *et al.* (2007), que utilizaram um marcador genético molecular a apolipoproteína D; JO *et al.* (2007), que utilizaram o STRO-1 para identificação das células do ligamento periodontal de camundongos; e ROGULJIC *et al.* (2013), que

utilizaram a alfa actina de músculo liso associado ao sistema cremoxifeno induzível.

O marcador tumoral escolhido foi o aldeído desidrogenase, conhecido como ALDH, que é uma enzima citosólica que participa da oxidação intracelular, convertendo principalmente o retinol em ácido retinoico, a vitamina A; encontrado com marcação positiva na fase final de diferenciação das células, é um marcador da fase final do estágio indiferenciado (DOUVILLE, BEAULIEU, BALICKI, 2009).

O ALDH marca células com grande capacidade de diferenciação, como é a célula tumoral (JIANG *et al.*, 2009; TOMITA *et al.*, 2016). Pesquisas relataram o uso do ALDH como marcador de células tumorais e saudáveis de vários tecidos, como no trabalho de GINESTIER *et al.* (2007), que utilizaram células mamárias normais e malignas, JIANG *et al.* (2009), que utilizaram células do tecido pulmonar, e ROEHRICH *et al.* (2013), com células cardíacas.

Observou-se que a expressão de ALDH na marcação de células cultivadas sob pressão no modelo apresentado neste trabalho teve alteração quando comparada à marcação do grupo controle que não foi submetido a carga. Quando se compararam os grupos de 3 g/cm² e 4 g/cm² com o grupo controle, que não estava sob compressão, a quantidade de células marcadas diminuiu. Obtiveram-se no grupo controle taxas de células marcadas por ALDH no valor de 5,33% de média e 5,58% de mediana e, no grupo experimental, de 3 g/cm², 1,04% de média e 1,00 de mediana. Diminuiu também no grupo experimental de 4 g/mm², com 2,38% de média e 2,49% de mediana, ambos os grupos com diferença estatística para com o grupo controle. Percebemos que a compressão diminuiu a quantidade de células marcadas, porém o aumento de carga não correspondeu a uma diminuição maior da quantidade de células marcadas, e não houve uma correlação

entre o aumento de carga e a diminuição de células marcadas, com diferença estatística entre os grupos 3g/cm^2 e 4g/cm^2 . Uma tentativa de explicação para tal fenômeno poderia ser que o valor da carga de 3g/cm^2 estaria no final de uma curva e que valores acima dele tenderiam a não diminuir tanto o número de células marcadas ou a iniciarem uma resposta diferente. De qualquer forma, abre uma perspectiva para avaliação de novos estudos, com maiores valores de carga. Esses resultados contrariam os resultados obtidos no trabalho de NAKAJIMA *et al.* (2008) que correlacionaram o aumento de carga à maior expressão de fator-2 de crescimento de fibroblasto e RANKL, mas corrobora os resultados obtidos no trabalho de NISHIJIMA *et al.* (2006), que obtiveram expressão crescente de RANKL nas cargas de 0,5, 1,0, 1,5 e $2,0\text{g/cm}^2$, e diminuição da expressão na carga de 3g/cm^2 , quando comparado à carga de 2g/cm^2 .

O presente estudo utilizou o ALDH e a citometria de fluxo para a marcação dos fibroblastos do ligamento periodontal.

Os ensaios baseados na atividade de ALDH foram descritos para isolar células-tronco murinas e humanas de vários tecidos e órgãos (MOREB *et al.*, 2008; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010; MA & ALLAN, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). A atividade de ALDH é eficaz como marcador celular de células tumorais e não tumorais, como demonstrado em vários tipos de tecidos (GINESTIER *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2009). No presente trabalho, avaliou-se a marcação das células do ligamento periodontal com ALDH e conseguiu-se quantificar em porcentagem, nos grupos estudados. O meio de detecção utilizado foi a citometria de fluxo, mas outros métodos podem ser utilizados, como o imuno-histoquímica, *Western blotting* e microscopia de fluorescência, tornando a marcação celular por ALDH uma ferramenta poderosa para a detecção de células indiferenciadas ou não e caracterização em muitos tecidos.

