

**MATEUS DE ABREU PEREIRA**

**CARGA COMPRESSIVA NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DO SISTEMA RANK/RANKL E OPG EM  
FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL HUMANO**

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

São Paulo

2019

**MATEUS DE ABREU PEREIRA**

**CARGA COMPRESSIVA NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DO SISTEMA RANK/RANKL E OPG EM  
FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL HUMANO**

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira

Coorientador: Prof. Antonio Carlos Aloise

São Paulo

2019



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



**COORDENAÇÃO: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lydia Masako Ferreira**

**ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lydia Masako Ferreira**

**COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise**

Pereira, Mateus de Abreu.

**Carga compressiva na expressão gênica do sistema RANK/RANKL e OPG em fibroblastos do ligamento periodontal humano.** / Mateus de Abreu Pereira. - São Paulo, 2019.

XI, 73 f.

Dissertação Doutorado – Universidade Federal de São Paulo.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Compressive load on RANK / RANKL and OPG gene expression in human periodontal ligament fibroblasts.

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

## **DEDICATÓRIA**

A minha esposa, **BRUNA SILVA DA ROCHA DE ABREU PEREIRA** ,  
pelo amor, companheirismo, força e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, **DANIEL PEREIRA JUNIOR e ROSE MARY  
CARDOSO DE ABREU PEREIRA**, pela dedicação aos seus filhos e  
exemplo de valores éticos e morais.

Aos meus irmãos, **BARBARA CRISTINA DE ABREU PEREIRA e  
ALEXANDRE DE ABREU PEREIRA** pelo apoio, incentivo e ajuda em  
todos estes anos.

Ao meus sogros **LUIZ ROBERTO DA ROCHA e MARGARETE  
SILVA DA ROCHA** e meus cunhados **KARINA SILVA ROCHA,  
ARTHUR SILVA ROCHA e PAULO SILVA ROCHA.**

## 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 Cirurgia Translacional 11º andar do Edifício de Pesquisa 1, orientadora deste projeto, pela oportunidade da convivência, e pelo conhecimento compartilhado com seus alunos.

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica e Co-orientador – UNIFESP, uma pessoa a qual aprendi a respeitar pela dedicação ao conhecimento e a ciência e lealdade aos amigos, exemplo de dedicação e esmero a ciência e a instituição Unifesp.

Aos novos amigos que fiz de pesquisa **FABIO ALESSANDRO SIMÕES, ANDREA CRISTINA BAPTISTA COELHO DE FARIA e FERNANDO BIOLCATI CHIANTIA**, pessoas que demonstraram tamanha dedicação aos estudos, foram verdadeiros exemplos de união ao grupo e a pesquisa.

Aos colegas de laboratório e PÓS GRADUAÇÃO **ANDREA CASTILHO SOARES DE AZEVEDO, FÁBIO SCHEMANN-MIGUEL, DELAINE PIRES ROMAN e 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 as segundas-feiras.

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

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

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>06</b>
<b>3 LITERATURA.....</b>	<b>08</b>
<b>4 MÉTODO.....</b>	<b>26</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>FONTES CONSULTADAS.....</b>	<b>54</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

LPH –	ligamento periodontal humano
PBS –	Phosphate buffered saline
HBSS –	Hank's Balanced Salt Solution
RT-PCR-	Real Time Polimerase Chain Reaction
OPG –	Osteoprotegerina
RANK –	Receptor ativador de fator nuclear $\kappa$ B
RANKL -	Receptor ativador de fator nuclear $\kappa$ B Ligante
ELISA -	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GCF-	Fluído crevicular gengival
COX-2	Cicloxygenase 2
PGE2	Próstraglandina
ODF	Fator de diferenciação de osteoclastos
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos

## RESUMO

**Introdução:** A movimentação dentária envolve uma série de reações bioquímicas complexas, no osso da maxila e da mandíbula, conduzidas devido à um mecanismo de defesa fisiológico que é conhecido por mecanotransdução. A utilização de modelos *in vitro* são de grande valia para a compreensão do comportamento celular na sua individualidade, e o cultivo de fibroblastos do ligamento periodontal, associada a simulação de carga compressiva, leve ou pesada, permite analisar as modificações metabólicas ocorridas nestas células. O sistema formado pelas proteínas receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B Ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) está diretamente ligado a formação e reabsorção do tecido ósseo. **Objetivo:** Avaliar a carga compressiva na expressão dos genes RANK\RANKL e OPG em fibroblastos do ligamento periodontal humano. **Métodos:** Fibroblastos periodontais humanos de linhagem foram expandidos e depois cultivados em placas de 6 poços, onde foram submetidos a cargas contínuas de 4, 12, 24 e 48 g/cm<sup>2</sup> pelo período de 6 horas. Após esse período, o RNAm foi extraído e avaliado pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real RT-PCR, utilizando sondas *TaqMan*. **Resultados:** Na análise dos resultados demonstrou-se uma expressão do gene OPG, porém não sendo identificado a expressão de RANK e RANKL. **Conclusão:** Foi observado que o aumento da carga compressiva estimulou a expressão gênica de OPG, porém não de RANK/RANKL nos grupos avaliados em fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano.

## ***ABSTRACT***

**Introduction:** Tooth movement involves a series of complex biochemical reactions in the maxilla and mandible bone, conducted due to a physiological defense mechanism known as mechanotransduction. The use of in vitro models is of great value for understanding the cellular behavior in their individuality, and the cultivation of periodontal ligament fibroblasts, associated with compressive load simulation, light or heavy, allows the analysis of metabolic changes in these cells. . The system formed by  $\kappa$ B nuclear factor activating receptor (RANK) proteins,  $\kappa$ B nuclear factor activating receptor (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) proteins are directly linked in bone tissue formation and resorption.

**Objective:** To evaluate compressive load on the expression of RANK \ RANKL and OPG genes in human periodontal ligament cells under continuous pressure. **Methods:** Human periodontal fibroblasts were expanded and then cultured in 6-well plates, where they were subjected to continuous loads of 4, 12, 24 and 48 g / cm<sup>2</sup> for a period of 6 hours. After this period, mRNA was extracted and evaluated by the RT-PCR Real-Time Polymerase Chain Reaction method using TaqMan probes. **Results:** The analysis of the results showed an expression of the OPG gene, but the expression of RANK and RANKL was not identified. **Conclusion:** It was observed that increased compressive load stimulated gene expression of OPG but not RANK / RANKL in the groups evaluated in adult human periodontal ligament fibroblasts.



## 1 Introdução

Quando um tecido é estimulado mecanicamente por tensão, compressão, osmose, pressão, gravidade ou tensão superficial, as células deste tecido sofrem alterações na sua forma e conseqüentemente seu metabolismo se altera para adaptar-se a uma nova configuração estrutural. A movimentação dentária induzida envolve uma série de reações bioquímicas no osso da maxila e da mandíbula, conduzidas devido a um mecanismo de defesa fisiológico conhecido por mecanotransdução BRASDA (1997), QIN & HU (2014). Essa modificação no metabolismo é capitaneado pela expressão de genes que irão sinalizar ao meio em que se encontram o recrutamento de moléculas especializadas para alterar a consistência, forma e até a destruição do tecido envolvido KANZAKI *et al.* (2002). No caso da movimentação dentária induzida, temos o alvéolo dentário o qual acomoda a raiz do dente, a gonfose, a qual todo este mecanismo é mais complexo pois ocorrem dois estímulos mecânicos simultaneamente, tensão e compressão do ligamento periodontal. Sem o ligamento periodontal é impossível que haja a movimentação dentária induzida que estimule uma remodelação do osso alveolar com remoção no lado compressivo e formação no lado de tensão KANZAKI *et al.* (2019). Essa estrutura altamente complexa, cuja unidade celular principal é o fibroblasto do ligamento periodontal, regido pelo princípio da mecanotransdução celular, promove a liberação de genes responsáveis pelo recrutamento de osteoclastos e osteoblastos SOKOS, EVERT, de VRIES (2014), NETTELHOFF (2016).

