

ANDRÉA BAPTISTA C. DE FARIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE RANK/RANKL/OPG EM
UMA CULTURA TRIDIMENSIONAL DE
FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS EM
MEMBRANAS DE QUITOSANA E XANTANA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo

2019

ANDRÉA BAPTISTA C. DE FARIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE RANK/RANKL/OPG EM
UMA CULTURA TRIDIMENSIONAL DE
FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS EM
MEMBRANAS DE QUITOSANA E XANTANA**

Orientador: Prof^{ta}. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

Coorientador: Prof. Antonio Carlos Aloise

São Paulo

2019



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



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

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

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

FICHA CATALOGRAFA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **NELSON BAPTISTA JUNIOR e JANETE AP. GIANESE BAPTISTA**, pelo amor incondicional e pela criação sólida em valores éticos e morais muito bem fundamentados.

Ao meu marido, **ANDRE COELHO DE FARIA**, pelo apoio neste momento importante, compreensão pelas noites mal dormidas, ausências e pelo estímulo para que continuasse adiante, sem desanimar.

Aos meus filhos, **CAUÃ BAPTISTA COELHO DE FARIA e LUCCA BAPTISTA COELHO DE FARIA**, por me fazerem querer ser um ser humano melhor e por entenderem minhas ausências quando o que eles mais queriam era passar os finais de semana comigo.

Aos meus sogros, **ANTONIO CARLOS COELHO DE FARIA e ROSEMARY RAMINELLI BUENO COELHO DE FARIA** pelo apoio e pelo suporte em ficar com meus filhos quando não podíamos estar com eles.

Aos meus irmãos, **EDUARDO ALEXANDRE BAPTISTA e NELSON BAPTISTA NETTO**, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À **Prof.a. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Coordenadora do Laboratório de Cirurgia Translacional 11º andar do Edifício de Pesquisa 1, orientadora deste projeto, um exemplo de pesquisadora, pela oportunidade e confiança depositada em minha pessoa para a execução deste trabalho.

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica e Coorientador – UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, que foi um verdadeiro mestre neste projeto, sendo paciente e determinado em nos guiar. Mostrando sempre a sua paixão pela ciência.

Aos meus amigos, colegas de pesquisa e parceiros de viagem **FABIO ALESSANDRO SIMÕES**, **ELLEN CRISTINA FAGNANI** e **FERNANDO BIOLCATI CHIANTIA**, pela amizade, incentivo apoio, compreensão, dedicação e paciência para que este trabalho se tornasse realidade.

Aos colegas de laboratório e **PÓS GRADUAÇÃO MATEUS ABREU PEREIRA**, **ANDREA CASTILHO SOARES DE AZEVEDO**, **FÁBIO SCHEMANN-MIGUEL**, **MARCO ANTONIO MATTAR** *in memoriam*, pela convivência, o aprendizado e pelos bons momentos compartilhados durante as apresentações nas reuniões do Laboratório de Cultura de Células às segundas-feiras.

A todos os professores e demais alunos do Programa de PÓS GRADUAÇÃO em Cirurgia Translacional pelas colaborações durante as apresentações nas reuniões da PG.

Às secretárias do programa de PÓS GRADUAÇÃO **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pelo carinho e empenho e paciência com que tratam os pós graduandos deste programa.

*Ontem não é nosso para recuperar, mas o amanhã é nosso para ganhar ou
perder.....*

(Lyndon B Johnson)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA.....	IX
RESUMO.....	XI
<i>ABSTRACT</i>.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	04
3 LITERATURA.....	06
4 MÉTODO.....	17
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS.....	50
FONTES CONSULTADAS.....	59
NORMAS ADOTADAS.....	61
APÊNDICE.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Solução de quitosana adicionada à solução de ácido acético...	22
Figura 02 – Goma xantana adicionada à água.....	24
Figura 03 – Solução de quitosana em solução de ácido acético adicionada à solução aquosa de xantana com o Pluronic® F127.....	25
Figura 04 – Membranas acondicionadas nas placas de poliestireno e levadas à estufa para secagem final.....	26
Figura 05 – Membrana de Quitosana e Xantana adaptada no fundo da placa de seis poços.....	28
Figura 06 – Cilindro de aço inoxidável de 48g/cm ² aplicado sob a cultura 3D.....	28
Figura 07 – Modelo de Compressão Estática usado nos grupos experimentais GE1, GE2 , GE3 e GE4.....	30
Figura 08 – Espectrofotômetro NanoDrop para determinar a concentração e o grau de pureza do RNA.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

LPH	ligamento periodontal humano
PBS	Phosphate buffered saline
2D	Cultura celular em monocamada
3D	Cultura celular tridimensional
RT-PCR	Real Time Polimerase Reação em Cadeia
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Receptor ativador de fator nuclear κ B
RANKL	Receptor ativador de fator nuclear κ B Ligante

RESUMO

Introdução: O cultivo de fibroblastos do ligamento periodontal, associada à simulação de cargas de compressão ou tensão sobre a célula, permite analisar as modificações na sua morfologia e identificar a expressão de proteínas e moléculas. O sistema formado pelas proteínas receptor ativador de fator nuclear κ B (RANK), receptor ativador de fator nuclear κ B Ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) está diretamente ligado à remodelação óssea, na formação e reabsorção do tecido ósseo. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica de RANK/RANKL e OPG na cultura tridimensional de fibroblastos periodontais humanos em membranas de quitosana e xantana. **Método:** Foram utilizados fibroblastos periodontais humanos imortalizados. As células foram distribuídas em dois grupos: Grupo Controle (GC), com cultivo tridimensional sem aplicação de carga durante 6h e Grupo Experimental (GE1, GE2, GE3 e GE4), com cultivo tridimensional com aplicação de carga de 4, 12, 24, e 48g/cm² respectivamente durante 6h. O RNAm das células foi extraído de todos os grupos e avaliados pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real PCR por sonda TaqMan. **Resultados:** Não houve a expressão de RANK/RANKL, mas houve a expressão de OPG, tendo sido significativamente maior no GE2 em comparação GC, GE1, GE3 e GE4. **Conclusão:** A carga de 12g/cm² por 6 horas em cultura tridimensional de fibroblastos periodontais apresentou maior expressão de OPG.

ABSTRACT

Introduction: The cultivation of periodontal ligament fibroblasts, associated with the simulation of compression loads or tension on the cell, allows to analyze the changes in its morphology and to identify the expression of proteins and molecules. The system formed by kB nuclear factor activating receptor (RANK) proteins, kB nuclear factor activating receptor (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) proteins are directly linked to bone remodeling, bone formation and resorption. **Objective:** To evaluate RANK/RANKL and OPG gene expression in three-dimensional human periodontal fibroblasts culture in chitosan and xanthan membranes. **Method:** Immortalized human periodontal fibroblasts were expanded, cells were divided into two groups: Control Group (CG), with three-dimensional culture without load application for 6h and Experimental Group (GE1, GE2, GE3 and GE4), with culture three-dimensional with load application of 4, 12, 24, and 48 g/cm² for 6h. Cell mRNA was extracted from all groups and evaluated by the TaqMan Probe Real Time Polymerase Chain Reaction method. **Results:** There was no expression of RANK/RANKL, but there was expression of OPG, being significantly higher in GE2 compared to GC, GE1, GE3 and GE4. **Conclusion:** The load of 12g/cm² for 6 hours in three-dimensional periodontal fibroblast culture showed higher OPG expression.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tratamento ortodôntico induz reações orquestradas dos tecidos periodontais em resposta à força física. Para que o dente se movimente dentro do alvéolo, metabolismos ósseos ocorrem simultaneamente no ligamento periodontal, levando a reabsorção óssea no lado de compressão e formação óssea no lado de tensão. Esse fenômeno é chamado de mecanotransdução. A mecanotransdução é interpretada como estímulo mecânico aplicado sobre tecidos e traduzida em sinais bioquímicos (KANG *et al.*, 2013).

O ligamento periodontal é um tecido funcional único que suporta os dentes com espessura média de 0,25mm, variando entre 0,2 e 0,4mm, mantém a integridade do tecido periodontal e modulam as forças externas, como forças oclusais. Porém, quando forças ortodônticas extremas são aplicadas aos dentes nem sempre pode ser mantida a integridade dos tecidos envolvidos (KANG *et al.*, 2013). A função do ligamento periodontal é dissipar as cargas que são exercidas sobre o elemento dental. Em dentes anquilosados, o ligamento periodontal está ausente e o cemento radicular está ligado diretamente com osso alveolar. Os cementoblastos da superfície radicular não possuem receptores para mediadores da remodelação óssea, e quando submetidos ao estresse, poderá levar à reabsorção radicular, por falta do ligamento periodontal (KANZAKI *et al.*, 2002). Portanto é necessário se criar um ambiente tridimensional (3D) simulando um modelo tecidual de ligamento periodontal, como ocorre *in vivo*, matriz extracelular (MEC) uma estrutura complexa, onde as células se proliferam e se diferenciam no organismo vivo.

Para que um arcabouço ou substrato tridimensional (3D) se aproxime de um ambiente *in vivo* é necessário permitir a adesão celular, o contato

célula-célula e permita a expressão do fenótipo esperado (KANG *et al.*, 2013).