Dado o fato de que há muito pouco consenso em marcadores de superfície de células nos vários tipos de tecidos, a adoção de marcadores de células baseados em propriedades intrínsecas, em vez de fenótipo, seria inestimável para o campo de pesquisa (DOUVILLE, BEAULIEU, BALICKI, 2009).

Como perspectiva para novos estudos baseados nessa linha de pesquisa adotada, podemos identificar e avaliar a subpopulação celular marcada com ALDH de fibroblastos do ligamento periodontal e indicar a avaliação de diferentes cargas e tempos.

7 CONCLUSÃO

7. Conclusão

A população de fibroblastos periodontais humanos marcados com ALDH diminuiu quando da aplicação de carga.

8 REFERÊNCIAS

Andersen KL, Norton LA. A Device for the application of known simulated orthodontic forces to human cells in vitro. *J Biomech.* 1991; 24(7):649-54.

Athirasala A, Hirsch N, Buxboim A. Nuclear mechanotransduction: sensing the force from within. *Curr Opin Cell Biol.* 2017 Jun;46:119-127.

Basdra EK. Biological reactions to orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop.* 1997;58(1):2-15.

Biswas A, Manivannan M, Srinivasan MA. Vibrotactile sensitivity threshold: nonlinear stochastic mechanotransduction model of the Pacinian corpuscle. *IEEE Trans Haptics.* 2015 Jan-Mar;8(1):102-13.

Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 1997 Feb;19(1):29-37.

Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of “stemness”. *Exp Hematol.* 2004 Jul;32(7):585-98.

Carano A, Siciliani G. Effects of continuous and intermittent forces on human fibroblast in vitro. *Eur J Orthod.* 1996 Feb;18(1):19-26.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3213-8.

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

De Abreu R A M, Pereira MD, Furtado F, Prado GPR, Mestriner W, Ferreira, LM. Masticatory efficiency and bite force in individuals with normal occlusion. *Arch Oral Biol*. 2014 Oct;59(10):1065-74.

De Souza BD, Bortoluzzi EA, Reyes-Carmona J, Dos Santos LG, Simões CM, Felipe WT, Felipe MC. Effect of temperature and seven storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol*. 2017;33(2):100-5.

Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jan-Feb;18(1):17-25.

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

Fujita T, Iwata T, Shiba H, Igarashi A, Hirata R, Takeda K, Mizuno N, Tsuji K, Kawaguchi H, Kato Y, Kurihara H. Identification of marker genes distinguishing human periodontal ligament cells from human mesenchymal stem cells and human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2007 Jun; 42(3): 283-6.

-
- Gasparetto M, Sekulovic S, Zakaryan A, Imren S, Kent DG, Humphries RK, Vasiliou V, Smith C. Varying levels of aldehyde dehydrogenase activity in adult murine marrow hematopoietic stem cells are associated with engraftment and cell cycle status. *Exp Hematol*. 2012 Oct;40(10):857-66.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007 Aug;10(3):149-60.
- Gillespie PG, Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):194-202.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer C, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
- Grigg P. Biophysical studies of mechanoreceptors. *J Appl Physiol* (1985). 1986 Apr;60(4):1107-15.
- Heckler AF, Mirzaei Z, Pereira I, Simmons CA, Gong SG. Development of a three-dimensional in vitro model system to study orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1498-510.

Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):316-23.

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 Jul;58(7):896-904.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. Aldehyde Dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009 Mar;7(3):330-8.

Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 2007 Apr;13(4):767-73.

Kang KS, Robling AG. New insights into Wnt-Lrp5/6- β -Catenin signaling in mechanotransduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Jan 20;5:246.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002 Feb;17(2):210-20.

Kook SH, Jang YS, Lee JC. Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF- α -mediated activation of CD 4 + T cells. *J Cell Biochem*. 2011 Oct;112(10):2891-901.

-
- Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS, Nör JE. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(23):9969-78.
- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Apr;129(4):469.e1-32.
- Lee W, Stover S, Raoulianboroujeni M, Sherman K, Fahimipour F, Dashtimoghadam E, Zito C, Jazayeri HE, Tayebi L. The efficacy of commercial tooth storage media for maintaining the viability of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2018 Jan;51(1):58-68.
- Lee YH, Nahm DS, Jung YK, Choi JY, Kim SG, Cho M, Kim MH, Chae CH, Kim SG. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):446-52.
- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):327-41.
- Li Y, Li M, Tan L, Huang S, Zhao L, Tang T, Liu J, Zhao Z. Analysis of time-course gene expression profiles of a periodontal ligament tissue model under compression. *Arch Oral Biol.* 2013 May;58(5):511-22.