Existem três proteínas envolvidas neste processo, a osteoprotegerina (OPG), o Receptor Ativador de Fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) e Receptor

## Introdução

Ativador de Fator nuclear  $\kappa$ B – ligante (RANKL), que são responsáveis pelo recrutamento de células promotoras da osteoclastogênese, viabilidade dessas células, e que possuem a capacidade de neutralizar a função principal de cada uma delas. Torna-se pois, de fundamental importância, o completo entendimento na dinâmica da expressão gênica dessas proteínas. Com a utilização de equipamentos de análise mais precisos é possível identificar os aspectos bioquímicos responsáveis por essas modificações celulares, as proteínas e as moléculas envolvidas em cada etapa, mas com o seu total funcionamento e os mecanismos envolvidos ainda sendo desconhecido SIMONET *et al.* (1997), KANZAKI *et al.* (2002), KOOK, JANG, LEE (2011), KANZAKI *et al.* (2019). A osteoclastogênese é o processo de diferenciação celular e está diretamente envolvido em processos inflamatórios patológicos tais como artrites reumatóides e doenças osteoporóticas, periodontites, metástase óssea do câncer; e processos fisiológicos como a remodelação óssea em articulações NAKAGAWA *et al.* (1998), NISHIJIMA *et al.* (2006).

A Osteoprotegerina (OPG), tem sido descrita como um “protetor do osso”, representa uma proteína madura de 380 aminoácidos. É secretada como uma proteína solúvel e é conhecida por ser expressa em vários tecidos, mas principalmente por células de linhagem osteoblástica. Sua principal atividade biológica é a inibição da diferenciação de osteoclastos, e estimular sua apoptose. O receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), que pode ser definido como um peptídeo de 616 aminoácidos que se adere a superfície celular de precursores de osteoclastos, é expressa por esta célula e outros tecidos, como músculo esquelético e fígado e tem como principal função ativar os osteoclastos unindo-se ao receptor de fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) que é um peptídeo de 317 aminoácidos, secretado por osteoblastos e uma vez que se une a RANK inibe a apoptose

## Introdução

dos osteoclastos. Unido a OPG, RANKL inibe a atividade osteoclástica SIMONET *et al.* (1997); LACEY *et al.* (1998) e NAKAGAWA *et al.* (1998). O aumento dessa razão sugeriu reabsorção óssea e o decréscimo indicou a possibilidade da formação óssea JACOBS *et al.* (2013).

Tem sido estudada a relação entre RANKL / OPG e a progressão da movimentação dentária induzida. A compressão induz a expressão de RANKL e reduz a expressão de OPG em células do ligamento periodontal humanos, aumentando assim a relação RANKL / OPG e favorecendo a osteoclastogênese mediada por RANKL. Por outro lado, o estresse aumenta a expressão de OPG em células do ligamento periodontal humanos *in vivo* e *in vitro*, que por sua vez inibe RANKL. No entanto, o mecanismo que regula a expressão de OPG em células PDL sob diferentes estresses mecânicos ainda não está claro KANZAKI *et al.* (2019).

Os modelos experimentais *in vitro* não são capazes de simular toda a complexidade de todos os órgãos e tecidos, estruturas e sua interatividade do corpo humano, porém, é possível simularmos diferentes aspectos físicos e parâmetros químicos de tecidos ou células individualmente através de mecanismos simples porém que exigem a aplicação de um profundo conhecimento de engenharia, biologia, química e física KANZAKI *et al.* (2002), MITSUHASHI (2011), LI, ZHANG e YANG (2019). Além disso, na atual dinâmica de pesquisas laboratoriais envolvendo o entendimento dos mecanismos celulares, além do objetivo de se otimizar o processo de cultura celular para futuras terapias, têm sido demonstrado que os fibroblastos podem ser uma alternativa viável à utilização de células primordiais (células tronco), uma vez que o processo de cultura, análise e aproveitamento destas células é menos complexo e possui custo reduzido ICHIM, O'HEERON e KESARI (2018). Tais fatores possibilitaram ao grupo a elaboração de um modelo compressivo o qual demonstrou-se

## Introdução

eficaz na reprodutibilidade da compressão dos fibroblastos do ligamento periodontal e na avaliação dos parâmetros necessários para uma simulação *in vitro*.

Objetivo

**2 OBJETIVO**

## **2 Objetivo**

Avaliar à carga compressiva na expressão gênica do sistema RANK\RANKL e OPG em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano.



### 3 Literatura

BRASDA (1997) enfatizou que o entendimento dos fundamentos biológicos da movimentação dentária é crucial para a ortodontia. A identificação, em métodos como o PCR, dos componentes dos sinais de transdução iniciados após a aplicação de força permitiu a sua manipulação levando a melhores resultados. Para examinar os efeitos da estimulação mecânica no periodonto, células do ligamento periodontal foram isoladas, colocadas em meio de cultura e caracterizadas. Em contraste com os fibroblastos gengivais, os fibroblastos do periodonto humano exibiram características típicas dos osteoblastos. Para entender o papel da estimulação mecânica, forças ortodônticas relevantes foram simuladas *in vitro*, em mecanismos que simulavam tensão e compressão. Os autores obtiveram como resultado que as células do ligamento periodontal humano responderam ao estiramento mecânico por sinais de expressão de genes que provavelmente incluíram pequenas proteínas ligantes de GTP (Guanosina Trifosfato) e fatores de transcrição (c-Jun e c Fos).

SIMONET *et al.* (1997) identificaram uma nova glicoproteína secretada em ratos murinos (fígado, pulmão, coração e rim) que regula a reabsorção óssea. Esta proteína, denominada osteoprotegerina (OPG), seria um novo membro da super família de receptores de TNF. Segundo os autores, *in vivo*, a expressão hepática de OPG resultaram numa profunda osteopetrose não letal em ratos transgênicos, coincidente com uma redução em fases posteriores da diferenciação de osteoclastos. Esses mesmos efeitos foram observados com a administração de OPG recombinante em camundongos normais. Os autores relataram que OPG bloqueia perda óssea associada à ovariectomia em ratos. Estes dados mostraram que a OPG

poderia atuar como um fator solúvel na regulação da massa óssea e implica uma utilidade para a OPG no tratamento da osteoporose associados com o aumento da atividade dos osteoclastos.

LACEY *et al.* (1998) analisaram e identificaram uma molécula ligante para osteoprotegerina, a qual seria uma citocina relacionada com fatores de necrose tumoral (TNF) e que substituiria a necessidade de células estromais, vitamina D3, e glucocorticóides no modelo de co-cultura de osteoclastogênese *in vitro*. Neste estudo os autores descreveram que OPG ligante (OPGL) liga-se a uma célula progenitora hematopoiética única que está comprometida com a linhagem dos osteoclastos e estimula a rápida indução de genes que caracterizam o desenvolvimento de osteoclastos. OPGL ativa diretamente osteoclastos isolados maduros *in vitro*, e a administração de curto prazo em ratos adultos normais resulta na ativação dos osteoclastos associado com hipercalcemia sistêmica. Segundo os autores OPGL é um fator de diferenciação e ativação de osteoclastos, sendo que os efeitos do OPGL estão bloqueados *in vitro* e *in vivo* por OPG, sugerindo que OPGL e OPG seriam os fatores de regulação extracelular essenciais no desenvolvimento dos osteoclastos.

NAKAGAWA *et al.* (1998) descreveram que o fator de diferenciação de osteoclastos (ODF) é um ligante para o fator de inibição da osteoclastogênese / osteoprotegerina (OCIF / OPG) além de mediar um sinal essencial para a osteoclastogênese. A forma solúvel de ODF liga-se diretamente aos progenitores de osteoclastos, o que sugeriu a presença de um receptor ligado à membrana para ODF (ODFR) nas células. Para entender o mecanismo de transdução de sinal mediador de ODF na osteoclastogênese, Os autores clonaram o ODFR molecularmente de uma

## Literatura

linha de osteoclastos macrófagos-like das células progenitoras de ratos. A análise da sequência de nucleótidos revelou que ODFR foi idêntica a RANK, um membro recentemente identificado da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que está envolvida na regulação da função de células dendríticas. Um anticorpo poli-clonal contra o domínio extracelular de RANK induziu osteoclastogênese na presença de fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF). Em contraste, tanto um RANK solúvel e fragmento Fab bloquearam a ligação de ODF com RANK e mediadores de osteoclastogênese ODF. Estes resultados indicam que RANK é o receptor de sinalização essencial para o mediador de osteoclastogênese ODF.