A técnica de cultura permite a análise de situações e características próximas daquelas que ocorrem *in vivo*. Dentre as vantagens da cultura celular, pode-se citar a utilização de parâmetros fixos como o controle de temperatura, nível de oxigênio, osmolaridade, controle de pH e do CO₂ (SANT'ANA *et al.*, 2002). As células proliferam e se diferenciam no organismo estando aderidas a um micro ambiente tridimensional (3D) conhecido (MEC).

A MEC é formada a partir de componentes sintetizados e depositados no exterior da superfície celular (colágenos, glicoproteínas e proteoglicanas) os quais fornecem integridade estrutural e funcional para os tecidos conjuntivos e órgãos (DALEY *et al.*, 2008; CHEN & JIN, 2010). A Cultura celular utilizando um arcabouço ou um substrato tridimensional (3D), tem sido utilizada para estabelecer um sistema de cultura que mimetize as interações entre células e MEC, como ocorre *in vivo* (LI *et al.*, 2011; VARONI *et al.*, 2018).

Estudos que avaliaram os eventos celulares na osteoclastogênese, utilizaram como instrumento de análise precisa a técnica de reação em cadeia (PCR). Esta técnica revolucionou as pesquisas em biologia molecular, e é possível obter parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a sequência, que é alvo do estudo (ROMER *et al.*, 2009, LI *et al.*, 2011).

A cultura tridimensional tem a finalidade de promover a propagação celular por meio do uso de suportes de matriz 3D. Este modelo de estudo envolvendo a mecanotransdução, por meio da compressão contínua de células, permite analisar as modificações na sua morfologia e identificar a expressão de proteínas e moléculas .

Introdução

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar a expressão gênica de RANK/RANKL/OPG na cultura tridimensional de fibroblasto periodontal humano em membranas de quitosana e xantana

3 LITERATURA

3 LITERATURA

NISHIJIMA *et al.* (2006) avaliaram os níveis de RANKL e OPG no fluido crevicular gengival (FCG) durante a movimentação ortodôntica e os efeitos da força de compressão sobre as células do ligamento periodontal humano *in vitro*. Dez pacientes adolescentes com tecidos periodontais saudáveis foram incluídos no estudo. O fluido crevicular gengival foi coletado nas margens cervicais distais do GE (canino superior direito) e nas margens cervicais distais do GC (canino superior esquerdo) no tempo de 0, 1, 24 e 168 horas após a força de retração aplicada. Já no estudo *in vitro* as células do ligamento periodontal humano foram extraídas de raízes de pré-molares de seis pacientes. Foi realizada a força de compressão (0, 0.5, 1, 2 e 3g/cm²) por 48 horas sob as células do ligamento periodontal humano. Os autores observaram no FCG, que níveis de RANKL foram significativamente maiores quando comparados aos níveis de OPG. Já no estudo *in vitro*, a força de compressão aumentou significativamente a secreção de RANKL e diminuiu a secreção de OPG em células do ligamento periodontal humano em um tempo e força dependente da magnitude.

NAKAO *et al.* (2007) estudaram a força de compressão intermitente no tratamento ortodôntico. Avaliaram o mecanismo molecular em células do ligamento periodontal de humanos (hPDL) estimulados por uma força intermitente. Células do hPDL foram submetidas a uma força de compressão (2,0 ou 5,0 g /cm²) durante 2 a 4 dias. Forças contínuas ou intermitentes foram aplicadas durante todo o dia ou durante 8 horas por dia, respectivamente. No terceiro e quarto dia, o dano celular foi menor com

força intermitente do que com força contínua. No quarto dia, expressões de RANKL e IL-1 β foram maiores com forças intermitentes do que com força contínua. Um antagonista do receptor de IL-1 inibiu a expressão de RANKL induzida por força compressiva. Estes resultados indicaram que a IL-1 β é um fator autócrino de regulação de compressão expressão induzida por RANKL em células PDL, e que a força intermitente pode efetivamente induzir a expressão de RANKL em células PDL com menor dano celular.

NAKAJIMA *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da força de compressão sob o Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 e a produção de RANKL nas células do ligamento periodontal humano *in vitro*. A força de compressão (0.5 a 4g/cm²) foi aplicada sob as células do ligamento periodontal de 0-24 horas. As quantidades de RANKL e FCF-2 foram medidas por ELISA e por PCR, e foram determinados os níveis de RNAm. Para medir a liberação de RANKL e FCF-2 por ELISA foi adicionado ao meio de cultura Fator de Crescimento anti-fibroblastos. Concluíram que a força de compressão induziu maiores níveis de RANKL e FCF-2 de maneira dependente do tempo e carga, porém quando adicionado fator de crescimento anti-fibroblastos, a expressão de RANKL foi inibida.

YAMAGUCHI *et al.* (2009) estudaram a movimentação ortodôntica descrevendo que a mesma é induzida por estímulos mecânicos e facilitada pela remodelação do ligamento periodontal (LPD) e osso alveolar. Uma pré-condição para estas atividades de remodelação, e, finalmente, para o deslocamento do dente, é a ocorrência de um processo inflamatório. Esta avaliação abrangeu o conhecimento sobre o papel do receptor ativador de

Literatura

fator nuclear κ B (RANK), do receptor ativador de fator nuclear- κ B ligante (RANKL), e a osteoprotegerina (OPG) nas reações dos tecidos periodontais, em resposta às forças ortodônticas. Foi descoberto que as concentrações de RANKL no fluido crevicular gengival (FCG) aumentaram durante o movimento ortodôntico, e a proporção de concentração de RANKL para a de OPG no FCG foi significativamente maior do que em locais de controle. Foi demonstrado *in vivo* a presença de RANKL e RANK em tecidos periodontais durante a movimentação dentária experimental de molares de ratos, e que as células do PDL sob estresse mecânico podem induzir a osteoclastogênese através de regulação positiva da expressão de RANKL durante a movimentação ortodôntica.

KOOK *et al.* (2009) estudaram o potencial osteoclastogênico da força mecânica nos fibroblastos do ligamento periodontal mediados pela osteoprotegerina. Os autores compararam a capacidade do fibroblasto periodontal em estimular a diferenciação osteoclástica de monócitos retirados da medula óssea de ratos e investigaram os efeitos das forças mecânicas sobre a produção de RANKL e OPG na população de fibroblastos. Os fibroblastos dos ligamentos periodontais produziram um maior número de células semelhantes aos osteoclastos, e esta foi aumentada quando houve a adição do anticorpo anti-OPG. Após 4h de aplicação de força centrífuga entre os tempos de 30-90min mediu-se os níveis de RANKL e OPG, e estes foram aumentados de forma diretamente proporcional ao aumento da força.

UYGUN *et al.* (2010) avaliaram o papel da espessura da membrana como um fator que influencia a adesão e a proliferação celular em membranas de

Literatura

quitosana com e sem glicosaminoglicanos. Células-tronco mesenquimais de rato (MSCs) cultivadas em membranas de quitosana de várias espessuras demonstraram adesão celular, disseminação e proliferação significativamente melhoradas à medida que a espessura da membrana foi aumentada. Os hepatócitos de rato exibiram um aumento do espalhamento no substrato com o aumento da espessura da membrana, semelhante às MSCs. Os autores concluíram que a espessura da membrana de quitosana é uma importante variável para alcançar maior proliferação, diferenciação e função celular.

MITSUHASHI *et al.* (2011), estudaram os efeitos da proteína 70 (HSP 70) na expressão do RNAm do fator de necrose tumoral (TNF- α) e do receptor ativador de fator nuclear κ B Ligante (RANKL) induzidos por forças compressivas nas células do tecido periodontal. Essas células foram comprimidas em cargas de 2g ou 4g durante 24 horas e foram tratadas com a proteína recombinante 70 por 12 horas. A produção dessa proteína foi avaliada pelo sistema ELISA. Como resultado desse trabalho houve um aumento da expressão do RNAm para HSP70, TNF- α e RANKL para 9 e 12 horas. Para 12h teve um decréscimo da produção de TNF- α e RANKL ao passo que HSP70 mostrou um aumento. Seus resultados mostraram que a proteína HSP70 pode modular a expressão do RNAm do TNF- α e RANKL nas células do ligamento periodontal durante a compressão destas.

DIERCKE *et al.* (2011) estudaram a correlação entre a compressão e a dependência na osteogênese com relação a epinefrina-A2. A ativação da epinefrina sinaliza a inibição dos osteoblastos e a ativação dos osteoclastos causando uma reabsorção óssea. Foram comprimidas células do ligamento periodontal através de força estática com carga de 30.3g/cm². Essa força

Literatura

induziu significativamente a expressão da epinefrina A2, ao passo que a epinefrina B2, também avaliada, não obteve expressão. Os osteoblastos do osso alveolar foram estimulados com a epinefrina A2 e teve um decréscimo na diferenciação osteoblástica.