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

Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011 Jun;7(2):292-306.

Machado CV, Passos ST, Campos TMC, Bernardi L, Vilas-Bôas DS, Nör JE, Telles PDS, Nascimento IL. The dental pulp stem cell niche based on a aldehyde dehydrogenase 1 expression. *Int Endod J.* 2016 Aug;49(8):755-63.

Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C, Staszyc C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet Res.* 2011 Aug 2;7(42):1-13.

Moreb JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr StemCell Res Ther.* 2008 Dec;3(4):237-46.

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 Apr;43(2):168-73.

Nakago-Matsuo C, Matsuo T, Nakago T. Intracellular calcium response to hydraulic pressure in human periodontal ligament fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Mar;109(3):244-8.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006 Aug;41(4):303-10.

Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J, Wehrbein H. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2015 Apr;20(3):621-9.

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(2):63-70.

Qin YX, Hu M. Mechanotransduction in musculoskeletal tissue regeneration: effects of fluid flow, loading, and cellular-molecular pathways. *Biomed Res Int.* 2014;2014:863421.

Roehrich ME, Spicher A, Milano G, Vassalli G. Characterization of cardiac-resident progenitor cells expressing high aldehyde dehydrogenase activity. *Biomed Res Int.* 2013;2013:503047.

Roguljic H, Matthews BG, Yang W, Cvija H, Mina M, Kalajzic I. In vivo identification of periodontal progenitor cells. *J Dent Res*. 2013 Aug;92(8):709-15.

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

Sant'Ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Culture and characterization of human derived periodontal ligament cells. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002;10(3):134-40.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CW, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010; 81(8): 1207-15.

Song M, Kim H, Choi Y, Kim K, Chung C. Skeletal myogenic differentiation of human periodontal ligament stromal cells isolated from orthodontically extracted premolars. *Korean J Orthod*. 2012 Oct;42(5):249-54.

Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y.

Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol.* 2011 Apr;56(4):380-8.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016 Mar 8;7(10):11018-32.

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

Early effects of orthodontics forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. *Angle Orthod.* 2011 Mar;81(2):284-91.

Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, Sowmya Jahnvi V, Bhonde RR,

Jyothi Prasanna S. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *J Cell Mol Med.* 2013 Feb;18(2):344-54.

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 Oct;108(4):402-9.

Zhang J, An Y, Gao LN, Zhang YJ, Jin Y, Chen FM. The effect of aging

on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials.* 2012;33(29):6974-86.

Zhang L, Wang L, Liu X, Zheng D, Liu S, Liu C. ALDH expression characterizes G1-phase proliferating beta cells during pregnancy. PLoS One 2014 May 2;9(5):e96204.

NORMAS ADOTADAS

ISO TC 150/SC/7. Tissue-engineered medical products.

ASTM F2150-13. Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds used in tissue-engineered medical products.

Descritores em ciências da saúde: DeCS [Internet]. ed. 2017. São Paulo (SP): Bireme / OPAS / OMS. [atualizado 20017 Mai; citado 2017 Jun 13]. Disponível em: <<http://decs.bvssalud.org>>.

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss. Versão Monousuário 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]. Disponível em: <<http://www.icmje.org>>.

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

Ferreira LM et al. Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático. Edição, organização e coordenação de Lydia Masako Ferreira. São Paulo: Red Publicações; 2017.

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. ed. Rio de Janeiro (BR): Medsi; 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Estudo Piloto

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

Foram formados os seguintes grupos experimentais:

Experimento

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

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

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

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

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

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

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

Resultados

Avaliação da apoptose

Os Quadros 1, 2 e 3 apresentam os valores encontrados da porcentagem de apoptose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificados por citometria de fluxo utilizando o *kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore), para os pacientes 1, 2 e 3 respectivamente:

Quadro 1 – Valores da porcentagem de apoptose celular – Paciente 1

	2D				
	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

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

Quadro 2 – Valores da porcentagem de apoptose celular – Paciente 2

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

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

Quadro 3 – Valores da porcentagem de apoptose celular – Paciente 3

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

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

Avaliação da necrose

Os Quadros 4, 5 e 6 apresentam os valores encontrados da porcentagem de necrose celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificados por citometria de fluxo utilizando o *kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore), para os pacientes 1, 2 e 3 respectivamente:

Quadro 4 – Valores da porcentagem de necrose celular – Paciente 1

	2D				
	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

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

Quadro 5 – Valores da porcentagem de necrose celular – Paciente 2

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0,1	2,60	3,10	3,50	3,30
G1		2,70	3,50	3,70	3,20
G2		3,00	3,40	3,70	3,10
G3		3,10	3,60	3,50	3,40
G4		4,75	4,80	4,90	4,95
G5		4,90	4,80	4,95	4,90
G6		4,90	4,80	4,90	4,85

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

Quadro 6 – Valores da porcentagem de necrose celular – Paciente 3

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	0,1	2,60	2,90	3,40	3,70
G1		2,60	3,10	3,70	3,80
G2		2,70	3,30	3,60	3,90
G3		2,90	3,50	3,50	3,50
G4		4,10	3,95	4,90	4,90
G5		4,40	4,15	4,85	4,85
G6		4,60	4,48	4,90	4,90

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

Avaliação da viabilidade celular

Os Quadros 7, 8 e 9 apresentam os valores encontrados da porcentagem da viabilidade celular na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificados por citometria de fluxo utilizando o *kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore), para os pacientes 1, 2 e 3 respectivamente:

Quadro 7 – Valores da porcentagem da viabilidade celular – Paciente 1

	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

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

Quadro 8 – Valores da porcentagem da viabilidade celular – Paciente 2

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

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

Quadro 9 – Valores da porcentagem da viabilidade celular – Paciente 3

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

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

Avaliação do ciclo celular

Fase sub-G0

Os Quadros 10, 11 e 12 apresentam os valores encontrados da porcentagem do ciclo celular, fase sub-G0, na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificados por citometria de fluxo utilizando o *kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore), para os pacientes 1, 2 e 3 respectivamente:

Quadro 10 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase sub-G0 – Paciente 1

	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

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

Quadro 11 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase sub-G0 – Paciente 2

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	11,54	17,54	25,81	25,01	25,78
G1		33,34	34,86	36,60	32,50
G2		38,65	27,90	27,69	43,22
G3		40,65	29,65	30,87	30,77
G4		41,67	37,08	35,08	35,56
G5		46,98	39,28	37,65	38,65
G6		57,09	50,94	49,08	56,87

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

Quadro 12 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase sub-G0 – Paciente 3

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

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

Fase G0-G1

Os Quadros 13, 14 e 15 apresentam os valores encontrados da porcentagem do ciclo celular, fase G0-G1, na cultura de fibroblastos periodontais no modelo de compressão verificados por citometria de fluxo utilizando o *kit* Guava Nexin (Millipore) no citômetro Guava (Millipore), para os pacientes 1, 2 e 3 respectivamente:

Quadro 13 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase G0-G1 – Paciente 1

	2D				
	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

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

Quadro 14 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase G0-G1 – Paciente 2

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	64,65	42,45	54,87	43,21	43,76
G1		42,45	53,65	43,76	54,87
G2		47,68	42,34	41,89	56,91
G3		47,46	56,74	60,02	55,43
G4		51,23	53,65	61,21	53,64
G5		38,36	57,98	50,00	54,67
G6		57,92	56,84	61,43	54,84

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

Quadro 15 – Valores da porcentagem do ciclo celular, fase G0-G1 – Paciente 3

	2D				
	0h	6h	12h	24h	30h
GC	62,87	41,65	42,34	49,27	53,85
G1		41,67	43,76	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	57,43	56,98

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

O estudo piloto foi idealizado para a obtenção de informações que não foram encontradas na literatura vigente, com a finalidade de se obter a carga e o tempo de compressão ideais para utilizar no experimento principal. Para isso, foi proposta a utilização de cargas que variavam de sem carga, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g/cm², por um período de tempo que oscilou entre 6, 12, 24 e 30 horas, tanto para pressão em culturas celulares em monocamada, como em culturas celulares usando o substrato de colágeno, com o objetivo de verificar qual a carga e o período de tempo que produziriam a maior viabilidade celular, menor morte celular por apoptose e necrose, além de permitir a verificação do ciclo celular. O estudo piloto permitiu a observação dos seguintes fenômenos: a) em relação aos intervalos de tempo de pressão estudados, não houve diferença estatística entre si, entretanto todos foram diferentes em relação ao controle, e dessa forma poderíamos optar por manter as células sob pressão 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 do estudo piloto qual carga/área seria a mais influente no estudo principal (G3 ou G4), a estratégia adotada foi a de conduzir os experimentos com ambas, e assim poder analisar se em uma amostra significativamente maior, esses resultados se manteriam.