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

membro da superfamília de receptores de TNF, que também é secretado pelas células da linhagem dos osteoblastos.

KANZAKI *et al.* (2002) examinaram como o estresse mecânico afeta a atividade de suporte de osteoclastogênese de células do ligamento periodontal (LPD). Levantou-se a hipótese que a compressão mecânica promove osteoclastogênese através da indução da cicloxigenase 2 (COX-2), promovendo a produção de próstaglandina E2 (PGE2), o que resulta no aumento da regulação da expressão de RANKL nas células do LPD. Para testar esta hipótese, os autores utilizaram um sistema de cultura de células primárias do ligamento periodontal humano. Elas foram compactadas continuamente e, em seguida foram co-cultivadas com células mononucleares de sangue periférico durante 4 semanas. As células do LPD sob estresse mecânico tiveram um aumento de fatores de osteoclastogênese em PBMC. Além disso, a expressão de RNAm de RANKL em células do LPD aumentou com a força de compressão. Curiosamente, a expressão de OPG permaneceu constante ao longo de força de compressão ou com o tratamento de PGE2. Em conclusão, a força de compressão regula a expressão RANKL em células do LPD. Além disso, a expressão de RANKL devido ao *stress* mecânico em células do LPD era dependente de PGE2. Os autores demonstraram que fibroblastos do LPD, expressaram elevada atividade de fosfatase alcalina, e que podem auxiliar na osteoclastogênese quando sob carga compressiva.

NISHIJIMA *et al.* (2006) realizaram estudo para determinar os níveis de receptor ativador de fator nuclear de kB ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) no fluido crevicular gengival (GCF) durante os movimentos dentários ortodônticos. O segundo objetivo foi investigar o

## Literatura

efeito da força de compressão na produção de RANKL e de OPG pelas células do ligamento periodontal humano (hPDL). Dez pacientes adolescentes foram incluídos. O GCF foi coletado da margem cervical distal dos dentes experimentais e controle a 0, 1, 24 e 168h após a força de retração ser aplicada. Estudo *in vitro* foi feito para examinar a secreção de RANKL e OPG das células do hPDL após a aplicação de força de compressão (zero, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0 g/cm<sup>2</sup> por 48hs) com cilindros de vidro nas respectivas forças. Foram utilizados *Kits* de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para determinar os níveis de RANKL e níveis de OPG no GCF e no meio condicionado. Como resultado, os níveis de RANKL no GCF foram significativamente mais altos, e os níveis de OPG foram significativamente mais baixos nos caninos experimentais do que nos dentes controle em 24h, mas não houve significância a 0, 1 ou 168h. Os estudos *in vitro* indicaram que a força de compressão aumentou significativamente a secreção de RANKL e diminuiu a de OPG nas células do hPDL de forma dependente do tempo e da magnitude da força. A secreção de RANKL estimulada pela compressão aumentou aproximadamente 16.7 vezes e a de OPG diminuiu 2.9 vezes, comparada com o grupo controle. Os resultados obtidos sugeriram que as alterações da quantidade de RANKL e OPG poderiam estar envolvidas na reabsorção óssea como resposta à força de compressão.

NAKAO *et al.* (2007) estudaram a força de compressão intermitente para verificar se esta estimula a reabsorção óssea no tratamento ortodôntico. O estudo examinou o mecanismo molecular em células do ligamento periodontal de humanos (hPDL) estimulados por uma força intermitente. Células do hPDL foram submetidas a uma força de compressão (2,0 ou 5,0 g /cm<sup>2</sup>) durante 2 a 4 dias. Forças contínuas e/ou

## Literatura

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 Interleucina IL-1 $\beta$  foram maiores com forças intermitentes do que com força contínua. Um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  inibiu a expressão de RANKL induzida por força compressiva. Estes resultados indicaram que a IL-1 $\beta$  é um fator autócrino de regulação de compressão expressão induzida por RANKL em células PDL, e que a força intermitente pode efetivamente induzir a RANKL em células PDL com menos danos celulares.

NAKAJIMA *et al.* (2008) relataram que o estresse mecânico ocasionado pelo aparelho ortodôntico, induz a produção de substâncias biologicamente ativas. Fator de crescimento de fibroblastos é uma citocina multifuncional que possui vários efeitos nas células fibroblásticas e fator 2 de crescimento de fibroblasto, desempenhando papel importante na remodelação do ligamento periodontal. O receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) é uma importante proteína envolvida na osteoclastogênese e os autores relataram recentemente que os níveis de RANKL foram aumentados pela força de compressão *in vitro*. Foram investigados os efeitos da força de compressão no fator 2 de crescimento de fibroblastos e produção de RANKL pelas células do ligamento periodontal humano. Uma força de compressão (0,5 - 4,0 g/cm<sup>2</sup>) foi aplicada nas células do ligamento periodontal humano por 0 - 24 horas, utilizando cilindros de vidro com diferentes pesos. As quantidades de RANKL solúveis (sRANKL) e fator 2 de crescimento de fibroblastos foram medidas usando ELISA, enquanto que os níveis de RNAm foram determinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, os anti-fator 2 de

## Literatura

crescimento de fibroblastos foram adicionados aos meios de cultura de células e mediram a inibição de sRANKL e fator 2 de crescimento de fibroblastos pela *enzyme linked immunosorbent assay*. A força de compressão induziu a nível mais alto de RANKL e fator 2 de crescimento de fibroblastos, no tempo e magnitude da força de uma forma dependente e tratamento com fator 2 de crescimento anti-fibroblasto inibiu a liberação da sRANKL. Concluíram que o fator 2 de crescimento de fibroblasto poderia estar envolvido parcialmente na osteoclastogênese durante o movimento dental.

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

## Literatura

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

KOOK *et al.* (2009) 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 nessa 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 30-90 min mediu-se os níveis de RANKL e OPG, que aumentaram de forma diretamente proporcional ao aumento da força.

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

KOOK, JANG & LEE (2011) relataram que fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) sentem e respondem a estímulos mecânicos e participam da reabsorção óssea alveolar durante o tratamento ortodôntico.

## Literatura

Este estudo examinou como o PDLF influencia a osteoclastogênese de macrófagos derivados da medula óssea (BMM), após a aplicação de tensão ou força de compressão. Investigaram também se linfócitos poderiam ser estimulador primário da ativação osteoclástica, durante remodelação óssea alveolar. Os autores descobriram que as forças mecânicas inibiram a diferenciação osteoclástica de BMM em co-culturas com PDLF, com PDLF produzindo predominantemente osteoprotegerina (OPG), em vez de receptor ativador do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligante (RANKL). Em particular, os PDLF aumentou a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em resposta à compressão. TNF- $\alpha$  exógeno aumentou o número de células TRAP- positivas e formação de poço em co-culturas de BMM com células *Jurkat*, mas não com células BJAB e este efeito foi quase totalmente inibido por anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , ou do receptor de TNF- $\alpha$ . Coletivamente, os resultados sugeriram que PDLF podem secretar níveis relativamente altos de TNF- $\alpha$  no lado de compressão do que no lado de tensão e este desequilíbrio conduz a expressão de RANKL, ativando CD4 $\beta$  células T, o que facilitou a reabsorção óssea durante a movimentação dentária ortodôntica.

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

## Literatura

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

SOKOS, EVERT, de VRIES (2014) afirmaram em uma revisão de literatura que o dente não pode se deslocar no osso alveolar sem a presença do ligamento periodontal. Aplicando-se diferentes tipos de forças mecânicas nos fibroblastos do ligamento periodontal pode resultar em uma modulação na sua habilidade de produzir molécula que são associadas a osteoclastogênese. A amplificação dessas forças, tende a causar um aumento na expressão gênica de RANKL, dependendo do tempo e força aplicados, por meio de um aumento na produção de prostaglandina-E2, mas

## Literatura

sem efeitos nos níveis de OPG. A síntese de RANKL foi hipo-expressa e de OPG hiper-expressa em resposta a uma hora de forças de tensão e compressão, o que levou a uma redução de células osteoclásticas. Concluiu que, com relação a formação osteoclástica, os fibroblastos do ligamento periodontal possuem um duplo papel significativo na remodelação do osso alveolar. Em condições fisiológicas pode sintetizar altos níveis de OPG comparado a RANKL, que possui um efeito inibitório na osteoclastogênese. Quando o equilíbrio fisiológico é perturbado, seja por forças mecânicas ou infecção bacteriana, a produção de moléculas que estimulam a osteoclastogênese é aumentada, levando possivelmente ao aumento de osteoclastos.