LI *et al.* (2011) elaboraram um modelo tridimensional com tecido de ligamento periodontal humano (HPDL) usando uma folha fina de ácido láctico-co-glicólico que serviu como um arcabouço. Após o aumento da compressão estática de 5 - 35 g/cm², durante 6 horas, a expressão de RNAm de RANKL foi significativamente regulada para cima pela força \geq 25 g/cm² no modelo. Depois de ter sido submetido à compressão estática de 25 g/cm² para 6 - 72 horas, a expressão de RNAm de PTHrP, IL-11, IL-8, e FGF-2, potenciais indutores de osteoclastogênese, foi significativamente expressiva no modelo, o que foi adicionalmente verificado pela compressão de PDL humano *in vivo*. No entanto, quando fibroblastos gengivais humanos foram substituídos por células PDL no modelo, quase nenhum dos indutores de osteoclastogênese foram expressos por forças de compressão. Os resultados forneceram novas evidências de que OPG também é um gene mecanorresponsivo em hPDL, e sua regulação negativa imediata após a compressão pode contribuir para a indução da osteoclastogênese. Este modelo de tecido pode servir como uma ferramenta eficaz para o estudo da resposta mecânica do ligamento periodontal.

BUSILACCHI *et al.* (2013) avaliaram a associação da quitosana com fatores de crescimento, PRP e MSC, para regeneração óssea e tecidual. Os autores observaram a liberação de fatores de crescimento dos compósitos de quitosana-PRP e de nano-hidroxiapatita ou fosfato de tricálcio, sendo

Literatura

altamente benéfica para aumentar a proliferação e diferenciação de MSC, qualificando a quitosana como um excelente veículo. Uma série de características bioquímicas da quitosana exercem sinergismo com células-tronco na regeneração de tecidos moles. Os autores concluíram que a quitosana poderá substituir vários polímeros naturais e sintéticos.

KANG *et al.* (2013) avaliaram a expressão gênica das células do ligamento periodontal em culturas 2D e em culturas 3D (gel de colágeno) após a aplicação de força de compressão de $2\text{g}/\text{cm}^2$ em um tempo de 2 e 48 horas. As células do ligamento periodontal foram extraídas de premolares de pacientes que estavam sob tratamento ortodôntico. As células do grupo controle 2D e do grupo controle 3D, foram cultivadas em condições idênticas, mas sem aplicação de força. A análise da expressão gênica foi feita por RT-PCR. Os autores observaram que após a aplicação de força de 2 horas, 191 e 553 genes mostraram mudanças em seus níveis de expressão em culturas 2D e 3D respectivamente. Após a aplicação de força por 48 horas, 280 e 519 genes mostraram mudanças em seus níveis de expressão em culturas 2D e 3D respectivamente. Os autores concluíram que as células cultivadas em culturas 2D e 3D mostraram perfis significativamente diferentes de expressão gênica, sugerindo que a ligação à matriz extracelular, influencia as respostas celulares ao mecanismos de estresse.

SOKOS *et al.* (2014) realizaram uma revisão de literatura da função dos fibroblastos do ligamento periodontal na osteoclastogênese mediante presença de bactérias e na presença de carga. Os autores observaram que os fibroblastos do ligamento periodontal expressam primeiramente OPG *in*

Literatura

vivo, já em trabalhos experimentais *in vitro* na presença de bactérias ou sob força de compressão, houve um aumento na expressão de RANKL, TNF e colônias de macrófagos. Concluíram que os fibroblastos do ligamento periodontal possuem capacidade regulatória no processo da osteoclastogênese.

ALVES *et al.* (2015) estudaram um modelo tridimensional de cultura de células avaliando a expressão fenotípica de osteoblastos sob uma cultura de células de fibroblastos. Como meio tridimensional utilizaram uma matriz de colágeno, e analisaram a expressão da fosfatase alcalina, da osteopontina e osteocalcina. Através da microscopia quantificaram a formação de nódulos ósseos. Quando comparado ao grupo controle, o modelo tridimensional mostrou-se eficaz para a proliferação de osteopontina e fosfatase alcalina.

BELLINI *et al.* (2015) avaliaram a aplicabilidade de curativos bioativos associando membranas densas e porosas de quitosana-xantana à células estromais mesenquimais multipotentes para o tratamento de feridas cutâneas. Células estromais mesenquimais multipotentes foram isoladas da medula óssea de três ratos Wistar pesando entre 200 e 300 g. As células foram expandidas até a quarta passagem. Os autores concluíram que as membranas não são mutagênicas e permitiram adesão e proliferação das células estromais mesenquimais *in vitro*. Já em ensaios *in vivo*, mostraram aceleração da cicatrização de feridas em ratos *Wistar*, indicando o uso desta associação de suporte de células para fins de engenharia tecidual.

NETTELHOFF *et al.* (2016) estudaram a influencia da compressão mecânica nos fibroblastos e osteoblastos do ligamento periodontal. As

Literatura

células foram expostas aos dois tipos de cargas compressivas, 2cN/mm^2 e 4cN/mm^2 , por 12 horas. Para coleta dos dados foram utilizados o PCR e o teste ELISA. A compressão causou nos fibroblastos uma resposta expressiva sobre os osteoblastos, tendo um aumento na expressão gênica para as carga maior de 4cN/mm^2 . Entretanto o aumento da carga diminuiu a expressão de RANKL quando comparado com a carga de 2cN/mm^2 . No teste ELISA, a síntese de osteopontina foi elevada para a carga de 2cN/mm^2 quando comparado ao grupo controle, mas com o aumento da carga esse efeito foi menor.

ZANG *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da IL-10 e da glicose na expressão gênica da proteína OPG e RANKL dos fibroblastos do ligamento periodontal. As células foram extraídas de pré-molares de pacientes que estavam sob tratamento ortodôntico. As células foram expandidas até a quinta passagem até atingir 1×10^4 cél/ml. Estas foram tratadas em diferentes concentrações de IL-10 (0.1, 10, 25, 50 e 100ng/ml) ou glicose (0, 5.5, 10, 20, 30 e 40nmol/L. As alterações na expressão de RNAm e das proteínas foram examinadas por RT-PCR e análise de *Western blot* respectivamente. Os autores concluíram que em altas concentrações de glicose, aumentou a expressão de RANKL e diminuiu de OPG, enquanto que a IL-10 demonstrou efeitos opostos.

SANCHO-TELLO *et al.* (2017) avaliaram os benefícios da combinação de plasma rico em plaquetas ativado com uma estrutura estabilizada de quitosana porosa para a regeneração de cartilagens. Os suportes de quitosana poroso estabilizado foram preparados utilizando geleificação por congelamento e combinados com plasma rico em plaquetas ativado. Os condrócitos articulares primários humanos foram isolados e cultivados em

Literatura

scaffolds de quitosana porosa estabilizada com e sem combinação de plasma rico em plaquetas ativadas. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a caracterização morfológica dos *scaffolds* resultantes. Os autores concluíram que o plasma rico em plaquetas ativado induz a diferenciação de condrócitos cultivados em estruturas de quitosana porosas estabilizadas.

KANZAKI *et al.* (2019) avaliaram os perfis de expressão de micro RNA sob força de compressão e tensão em células do ligamento periodontal. Foi realizada a compressão ($2\text{g}/\text{cm}^2$) e a tensão por 24 horas sobre as células do ligamento periodontal. A análise de expressão gênica foi realizada por RT-PCR. Observaram que alguns micro RNAs são mais expressos em qualquer tempo de mecanismo de estresse, e que outros são mais expressos somente em tempos específicos de mecanismo de estresse. Concluíram que o miR-3198 em força de tensão induz o aumento da expressão de OPG e, em mecanismos de estresse, diminui sua expressão.

Li *et al.* (2019) avaliaram através de uma revisão sistemática o mecanismo pelo qual os sinais mecânicos são transduzidos em sinais biológicos, regulando a homeostase óssea via ligamento periodontal durante o tratamento ortodôntico. Foi abordado nesta revisão os efeitos de cargas aplicadas sob as células do ligamento periodontal nas propriedades osteogênicas e osteoclastogênicas. Um total de 26 estudos foram incluídos, dos 555 artigos obtidos através da pesquisa na base de dados, e quatro estudos sobre tipos de abordagem biomecânica foram identificados. Apenas nove estudos investigaram os mecanismos pelos quais os fibroblastos do ligamento periodontal transduzem estímulo mecânico. Os estudos forneceram evidências de estudos mecânicos *in vitro*, e a força de

Literatura

compressão foi caracterizada pela aplicação estática e contínua, enquanto que a força de tração foi principalmente cíclica. Concluíram que os fibroblastos do ligamento periodontal desempenham um papel único e dominante na regulação da remodelação óssea durante o movimento ortodôntico.

4 MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Desenho da pesquisa

- Primário
- Experimental
- Prospectivo
- Centro Único

4.2 CEP

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo/Unifesp, tendo sido aprovado na reunião do dia 12 de Dezembro de 2.016, sob número 7940050819 (APÊNDICE 1)

4.3 FIBROBLASTOS IMORTALIZADOS DERIVADOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

Foram utilizados fibroblastos do ligamento periodontal humano imortalizados adquiridos da Lonza Walkersville, Inc. (Walkersville, USA), definidas pela empresa como Clonetics™ Human Fibroblast Cell System. Foram adquiridos 10 vials contendo 5×10^5 células cada, crio-preservadas e catalogadas pelo código (DHFL-AS 00194192).

4.3.1 Expansão dos Fibroblastos Periodontais

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil), seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas. Para cultura celular foi utilizado a densidade de semeadura dos fibroblastos periodontais de 5×10^5 células em garrafas de cultura de 75cm^2 (Corning, MO, USA) em ambiente controlado de 37°C e 5% de CO_2 (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil). O meio de cultura utilizado foi o SCBM™ (Lonza Walkersville, Inc. Walkersville, USA) Stromal Cell Basal Medium catalogado como CC-3205 disponível em garrafas de 500 ml.