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1 – Título do projeto: Fibroblastos periodontais humanos cultivados sob compressão estática contínua e marcados com aldeído desidrogenase.

2 – Tipo de estudo: experimental “*in vitro*” (em laboratório), com o objetivo de avaliar a proliferação e diferenciação de células, no caso fibroblastos (células) do ligamento periodontal, que é o tecido que sustenta o dente dentro do osso da mandíbula e da maxila.

Nós gostaríamos de convidar você a participar voluntariamente desta pesquisa, a qual tem por objetivo obter informações importantes para um entendimento melhor do cultivo de fibroblastos periodontais, que são células presentes na pele e na gordura do corpo humano, e que podem de alguma maneira ajudar no tratamento e na recuperação do tecido ósseo humano.

3 – O seu ato operatório transcorrerá normalmente, sem nenhuma alteração, nenhum prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será coletado o tecido que for retirado durante a cirurgia e que seria desprezado (porque já não tem mais utilidade), para ser enviado ao Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp/EPM.

4 – Não existem desconfortos e riscos ao paciente.

5 – Não há benefício direto para o participante.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Fabio Schemann Miguel, que pode ser encontrado no endereço: Rua Pedro de Toledo, 781, 11º andar, frente, Tel. 5579-2583. Se você tiver alguma sugestão ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu,

572, 1º andar, cj 14; Tel.: 5571-1062; Fax: 5539-7162; e-mail: cepunifesp@epm.br

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

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

9 – É assegurado a todos os pacientes o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, bastando para isso que entre em contato com Fabio Schemann Miguel no endereço: Rua Pedro de Toledo, 781 – 11 andar, frente, Tel. 5579.2583.

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Modelo de Compressão Estática Contínua em Células-tronco Mesenquimais Adultas Derivadas do Ligamento Periodontal Adulto Humano”.

Eu discuti com Fabio Schemann Miguel sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claras para mim quais são as intenções do

estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse 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, semianalfabetos 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 desse paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___ / ___ / ___

APÊNDICE 3 – Aprovação do CEP da Unifesp

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MODELO DE COMPRESSÃO ESTÁTICA CONTÍNUA EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS DERIVADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL ADULTO HUMANO.

Pesquisador: FABIO SCHEMANN MIGUEL

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18181813.0.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 411.270

Data da Relatoria: 04/10/2013

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer do CEP. 347570 DE 2/8/2013

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer do CEP. 347570 DE 2/8/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer do CEP. 347570 DE 2/8/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer do CEP. 347570 DE 2/8/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer do CEP. 347570 DE 2/8/2013

Recomendações:

NA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias colocadas:

1) EXCLUIR na PB o item: "Área Temática Especial Área 5. Novos procedimentos ainda consagrados

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 411.270

na literatura", pois o estudo não necessita de envio à CONEP para análise.

RESPOSTA: O pesquisador fez a adequação e o estudo foi retirado da área temática especial.

PENDENCIA ATENDIDA.

2)Apresentar carta de ciência e concordância com o estudo do responsável pelo ambulatório odontológico do Hospital Municipal de Urgência de Guarulhos.

RESPOSTA: carta apresentada de forma adequada.

PENDENCIA ATENDIDA.

PROJETO APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Fpo solicitado parecer "ad referendum" deste estudo em virtude das pendencias serem apenas administrativas e terem sido atendidas de forma adequada. O projeto pode ser aprovado.

SAO PAULO, 01 de Outubro de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

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

FONTES CONSULTADAS

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(Suppl 2):2-9. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci_arttext>.

Nahas FX, Ferreira LM. A arte de redigir um trabalho científico. Acta Cir Bras. 2005;20(Suppl 2):17-8. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502005000800005>.