QIN & HU (2014) enfatizaram que enquanto a sinalização da mecanotransdução foi comprovada essencial para a regeneração de tecidos, continua crítica para determinar respostas celulares específicas tais como sinais mecânicos em mecanismos subjacentes. A dinâmica de fluidos e o fluxo de como eles são induzidos por carga mecânica tem demonstrado que há potencial para regular a adaptação óssea e reduzir a sua perda. Vias de mecanotransdução são de grande interesse na elucidação da produção de sinais mecânicos e tais efeitos observados incluíram redução da perda óssea, aumento da formação óssea e diferenciação de células osteogênicas. O objetivo desta revisão foi desenvolver uma compreensão molecular dos processos de mecanotransdução em regeneração tecidual podendo fornecer novos *insights* sobre a fisiologia óssea. Foi discutido o potencial de carga mecânica utilizada para induzir o fluxo de fluido ósseo dinâmico, regulação de adaptação óssea e otimização de parâmetros de estimulação em vários níveis de carga. O potencial de carga mecânico para regular a microcirculação também foi discutida. Estes dados e discussões destacaram

o processo ainda altamente complexo e coordenado de mecanotransdução na regeneração do tecido ósseo.

NETTELHOFF *et al.* (2016) investigaram e compararam *in vitro* as alterações em fibroblastos do ligamento periodontal humano e osteoblastos, após a aplicação de força de compressão utilizando dois diferentes tipos de cargas. Os fibroblastos e osteoblastos foram expostos às forças compressivas computadorizadas (*Compression Plus System Flexcell – FX-3000*) com uma magnitude de 2 cN/mm<sup>2</sup> e 4 cN/mm<sup>2</sup> durante 12 horas para simular forças moderadas e altas respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a taxa de apoptose pelo ensaio do TUNEL. As expressões dos genes da fosfatase alcalina, osteocalcina, osteoprotegerina e RANKL foram analisadas usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Osteopontina, matriz metaloproteinase e inibição do tecido de metaloproteinase foram quantificados pelo ensaio ELISA. A força de 4 cN/mm<sup>2</sup> diminuiu a viabilidade celular, especialmente nos osteoblastos, mas não induziu ao aumento da apoptose. A expressão do gene de fosfatase alcalina aumentou depois de mais de 2 cN/mm<sup>2</sup> nos fibroblastos e após 4 cN/mm<sup>2</sup> nos osteoblastos. Osteocalcina não sofreu alteração após a aplicação das forças compressivas. A maior relação de RANKL/Osteoprotegerina foi medida após a aplicação de 2 cN/mm<sup>2</sup> em ambos os tipos celulares. Concluíram que os osteoblastos manifestaram um maior efeito sobre a remodelação óssea por meio da regulação positiva da Osteopontina, enquanto os fibroblastos facilitaram a movimentação ortodôntica, influenciando a matriz extracelular por meio da proporção de metaloproteinase 8 e 1.

ICHIM, O'HEERON & KESARI (2018) relataram que a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) oferece grande potencial para o tratamento de doenças através da capacidade multifuncional e responsiva dessas células. Em numerosos contextos, as CTM demonstraram reduzir a inflamação, modular as respostas imunes e fornecer suporte de fatores tróficos para a regeneração. Embora a fonte de CTM mais usada, a medula óssea forneça relativamente pouco material inicial para expansão celular e exija meios de extração invasivos, os fibroblastos são facilmente colhidos em grande número de vários resíduos biológicos. Além disso, a expansão *in vitro* de fibroblastos é significativamente mais fácil, dada a robustez dessas células na cultura de tecidos e o menor tempo de duplicação em comparação com as CTM típicas. Os autores apresentaram o conceito de que, em alguns casos, os fibroblastos podem ser utilizados como terapia celular mais prática e potencialmente mais eficaz do que as células-tronco mesenquimais. Ação Anti-inflamatória, imunológicos e as propriedades moduladoras e regenerativas dos fibroblastos foram discutidas no contexto da medicina regenerativa e os autores concluíram que há um vasto campo de aplicação terapêutica ainda não explorado na medicina.

LI, ZHANG & YANG (2019) Afirnam que muitos estudos *in vitro* investigaram o mecanismo pelo qual os sinais mecânicos são transduzidos em sinais biológicos que regulam a homeostase óssea via fibroblastos do ligamento periodontal durante o tratamento ortodôntico, mas os resultados não foram revisados sistematicamente. Considerando os parâmetros de várias abordagens de carga mecânica *in vitro* e seus efeitos nas propriedades osteogênicas e osteoclastogênicas dos fibroblastos do ligamento periodontal os autores tiveram como objetivo fazer isso. Palavras-chave específicas foram usadas para pesquisar bancos de dados

## Literatura

eletrônicos (EMBASE, PubMed e Web of Science) para literatura em inglês publicada entre 1995 e 2017. Um total de 26 estudos dos 555 artigos obtidos por meio da busca no banco de dados foram finalmente incluídos e quatro tipos principais de abordagem biomecânica foram identificados. A força de compressão é caracterizada pela aplicação estática e contínua, enquanto a força de tração é principalmente cíclica. Apenas nove estudos investigaram os mecanismos pelos quais os fibroblastos do ligamento periodontal transduzem estímulos mecânicos. Os estudos forneceram evidências *in vitro* de regimes de carregamento em que os fibroblastos do ligamento periodontal desempenham um papel único e dominante na regulação da remodelação óssea durante o movimento dentário ortodôntico. As evidências dos estudos revisados descreveram as características dos fibroblastos do ligamento periodontal expostos à força mecânica. Concluíram que estudos adicionais devem ser realizados para explorar os efeitos da tensão estática nas propriedades citomecânicas, a necessidade de desenvolver novas e melhores técnicas para aplicação de carga compressiva estática, além de uma análise mais profunda dos sistemas reguladores subjacentes e modelos de aplicação de força *in vitro* que simulem a carga ortodôntica clínica, permitindo aos pesquisadores elucidar o comportamento biológico dos fibroblastos do ligamento periodontal em resposta a estímulos mecânicos. Além disso, o esclarecimento de alguns dos sistemas reguladores subjacentes ainda está para ocorrer e são necessários mais estudos para facilitar isso.

KANZAKI *et al.* (2019) descreve que os osteoclastos desempenham um papel crítico na reabsorção óssea devido ao movimento dentário ortodôntico (OTM). Na OTM, uma força é exercida sobre o dente, criando compressão do ligamento periodontal (PDL) em um lado do dente

## Literatura

e tensão no outro lado. Em resposta a essas tensões mecânicas, o equilíbrio do ativador de receptor do ligante kappa-B de fator nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) muda para estimular a osteoclastogênese. No entanto, o mecanismo de expressão de OPG nas células PDL sob diferentes pressões mecânicas permanece incerto. Nossa hipótese foi de que a compressão e a tensão induzem diferentes perfis de expressão de microRNA (miRNA), responsáveis pela diferença na expressão de OPG nas células PDL. Para estudar os perfis de expressão de miRNA resultantes de OTM, aplicaram força de compressão (2 g / cm<sup>2</sup>) ou força de tensão (alongamento de 15%) em células PDL humanas imortalizadas (HPL) por 24 h e o miRNA foi extraído. A expressão do miRNA em cada amostra foi analisada usando um microarray de miRNA humano, e as alterações na expressão do miRNA foram confirmadas por RT-PCR em tempo real. Além disso, o mimetismo e o inibidor de miR-3198 foram transfectados para células HPL, e a expressão e produção de OPG avaliadas. Descobrimos que certos miRNAs foram expressos diferencialmente sob compressão e tensão. A RT-PCR em tempo real confirmou que a compressão induzia a expressão de miR-3198, mas a tensão a reduzia, nas células HPL. Consistente com os relatórios anteriores, a expressão de OPG foi reduzida por compressão e induzida por tensão, embora o RANKL tenha sido induzido por compressão e tensão. A expressão de OPG foi regulada positivamente pelo inibidor do miR-3198 e reduzida pela imitação do miR-3198, nas células HPL. O inibidor do miR-3198 resgatou a regulação negativa da OPG mediada por compressão. Por outro lado, o miR-3198 imita a expressão reduzida de OPG sob tensão. No entanto, a expressão de RANKL não foi afetada pelo inibidor ou mimético do miR-3198. Concluíram que o miR-3198 é regulado positivamente por

## Literatura

compressão e é sub-regulado por tensão, sugerindo que o miR-3198 diminui a expressão da OPG em resposta ao estresse mecânico.