Para expansão das células o meio de cultura SCBM™ foi suplementado com Soro Fetal Bovino SFB (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) catalogado como CC- 4102R em garrafas de 25ml, Insulina Recombinante Humano catalogado como CC4021R em vials de 0,5ml, Sulfato de Gentamicina e Anfotericina- B catalogado como CC4018R em vials 0,5ml.

Após a suplementação do meio, as células foram expandidas até a confluência de 80% nas garrafas de cultura, que durou em média entre 30 a 40 dias, foram realizadas subculturas nas quais utilizou-se tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA), foi realizada a contagem de células utilizando-se contador de células automático (Invitrogen - Countess, Seul, Korea) e congeladas para posterior utilização.

Para o congelamento das células utilizou-se o meio de cultura Alpha-MEM com 50% SFB inativado, 1% de BSA (*Bovine Serum*

Método

Albumin, Albumina Sérica Bovina, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA). A solução de congelamento foi transferida para criotubos (Ciencor, Aton, São Paulo, Brasil) com uma densidade de 1×10^6 células/ml. Os criotubos foram imediatamente colocados em gelo a 4°C e transferidos para o congelador a -20°C, onde permaneceram por 1 hora. A seguir, foram transferidos para o *freezer* - 80°C, onde permaneceram por 48 horas e, armazenados no nitrogênio líquido, onde as células foram mantidas a -196°C até a realização dos experimentos.

Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de Alfa-MEM (Lab Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1% de antibióticos. A suspensão celular foi centrifugada a 100 g por seis minutos à temperatura ambiente (Centrífuga Fanem Excelsa II, São Paulo, Brasil). O sobrenadante contendo DMSO foi desprezado e o botão de células, ressuspensão em 15 ml de meio de cultura para Alfa-MEM. Foi realizado o cultivo das células por até 48 horas para que elas pudessem aderir a placa. Após, elas foram tripsinizadas e contadas de forma que houvesse 2×10^5 em 200 µl de meio de cultura.

4.4 MEMBRANA DE QUITOSANA E XANTANA

4.4.1 Preparação da solução de Ácido Acético 2%

Método

No interior de uma capela, 50 ml de água foram colocados em um balão volumétrico de vidro de 1.000 ml (Laborglass, São Paulo/SP). Com o auxílio de um pipetador automático Pipeo® (Vitlab, GroBostheim, Germany) e uma pipeta sorológica 10 ml (BioNaky) esterelizada por radiação γ , foram adicionados 20 ml de Ácido Acético Glacial 100% (Mercky, Alemanha).

Em seguida, foram adicionados ao balão volumétrico mais 930 ml de água ultrapura para atingir o volume total de 1.000 ml, e homogeneizados na sequência. Essa solução de ácido acético foi reservada, para uso na dissolução da quitosana.

4.4.2 Preparação da solução de Quitosana 1% em Ácido Acético 2%

Em um recipiente tipo *becker*, de 1.000 ml (Nalgon, Itupeva/SP) foram adicionados 500 ml da solução de ácido acético 2%. Uma balança de precisão modelo ATX224 (SHIMADZU, Kyoto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a quitosana de média massa molecular e grau de desacetilação de 82% (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA). Um *becker* de 100 ml (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado sobre o prato da balança e, na sequência, a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do *becker*.

Com o auxílio de uma espátula metálica, 3g de quitosana foram adicionados a esse *becker*, para serem diluídos na solução de ácido acético 2%. O volume de 3g de quitosana foi então adicionado aos 500 ml da solução de ácido acético 2% e foram levados à um agitador mecânico para

Método

a obtenção da solução de quitosana 1% em ácido acético a 2%.

O agitador mecânico utilizado possuía hélices do tipo naval e pás inclinadas, com 3cm de raio, modelo Tecnal TE-139 (Tecnal - Piracicaba/SP); a base do eixo das pás foi mantida a uma distância de 2 cm do fundo do *becker* e uma rotação pré-estabelecida de 1.000 RPM foi mantida. As rotações foram aferidas com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (INSTRUTHERM, São Paulo/SP).

Após a inclusão dos 3g de quitosana na solução de ácido acético 2%, a agitação foi mantida por 30 minutos, até a completa solubilização da quitosana e a obtenção de uma solução homogênea.(Figura 1)

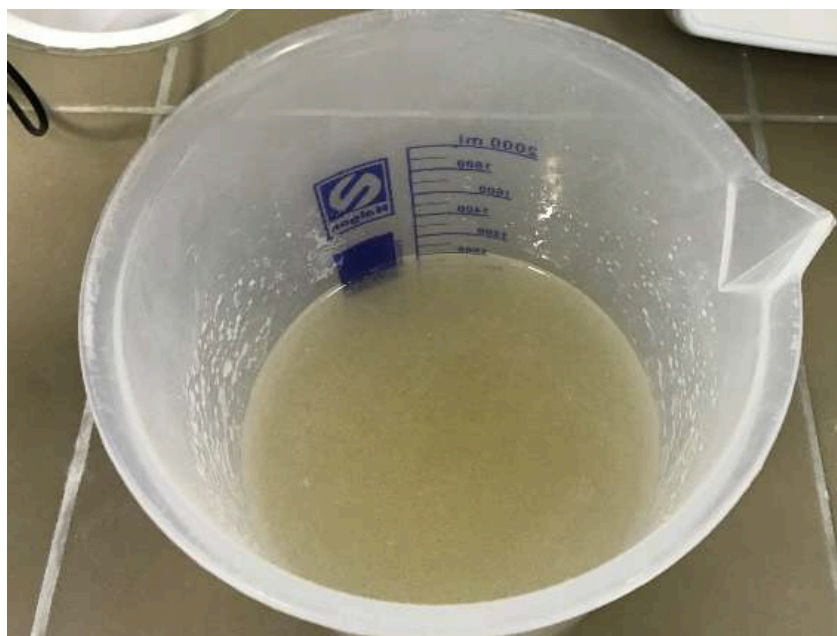


Figura 1: Solução de quitosana adicionados à solução de ácido acético

4.4.3 Preparação da solução aquosa de xantana 1%

Em um *béquer* de 1.000 ml (Nalgen, Ref. 1000-01000) - com 20 cm

Método

de altura, 10 cm de diâmetro e fundo chato - foi colocado 300 ml de água. Uma balança de precisão SHIMADZU, modelo ATX224 – com capacidade de aferição em milésimos de grama - foi utilizada para dosar a goma xantana (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA). Com o auxílio de uma espátula, 3g de goma xantana foi pesado e reservado. Da mesma forma 4,5g de Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA) foi pesado e reservado em um *béquer* de 100 ml (Dovil).

Em um recipiente tipo *becker*, 1.000 ml (Nalgon, Itupeva/SP) foram adicionados 500 ml de água ultrapura. Uma balança de precisão modelo ATX224 (SHIMADZU, Kyoto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a goma xantana (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA).

Um *becker* de 100 ml (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado centralizado sobre o prato da balança. Após a estabilização da pesagem, que levou cerca de 5 segundos, a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do *becker*.

Com o auxílio de uma espátula metálica, 3g de goma xantana foram adicionados ao *becker*, para serem diluídos em água, foram levados até um agitador mecânico. O agitador mecânico utilizado, possuía hélices do tipo naval e pás inclinadas, com 3cm de raio, modelo Tecnal TE-139 (Tecnal - Piracicaba/SP), a base do eixo foi mantida a uma distância de 2cm do fundo do *béquer* e uma rotação pré-estabelecida de 1.000 RPM foi mantida. Os 3g de goma xantana foram adicionados à água, vagarosamente (Figura 2) e a agitação foi mantida por 20 minutos, até a completa solubilização da goma xantana e obtenção de uma solução homogênea. Após a solubilização e homogenização da goma xantana, o surfactante *Pluronic*® F127 foi

Método

adicionado à mistura de forma muito lenta, evitando a formação de grumos. A mistura foi agitada por mais 10 minutos.



Figura 2: Goma xantana adicionada à água

4.4.4 Preparação da solução de Quitosana e Xantana

Para a produção da solução de quitosana/xantana, o *béquer* contendo a solução aquosa de xantana 1% com o *Pluronic*® F127 1,5% foi colocado no agitador mecânico. Com auxílio de uma bomba peristáltica, modelo TE-BP-01 (TECNAL, Piracicaba/SP) a solução de quitosana 1% em solução de ácido acético 2% foi adicionada à solução aquosa de xantana 1% com o

Método

Pluronic® F127 1,5% (Figura 3). Durante 30 minutos o agitador mecânico foi mantido a uma velocidade de 1.000 RPM, até que toda solução de quitosana fosse adicionada à solução de xantana/*Pluronic*® F127. Ao término da mistura das soluções, a velocidade do agitador mecânico foi aumentada para 1.200 RPM durante 10 minutos.