## **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/Hospital São Paulo, tendo sido aprovado na reunião do dia 31 de Outubro de 2016, sob número 9539241016 (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  $5 \times 10^5$  células, 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. O início do processo de cultura utilizou a densidade de semeadura dos Fibroblastos Periodontais de  $5 \times 10^5$  células em garrafas de cultura de  $75\text{cm}^2$  (Corning, MO, USA) em ambiente controlado de  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  (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 cultura, 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.

O congelamento das células foi realizado utilizando-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) em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/ml. Os criotubos foram imediatamente colocados em gelo a  $4^\circ\text{C}$  e transferidos para o congelador a  $-20^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 1 hora. A seguir, foram transferidos para o *freezer* a  $-80^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 48 horas e, armazenados no nitrogênio líquido, onde as células foram mantidas a  $-96^\circ\text{C}$  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 as células ressuspensas 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 este período, o meio foi tripsinizado e as células contadas de forma que houvesse  $2 \times 10^5$  em 200  $\mu\text{l}$  de meio de cultura.

#### 4.4 DELINEAMENTO DA PESQUISA

##### 4.4.1 Aplicação da Compressão Estática Contínua.

Para o ensaio de compressão foi utilizada a densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço diluídas em 200  $\mu\text{l}$  de meio Alfa-MEM, semeadas no centro

## Método

dos poços. As células foram pré-incubadas durante seis horas em meio de cultura contendo meio Alfa-MEM antes da aplicação da compressão estática. Após este período, o peso foi aplicado sobre as células durante seis horas na incubadora, ou seja, elas foram continuamente comprimidas, utilizando uma compressão uniforme, baseadas num modelo de compressão estática contínua para experiências *in vitro* (Figura 1) e seus diferentes tamanhos (Figura 2).

Este modelo consiste de um cilindro de aço inoxidável do tipo 304 com várias alturas (HB Usinagem LTDA, São Paulo Brasil) com diâmetro de 27 mm colocado no centro de cada poço da placa de cultura imediatamente sobre as células. As medidas estão descritas no Quadro 1.

**Quadro 1:** Dimensões dos cilindros de aço inoxidável utilizados no modelo compressivo.

PESO	ALTURA	DIÂMETRO	CARGA
22g	0,508 cm	2,7 cm	4g/cm <sup>2</sup>
68g	1,225 cm	2,7 cm	12g/cm <sup>2</sup>
138g	3,050 cm	2,7 cm	24g/cm <sup>2</sup>
274g	6,101 mm	2,7 cm	48g/cm <sup>2</sup>



Fig. 1: Cilindros posicionados na placa de 6 poços para aplicação da carga compressiva.

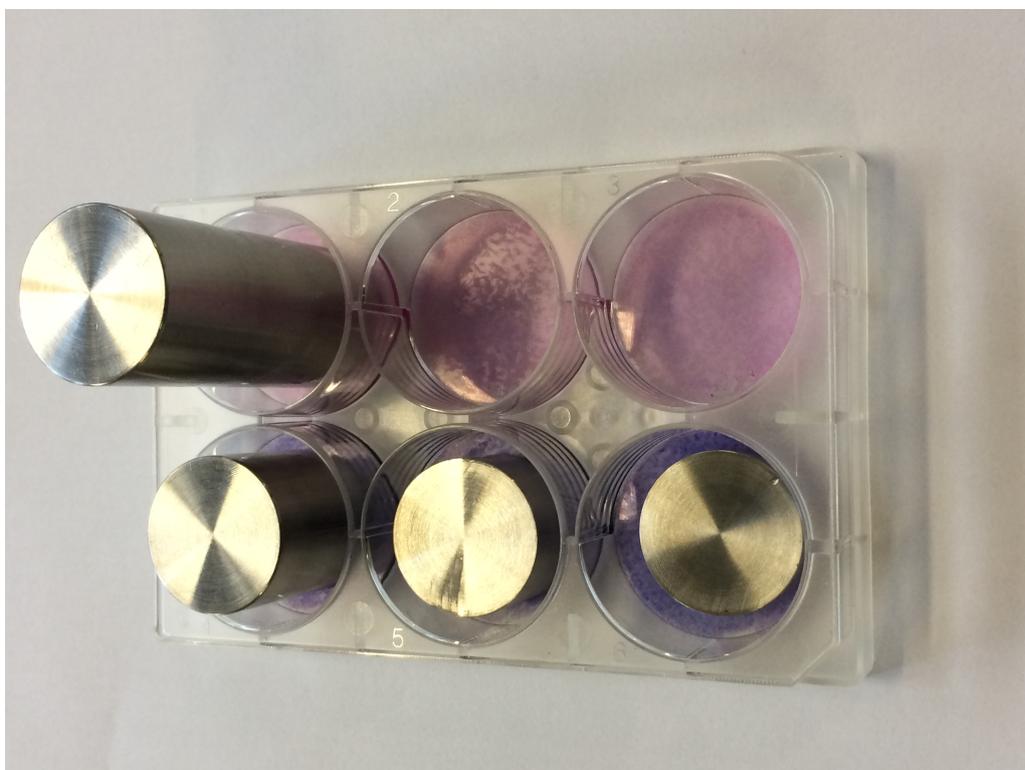


Fig. 2: Diferentes tamanhos dos cilindros utilizados no experimento

#### **4.4.2 Experimento**

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

Distribuição dos grupos:

- Grupo Controle (GC) (4,0 g/cm<sup>2</sup> por 6 horas);
- Grupo Experimental 1 (GE2) (12,0 g/cm<sup>2</sup> por 6 horas);
- Grupo Experimental 2 (GE3) (24,0 g/cm<sup>2</sup> por 6 horas);
- Grupo Experimental 3 (GE4) (48,0 g/cm<sup>2</sup> por 6 horas);

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA**

Para avaliação da presença dos genes alvos, utilizou-se o método de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando o sistema de sondas TaqMan Gene Expression Assays RT-PCR.

A amplificação por PCR será 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.

##### **4.5.1 Extração do RNA**

###### **4.5.1.1 Extração e purificação de RNA**

## Método

O RNA total foi extraído com o kit PureLink<sup>®</sup>RNA Mini Kit Invitrogen (Carlsbad, Ca. 92008. USA), conforme instruções do fabricante. O meio de cultura foi recolhido e as células lavadas com solução de fosfato-salino tamponado (PBS) uma vez. O PBS foi removido e foi adicionado 300 $\mu$ L de tampão de lise acrescido de 1% de b-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% 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 $\mu$ L de tampão de lavagem I (Wash Buffer I), e lavada por duas vezes com 500 $\mu$ L de tampão de lavagem II (Wash Buffer II). A cada etapa de lavagem seguiu-se uma centrifugação de 15 seg a 10.000 g. O RNA purificado aderido à microcoluna foi eluído em um volume de 20 $\mu$ L com água ultrapura livre de RNases e DNases, após 2 min 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* (Carlsbad, Ca. 92008. USA). Para tal, os 16 $\mu$ L das amostras foram incubados por 15min à temperatura ambiente com 2 $\mu$ L de DNase I *Buffer* and 2 $\mu$ L de DNase I, *Amplification Grade* (1 unidade/ $\mu$ L).

As amostras de RNA purificadas foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop* (Thermo Scientific, USA) e utilizadas para síntese do DNA complementar (cDNA).