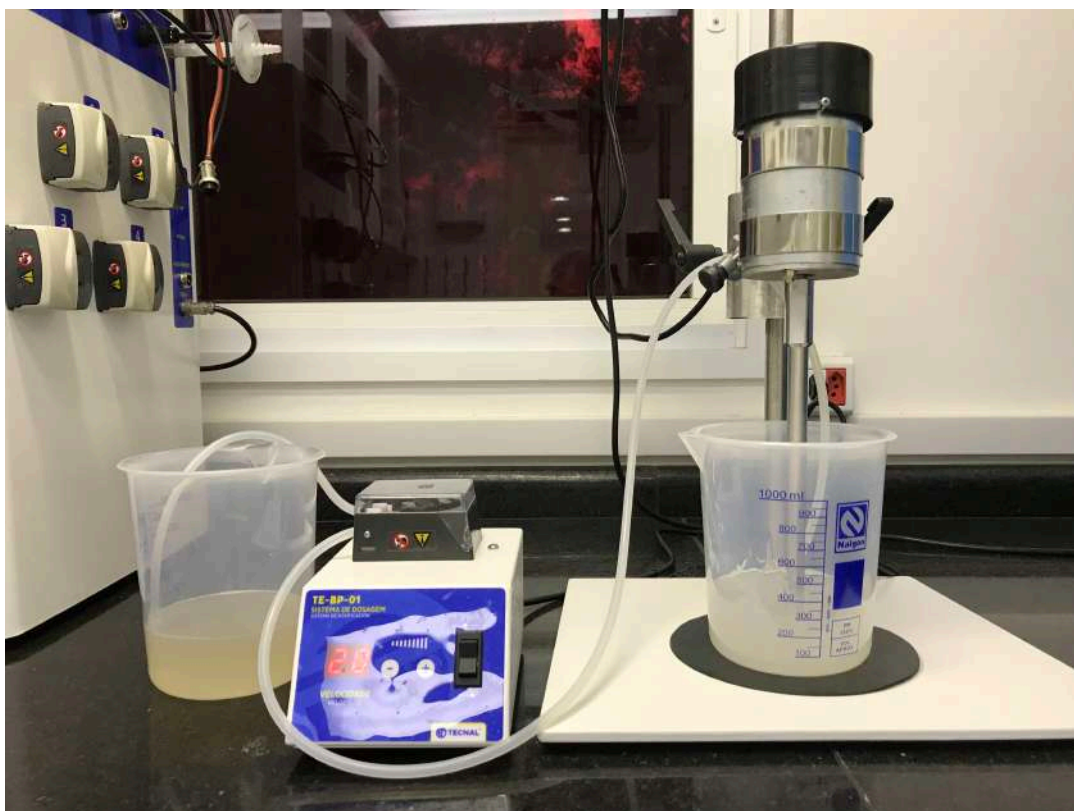


Figura 3: Solução de quitosana em solução de ácido acético adicionada à solução aquosa de xantana com o *Pluronic*® F127.

O volume obtido foi igualmente distribuído, em proporções iguais de 80 ml, em 20 placas lisas de poliestireno, nas medidas de 90 x 15 mm. Para efetuar esta distribuição uma pipeta sorológica de 10 ml (BioNack) foi usada com o auxílio de um pipetador automático Pipeo® (Vitlab, BroBostheim, Germany).

As placas com a solução de quitosana/xantana foram levadas à estufa de circulação de ar modelo TE-393-80L (TECNAL), a 37°C, por um

Método

período de 48 horas para evaporação do ácido acético e secagem. Após a secagem as membranas foram retiradas das placas de poliestireno e imersas em 500 ml de água, por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes para remoção dos resíduos de ácido acético. Uma nova lavagem em 200 ml de solução *HEPES* 10% por 30 minutos foi efetuada a fim de eliminar resíduos do *Pluronic*® F127, e uma lavagem final por 30 minutos, em 500 ml de água, foi realizada para remoção da solução *HEPES*. As membranas foram novamente acondicionadas nas placas de poliestireno e levadas à estufa para secagem final por um prazo de 16 a 24 horas (Figura 4).



Figura 4– Membranas acondicionadas nas placas de poliestireno e levadas à estufa para secagem final

Após a secagem as membranas de quitosana e xantana foram

encaminhadas para empresa Acecil Central de Esterilização Indústria e Comércio (Campinas-SP. Brasil), onde foi realizada a esterilização por Óxido e Etileno.

4.5 APLICAÇÃO DA COMPRESSÃO ESTÁTICA CONTÍNUA

Para o ensaio de compressão foi utilizada a densidade de 2×10^5 células/poço diluídas em 200 μ l de meio Alfa-MEM, semeadas sobre uma membrana de Quitosana e Xantana já adaptada no fundo da placa de seis poços (Figura 5). As células sobre a membrana de Quitosana e Xantana foram pré-incubadas durante seis horas em meio de cultura contendo meio Alfa-MEM antes da aplicação da compressão estática. Após, a carga foi aplicada sobre a membrana Quitosana e Xantana durante seis horas na incubadora, utilizando uma compressão uniforme, baseadas num modelo de compressão estática contínua para experiências *in vitro* (Figura 6).

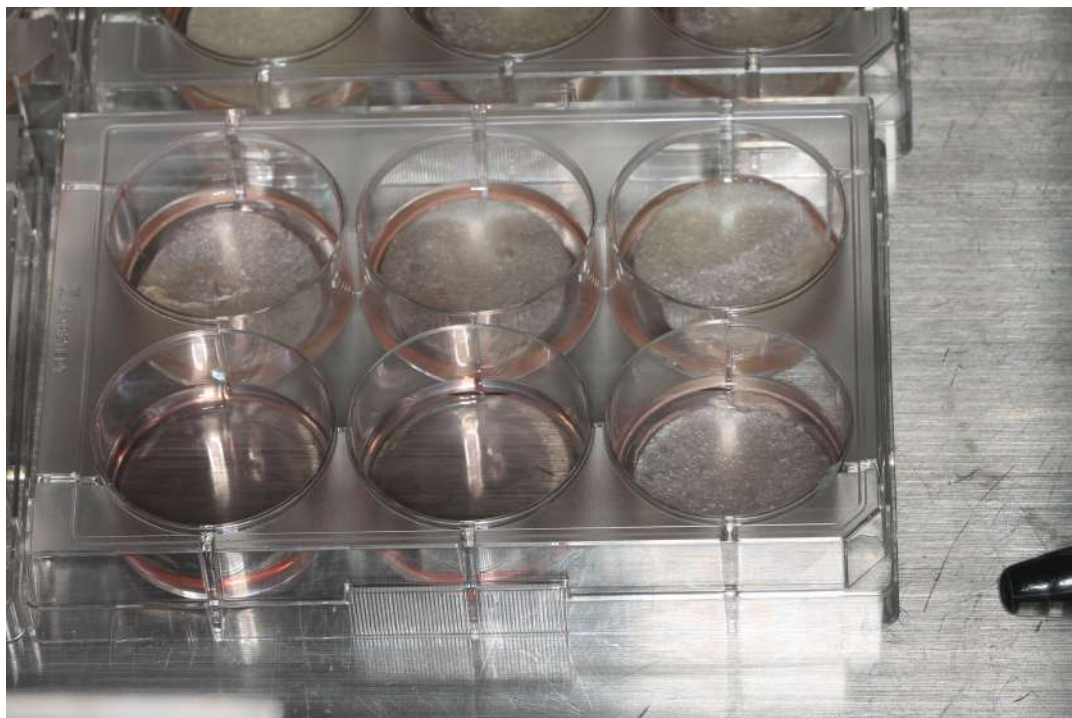


Figura 5 – Membrana de Quitosana e Xantana adaptada no fundo da placa de seis poços



Figura 6– Cilindro de aço inoxidável de 48g/cm^2 aplicado sob a cultura 3D

Este modelo consistiu de cilindros de aço inoxidável do tipo 304,

Método

com várias alturas (Quadro 1) e (Figura 7) (HB Usinagem LTDA, São Paulo, SP-Brasil) colocado no centro de cada poço da placa de cultura imediatamente sobre a membrana de Quitosana/Xantana.

Quadro 1. Peso, Altura, Diâmetros e Carga total dos cilindros de aço inoxidável utilizados no modelo compressivo

Peso	Altura	Diâmetro	Carga
22g	0,5cm	2,7cm	4g/cm ²
68g	1,22cm	2,7cm	12g/cm ²
138g	3,0cm	2,7cm	24g/cm ²
274g	6,1cm	2,7cm	48g/cm ²