#### 4.5.1.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado com o *SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, USA). A primeira fita foi sintetizada em

## Método

volume final de 20 $\mu$ L, a partir de um aporte de 250ng de RNA total livre de DNA, com 50 $\mu$ M (1 $\mu$ l) de Oligo DT, 50 $\mu$ M (1 $\mu$ l) de hexâmeros randômicos e 1 $\mu$ l do tampão de anelamento. A mistura foi incubada a 65°C por 5min e resfriada a 4°C por 1min. Em seguida, foram adicionados 10 $\mu$ l de tampão de reação de síntese cDNA (25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M DTT, 40 U/ $\mu$ l de RNase *Out*) e 2 $\mu$ L do mix com transcriptase reversa *SuperScript III* e RNase *Out* (2x Enzyme Mix) e seguiram-se inubações a 25°C por 10min, 50° C por 50 min e 85°C por 5min. Ao final da reação, a amostra foi diluída a um volume final de 50 $\mu$ l com água ultrapura livre de RNases e DNases.

#### 4.7.2 Reação de Real time – PCR

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

A reação de qPCR foi realizada utilizando *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*. Para avaliar a eficiência das *TaqMan™ Gene Expression Assays (Applied Biosystems™)* (quais TaqMans, 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 $\mu$ 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  $\mu$ L de *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*, 1  $\mu$ L da *TaqMan* e água livre de RNase para volume final de 10  $\mu$ L. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Após ter preparado o material na placa para a

## Método

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 GAPDH. 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001), onde:

Ct: indica o número do ciclo no qual a quantidade 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;

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

## 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

### 5.1 RANKL

Avaliação da expressão gênica por RT-PCR do RNA mensageiro da proteína receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) não foi expressa ou foi expressa em níveis não detectáveis pelo método utilizando sondas *TaqMan*.

### 5.2 RANK

Avaliação da expressão gênica por RT-PCR do RNA mensageiro da proteína receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) não foi expressa ou foi expresso em níveis não detectáveis pelo método utilizando sondas *TaqMan*.

### 5.3 OPG

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 apresentados no Quadro 1. Em todas as cargas aplicadas houve expressão de OPG, sendo a diferença da expressão não significativa entre os grupos (Tabela 1).

**Quadro 1:** Medias da leitura de expressão gênica

Grupos	Média	Variância	Desvio Padrão
4 g/cm <sup>2</sup>	23,845	0,469225	0,685
12 g/cm <sup>2</sup>	24,47	0,6084	0,78
24 g/cm <sup>2</sup>	24,365	0,001225	0,035
48 g/cm <sup>2</sup>	23,54	0,0169	0,13

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

	GC	GE1	GE2	GE3	P
OPG	23,84±0,68	24,47±0,78	24,36±0,03	23,54±0,13	0,05

GC: grupo controle células com compressão de 4g/cm<sup>2</sup>; GE1: grupo com compressão de 12g/cm<sup>2</sup>; GE2: grupo com compressão de 24g/cm<sup>2</sup>; GE3: grupo com compressão de 48g/cm<sup>2</sup>, todos por 6 horas.

Teste ANOVA *one way* com correção do teste de *Tukey*.

**6 DISCUSSÃO**

## 6 Discussão

A movimentação ortodôntica dos dentes (MOD) induzindo a osteoclastogênese possibilita um *start* no processo de remodelação do tecido ósseo. Existem evidências que células cultivadas em monocamadas (2D) podem expressar níveis diferentes de marcadores genéticos do que quando cultivadas em um modelo tridimensional (KANZAKI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2009; KOOK *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que as mudanças na relação RANKL/OPG poderia afetar o processo de remodelação óssea. O aumento dessa razão sugeriu reabsorção óssea e o decréscimo indicou a possibilidade da formação óssea KANZAKI *et al.*, (2002), NISHIJIMA *et al.* (2006) e TYROVOLA *et al.* (2008),

Não é consenso na literatura a relação entre o tempo de aplicação e a carga ideais para a simulação de forças compressivas em fibroblastos periodontais humanos, devido à diferença metodológica entre os estudos. A elaboração de um modelo para análise da compressão celular está baseada no princípio da mecanotransdução *in vivo*. Este fenômeno é conhecido por ser um estímulo mecânico onde a célula responde com necrose, apoptose ou diferenciação. No caso do fibroblasto derivado do ligamento periodontal, a mecanotransdução leva à produção e liberação de moléculas capazes de regular e normalizar a homeostase óssea local (KANZAKI *et al.*, 2002; JACOBS *et al.* 2013, QIN & HU, 2014 e KANZAKI *et al.*, 2019).

Na construção de modelo experimental para mecanotransdução a escolha da célula alvo, não pode levar em conta apenas o tipo celular, mas também o tecido a qual ela é oriunda LI, ZHANG & YANG (2019).

Nos estudos de NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAJIMA *et al.* (2008), em cultura de fibroblastos periodontais humanos visando investigar a expressão de RANKL e OPG, foram aplicadas forças compressivas diretamente sobre as células, com cargas que variaram de 0 à 4 g/cm<sup>2</sup> por um período de 0 – 48 horas. Nestes dois estudos os resultados demonstraram que a magnitude da força de compressão e o tempo estão diretamente relacionados com o aumento da produção de RANKL, o que se mostrou diferente do presente estudo, o qual no período de 6 horas, mesmo com o aumento de carga, não houve expressão de RANKL.

NAKAO *et al.* (2007) aplicaram a carga compressiva intermitente, alterando a quantidade de meio de cultura nos frascos, ou seja, quanto maior o volume maior seria o peso exercido sobre as células. De outra forma, KOOK, JANG & LEE (2011), JACOBS *et al.* (2013), e NETTELHOFF *et al.* (2016) utilizaram-se de um dispositivo específico para simulação do estímulo de tensão e compressão em cultura de células, o *Flexcell compression Plus System (Hillsborough, USA)* e o *Flexercell Strain Unit (Asbach, Germany)*. O presente estudo utilizou a carga compressiva constante aplicado por cilindros de aço inoxidável.

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

todas as cargas, no tempo de 6 horas e em monocamada, sem diferença significativa, assim como o estudo de KIM *et al* (2009). Isso leva a entender que no início do estímulo, em modelos monocamada, a sinalização de proteção pode ter sido acionado devido ao fato de estar em contato direto com as células, houve uma expressão relativa de OPG sem diferença significativa em um período de 6 horas de estímulo mecânico mesmo com o aumento das cargas compressivas.

KANZAKI *et al.* (2019), verificaram que após 24 horas e com uma carga de  $2.0\text{g}/\text{cm}^2$  a expressão de RANKL foi detectável em ambos os modelos. Já a expressão de RNAm de OPG foi significativamente maior no modelo de tensão do que no modelo compressivo, assim como no modelo de JACOBS *et al.* (2013). Neste estudo o modelo compressivo também utilizou células imortalizadas, e a expressão de RANK/RANKL foi indetectável. Pôde-se observar aumento dos níveis de OPG.

KOOK, JANG & LEE (2011), demonstraram que OPG foi naturalmente mais expresso que RANKL na cultura *in vitro* após carga compressiva, e sugeriram que os fibroblastos do ligamento periodontal seriam mais propensos a expressar OPG, mas não apresentaram diferença significativa entre os níveis de OPG e RANKL quando avaliados por imunohistoquímica.

Neste estudo, o modelo compressivo baseou-se nos modelos de KANZAKI *et al.* (2002); NISHIJIMA *et al.* (2006) e NAKAJIMA *et al.* (2008). O modelo consiste de um cilindro de aço inoxidável, com diâmetro de 27 mm, com diferentes alturas. Com relação aos métodos de carga compressiva por aumento de volume de meio, a aplicação de carga diretamente sobre a célula parece ser mais previsível, porém na

comparação com os métodos que empregam um equipamento específico para simular e medir tensão e compressão, o método de aplicação direta da carga como o empregado neste estudo é possivelmente menos preciso.

Em estudo de aplicação direta de força sobre as células KANZAKI *et al* (2019) utilizaram carga estática contínua, menor que a utilizada no presente estudo. Puderam verificar uma diminuição da expressão de OPG sob carga compressiva, comparado com grupo sem carga e com aplicação de forças de tensão. O presente estudo, a exemplo de JACOBS *et al.* (2013), NETTELHOFF *et al.* (2016) e KANZAKI *et al.* (2019), também utilizou-se de células imortalizadas, que, além da facilidade de obtenção, certificação de origem, permitem padronizar o modelo permitindo uma avaliação mais precisa dos parâmetros estudados, diferente do uso de células primárias dos estudos de BRASDA (1997), KANZAKI *et al.* (2002), NISHIJIMA *et al.* (2006), NAKAO *et al.* (2007), NAKAJIMA *et al.* (2008), KIM *et al.* (2009), KOOK *et al.* (2009) e KOOK, JANG & LEE (2011) as quais exigem etapas de preparo a mais e confirmação de que se trata das mesmas.

Além disso outros estudos realizados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstraram que forças contínuas nos fibroblastos do ligamento periodontal humano e animal tiveram um maior efeito na indução de expressão de genes responsáveis pelo processo de remodelação dessas células, o que se demonstrou diferente em estudos com forças interrompidas como KANZAKI *et al.* (2002), KOOK *et al.* (2009), KIM *et al.* (2009), concluindo-se que uma estimulação contínua induziu uma diferenciação de osteoclastos dentro da medula óssea e sua consequente migração para dentro do ligamento periodontal BRASDA (1997), KOOK *et al.* (2009), KOOK, JANG & LEE (2011). No caso dos fibroblastos, os

estudos de NAKAO *et al.* (2007), demonstraram que os fibroblastos derivados do tecido gengival possuíam comportamentos diferentes dos fibroblastos do ligamento periodontal, inclusive no que concerne ao estímulo para formação óssea como a neoformação de nódulos minerais pelos fibroblastos periodontais.

Além disto, os fibroblastos (principais grupos celulares dos tecidos conjuntivos) são células especializadas, de fácil obtenção e tendo sido descrito como potencial alternativa na utilização em terapia celular, sendo descrito como mais eficaz do que as células-tronco mesenquimais ICHIM, O'HEERON & KESARI (2018).

A osteoprotegerina (OPG) é de linhagem osteoblástica. O receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) e o receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) (SIMONET *et al.*, 1997; LACEY *et al.*, 1998; NAKAGAWA *et al.*, 1998; HOFBAUER *et al.*, 2000; KANZAKI *et al.*, 2002 e KANZAKI *et al.*, 2019) expressam-se em células precursoras de osteoclastos, induzem eventos-chave, incluindo multinucleação das células osteoclásticas e por consequência a destruição do tecido ósseo no local o qual estas são recrutadas.

NAKAO *et al.* (2007), corroboram com os resultados de outros estudos como os de NISHIJIMA *et al.* (2006), KOOK *et al.* (2009) os quais sugeriram que quando os fibroblastos do ligamento periodontal estão sob estresse podem secretar maiores níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no lado de compressão, causando este desequilíbrio que conduz a expressão de RANKL, facilitando a reabsorção óssea durante a movimentação dentária. A análise de expressões gênicas demonstraram que algumas dessas expressões ocorreram para manutenção da homeostase do ligamento periodontal, quando sob a influência de forças de tensão.

O RANKL solúvel é liberado da membrana plasmática, sendo que

## D i s c u s s ã o

este e o RANKL aderido à membrana, regulam a osteoclastogênese e a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é a receptora solúvel de atração do RANKL que pode suprimir a ligação entre RANK e RANKL e bloquear os seus efeitos sobre a osteoclastogênese e a reabsorção óssea (HOFBAUER *et al.*, 2000; NISHIJIMA *et al.*, 2006),

Na elaboração de modelo experimental, a escolha do tipo de célula determina os parâmetros de avaliação BASDRA (1997), SIMONET *et al.* (1997), LACEY *et al.* (1998), (NISHIJIMA *et al.* (2006), NAKAJIMA *et al.* (2008), KIM *et al.* (2009), LI *et al.* (2011). No presente estudo os fibroblastos derivados do ligamento periodontal *in vitro* tiveram papel de controle da osteoclastogênese por meio da expressão da osteoprotegerina e mesmo em diferentes cargas compressivas, de uma carga leve de 4 g/cm<sup>2</sup> a uma carga mais elevada de 48g/cm<sup>2</sup>, nos levou a um resultado em que a expressão de OPG não se alterou entre elas, e ao mesmo tempo não foi possível detectar a expressão de RANKL/RANK. Tais células demonstram-se eficientes para elaboração de estudos *in vitro*, uma vez que o objetivo principal é entender o mecanismo celular e não diferenças na características dos doadores.

Em um estudo utilizando ratos transgênicos que possuíam a expressão hepática da Osteoprotegerina, SIMONET *et al.* (1997) verificaram que houve aumento generalizado da densidade óssea em vertebras e ossos longos, além de achados histológicos que confirmaram grave osteopetrose com presença de trabeculado na cartilagem circundada por ossos na diáfise media de osso femoral, local comumente preenchido de elementos hematopoiéticos.

Em suma, estudos realizados tanto em animais quanto *in vitro* demonstraram que forças contínuas nos fibroblastos do ligamento

## D i s c u s s ã o

periodontal humano e animal tiveram maior efeito na indução de expressão de genes responsáveis pelo processo de remodelação dessas células, situação diferente foi demonstrada em estudos com forças interrompidas SOKOS, EVERTS & DE VRIES (2014) concluindo-se que estimulação contínua induziu diferenciação de osteoclastos dentro da medula óssea e sua consequente migração para dentro do ligamento periodontal.

As perspectivas deste estudo seguem a mesma direção da literatura consultada. Uma vez que foi observado a eficiência do modelo na questão da aplicação de carga compressiva, mesmo que a carga elevada não demonstrou um efeito significativo na expressão de OPG, e uma diferença com a literatura com relação a expressão de RANKL, a manutenção deste modelo abre espaço para testes com o aumento de tempo e também para avaliação de parâmetros de diferentes tipos celulares submetidos a mecanotransdução. A identificação de outras vias de sinalização molecular, que também têm sido demonstrado na literatura, e o modelo aplicado a cocultura de células também fazem parte das perspectivas.



## **7 Conclusão**

O aumento da carga compressiva por 6 horas estimulou a expressão gênica de OPG mas não de RANK/RANKL nos grupos avaliados em fibroblastos adultos do ligamento periodontal humano.

## Referências

**8 REFERÊNCIAS**

## 8 Referências

Basdra EK. Biological reactions to orthodontic tooth movement. *J OrofacOrthop.* 1997; 1: 2-15.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 2-12.

Ichim TE, O’Heeron P, Kesari S. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine.* 2018; 16:212.

Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, Walter C, Wehrbein H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Arch Oral Biol.* 2013; 58: 896-904.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under stress induce osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand up-regulation via prostaglandin  $E_2$  synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 210–20.

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

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

## Referências

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: 101-1019.

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

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

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

Li M, Zhang C, Yang Y. Effects of mechanical forces on osteogenesis and osteoclastogenesis in human periodontal ligament fibroblasts. *Bone Joint Res.* 2019; 8: 19-31.

Mitsubishi M, Yamaguchi M, Kojima T, Nakajima R, Kasai K. Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF- $\alpha$  and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Inflamm. Res.* 2011; 60: 187-194.

Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. Rank is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys*

Res Commun. 1998; 253: 395-400.

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

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

Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblast and osteoblast. Clin Oral Investig. 2016; 9: 1-9.

Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells *in vitro*. Orthod Craniofac Res. 2006; 9: 63-70.

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

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

## Referências

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

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

**FONTES CONSULTADAS**

## Fontes Consultadas

Comitê de Ética em Pesquisa [Internet]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (Unifesp); [citado 2013 Jan 27]. Disponível em:

<http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica/>

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

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

Thermo Fisher Scientific. ThermoFisher Cloud. cloud computing platform that connects scientists, instruments, and software in a collaborative, multi-disciplinary environment. – Análise de dados.



## **Normas adotadas**

Descritores em Ciência da Saúde (Decs)[Internet]. São Paulo: Biblioteca Regional de Medicina (Bireme) – [citado 2013 Jan]. Disponível em: <http://decs.bvs.br>.

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 US 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;



# Apêndices



São Paulo, 12 de agosto de 2019  
CEP N 9539241016

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Mateus De Abreu Pereira  
Depto/Disc: Cirurgia  
Pesquisadores associados: Antonio Carlos Aloise (unifesp); Lydia Masako Ferreira (orientador)

Título do projeto: "INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA CARGA COMPRESSIVA NA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA RANK/RANKL E OPG EM CULTURA DE FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO".

### Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Projeto de pesquisa apresentado à Universidade Federal de São Paulo para matrícula no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional – Nível Doutorado. Projeto vinculado ao Departamento de Cirurgia, Campus São paulo. ORIENTADORA: Prof.ª. Dr.ªLYDIA MASAKO FERREIRA; CO-ORIENTADOR: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE.

Os modelos de estudo envolvendo a força compressiva estática contínua e a cultura de fibroblastos periodontais têm sido bastante utilizados em várias pesquisas acadêmicas pelo mundo nos últimos anos e demonstraram a presença de determinadas proteínas e citocinas envolvidas no processo de osteoclastogênese. Sabe-se que existe uma população de células indiferenciadas no ligamento periodontal responsável pela sua homeostase que são os fibroblastos do ligamento periodontal. Uma questão relevante que não foi demonstrado nos estudo anteriores é a avaliação completa e específica da expressão gênica de RANK/ RANKL e OPG sob cargas próximas de uma situação fisiológica e de cargas superiores a essa situação.

O estudo tem como objetivo, avaliar a expressão gênica do sistema RANK/RANKL E OPG na compressão de fibroblastos adultos derivados do ligamento periodontal humano sob variadas cargas de pressão continua.

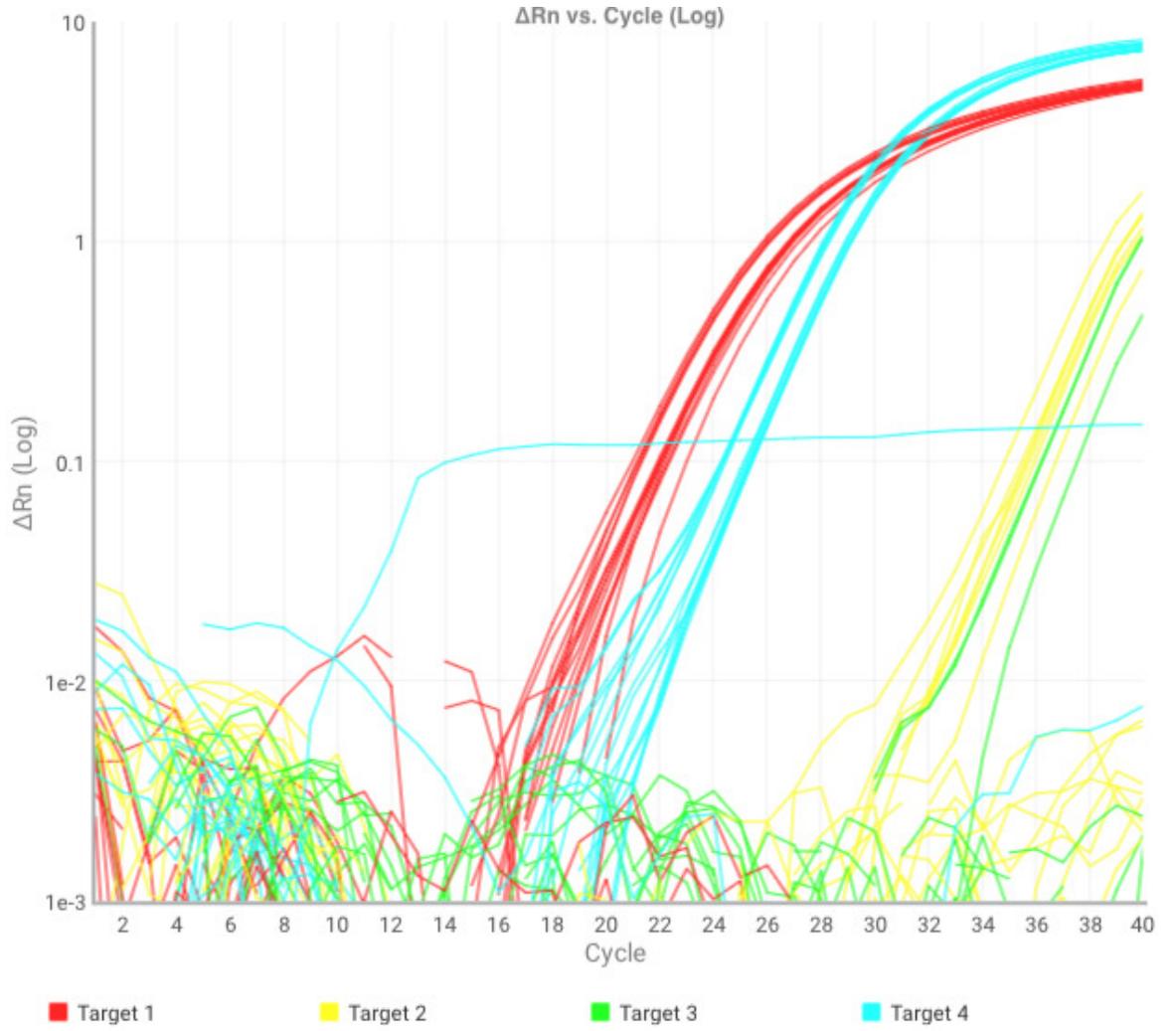
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 31/10/2016, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

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





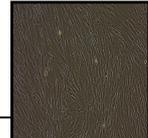
## ANEXOS

## Lonza

Lonza Walkersville, Inc.  
 www.lonza.com  
 scientific.support@lonza.com  
 Scientific Support: 800-521-0390  
 Document # TS CC-7049-3 11/10  
 Walkersville, MD 21793-0127 USA  
 © 2010 Lonza Walkersville, Inc.

## Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Systems

### HPdLF



#### Introduction

Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Systems contain Normal Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF) and optimized media for their growth. Each System can generate HPdLF cultures for a variety of experimental applications including periodontal disease research. Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Systems are convenient and easy to use, allowing the researcher to focus on results. Cryopreserved HPdLF are shipped in third passage.

#### Cell System Components (Need to be purchased separately)

- One Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Product (Cryopreserved)
- One Stromal Cell Medium BulletKit™ – 500 ml  
Clonetics™ SCGM™ BulletKit™ (CC-3205) contains one 500 ml bottle of Stromal Cell Basal Medium and the following growth supplements: hFGF-B, 0.5 ml; Insulin, 0.5 ml; FBS, 25 ml; GA-1000, 0.5 ml.
- One ReagentPack™ (CC-5034) Containing:
 

Trypsin/EDTA	100 ml
Trypsin Neutralizing Solution	100 ml
HEPES Buffered Saline Solution	100 ml

#### Characterization of Cells

Routine characterization of HPdLF includes immunofluorescent staining. Cells stain negative for Pan Cytokeratin.

#### Performance

Recommended seeding density for subculturing	3,500 cells/cm <sup>2</sup>
Typical time from subculture to confluent monolayer	6 - 9 days
Additional population doublings guaranteed using Clonetics™ System	10

#### Quality Control

All cells are performance assayed and test negative for HIV-1, Hepatitis-B, Hepatitis-C, mycoplasma, bacteria, yeast and fungi. Cell viability, morphology and proliferative capacity are measured after recovery from cryopreservation. Clonetics™ Media are formulated for optimal growth of specific types of normal human cells. Certificates of Analysis (COA) for each cell strain are shipped with each order. COA for all other products are available upon request.

#### Ordering Information

##### Cryopreserved Cells

CC-7049 HPdLF ≥500,000 cells

Other formats are available. Contact Scientific Support for details.

CC-3205	SCGM™ BulletKit™, SCBM™ plus SingleQuots™ of growth supplements	500 ml
CC-3204	SCBM™, Stromal Cell Basal Medium	500 ml
CC-4181	SCGM™ SingleQuots™, Formulates SCBM™ to SCGM™	
CC-5034	ReagentPack™	
	Trypsin Neutralizing Solution	100 ml
	Trypsin/EDTA Solution	100 ml
	HEPES Buffered Saline Solution	100 ml

When placing an order or for technical service, please refer to the product numbers and descriptions listed above. For a complete listing of all Clonetics™ Products, refer to the Lonza website or the current Lonza catalog. To obtain a catalog, additional information or technical service you may contact Lonza by web, e-mail, telephone, fax or mail.

All trademarks herein are marks of Lonza Group or its subsidiaries.