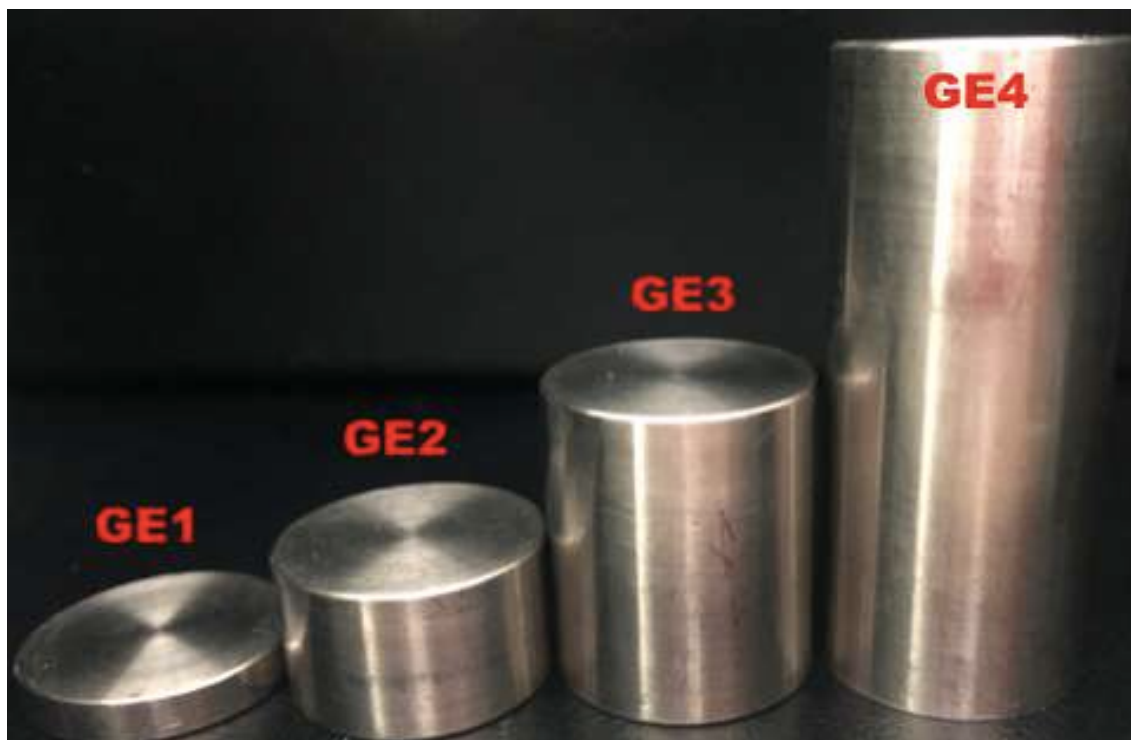


Figura 7 – Modelo de Compressão Estática usado nos grupos experimentais GE1, GE2, GE3 e GE4

4.5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

4.5.2 Experimento

Este estudo foi realizado com fibroblastos imortalizados do ligamento periodontal humano adquiridos da Lonza Walkersville, Inc. (Walkersville, USA), definidas pela empresa como Clonetics™ Human Fibroblast Cell System.

4.5.3 Grupos Avaliados

Grupo Controle (GC) (sem compressão por 6 horas)

Grupos Experimentais

Grupo Experimental 1 (GE1) (4,0 g/cm² por 6 horas)

Grupo Experimental 2 (GE2) (12,0 g/cm² por 6 horas)

Grupo Experimental 3 (GE3) (24,0 g/cm² por 6 horas)

Grupo Experimental 4 (GE4) (48,0 g/cm² por 6 horas)

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para avaliação da presença dos genes alvos utilizamos o método de Reação de Cadeia Polimerase (PCR), utilizando o sistema de sondas TaqMan Gene *Expression Assays* RT-PCR.

A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (QuantStudio™ 5 Digital ThermoFisher Scientific CA, EUA). A vantagem do PCR em tempo real é a possibilidade de quantificar de maneira precisa os ácidos nucleicos e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

4.6.1 EXTRAÇÃO DO RNA

4.6.1.1 Extração e purificação de RNA

O RNA total foi extraído com o kit PureLink®RNA Mini Kit

Método

Invitrogen (Carlsbad, Ca. 92008. USA) conforme instruções do fabricante. Após tratamento o meio de cultura foi recolhido, e as células juntamente com a membrana de quitosana e xantana foram lavadas com Solução de fosfato-salino tamponado (PBS) uma vez. O PBS foi removido e foi adicionado 300 μ L de tampão de lise acrescido de 1% de β -mercaptoetanol diretamente à placa. As células foram homogeneizadas com a pipeta e transferidas para um tubo cônico de 1,5mL onde foram diluídas em Etanol 70% (v/v) e aplicadas em microcoluna de sílica com isotiocianato de guanidina (a qual retém o RNA total) e centrifugada a 12.000 g por 15 segundos em temperatura ambiente e o eluato descartado. Em seguida, a microcoluna foi lavada com 700 μ L de tampão de lavagem I (Wash Buffer I), e lavada por duas vezes com 500 μ L de tampão de lavagem II (Wash Buffer II). A cada etapa de lavagem seguiu-se uma centrifugação de 15 segundos a 10.000 g. O RNA purificado aderido à microcoluna foi eluído em um volume de 20 μ L com água ultrapura livre de RNAses e DNAses, após 2 minutos de centrifugação a 12.000 g.

As amostras de RNA foram descontaminadas de DNA genômico remanescente com a utilização da DNase I, *Amplification Grade* (Invitrogen). Para tal, os 16 μ L das amostras foram incubadas por 15min à temperatura ambiente com 2 μ L de DNase I Buffer and 2 μ L de DNase I, *Amplification Grade* (1 unidade/ μ L).

Os RNAs totais foram quantificados utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific, USA) para determinar a concentração e o grau de pureza do RNA para realizar a síntese do DNA complementar (cDNA). (Figura 8)



Figura 8: Espectrofotômetro NanoDrop para determinar a concentração e o grau de pureza do RNA

4.6.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado com o *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante.

4.6.3 Reação de Real time – qPCR

Como controle endógeno da reação de RT-PCR foi utilizado o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Método

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*. Para avaliar a eficiência das *TaqMan™ Gene Expression Assays (Applied Biosystems™)*, foram usadas diferentes concentrações de cDNA (25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng e 1,56 ng) para cada *TaqMan* com a mesma concentração (1 μ L) em triplicata. Os Cts e as concentrações iniciais de cDNA foram usados para fazer uma curva de eficiência, onde concentrações maiores devem gerar um valor de Ct menor, proporcionalmente. Após a obtenção das curvas de eficiência determinou-se a concentração de 6,25 ng. Para cada reação foram adicionados 6,25 ng de cDNA, 5 μ L de *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*, 1 μ L da *TaqMan* e água livre de RNase para volume final de 10 μ L. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Após ter preparado a reação foi utilizado o *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems™)*. O ciclo de amplificação consistiu de: 95 ° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 ° C por 15 segundos, 60 ° C por 1 minuto e 72 ° C por 30 segundos. A curva de dissociação foi feita com 1 ciclo de 95 ° C por 1 minuto, 60 ° C por 30 segundos e 95 ° C por 30 segundos. A partir das curvas de amplificação geradas foi determinado o número de ciclos que passam o limiar Ct, no qual todas as amostras podem ser comparadas. Com esses valores, foi empregado o método de quantificação relativa, no qual os resultados obtidos com a análise dos genes de interesse foram comparados com o gene referência GADPH. Dessa maneira, níveis arbitrários de mRNA foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador (grupo controle). A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta \Delta Ct}$, onde: Ct: indica o número do ciclo no qual a quantidade

Método

do gene de interesse amplificado alcança um limiar fixo, quanto menor o valor numérico de Ct, mais rápido foi atingido o número de cópias estabelecido;

- Δ Ct: normalização em relação ao gene de expressão constitutiva, obtido pela diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene referência (neste caso, GAPDH) para cada amostra;

- $\Delta \Delta$ Ct: média do Δ Ct do grupo controle – Δ Ct de cada gene para cada amostra.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) *one way* com correção do teste de *Tukey*. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes e assinalados com *.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Não houve expressão gênica da proteína receptor ativador de fator nuclear κ B ligante (RANKL) pelo método utilizado de sondas *TaqMan Gene Expression Assays* RT-PCR, e os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão dos valores das triplicatas da expressão gênica de RANKL. Valores em expressão relativa (VER) obtidos por RT-PCR.

Grupos	Expressão Relativa de RANKL
GC	0,03 \pm 0,01
GE1	0,04 \pm 0,01
GE2	0,09 \pm 0,02
GE3	0,08 \pm 0,01
GE4	0,03 \pm 0,01
Valor de p	0,8

GC (grupo controle); GE1(grupo experimental 1- 4g/cm²); GE2(grupo experimental 2- 12g/cm²); GE3(grupo experimental 3- 24g/cm²); GE4(grupo experimental 4- 48 g/cm²). RANKL Teste de Anova com $p < 0.05$.

Não houve expressão gênica da proteína receptor ativador de fator nuclear κ B (RANK) pelo método utilizado de sondas *TaqMan Gene Expression Assays* RT-PCR, e os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Média e Desvio Padrão dos valores das triplicatas da expressão gênica de RANK. Valores em expressão relativa (VER) obtidos por RT-PCR.

Grupos	Expressão Relativa de RANK
GC	0,02 ±0,01
GE1	0,07 ±0,02
GE2	0,03 ±0,01
GE3	0,02 ±0,01
GE4	0,03 ±0,01
Valor de p	0,8

GC (grupo controle); GE1(grupo experimental 1- 4g/cm²); GE2(grupo experimental 2- 12g/cm²); GE3(grupo experimental 3- 24g/cm²); GE4(grupo experimental 4- 48 g/cm²). RANK, Teste de Anova com p< 0.05.

Após a realização da leitura de expressão gênica no RT-PCR, foi realizada a análise dos dados obtidos da expressão da osteoprotegerina e os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão dos valores das triplicatas da expressão gênica de Osteoprotegetina (OPG). Valores em expressão relativa (VER) obtidos por RT-PCR.

Grupos	Expressão Relativa de OPG
GC	0,5 ±0,1
GE1	0,6 ±0,1
GE2	1.5 ±0,2
GE3	0.8 ±0,1
GE4	0,6 ±0,1
Valor de p	0,03*

GC (grupo controle); GE1(grupo experimental 1- 4g/cm²); GE2(grupo experimental 2- 12g/cm²); GE3(grupo experimental 3- 24g/cm²); GE4(grupo experimental 4- 48 g/cm²). OPG (osteoprotegerina)
 Teste de Anova com p< 0.05 assinalado com *

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O ligamento periodontal é um tecido altamente diferenciado, possuindo rotatividade rápida e altas taxas de remodelação, sendo o fibroblasto periodontal a célula predominante deste tecido, mas também podemos encontrar outras células como as mesenquimais indiferenciadas e epiteliais. As células do ligamento periodontal são responsáveis não só pela manutenção do ligamento periodontal como também do osso alveolar e cemento radicular (LI *et al.*, 2019). Acredita-se que o potencial regenerativo do ligamento periodontal esteja relacionado com as funções dos fibroblastos periodontais (KOOK *et al.*, 2011), sendo estas células as mais abundantes do ligamento periodontal e conhecidas por modular os processos de remodelação óssea alveolar por meio da produção de enzimas e citocinas ativas, incluindo o RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β), RANKL (Ligante) e a OPG (Osteoprotegerina) (NISHIJIMA *et al.*, 2006; KOOK *et al.*, 2011), quando submetidos a estresse mecânico ou fisiológico.

A osteoprotegerina (OPG) é a receptora solúvel de atração do RANKL que pode suprimir a ligação entre RANK e RANKL e bloquear os seus efeitos sobre a osteoclastogênese e a formação óssea, já o RANKL solúvel é liberado da membrana plasmática por conversor de metaloprotease-desintegrina-TNF- α , sendo que o RANKL solúvel e o RANKL aderido a membrana regulam a osteoclastogênese e a formação óssea. (KANZAKI *et al.*, 2002; NISHIJIMA *et al.*, 2006; KOOK *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011). Devido a dificuldade em executar experimentos *in vivo* KANG *et al.*, (2013), NAKAJIMA *et al.*,(2008) e NISHIJIMA *et al.*, (2006) utilizaram modelos compressivos sobre fibroblastos periodontais a

fim de investigar o mecanismo pelo qual sinais mecânicos são transduzidos em sinais biológicos, que regulam a homeostase óssea via ligamento periodontal.

A maioria das células em um ambiente nativo *in vivo* são integrados dentro de um gel 3D, hidratado, flexível e poroso, cercado por outras células, chamado de matriz extracelular (MEC). A fim de reconstruir um modelo que represente mais de perto a estrutura natural e as funções dos tecidos *in vivo*, neste estudo foi desenvolvido um modelo de compressão celular tridimensional (3D) para verificar *in vitro* os eventos celulares que acontecem *in vivo* quando a célula é submetida à uma força compressiva. HECKLER *et al.*, (2013) desenvolveram um modelo tridimensional (3D), géis de colágeno semeados com fibroblastos do ligamento periodontal humano observaram a proliferação celular, a viabilidade e o surgimento de um possível fenótipo contrátil, replicando a condição restrita do ligamento periodontal humano *in vivo*.

Para reconstituir o ambiente *in vivo*, células devem aderir e crescer adequadamente nos arcabouços ou substratos tridimensionais (3D) facilitando assim o contato célula-célula e a expressão do fenótipo esperado (MINUTH *et al.*, 1998; GRIFFITH, 2002). As células cultivadas em matriz 3D representam mais de perto a estrutura natural e função dos tecidos *in vivo* no que diz respeito à fisiologia, forma da célula e seu ambiente (MUELLER-KIESER, 1997; CHEVALLAY & HERBAGE, 2000; XU *et al.*, 2009). A mecanotransdução pode ser interpretada como o processo de produção de uma reação bioquímica a partir de um estímulo mecânico.

As reações bioquímicas em cadeia induzidas pelo estímulo mecânico atuam em nível celular e podem causar inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, alteração na migração celular, entre outros efeitos. Durante a mastigação, por exemplo, as forças mecânicas transferidas para

os dentes são dissipadas através do ligamento periodontal. Os estudos histológicos do tecido ao redor desses dentes mostram que durante essa força temos uma tensão associada a formação óssea e do outro lado uma compressão, induzindo uma reabsorção óssea (MEIKLE *et al.*, 2006). As pesquisas no campo da biologia celular buscam muitas vezes identificar quais as moléculas estão presentes durante esse processo de diferenciação celular quando submetidos à diferentes tipos de cargas durante a movimentação dentária. As cargas elevadas podem reduzir a viabilidade celular, causando apoptose ou dano tecidual expressivo, ao passo que as células do tecido periodontal podem desenvolver atividade osteoblástica quando submetidas ao estresse mecânico (WESCOTT *et al.*, 2007). Como indicador dessa remodelação temos a expressão de marcadores da osteoclastogênese: osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator kB (RANK) e receptor ativador de fator nuclear kB ligante (RANKL) responsáveis pela diferenciação, proliferação celular e a expressão da matriz extracelular (ROMER *et al.*, 2009).

O sistema RANK/RANKL e OPG desempenha um papel chave na reabsorção óssea e pode ser modificado pelos osteoblastos, fibroblastos e osteoclastos (KEARNS *et al.*, 2008 e LOSSDORFER *et al.*, 2011). O RANKL é quem facilita a reabsorção óssea através dos osteoclastos e ativa a maturação óssea (YASUDA *et al.*, 2009). Os osteoblastos e os fibroblastos também expressão a OPG, uma proteína de equilíbrio, que atua como um receptor para o RANKL inibindo a reabsorção óssea.

O arcabouço de colágeno tem sido utilizado na engenharia tecidual por possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa antigenicidade (LEE *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2015). No entanto, certas propriedades dos arcabouços tridimensionais de colágeno limitaram seu uso por possuir imunogenicidade leve, falta de resistência mecânica e estabilidade à

hidratação, além de alto custo de colágeno puro (SOUZA *et al.*, 2019). Diferentes tipos de materiais poliméricos de origem natural ou sintética têm sido utilizados na produção de substrato ou arcabouços como modelos estruturais para direcionar o crescimento celular. Propriedades como biocompatibilidade, resistência mecânica, baixa toxicidade, capacidade de absorção de fluidos, tamanho e a forma dos poros são de grande importância na seleção da matéria prima utilizada para produção de substratos ou arcabouços (BELLINI *et al.* 2012; BELLINI *et al.*, 2015). Neste estudo, como arcabouço ou substrato tridimensional(3D) foi desenvolvido a membrana de quitosana e xantana porosa, corroborando com trabalhos de UYGUN *et al.*, (2010) que relataram a espessura da membrana pode ser um importante fator para alcançar maior proliferação e diferenciação celular. Varoni *et al.*, (2018) avaliaram a regeneração periodontal em camundongos nus utilizando como arcabouço membranas de quitosana porosas e densas, observaram alta biocompatibilidade, crescimento celular e vascularização no interior da membrana porosa, sugerindo um candidato promissor para a regeneração periodontal.

LI *et al.*, em 2011, utilizaram um modelo (3D) uma matriz de polímero poli-L-glicólico e ácido poli-L-lático semeadas com as células do ligamento periodontal que submetidas a uma força de compressão, a relação entre a OPG e RANKL foi significativamente diminuída para os tempos de 3 e 6 horas, no entanto a expressão da OPG diminuiu após 3 horas, e aumentou para o tempo de 6 horas e foi significativamente expressiva após o tempo de 12 horas.

MITSUHASHIET *et al.*, (2011) observaram que a proteína recombinante 70 (HSP70) pode modular a expressão do RNAm do TNF α e RANKL nas células do ligamento periodontal durante a compressão, de maneira dependente do tempo e magnitude. LI *et al.*, (2011) avaliaram um

modelo tridimensional com tecido do ligamento periodontal utilizando uma fina folha de ácido láctico-co-glicólico que serviu como arcabouço. Após aplicado a força de compressão de 25g/cm^2 durante 6, 24 e 72h, foi observado um aumento na expressão de RANKL durante 6 e 24h, e uma diminuição na expressão de OPG, a medida que o tempo aumentou em 72h, observou-se uma diminuição na expressão de RANKL e um aumento na expressão de OPG.

No entanto NISHIJIMA *et al.*, (2006) e NAKAGIMA *et al.*, (2008) utilizaram modelos compressivos em culturas de monocamadas (2D) de fibroblastos periodontais humanos, observaram um aumento na expressão de RANKL e uma diminuição na expressão de OPG quando aplicadas uma força de compressão de 4g/cm^2 por um período de 48h. Nestes dois trabalhos os resultados mostraram que a magnitude da força de compressão e o tempo estão diretamente relacionados com o aumento da produção de RANKL. Por outro lado, KANZAKI *et al.* (2019) avaliaram por RT-PCR perfis de expressão de micro RNAs na força de tensão e compressão dos fibroblastos periodontais e observaram que alguns micro RNAs aumentaram a expressão em qualquer tempo no mecanismo de estresse, enquanto que, outros micro RNAs aumentaram sua expressão somente em tempos específicos. Corroborando com KANZAKI *et al.* (2002) NISHIJIMA *et al.* (2006), KOOK *et al.* (2009) e KOOK *et al.*, (2011) os quais sugeriram que os fibroblastos do ligamento periodontal quando sob estresse aumentam a expressão de RANKL e diminuem a expressão de OPG, facilitando a reabsorção óssea durante a movimentação dentária. Existem evidências que células de cultura 2D e 3D podem expressar níveis diferentes de expressão gênica, sugerindo uma ligação à matriz extracelular que podem influenciar as respostas celulares ao estresse (KANZAKI *et al.*, (2002), KIM *et al.*, (2009), KOOK *et al.*, (2009).

D i s c u s s ã o

A expressão de OPG neste estudo foi constatada em todos os grupos avaliados, porém só houve diferença estatística nos valores encontrados no grupo GE2, o qual utilizou uma carga de 12g/cm^2 . O resultados deste estudo em relação ao GE2 foram similares aos encontrados por JAINRU *et al.*, (2015) os quais utilizaram uma carga de 25g/cm^2 por 3,6 e 12 horas obtendo uma expressão menor de OPG em três horas e uma expressão maior de OPG em seis horas de compressão, inclusive concluindo que a compressão estática a longo prazo aumentaria a expressão de OPG, neste estudo no grupo GE4, onde utilizou-se uma carga de 48g/cm^2 , observou-se uma diminuição dos valores de expressão de OPG. Já trabalhos de LI *et al.*, (2011) mostraram que no tempo de seis horas de compressão mecânica (25g/cm^2) houve um aumento na expressão de RANKL, já neste estudo quando da utilização do modelo proposto não houve a expressão de RANKL, mas houve a expressão de OPG. A OPG é um gene que responde diferentemente a estímulos mecânicos em culturas 3D, quando comparada a cultura 2D, sugerindo que a ligação à matriz extracelular pode influenciar as respostas celulares.

Como perspectiva, deste estudo temos a avaliação da expressão gênica (RANK/RANKL/OPG) utilizando uma cocultura de fibroblastos periodontais e osteoblastos com o mesmo modelo de compressão estática contínua em tempos maiores.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A carga de 12g/cm^2 por 6 horas em cultura tridimensional de fibroblastos periodontais apresentou maior expressão de OPG.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIA

Alves LB, Mariguela VC, Grisi MF, Souza SL, Novaes Junior AB, Taba Junior M, Oliveira PT, Palioto DB. Expression of osteoblastic phenotype in periodontal ligament fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel. *J. Appl Oral Sci.* 2015; Mar; 23(2):206-14.

Bellini MZ, Pires ALR, Vasconcelos MO, Moraes AM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *J. Appl Polym Sci.* 2012; 125:421-31.

Bellini MZ, Caliari-Oliveira C, Mizukami A, Swiech K, Covas DT, Donadi EA, Oliva-Neto P, Moraes AM. Combining Xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *J. Biomater. Appl.* 2015; 29(8): 1155-66.

Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RAA. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr. Polym.* 2013; 98: 665-76.

Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, Yahia L. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyonic complex. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999;51:107-16.

Chen FM; Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current

Referências

approaches and expanding opportunities. *Tissue engineering. Part B, Reviews*. 2010;16: 219-55.

Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2000;38; 211-18.

Daley WP; Peters SB; Larsen M. Extracellular matrix dynamics indevelopment and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*. 2008;121; 255-64.

Diercke K., Sen S., Kohl A., Lux C.J. and Erber R. Compression-depend Up-regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts attenuates osteogenesis. *J. Dent Res*. 2011; 90(9): 1108-15.

Griffith LG; Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002; 295;1009-14.

Heckler AF, Mirzaei Z, Pereira I, Simmons CA, Gong S-G. Development of a three-dimensional in vitro model system to study orthodontic tooth movement. *Archives of Oral Biology*. 2013; 58:498-10.

Jianru YI, Le LI, Yan YA et al. Static compression regulates OPG expression in periodontal ligament cells via the CAMK II pathway. *J. Appl Oral Sci*. 2015;23(6);549-54.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under stress induce osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear

Referências

Factor κ B Ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J. Bone Miner Res.* 2002;17: 210–20.

Kanzaki H, Wada S, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Noda K e Nakamura Y. Compression and tension variably alter Osteoprotegerin expression via miR-3198 in periodontal ligament cells. *BMC Molecular and Cell Biology.* 2019; 20(6): 187-00.

Kang KL, Lee SW, Ahn YS, Kim SH, Kang YG. Bioinformatic analysis of responsive genes in two-dimension and three-dimension cultured human periodontal ligament cells subjected to compressive stress. *J. Periodont Res.* 2013; 48: 87-97.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ .Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008; 29:155–92

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

Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim FM, Lee CB, Jeon YM, Kim JG, Lee JC. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling. *J. Cell Biochem.* 2009; 106:101-19.

Referências

- 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;112:2891-01.
- 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;41:446-52.
- Li Y, Zheng W, Liu JS, Wang J, Yang P, Li ML, Zhao ZH Expression of osteoclastogenesis inducers in a tissue model of peri-odontal ligament under compression. *J. Dent Res.* 2011; 90:115–20.
- Liu J, Bian Z, Kuijpers-Jagtman AM. Skin and oral mucosa equivalents: Construction and performance. *Orthod Craniofac Res.* 2010;13:11–20.
- Li M, Zang C, Yang Y. Effects of mechanical forces on osteogenesis and osteoclastogenesis in human periodontal ligament fibroblasts. *Bone Joint Res.* 2019; 8:19–31.
- Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin Oral Investig.* 2011;15:941–52.
- Meikle MC .The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J. Orthod.*2006;28:221–40.

Referências

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

Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American J. of Physiology.* 1997; 273:1109-23.

Mitsubishi M., Yamaguchi M., Kojima T., Nakajima R., Kasai K. Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF and RANKL expression. In human periodontal ligament cells. *Inflamm. Res.* 2011;60:187-94.

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

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

Nettelhoffl L, Grimm S, Jacobs C, Walter CAMP, Goldschmitt J, Wehrbein H. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *Clin Oral Invest.* 2016; 20:621–29.

Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic

Referências

tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006; 9: 63-70.

Nokhbehsaim M, Deschner B, Winter J, Bourauel C, Jager A, Jepsen S, Deschner J. Anti-inflammatory effects of EMD in the presence of biomechanical loading and interleukin-1b in vitro. *Clin Oral Invest.* 2012; 16:275-83.

Romer P .The molecular mechanism behind bone remodelling: A review. *Clin Oral Investig.*2009; 13: 355–62.

Sancho-Tello M, Martorell S, Roig MM, Milián L, Gámiz-González MA, Ribelles JLG, Carda C. Human platelet-rich plasma improves the nesting and differentiation of human chondrocytes cultured in stabilized porous chitosan scaffolds. *J. Tissue Eng.* 2017;8:1-6.

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

Sokos D, Everts V, Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblastos in osteoclastogenesis : a review. *J. Periodont Res.* 2014; 50:152-59.

Souza RFB, Souza FCB, Rodrigues C, Drouin B, Popat KC, Mantovani D, Moraes AM. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. *Materials Science & Engineering C.* 2019; 94:364–75.

Uygun BE, Bou-Akl T, Albanna M, Matthew HW. Membrane thickness in an important variable in membrane scaffolds: influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. *Acta Biomater.* 2010; 6:2126-31.

Varoni EM, Vijayakumar S, Canciani E, Cochis A, De Nardo L, Lodi G, Rimondini L, Cerruti M. Chitosan-Based Trilayer Scaffold for Multitissue Periodontal Regeneration. *J. Dent Res.* 2018; 97(3): 303–11.

Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. *J. Dent Res.* 2007;86:1212-16.

Xu T, Molnar P, Gregory C, Das M, Boland T, Hickman JJ. Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials.* 2009; 30;4377-83.

Zang L, Ding Y, Rao GZ e Miao D. Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts. *Brasilian Journal of Medical and Biological Res.* 2016. 49;4:1414-31.

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

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T,

Referências

Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA.2009; 95:3597–02.

FONTES CONSULTADAS

Fontes Consultadas

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras. 2005; 20 (Supl. 2):02-9.

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. Acta Cir Bras. 2005; 20 (Supl. 2):19- 25.

NORMAS ADOTADAS

Descritores em Ciências da Saúde (Decs) [Internet]. São Paulo: Biblioteca Regional de mMedicina (Bireme) – [citado 2013 Jan 27].

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

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2017. PubMed.gov. U.S.National Library of Medicine – National Institutes of Health. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Terminologia anatômica Internacional. Federative Committee on Anatomical Terminology. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. Barueri: Manole; 2001.248p.

APÊNDICE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 12 de agosto de 2019
CEP N 7940050819

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Andrea Cristina Baptista Coelho De Fariacoelho De Faria
Depto/Disc: Cirurgia/cirurgia Plástica
Pesquisadores associados: Antonio Carlos Alise (unifesp); Lydia Masako Ferreira (orientador)

Título do projeto: "EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA RANK/RANKL/OPG SOBRE UMA CULTURA TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS SOB COMPRESSÃO CONTÍNUA".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Os trabalhos desenvolvidos até hoje no laboratório de cultura de células utilizaram a aplicação de um modelo de compressão diretamente sobre as células. O fato de se utilizar um arcabouço com propriedades físicas e mecânicas mais próximas da mucosa oral como pode produzir resultados diversos na análise do modelo de compressão contínuo sobre os fibroblastos derivados do ligamento periodontal in vitro.

O estudo tem como objetivo, avaliar a expressão do sistema RANK/RANKL/OPG na cultura tridimensional de fibroblastos humanos cultivados sob compressão contínua.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 06/08/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo