ALINE CAMPOS DE QUEIROZ

Células-tronco do ligamento periodontal de ratos mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF: avaliação *in vitro*

São Paulo
2020

ALINE CAMPOS DE QUEIROZ

Células-tronco do ligamento periodontal de ratos mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF: avaliação *in vitro*

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins.

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Queiroz, Aline Campos de.

Células-tronco do ligamento periodontal de ratos mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF: avaliação *in vitro* / Aline Campos de Queiroz; orientador Marília Trierveiler Martins -- São Paulo, 2020.

101 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Ligamento periodontal. 2. Células-tronco. 3. Mobilização celular. 4. Fator estimulador de colônias de granulócitos. 5. Fator de crescimento transformador beta1. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Queiroz AC. Células-tronco do ligamento periodontal de ratos mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF: avaliação *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 22/05/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Cibele Pelissari dos Santos

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Marinella Holzhausen Caldeira

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Victor Elias Arana-Chavez

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho aos meus pais Andrea e Jailson, e ao meu irmão Gustavo, por todo o suporte, paciência e compreensão durante todos esses anos de graduação e de pós-graduação. Vocês são a minha base e em quem eu me espelho todos os dias. O nosso amor está acima das coisas deste mundo.

Dedico ao Rafael, meu companheiro em todos os momentos e aquele que sempre acreditou em mim e não deixou que eu desistisse dos meus sonhos. É maravilhoso compartilhar a vida ao seu lado.

Dedico ao meu avô José Queiroz (*in memoriam*) que sempre foi, e sempre será, um exemplo de garra, determinação e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Marília Trierveiler Martins, por ter acreditado e confiado em mim desde o dia em que eu bati na sua porta com o sonho de pesquisar, ainda na iniciação científica. Obrigada por todo aprendizado durante esses anos, por não me deixar desanimar nem por um segundo, e por me mostrar como a docência e a pesquisa são encantadoras e gratificantes.

Agradeço aos meus avós, à toda minha família e às minhas queridas amigas (de uma vida inteira e da turma 116) por compreenderem a minha ausência em alguns momentos e por sempre me apoiarem e incentivarem.

Agradeço à Cibele Pelissari, por ter sido minha coorientadora desde a iniciação científica e por me ensinar muito do que eu sei sobre laboratório e o mundo das células-tronco dentais.

Agradeço aos colegas de pós-graduação, por compartilharem as dificuldades, dúvidas, anseios e também momentos de muita alegria. Vocês fizeram os meus dias mais leves e felizes.

Agradeço em especial à Anaeliza e Emília por ouvirem as minhas lamentações e por me encorajarem nesse mundo louco da pós-graduação. Agradeço à querida Flávia, pelo apoio, conversas e suporte constante no laboratório. Agradeço também aos meus “irmãos” de orientadora: Thalita, Gabriela e Ivan, pela amizade construída.

Agradeço aos funcionários Vinícius, Elisa, Juvani e Edna por todo o auxílio nos momentos de dúvida e desespero. Agradeço à querida Adriana pelo carinho, paciência e apoio em todas as atividades laboratoriais, e em todos os momentos.

Agradeço aos professores do departamento, Profa. Marina Gallottini, Profa. Suzana Orsini, Profa. Kareem Ortega, Prof. Décio Santos, Prof. Dr. Fábio Daumas e Profa. Luciana Corrêa, por todos os ensinamentos desde a graduação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dessa pesquisa.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a
sociedade muda”
Paulo Freire.

RESUMO

Queiroz AC. Células-tronco do ligamento periodontal de ratos mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF: avaliação *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

As células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) têm um potencial estratégico para a regeneração periodontal, que deve ser explorado. Sabe-se que as células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de migração e que alguns fatores estão associados a esses estímulos quimiotáticos. Assim, como as células do ligamento periodontal constituem uma população heterogênea, o uso de moléculas que induzam a mobilização de células com melhores propriedades de células-tronco constitui um importante método para o seu enriquecimento *in vitro*. Desse modo, este estudo teve por objetivo avaliar as células mobilizadas pelos fatores TGF- β 1 e G-CSF em relação a sua clonogenicidade, proliferação e potencial de diferenciação osteogênica e cementogênica. Os quatro grupos de estudo foram estabelecidos de acordo com o ensaio de mobilização celular, sendo denominados: controle (células não mobilizadas); membrana (células com mobilização espontânea); e células mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF. O grupo membrana exibiu uma maior eficiência na formação de colônias em comparação ao controle ($p=0,0001$) e às células mobilizadas por G-CSF ($p=0,002$) e TGF- β 1 ($p=0,0001$). No ensaio de proliferação por MTS, os grupos membrana e controle exibiram maior potencial proliferativo, após 72 horas, na comparação com o grupo mobilizado pelo TGF- β 1 ($p<0,001$) e G-CSF ($p>0,05$). Já no ensaio de proliferação pela curva de crescimento celular, após 72 horas, o grupo membrana exibiu maior proliferação celular em relação aos demais ($p>0,05$). Após indução da diferenciação osteogênica, os grupos controle e membrana obtiveram maior deposição mineral em comparação aos grupos de células mobilizadas pelos fatores quimiotáticos ($p<0,0001$). A análise por meio de RT-PCR demonstrou que as células mobilizadas por G-CSF e TGF- β 1, e cultivadas por 21 dias sem indução prévia, exibiram uma maior expressão gênica de *ALP* em comparação com os grupos controle e membrana. Em relação ao gene *RUNX2*, as células cultivadas em alta confluência também exibiram maior expressão em

comparação às cultivadas até atingirem 80% de confluência, com exceção do grupo TGF- β 1. As bandas de eletroforese mais intensas para *CEMP1* foram observadas nos grupos controle cultivados nas duas situações, assim como nos grupos membrana e G-CSF cultivados por 21 dias. Em conclusão, os nossos resultados demonstram que as células não mobilizadas exibem melhores propriedades clonogênicas e proliferativas, enquanto aquelas mobilizadas pelos fatores quimiotáticos expressam importantes marcadores osteogênicos.

Palavras-chave: Ligamento periodontal. Células-tronco. Mobilização celular. G-CSF. TGF- β 1.

ABSTRACT

Queiroz AC. Rat periodontal ligament stem cells mobilized by TGF- β 1 and G-CSF: *in vitro* evaluation [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Periodontal ligament stem cells (PDLSCs) have a strategic potential for periodontal regeneration, which must be explored. Mesenchymal stem cells have the ability to migrate, and some factors play a role in these chemotactic stimuli. Based on the fact that periodontal ligament cells constitute a heterogeneous population, the use of molecules to induce the mobilization of cells that hold better stem cells properties is an important method for their *in vitro* enrichment. Thus, this study aimed to evaluate rat PDLSCs mobilized by TGF- β 1 and G-CSF in regard to their clonogenicity, proliferation rates, and osteogenic and cementogenic differentiation potential. The four study groups were established according to the cell mobilization assay: control (non-mobilized cells); membrane (cell with spontaneous mobilization); and cells mobilized by TGF- β 1 and G-CSF. The membrane group exhibited greater clonogenic efficiency than the control group ($p=0,0001$) and the cells mobilized by G-CSF ($p=0,002$) and TGF- β 1 ($p=0,0001$). MTS assay showed that membrane and control groups exhibited greater proliferative potential after 72 hours than TGF- β 1 ($p<0,001$) and G-CSF ($p>0,05$) mobilized cells. Cell growth curve after 72 hours showed that membrane group exhibited higher cell proliferation than the others ($p>0,05$). In the osteogenic differentiation assay, the control and membrane groups obtained higher mineral deposition than those mobilized by chemotactic factors ($p <0,0001$). RT-PCR demonstrated that cells mobilized by G-CSF and TGF- β 1, after being cultivated for 21 days without previous induction, showed a higher expression of *ALP* than the control and membrane groups. Regarding *RUNX2*, cells cultured at high confluence also exhibited higher expression when compared to those cultured by up to 80% confluence, with the exception of the TGF- β 1 group. For *CEMP1*, the most intense electrophoresis bands were seen in the control group – in both cell culture conditions –, and also in the membrane and G-CSF groups cultivated for 21 days. In conclusion, our results demonstrate that non-mobilized cells exhibit better clonogenic and

proliferative properties, while those mobilized by chemotactic factors express important osteogenic markers.

Keywords: Periodontal ligament. Stem cells. Cell mobilization. Granulocyte colony-stimulating factor. Transforming growth factor beta 1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Fotografias das placas evidenciando as unidades formadoras de colônias após 10 dias de cultivo nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D)..... 59
- Figura 5.2 - Gráfico da porcentagem de eficiência da formação de colônias nos quatro grupos de estudo. * $p < 0,0005$; ** $p < 0,0001$ 60
- Figura 5.3 - Gráficos exibindo a média das absorbâncias (nm) obtidas no teste de viabilidade celular (MTS) em cada grupo para análise da proliferação celular após 24, 48 e 72 horas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$ 62
- Figura 5.4 - Gráfico da curva de crescimento celular de todos os grupos de estudo após 24, 48 e 72 horas. Média ($\pm$ desvio padrão) do número de células viáveis 63
- Figura 5.5 - Gráfico do tempo de dobra das populações em comparação com o número total de células plaqueadas inicialmente (1×10^4 células) 64
- Figura 5.6 - Marcação por imunofluorescência das células positivas para o anticorpo anti-CD105 nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D) (aumento de 400X)..... 65
- Figura 5.7 - Gráfico da frequência de células positivas ($\pm$ desvio padrão) para o anticorpo anti-CD105 em todos os grupos estudados 66
- Figura 5.8 - Marcação por imunofluorescência das células positivas para o anticorpo anti-NG2 nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D) (aumento de 400X) 66
- Figura 5.9 - Gráfico da frequência de células positivas ($\pm$ desvio padrão) para o anticorpo anti-NG2 em todos os grupos de estudo. * $p < 0,05$ 67
- Figura 5.10 - Imagens capturadas em microscópio de luz invertida (aumento de 50X) evidenciando depósitos minerais dos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D)..... 68

- Figura 5.11 - Gráfico exibindo a média das absorvâncias (nm) obtidas após quantificação dos depósitos minerais em cada grupo analisado. *p<0,0001 68
- Figura 5.12 - Cortes histológicos corados por azul de toluidina em um aumento de 400x no grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1 (A) e grupo controle (B)..... 69
- Figura 5.13 - Expressão de mRNA de *ALP*, *RUNX2* e *CEMP1* nas células cultivadas até 80% de sua confluência nos grupos controle (A), membrana (C), G-CSF (E) e TGF- β 1 (G); e nas células cultivadas por 21 dias nos grupos controle (B), membrana (D), G-CSF (F) e TGF- β 1 (H)..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
bFGF	do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>
BMPs	do inglês <i>bone morphogenetic proteins</i>
CAP	do inglês <i>cementum attachment protein</i>
CEMP1	do inglês <i>human cementum protein 1</i>
DPSCs	do inglês <i>dental pulp stem cells</i>
EJL	epitélio juncional longo
EMD	do inglês <i>enamel matrix derivative</i>
FDA	food and drug administration
FGF-2	do inglês <i>fibroblast growth factor 2</i>
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
G-CSF	do inglês <i>granulocyte-colony stimulating fator</i>
GVHD	do inglês <i>graft-versus-host disease</i>
HACD1	do inglês <i>3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1</i>
HE	coloração de hematoxilina e eosina
IGF-1	do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
iPS	do inglês <i>induced pluripotent stem cell</i>
MMPs	do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>
NK	do inglês <i>natural-killer cells</i>
OCN	do inglês <i>osteocalcin</i>
PBMNCs	do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	do inglês phosphate buffered saline
PDGF	do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
PDLSCs	do inglês <i>periodontal ligament stem cells</i>
RUNX2	do inglês <i>runt-related transcription factor 2</i>
SCAPs	do inglês <i>stem cells from apical papilla</i>
TGF- β 1	do inglês <i>transforming growth factor beta-1</i>
UFC-F	unidade formadora de colônia de fibroblastos
α -MEM	do inglês <i>minimum essential medium Eagle</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	miligrama
kg	quilograma
%	porcentagem
ml	mililitro
°C	graus Celsius
ng	nanograma
μm	micrometro
μl	microlitro
nm	nanometro
mm	milimetro
log	função logaritmo decimal
nM	nanomolar
μg	micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	O PERIODONTO E A DOENÇA PERIODONTAL	27
2.2	REPARO PERIODONTAL	29
2.3	TERAPIAS PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL	31
2.4	CÉLULAS-TRONCO: CARACTERÍSTICAS GERAIS	33
2.5	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	35
2.6	CÉLULAS-TRONCO DENTAIS	38
2.7	CÉLULAS-TRONCO DO LIGAMENTO PERIODONTAL	38
2.8	MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E O G-CSF	41
2.9	O PAPEL DO FATOR TGF- β 1	43
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA	49
4.2	ENSAIO DE MOBILIZAÇÃO CELULAR E ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO	50
4.3	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	51
4.4	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA VIABILIDADE CELULAR	52
4.5	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR E <i>POPULATION DOUBLING</i>	52
4.6	CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	53
4.7	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA <i>IN VITRO</i>	55
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICO <i>IN VITRO</i>	55
4.9	AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO POR RT-PCR	56
4.10	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	57
5	RESULTADOS	59
5.1	EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	59
5.2	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA VIABILIDADE CELULAR	60
5.3	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR E <i>POPULATION DOUBLING</i>	63
5.4	CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	64
5.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA <i>IN VITRO</i>	67

5.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA <i>IN VITRO</i>	69
5.7	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO POR RT-PCR	70
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso em Animais (CEUA)	101

1 INTRODUÇÃO

As técnicas baseadas na engenharia de tecidos e as terapias com o uso de células-tronco emergiram como novas abordagens para a regeneração dos tecidos danificados ou perdidos. As células-tronco mesenquimais são células altamente proliferativas *in vitro*, clonogênicas, com capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diversos subtipos celulares, incluindo osteoblastos, condrócitos e adipócitos (1). Somado a essas importantes características, o seu isolamento em diferentes tecidos sugere que as células-tronco mesenquimais desempenham um importante papel no reparo tecidual, constituindo assim, uma fonte potencial regenerativa (2).

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica que culmina na perda dos tecidos de suporte do dente, assim como em sequelas funcionais e estéticas aos pacientes (3). Como as abordagens terapêuticas atualmente disponíveis ainda não são totalmente capazes de restituir os tecidos do ponto de vista arquitetural e funcional, promovendo a neoformação óssea, de cemento e do ligamento periodontal, há um atual interesse no uso das células com propriedades tronco visando o seu grande potencial regenerativo. Desse modo, estudos têm se concentrado na busca por terapias para a regeneração dos tecidos da região oral e maxilofacial, incluindo aqueles que constituem o complexo periodontal.

Nesse sentido, as células-tronco do ligamento periodontal constituem uma população mesenquimal única, capaz de promover a formação de cemento, osso e de fibras do ligamento periodontal, e assim regenerar defeitos periodontais *in vivo* (4, 5). No entanto, para que o uso clínico dessas células se torne uma realidade terapêutica corriqueira, é preponderante o aprimoramento dos protocolos de isolamento e de cultivo celulares, garantindo eficácia ao método e segurança aos pacientes. Para isso, é desejável também a seleção *in vitro* de células com melhores propriedades de células-tronco, de modo a gerar o enriquecimento de populações heterogêneas, como as do ligamento periodontal.

As células-tronco mesenquimais exibem mecanismos fisiológicos migratórios próprios frente a estimulação por moléculas sinalizadoras. Além disso, já se sabe

que a migração celular pode ser induzida por agentes mobilizadores, que incluem citocinas, quimiocinas e drogas citotóxicas (6). O fator G-CSF é o mais frequentemente utilizado, por exemplo, para indução da migração de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico, e o seu uso já é uma realidade clínica no transplante de medula óssea (7). Assim, acredita-se que essas moléculas mobilizadoras possam também induzir a migração de outros tipos celulares com grande potencial terapêutico, incluindo as células-tronco de origem dental.

Diante disso, as células-tronco da polpa dental e da papila apical já foram avaliadas em relação a indução da sua quimiotaxia por fatores mobilizadores, entre eles o G-CSF e o TGF- β 1. Os resultados foram positivos e ambos se mostraram bons agentes quimiotáticos, de modo que as células mobilizadas exibiram propriedades com alto potencial regenerativo (8, 9). No entanto, em relação às células-tronco do ligamento periodontal, pouco se sabe sobre a sua capacidade de atração por moléculas bioativas e a sua resposta frente a esses agentes. Portanto, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários visando o enriquecimento dessas populações de modo a garantir células com melhores propriedades “tronco”, e consequentemente, novas terapias no campo da odontologia regenerativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PERIODONTO E A DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é um conjunto complexo de tecidos constituído por tecidos duros (cimento e osso alveolar) e por tecidos moles (gengiva e ligamento periodontal). Sua função principal é a de suporte e inserção dos dentes, mas também desempenha importantes funções sensoriais, imunoprotetoras, de nutrição, homeostase e reparação tecidual em resposta à doença periodontal ou traumas mecânicos (10, 11).

O seu desenvolvimento se inicia na fase de raiz da odontogênese, quando a diferenciação celular alcança a alça cervical e os epitélios interno e externo do órgão do esmalte se proliferam em sentido apical, formando uma dupla camada chamada de bainha epitelial de Hertwig. As células da camada interna da bainha induzem as células ectomesenquimais da papila dental a se diferenciarem em odontoblastos, responsáveis pela formação da dentina radicular. Com o avanço da rizogênese, ocorre também a formação da polpa dental e a diferenciação das células ectomesenquimais do folículo dentário nos tecidos periodontais de inserção. Assim, cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos são responsáveis, respectivamente, pela formação do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Por fim, fibras colágenas do ligamento periodontal, chamadas de fibras de Sharpey, são incorporadas no cimento e osso alveolar neoformados (12).

O cimento é um tecido conjuntivo avascular composto por uma parte inorgânica de hidroxiapatita e por uma parte orgânica, representada principalmente pelo colágeno tipo I e por proteínas não colágenas (osteopontina e sialoproteína). A camada de cimento que reveste a raiz dental e se fixa à dentina radicular é denominada de cimento acelular, ou primário, e a sua função principal é ancorar os feixes de fibras do ligamento periodontal (fibras de Sharpey) ao dente. Já a porção apical de cimento é denominada de cimento celular, ou secundário, cuja função é auxiliar o movimento do dente no alvéolo (13-15).

O osso alveolar compreende a camada de tecido ósseo que reveste os alvéolos dentários. Por ser o local onde as fibras do ligamento periodontal se inserem, o osso alveolar desempenha um importante papel na dissipação de forças, uma vez que é submetido à constante remodelação durante as funções mastigatórias (15). O ligamento periodontal, por sua vez, é um tecido conjuntivo altamente celularizado e vascularizado, interposto entre o cemento e o osso alveolar. Ele é composto por constituintes celulares, como fibroblastos, macrófagos e células mesenquimais indiferenciadas, além de um componente extracelular representado por proteínas colágenas e não colágenas. As suas fibras formam uma malha responsável pela ancoragem do dente ao seu respectivo alvéolo, conferindo assim a proteção necessária para a mecânica do sistema mastigatório (16, 17).

A doença periodontal caracteriza-se como uma inflamação crônica proveniente de infecção bacteriana. A sua progressão resulta na destruição dos tecidos de suporte, culminando na perda dentária caso não for tratada (18). A gengivite é a forma mais branda e reversível da doença, uma vez que não afeta as estruturas de suporte e inserção. A periodontite, por sua vez, acarreta na destruição progressiva do ligamento periodontal e do suporte ósseo, sendo uma das principais causas de perda da função mastigatória em adultos (3, 18, 19). Por se tratar de uma condição bucal comum na população, a doença periodontal tem um impacto significativo na qualidade de vida das pessoas. A associação da doença periodontal com distúrbios sistêmicos como diabetes (20), artrite reumatoide (21) e doenças cardiovasculares (22) tem sido amplamente discutida na literatura.

Espécies bacterianas que habitam sítios subgengivais, conhecidas como periodontopatógenas, são sabidamente associadas à patogênese da doença periodontal. Entre elas há *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Embora a invasão bacteriana seja necessária, fatores genéticos e ambientais, em especial o tabaco e a diabetes, também estão correlacionados com o desenvolvimento da doença periodontal. Além disso, a resposta imunoinflamatória em consequência da infecção presente nos tecidos periodontais desencadeia mecanismos que culminam na destruição tecidual (19).

O tratamento tradicional da doença periodontal consiste na remoção dos focos de infecção e na interrupção da progressão da perda tecidual. No entanto, a reconstrução das estruturas de suporte perdidas e as sequelas estéticas e

funcionais decorrentes dessa perda ainda constituem um grande desafio no tratamento de pacientes com história prévia de doença periodontal. Ao longo dos anos, foram desenvolvidos tratamentos como: enxertos e substitutos ósseos; técnicas de regeneração óssea guiada; e a introdução de proteínas da matriz do esmalte e de fatores de crescimento (11, 23). No entanto, essas medidas terapêuticas foram incapazes de regenerar o tecido periodontal tal qual sua arquitetura e função originais, e para que ocorra a regeneração periodontal, é necessário a coordenação de diversos eventos celulares e moleculares (3).

2.2 REPARO PERIODONTAL

O processo de reparo periodontal envolve componentes celulares, moleculares e de matriz extracelular (24). Enquanto no reparo por cicatrização o tecido formado se distingue do original, na regeneração tecidual é necessário que ocorra a restituição da integridade anatômica e funcional do tecido tal qual antes do dano. As terapias periodontais convencionais, cirúrgicas ou não, consistem em induzir eventos celulares e moleculares associados à cicatrização da ferida (25).

A cicatrização das feridas periodontais se inicia com uma complexa cascata molecular e celular, seguida por uma resposta inflamatória e a formação de um coágulo rico em fibrina para conferir resistência à tração, além de atuar como um reservatório de fatores de crescimento e como uma matriz para a migração celular. Essa fase inflamatória é repleta de infiltrados de neutrófilos, monócitos e células epiteliais. Os neutrófilos são responsáveis por limpar a ferida e remover detritos bacterianos, mas também atuam como uma fonte de citocinas pró-inflamatórias para ativação de fibroblastos. Os monócitos, por sua vez, são recrutados para o local da ferida e tornam-se macrófagos, cuja função também é a fagocitose de tecido necrótico, células e bactérias presentes na matriz de fibrina, assim como a síntese e secreção de citocinas e fatores de crescimento (24-26). Logo após a organização desse coágulo, inicia-se a reepitelização da ferida. Para isso, a enzima plasmina, derivada da ativação do plasminogênio, é responsável pela dissolução da barreira de fibrina juntamente com metaloproteinases de matriz (MMPs) (25, 27).

Após essa fase, é possível observar na ferida a formação de um tecido de granulação composto por vasos neoformados, fibroblastos, macrófagos, fatores de crescimento, citocinas e um tecido conjuntivo frouxo. Os macrófagos liberam citocinas que estimulam a síntese de uma matriz extracelular por fibroblastos, e de forma recíproca, a fibronectina e o colágeno da matriz extracelular facilitam a adesão e a migração de fibroblastos no tecido de granulação. Além disso, a matriz atua como um importante suporte para células e vasos sanguíneos (25, 28). Com a progressão da cicatrização, ocorre a remodelação do tecido de granulação e a matriz extracelular é substituída por uma nova, rica em colágeno. Por fim, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos para permitir a contração da ferida, e como resultado do reparo há a formação de um tecido que não restaura completamente a arquitetura e/ou função do tecido periodontal original (24, 26).

Adicionalmente, a migração de células epiteliais para a superfície radicular durante a cicatrização é responsável pela formação do epitélio juncional longo (EJL), o que não ocorre na regeneração periodontal, uma vez que há formação de novos cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. A regeneração periodontal envolve inicialmente componentes inflamatórios, o recrutamento, proliferação e diferenciação de populações celulares originárias do tecido conjuntivo, e a síntese de constituintes da matriz extracelular. Para que ocorra a nova formação de fibras conjuntivas e sua consequente inserção no cemento e osso neoformados, fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos e células endoteliais precisam agir de forma coordenada e integrada, o que é ditado por mediadores solúveis (11, 29). Essas células progenitoras devem primeiramente migrar para o local da ferida, ou seja, para a superfície radicular, e depois devem ocorrer os estágios de proliferação e maturação adequados e necessários para o reparo tecidual. Além das células progenitoras, sinalizações, fatores de crescimento, componentes celulares, moleculares e de matriz devem estar presentes e em harmonia nesse processo (13, 25).

Assim, a terapia periodontal regenerativa visa a restauração do periodonto por meio da formação de novas estruturas (30). No entanto, a formação e remodelação desses tecidos constituem um desafio, uma vez que a regeneração do sistema periodontal envolve diferentes tipos celulares. Outro impasse é o fato do ligamento periodontal apresentar pequena dimensão, arquitetura complexa e possuir atributos

funcionais e únicos como a sua rápida renovação (*turnover*) e a remodelação dos constituintes da matriz extracelular (16). Além disso, novas fibras de Sharpey precisam ser formadas para que ocorra uma correta conexão e integração entre essas fibras colágenas do ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar (31).

2.3 TERAPIAS PARA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

A primeira técnica utilizada em busca da regeneração periodontal foi o condicionamento das superfícies radiculares por meio da sua desmineralização com agentes ácidos ou químicos, como por exemplo o ácido cítrico e a fibronectina. O objetivo do condicionamento era a reversão da hipermineralização da superfície radicular oriunda da doença periodontal, para que depois fosse possível uma repopulação celular e consequentemente a regeneração dos tecidos. Ademais, acreditava-se que a exposição de fibras colágenas antigas possibilitaria a interligação de novas fibras neoformadas. No entanto, não foram observados efeitos benéficos para a regeneração e, como consequências deletérias, anquilose e reabsorção radicular foram observadas (32).

Em relação ao reparo dos defeitos periodontais, diferentes tipos de materiais passaram a ser estudados para estimular a regeneração óssea. Materiais aloplásticos ou sintéticos, autoenxertos e enxertos entre indivíduos da mesma espécie (aloenxertos) ou de espécies diferentes (xenoenxertos) foram utilizados para o tratamento dos defeitos ósseos. Todavia, apesar de serem observados preenchimento ósseo radiográfico e pequenos ganhos de inserção clínica, esses materiais apresentaram pouca capacidade osteoindutiva e insuficiente potencial regenerativo (11, 24).

O conceito de regeneração tecidual guiada surgiu na década de 1980 baseado em estudos sobre a cicatrização periodontal que concluíram que a colocação de uma barreira física nos defeitos periodontais da superfície radicular impedia a migração de células epiteliais e conjuntivas do tecido gengival, visando

induzir a repopulação da ferida por células ósseas e do ligamento periodontal (11, 33, 34). Entretanto, apesar dos diversos tipos de membranas utilizadas, reabsorvíveis ou não, os resultados clínicos ao longo dos anos foram imprevisíveis, principalmente devido à sensibilidade técnica do procedimento cirúrgico e às altas taxas de falhas e complicações pós-operatórias (35).

Outra abordagem utilizada visando a regeneração periodontal foi a aplicação local de fatores de crescimento na superfície radicular, uma vez que esses fatores são moléculas de polipeptídeos liberadas ou ativadas durante a cascata de cicatrização. Estudos clínicos randomizados em pacientes com periodontite demonstraram que o fator de crescimento de fibroblastos ou FGF-2 (do inglês *fibroblast growth factor*), e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) mostraram-se eficazes no preenchimento de defeitos ósseos localizados (36, 37). Em cães da raça Beagle, a combinação de PDGF com IGF-1 (do inglês *insulin-like growth factor*) em sítios prévios de cirurgias periodontais foi responsável pelo aumento da atividade óssea metabólica, além de uma maior formação de osso e cimento (38). Além disso, as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas, do inglês *bone morphogenetic proteins*) também vem sendo apontadas ao longos dos anos como possíveis fatores de promoção da morfogênese periodontal, pois já se sabe que elas desempenham um importante papel na regeneração óssea e do cimento (39).

No entanto, apesar dos fatores de crescimento serem correlacionados na literatura com a capacidade de influenciar importantes funções celulares, e promover o crescimento e diferenciação de diferentes células que atuam no processo de regeneração periodontal, ainda não há uma total compreensão das funções que cada um desempenha no processo de regeneração do periodonto, nem tampouco como ocorre a sua cinética e liberação nesses tecidos (24, 35).

As proteínas da matriz do esmalte (EMD, do inglês *enamel matrix derivative*) são um grupo de moléculas associadas à amelogênese amplamente estudadas na regeneração periodontal devido ao seu papel na cementogênese e nas interações epitélio-mesenquimais que ocorrem durante o desenvolvimento da raiz e das estruturas de suporte dental (35, 40, 41). Uma mistura de proteínas da matriz do esmalte é comercializada e consiste principalmente em amelogeninas, alginato de propilenoglicol (transportador) e água. No entanto, apesar das evidências

histológicas de regeneração do tecido periodontal após o uso desses produtos, ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação dessas proteínas. Clinicamente, os resultados do uso das proteínas da matriz do esmalte não diferem daqueles observados em casos de regeneração tecidual guiada, sendo que ambos possuem indicações muito específicas, por vezes com pouca utilidade clínica (13).

Atualmente, a engenharia de tecidos emergiu como uma alternativa aos tratamentos convencionais, tendo como objetivo a formação de novos tecidos visando a substituição daqueles perdidos ou danificados. Ela se baseia nos princípios da biologia celular, molecular e dos biomateriais (42, 43). Para isso, células progenitoras obtidas a partir de técnicas de cultura celular são transferidas para um arcabouço tridimensional, o qual deverá ser implantado no sítio do defeito para promoção da regeneração do tecido (24).

De acordo com Bartold e colaboradores no ano de 2000, para que ocorra regeneração tecidual, a partir das técnicas da engenharia de tecidos, são necessários: níveis e sequência apropriados de sinais regulatórios; a presença e a quantidade de células progenitoras viáveis; e uma matriz extracelular ou uma estrutura carreadora. Em especial, para a regeneração periodontal bem-sucedida, os autores requerem também características bioquímicas, como a capacidade de manutenção de espaços suficientes para o crescimento intraósseo e do osso alveolar e, ao mesmo tempo, a formação de uma barreira física para evitar a formação do epitélio juncional longo. Além disso, características biológicas, como a biocompatibilidade e a incorporação de células e fatores apropriados para a regeneração, são necessários (11).

2.4 CÉLULAS-TRONCO: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Como as células-tronco possuem a capacidade de originar tipos celulares especializados, elas passaram a ser consideradas potenciais terapêuticos para a regeneração tecidual (24). Por definição, células-tronco são células clonogênicas, indiferenciadas e com capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas

linhagens (44). De acordo com a sua plasticidade, elas são classificadas em: totipotentes, quando possuem a capacidade de ser diferenciadas em qualquer tipo de tecido, incluindo os embrionários; pluripotentes, quando se diferenciam em tecidos embrionários derivados dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma); e multipotentes, quando possuem a capacidade de gerar tecidos do mesmo folheto embrionário de origem (45).

As células-tronco humanas já foram isoladas de tecidos embrionários, assim como de tecidos especializados e já formados, sendo denominadas nesses casos de células-tronco adultas ou somáticas. Em 2006, Takahashi e Yamanaka incluíram as células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), oriundas de reprogramação celular, como uma nova fonte de células-tronco (46). As células-tronco embrionárias são derivadas da camada interna do blastocisto e caracterizam-se por uma proliferação ilimitada e por se manterem indiferenciadas *in vitro*. Adicionalmente, elas possuem a capacidade de diferenciação em células derivadas das três camadas germinativas (47). As células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), por sua vez, são geradas a partir de células adultas por meio da expressão de quatro fatores de transcrição: Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc. A nível celular, essas células apresentam capacidade de autorrenovação e amplo potencial de diferenciação, assim como as células-tronco embrionárias. No entanto, apesar do seu grande potencial para terapia celular, uma vez que essas células podem virtualmente produzir tipos celulares distintos *in vitro*, a sua estabilidade genômica ainda é uma dificuldade, a sobrevivência de células injetadas *in vivo* permanece um desafio e as suas propriedades tumorigênicas levantam dúvidas em relação a sua segurança em terapias regenerativas (48-50).

As células-tronco adultas podem ser mesenquimais, epiteliais ou hematopoiéticas. Além de serem responsáveis pela manutenção da homeostase tecidual, elas possuem a capacidade de diferenciação em diferentes subtipos celulares (44, 51). Nos vários tecidos, essas células, sob o estado de quiescência, localizam-se em microambientes tridimensionais denominados nichos. O nicho possui diversos componentes que captam fatores externos, interagem entre si, integram fatores locais e sistêmicos, e liberam sinalizadores que induzem as células-tronco para um estado de ativação, direcionando-as para proliferação, diferenciação ou autorrenovação (52). Geralmente, as células-tronco adquirem limitações funcionais quando encontradas fora do nicho, podendo alterar suas características

originais ou sofrer rearranjo de fenótipo, perdendo, assim, a expressão de certos marcadores e passando a expressar outros tipos (52, 53).

As células-tronco adultas, em especial as mesenquimais, já foram identificadas em muitos tecidos nos últimos anos. As células-tronco hematopoiéticas foram as primeiras a serem isoladas e caracterizadas. Essas células, oriundas da medula óssea e do estroma do baço e do timo, se aderiam ao plástico quando plaqueadas em baixa densidade e formavam unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (UFC-F) em condições de cultura apropriadas. Elas exibiam, ainda, as características de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens (54, 55). Estudos posteriores demonstraram que as células-tronco hematopoiéticas habitam microambientes especializados e distintos durante o seu desenvolvimento, o que pode contribuir para a sua grande heterogeneidade (56, 57). Atualmente, elas constituem as células-tronco adultas mais bem caracterizadas na literatura e podem ser isoladas a partir da medula óssea, do cordão umbilical ou do sangue periférico. Como elas dão origem a todas as células da linhagem sanguínea, por meio da hematopoese, o transplante de células-tronco hematopoiéticas tornou-se uma realidade e vem sendo realizado rotineiramente no tratamento de doenças como a leucemia mieloide aguda e os linfomas Hodgkin e não-Hodkin (56).

2.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que se caracterizam por serem aderentes ao plástico quando em cultura, pela sua capacidade de formar colônias e por se diferenciarem, quando estimuladas, em células com características de osteoblastos, condrócitos e adipócitos (1). Além da medula óssea, fontes de células-tronco mesenquimais já foram isoladas de diversos tecidos, como por exemplo o tecido adiposo (58), cordão umbilical (59), sangue periférico (60), e tecidos dentais como a polpa (61) e o ligamento periodontal (5).

Os pericitos são células perivasculares que envolvem as células endoteliais de capilares e microvasos, e que apresentam características semelhantes àsquelas

encontradas em células com característica “tronco” (62-64). Nesse sentido, Crisan e colaboradores observaram que células perivasculares de diversos tipos de tecidos fetais e adultos sofrem diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro*, além de exibirem marcação negativa para marcadores conhecidos por serem expressos por células endoteliais e hematopoiéticas, como CD34 e CD45, o que suporta a hipótese de que os pericitos possam ser uma população de células-tronco residentes nos tecidos adultos (65). Todavia, embora os marcadores CD146, PDGFR- β , NG2, α -SMA e RGS-5 sejam comumente usados na sua identificação, o isolamento e caracterização dos pericitos ainda permanece um desafio (62, 66).

Já se sabe que os padrões de marcação celular sofrem alterações em células isoladas de diferentes tecidos. Portanto, embora as células-tronco mesenquimais expressem alguns marcadores conhecidos de células-tronco da medula óssea, existe uma variação biológica que faz com que essas células tenham propriedades específicas do tecido em que são isoladas (67), motivo pelo qual acredita-se que elas sejam um reservatório de células indiferenciadas que adquirem características fenotípicas locais (66). Embora ainda não haja um marcador biológico específico capaz de diferenciar essas células, a Sociedade Internacional de Terapia Celular, em 2005 e 2006, definiu critérios mínimos para o isolamento das células-tronco mesenquimais, baseados nas células-tronco da medula óssea. Entre outros critérios, estipulou-se que essas células deveriam ter expressão positiva para os marcadores CD105, CD90 (Thy-1) e CD73, e negativa para CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α e CD19 (1, 68).

Uma função importante das células-tronco mesenquimais é a sua propriedade imunomoduladora. Estudos sugerem que ao mesmo tempo que a secreção de citocinas e outros fatores pró-inflamatórios possam ativar essas propriedades imunorreguladoras, as células-tronco mesenquimais também podem afetar a resposta imune por meio da supressão de células dendríticas, linfócitos T e B, e células NK (do inglês *natural-killer cells*) (69). Ren e colaboradores demonstraram que o INF- γ , associado a outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , foram responsáveis pela indução da função imunossupressora das células-tronco mesenquimais *in vivo*. Como resultado da combinação dessas citocinas provenientes do microambiente inflamatório, as células-tronco mesenquimais

passaram a expressar várias quimiocinas e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) responsáveis pela migração e supressão de linfócitos T (70).

Outros estudos demonstraram que a proliferação, diferenciação e as propriedades quimiotáticas de linfócitos B também são alteradas pelas células-tronco mesenquimais *in vitro*, principalmente devido à produção de fatores solúveis e à inibição da produção de imunoglobulinas e de receptores de quimiocinas (71, 72). Assim, devido a sua capacidade de regulação dos sistemas imunes e o seu grande potencial terapêutico, estudos vem comprovando os benefícios imunossupressores das células-tronco mesenquimais *in vivo* em distúrbios imunológicos como o lúpus eritematoso sistêmico e a doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD, do inglês *graft-versus-host disease*) (2, 73). No entanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados *in vitro*, assim como ensaios clínicos, para a ampliação do conhecimento atual acerca do mecanismo de imunomodulação das células-tronco mesenquimais (74).

A propriedade de multipotência das células-tronco mesenquimais e a sua distribuição em diversos tecidos sugerem que essas células possam desempenhar um papel importante no reparo tecidual (2). Porém, os mecanismos envolvidos no seu recrutamento e na sua diferenciação em diversos tipos celulares, principalmente nos locais com dano tecidual, ainda não estão elucidados. Ademais, células imunes e mediadores inflamatórios, assim como fibroblastos e células epiteliais, são responsáveis por alterações no microambiente lesado que culminam em diferentes formas de interação com as células-tronco residentes em cada tecido (69). No entanto, ainda não há evidências concretas de como ocorre a migração das células-tronco para o local da ferida, nem estão elucidados os processos envolvidos na diferenciação das células-tronco residentes nos tecidos, uma vez que não há ainda um marcador confiável para a identificação dessas células (75).

2.6 CÉLULAS-TRONCO DENTAIS

As células-tronco dentais são populações de células isoladas de diferentes tecidos de origem dental e que compartilham características *in vitro* semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea. Elas desempenham um importante papel na homeostase e reparação do dente, como por exemplo, na formação de odontoblastos em casos de danos à dentina e no reparo dos tecidos periodontais (76). Fontes de células-tronco já foram identificadas na polpa de dentes permanentes (61) e decíduos (77), ligamento periodontal (5), folículo dental (78), osso alveolar (79) e na papila apical (80), enquanto células progenitoras já foram isoladas do germe dental (81) e da gengiva (82). As células-tronco da polpa e papila dentais, e as do ligamento periodontal, são as mais bem descritas na literatura devido ao seu grande potencial regenerativo.

2.7 CÉLULAS-TRONCO DO LIGAMENTO PERIODONTAL

As células-tronco derivadas do ligamento periodontal, denominadas de PDLSCs (do inglês *periodontal ligament stem cells*) foram descritas pela primeira vez por Seo e colaboradores, em 2004. Esse grupo foi capaz de isolar do ligamento periodontal humano uma população de células multipotentes com capacidade de diferenciação adipogênica e em células semelhantes a osteoblastos e cementoblastos. Além disso, essas células mostraram-se clonogênicas e altamente proliferativas *in vitro*, propriedades que puderam defini-las como células com característica tronco. Ainda *in vitro*, foram capazes de formar novas fibras colágenas semelhantes às fibras de Sharpey. Quando transplantadas em ratos imunocomprometidos, juntamente com hidroxapatita, participaram do processo de reparo de defeitos periodontais pré-estabelecidos, e formaram tecidos semelhantes ao cimento e ao ligamento periodontal. Os marcadores CD146 e STRO-1, conhecidos por serem expressos por células-tronco da polpa dental e da medula óssea, assim como o marcador de células de tendões Scleraxis, também foram expressos pelas PDLSCs (5).

Posteriormente, estudos comprovaram que as células-tronco do ligamento periodontal humano sob condições de cultura apropriadas eram capazes de se diferenciar tanto em osteoblastos, quanto em condrócitos e adipócitos, em comparação com as células-tronco da medula óssea já bem caracterizadas (83, 84). Mais recentemente, demonstrou-se também que as PDLSCs têm a capacidade de diferenciação em células de origem neural, como por exemplo em células de Schwann em cães, por meio da via de sinalização Erk1/2 (85). Assim como a transdiferenciação de células-tronco humanas em células neuronais semelhantes a gânglios da retina (86).

Em relação ao seu grande potencial proliferativo, observou-se, ainda, que essas células exibem maior potencial de crescimento celular em comparação com as células-tronco da medula óssea e da polpa dental (87), e essa maior taxa de proliferação celular foi associada com a via de sinalização Shh, uma via que potencialmente atua na autorrenovação das PDLSCs (88). Além disso, demonstrou-se também que as células-tronco do ligamento periodontal exibem efeitos imunomoduladores importantes, principalmente nas células mononucleares do sangue periférico (PBMNCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*). Ao serem transplantadas em suínos, PDLSCs humanas foram responsáveis pela supressão de células T via prostaglandina E2 (89), assim como a inibição do complexo da glicoproteína CD1b em células dendríticas derivadas de monócitos também foi descrita como uma importante via que resultou na supressão dessas células (90). Efeitos supressores também foram observados na proliferação, diferenciação e migração de células B quando co-cultivadas com as PDLSCs (91). No entanto, por outro lado, as células-tronco do ligamento periodontal humano saudáveis e inflamadas co-cultivadas com PBMNCs induziram células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺, revelando sua importante função nas respostas imunes da doença periodontal (92).

Assim, vem sendo demonstrado na literatura que as células-tronco do ligamento periodontal contém uma população com características mesenquimais importantes como capacidades de autorrenovação, multipotência e imunomodulação, tornando-se, portanto, um grande potencial terapêutico para a regeneração dos tecidos periodontais. Para avaliação desse potencial regenerativo, Liu e colaboradores, em 2008, realizaram o transplante autólogo de células-tronco

do ligamento periodontal em defeitos periodontais criados cirurgicamente em porcos em miniatura. Os resultados sugeriram uma importante contribuição dessas células para a regeneração do periodonto, uma vez que foram observadas neoformações de cemento, osso e ligamento periodontal na área do defeito, além de um aumento da altura do osso alveolar em comparação com os grupos controle (4).

Em outros modelos *in vivo*, PDLSCs humanas foram implantadas em defeitos cirúrgicos criados em ratos atímicos utilizando-se *cell sheets*, ou seja, membranas de células cultivadas em laboratório que dispensam a necessidade de arcabouços tridimensionais (*scaffolds*) carreadores (93, 94). No estudo de Flores e colaboradores, as células-tronco do ligamento periodontal foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico, enquanto *cell sheets* do grupo controle não receberam essa indução prévia. Como resultado, após a criação de defeitos de fenestração em ratos atímicos, observou-se no grupo experimental a formação de fibras do ligamento periodontal, semelhantes às fibras de Sharpey, conectadas a um tecido recém-formado e semelhante ao cemento acelular na superfície radicular desnuda, enquanto no grupo controle foram observados apenas uma massa de fibras paralelas e desorganizadas, além de uma matriz extracelular densa (95).

Os estudos pré-clínicos incluem outros modelos animais além de ratos e suínos, como por exemplo cães da raça Beagle (96), ovelhas (97) e primatas (98). Adicionalmente, uma grande variedade de defeitos cirúrgicos periodontais vem sendo utilizada nos estudos acerca das células-tronco do ligamento periodontal, como por exemplo os de fenestração, furcas grau II e grau III, intra-ósseos com números variáveis de paredes e circunferenciais. Somado à essa grande variabilidade de defeitos cirúrgicos e de modelos animais, as fontes de células utilizadas (autólogas, alogênicas ou xenogênicas) também é variável (99). Desse modo, apesar dos estudos pré-clínicos fornecerem evidências científicas que suportam o uso das PDLSCs para a regeneração dos tecidos periodontais, ainda é necessário um melhor entendimento sobre o perfil fenotípico dessas populações, além de compreender suas propriedades imunorreguladoras e o seu próprio potencial regenerativo, para que assim possam ser definidos critérios para a utilização dessas células de forma segura e eficaz (30, 99).

Apesar da grande parte dos estudos acerca da regeneração periodontal estarem em estágio pré-clínico, um estudo piloto clínico foi publicado em 2010.

Nesse estudo, células progenitoras do ligamento periodontal humano autólogas foram implantadas, juntamente com material de enxerto ósseo, em 16 dentes com sequelas oriundas da doença periodontal de três pacientes. Os pacientes foram acompanhados por um período de 3-72 meses, e de um modo geral, eles apresentaram redução nas profundidades de sondagem e ganhos de inserção. Além disso, nenhum paciente apresentou efeitos adversos ao tratamento (100).

Mais recentemente, alguns *clinical trials* começaram a ser realizados, e até já publicados. Um deles realizou um estudo clínico randomizado em que PDLSCs autólogas foram transplantadas juntamente com o substituto ósseo Bio-oss® em defeitos intra-ósseos de 30 pacientes com periodontite. Observou-se que a diminuição da profundidade dos defeitos ósseos não foi estatisticamente significativa entre o grupo com células-tronco e o grupo controle, no entanto, mais uma vez o uso das PDLSCs em humanos não produziu efeitos adversos importantes após um acompanhamento de 12 meses (101), o que corrobora o fato de que são necessários novos estudos multicêntricos e com amostras maiores para que a eficácia e a segurança dessas terapias sejam aperfeiçoadas, e o seu uso se torne uma realidade terapêutica.

2.8 MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E O G-CSF

Os primeiros estudos acerca da mobilização celular ocorreram em células-tronco hematopoiéticas, após a descoberta de que progenitores hematopoiéticos, os quais residiam originalmente na medula óssea, circulavam também no sangue periférico. Como a quantidade de células progenitoras circulantes era considerada baixa para as necessidades terapêuticas, fatores de crescimento, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*), passaram a ser estudados e utilizados para a indução da liberação dessas células no sangue. Desde então, o transplante de células-tronco hematopoiéticas vem sendo utilizado no tratamento de doenças hematológicas e de alguns tumores sólidos, visando a reconstituição da hematopoese do paciente após altas doses de quimioterapia (102-104).

Já se sabe também que o G-CSF é responsável pela mobilização de células-tronco mesenquimais da medula óssea para a corrente sanguínea e que a sua produção, por uma diversidade de células, está relacionada a situações de inflamação e infecção (105, 106). Além disso, como o G-CSF estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos precursores de granulócitos, acredita-se que ele altere o sistema imunológico por meio de uma modificação no número de linfócitos circulantes (107). No entanto, apesar dos mecanismos moleculares referentes à sua ação quimiotática ainda não terem sido completamente elucidados, o uso clínico do G-CSF já foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration), uma respeitada entidade norte-americana.

A partir do conhecimento dessa capacidade migratória das células-tronco mesenquimais e do potencial de mobilização do fator estimulador de colônias de granulócitos, Murakami e colaboradores desenvolveram um método para enriquecer *in vitro* uma população de células-tronco da polpa dental humana (DPSCs, do inglês *dental pulp stem cells*). Eles utilizaram membranas semipermeáveis com tratamento de superfície para permitir a migração celular, utilizando-se o G-CSF como fator indutor da mobilização. As células mobilizadas nesse estudo apresentaram alto potencial proliferativo, antiapoptótico e de multidiferenciação *in vitro*, além do potencial de regeneração pulpar *in vivo* (9). Ainda nesse mesmo ano, foi demonstrado que o transplante autólogo de células-tronco da polpa dental enriquecidas pelo G-CSF, em um dente pulpectomizado de cão, permitiu a regeneração do complexo dentino-pulpar e estimulou a migração celular e a imunossupressão *in vitro* (108, 109).

Nas células-tronco da papila apical (SCAPs, do inglês *stem cells from apical papilla*), o efeito quimiotático do G-CSF foi avaliado isoladamente e em combinação com os fatores SDF-1, TGF- β 1, PDGF e FGF-2. Observou-se que o G-CSF e o FGF-2 foram os dois melhores agentes quimiotáticos, e que a combinação de G-CSF e TGF- β 1 exibiu ainda melhores resultados em relação a migração celular, além de uma maior diferenciação osteogênica dessas células, indicando o seu grande potencial para a regeneração dos tecidos de origem dental (8). Assim, acredita-se que o estudo dessas moléculas bioativas possibilite estratégias futuras de “*cell homing*”, em que as células-tronco possam ser atraídas por esses fatores quimiotáticos para regenerarem outros tecidos lesados (8, 110), o que poderia

contribuir para novas terapias no campo da endodontia regenerativa, assim como de outras áreas da odontologia.

Desse modo, já se sabe que as células-tronco mesenquimais de origem dental podem ser enriquecidas a partir de biomoléculas que induzam a sua mobilização. Mas, até o momento, nos tecidos dentais, apenas as células-tronco da polpa e da papila apical humanas foram mobilizadas e bem caracterizadas. Nesse sentido, como as taxas de proliferação celular no ligamento periodontal sofrem alterações a partir de estímulos físicos e biológicos, como por exemplo durante tratamentos ortodônticos, acredita-se que as PDLSCs possam também ser mobilizadas por estímulos específicos, porém ainda desconhecidos (76, 111).

2.9 O PAPEL DO FATOR TGF- β 1

Uma variedade de fatores de sinalização está envolvida na geração, manutenção e regeneração dos tecidos periodontais. Entre eles, o TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor beta-1*) é uma citocina amplamente aceita na literatura como mediadora da cicatrização de feridas e do reparo tecidual. Na fase inflamatória, por exemplo, induz a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos para o local da lesão, e também atua na formação do tecido de granulação, regula a síntese e deposição da matriz extracelular e induz a transição epitélio-mesênquima por meio de várias vias (112, 113). Assim, devido ao seu papel no reparo tecidual, estudos recentes vêm também correlacionando o TGF- β 1 com eventos relacionados à proliferação, diferenciação e recrutamento de células progenitoras e com característica “tronco” em caso de injúrias aos tecidos dentais (114), uma vez que já se sabe que ele desempenha essas importantes funções durante a odontogênese, além participar das interações epitélio-mesenquimais essenciais para o processo de formação dental (113, 115).

A proliferação e a migração celular são eventos necessários para o reparo e sabe-se que o TGF- β 1 regula essas funções dependendo do tipo celular envolvido. Demonstrou-se que ele é um indutor *in vitro* da quimiotaxia de células do sistema

imune, como linfócitos T e monócitos, assim como de osteoblastos e queratinócitos (113, 116-118). O TGF- β 1 foi ainda responsável indiretamente pelo recrutamento de células-tronco da medula óssea, de forma que a partir da via de sinalização Smad3, ele estimulou as células da musculatura lisa a produzirem moléculas que atraem as células-tronco mesenquimais e as células progenitoras (119).

Além do seu potencial quimiotático nessas células, acredita-se que o TGF- β 1 seja um dos fatores de crescimento envolvidos na diferenciação de células da linhagem osteoblástica (113). Zhang e colaboradores (2003) demonstraram que o TGF- β 1 cultivado com culturas de osteoblastos humanos, em um modelo de implantes, foi responsável pela estimulação da diferenciação dessas células e pela expressão de proteínas da matriz óssea, corroborando a ideia de que ele possa ter um importante papel como um fator osteoindutor na formação óssea (120).

Ademais, como estudos têm correlacionado o TGF- β 1 com a ativação de fatores de transcrição de diversas vias, acredita-se que o seu efeito possa ser dependente do tipo celular e do estado de diferenciação dessas células (121-123). Quando transfectado em células-tronco da polpa dental humanas (hDPSCs), por exemplo, o gene que codifica a proteína TGF- β 1 possibilitou um aumento das diferenciações osteogênica e condrogênica, enquanto a diferenciação adipogênica foi inibida. Além disso, ele também demonstrou ter um impacto positivo na proliferação dessas células (121).

Em relação aos tecidos periodontais, apesar do TGF- β 1 ter induzido a proliferação de células de cultura primária do ligamento periodontal humano e a expressão de componentes da sua matriz extracelular em estudos anteriores, o seu efeito nessas células parece depender também do estágio de diferenciação em que elas se encontram (124, 125). Kono e colaboradores sugeriram que o TGF- β 1, em associação com o bFGF (do inglês *basic fibroblast growth factor*), induz a diferenciação fibroblástica das células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) por meio da regulação positiva de colágeno tipo I e alfa-actina de músculo liso. Assim, por se tratar de um estimulador da regeneração tecidual e de um mediador fibrogênico (124), acredita-se que o TGF- β 1 desempenhe um importante papel na manutenção e regeneração do complexo periodontal, principalmente em relação a proliferação e diferenciação das células do ligamento periodontal, e a síntese de suas fibras conjuntivas.

Desse modo, o TGF- β 1 parece ser um fator importante no desenvolvimento e manutenção dos tecidos periodontais. Porém, ainda não há evidências científicas suficientes que comprovem os meios da sua atuação na regeneração periodontal ou uma possível relação com a indução da quimiotaxia de células-tronco do ligamento periodontal. Nesse sentido, como o processo de enriquecimento celular possibilita a seleção de células com mais características “tronco” a partir de uma população heterogênea, a utilização do TGF- β 1 para a mobilização *in vitro* de populações de células do ligamento periodontal visa uma nova estratégia para o uso das PDLSCs em terapias de regeneração do complexo periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

- a. Objetivo geral: avaliação do potencial dos fatores TGF- β 1 e G-CSF em mobilizar populações de células-tronco do ligamento periodontal de ratos visando o enriquecimento de células progenitoras e com característica “tronco”.
- b. Objetivos específicos:
 - Isolar *in vitro* as células-tronco do ligamento periodontal mobilizadas pelos fatores TGF- β 1 e G-CSF, e caracterizá-las em relação a sua clonogenicidade, potencial de proliferação celular e perfil fenotípico mesenquimal.
 - Avaliar o potencial de diferenciação condrogênica, cementogênica e osteogênica das células-tronco do ligamento periodontal mobilizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA

O presente estudo obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, número 011/2018 (Anexo A).

Para o isolamento das células do ligamento periodontal, três ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos na idade de 30 dias de vida foram adquiridos no Biotério de produção de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo e armazenados no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Biotério da FOUSP, enquanto as demais etapas laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia de Células-tronco em Odontologia (LABITRON).

Os animais foram eutanasiados sob anestesia com solução do anestésico cloridrato de xilazina (Anasedan®) e de relaxante muscular a base de cloridrato de ketamina (Dopalen®), em solução com 100 mg/kg do anestésico e 50 mg/kg do relaxante muscular via intraperitoneal, seguido por deslocamento cervical. Após eutanásia dos animais, os primeiros, segundos e terceiros molares dos quatro quadrantes de cada um dos animais foram removidos dos respectivos alvéolos com auxílio de instrumento odontológico, baseando-se em protocolos já estabelecidos (126, 127). Após verificação visual da ausência de tecido gengival aderido, os dentes foram armazenados e lavados por três vezes em solução de PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) 1x estéril com 2% de antibióticos/antimicóticos (Gibco #15240; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e trocas a cada 5 minutos foram realizadas, já em ambiente de fluxo laminar. Seguido da lavagem, os tecidos do ligamento periodontal foram obtidos por meio de raspagem na raiz com bisturi, e colocados em tubos Falcon de 15 ml contendo 3 ml de solução para digestão enzimática de collagenase tipo I (3 mg/ml) e dispase (4 mg/ml).

O material foi incubado a 37 °C por 45 minutos, com agitações leves a cada 15 minutos. Ao final, a solução enzimática foi diluída em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino e centrifugada por 5 minutos. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o *pellet* com as células foi ressuspensão em meio de cultivo α -MEM (*minimum essential medium Eagle*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino (Gibco #12657; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 1% de solução antibiótica/antimicótica e 1% de L-Glutamina (GlutaMAX Gibco #35050; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As células foram colocadas em placa de Petri com meio de cultivo e mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após as células aderirem à placa, o meio de cultivo foi trocado de acordo com a necessidade do metabolismo celular.

O monitoramento do crescimento das células foi realizado com o uso de microscópio de contraste de fase invertido, e o subcultivo foi feito assim que atingiram 80% de confluência na placa, usando o TrypLE™ como solução enzimática. As culturas de células de passagem 3 a 6 foram utilizadas em todos os experimentos.

4.2 ENSAIO DE MOBILIZAÇÃO CELULAR E ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Estabelecida a concentração ideal de 100 ng/ml para os fatores TGF- β 1 e G-CSF, 5·10⁴ células do *pool* de células do ligamento periodontal passaram por filtro com poro de 70 μ m (Falcon® cell strainer #352350) para desagregação celular. Após, as células foram colocadas em insertos sobre membranas de polycarbonato semipermeáveis com poros de 5 μ m (Transwell® #3421), em placas de 24 poços. A câmara superior dos insertos foi preenchida com 150 μ l de meio α -MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e 150 μ l de meio de cultivo contendo o *pool* de células, totalizando 300 μ l. A câmara inferior foi preenchida com 500 μ l de meio α -MEM suplementado contendo o TGF- β 1 ou o G-CSF nas concentrações determinadas.

No grupo em que se desejou estabelecer o controle adequado da membrana, a câmara inferior foi preenchida apenas com 500 µl de meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sem nenhum fator mobilizador. Após incubação de 24 horas, as células de todos os grupos que permaneceram aderidas à membrana de polycarbonato na câmara superior, e que, portanto, não migraram, foram descartadas. Já as células aderidas à câmara inferior, que sofreram o processo de mobilização ou migração espontânea, foram liberadas utilizando-se o TrypLE™ como solução enzimática e subcultivadas em meio α -MEM suplementado para ensaios posteriores.

Após o ensaio de mobilização celular foram estabelecidos os quatro grupos de estudo: grupo **controle**, composto pelo *pool* de células do ligamento periodontal, e que não foi submetido ao ensaio de mobilização celular; grupo **membrana**, composto por células que sofreram migração espontânea, uma vez que foram colocadas em insertos na ausência de qualquer fator quimiotático para avaliação do controle adequado da membrana semipermeável; grupo **G-CSF**, composto pelas células que foram mobilizadas quando colocadas em insertos sobre membrana semipermeável na presença do fator G-CSF; e o grupo **TGF- β 1**, composto pelas células que foram mobilizadas quando colocadas em contato com o fator TGF- β 1.

4.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

As células do ligamento periodontal foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e plaqueadas, em triplicata, em baixa densidade (10^3 em placa de 60 milímetros). Após 10 dias, as células foram fixadas em formaldeído a 4% durante 30 minutos e coradas com azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), também por 30 minutos. Após, as unidades formadoras de colônias foram contadas. Para isso, as placas foram fotografadas e as imagens analisadas utilizando-se o software Image J® (National Institute of Health, USA).

Para avaliação da porcentagem de eficiência de formação das colônias foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{\text{Número de colônias formadas}}{\text{Número de células plaqueadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA VIABILIDADE CELULAR

Para análise da proliferação celular, por meio do número de células viáveis, células de todos os grupos foram plaqueadas na concentração de 10^3 por poço e em placa de 96. Adicionou-se meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os ensaios de MTS (sal Tetrazolium) foram realizados em triplicatas pelos períodos de 24, 48 e 72 horas, seguindo protocolo do fabricante (CellTiter 96® Aqueous One Solution cell proliferation assay #TB245, Promega). Após os tempos pré-estabelecidos, 20 μ l de solução de MTS foi adicionada ao meio de cultivo e incubada a 37 °C por 180 minutos. O método baseia-se na formação de um produto cromogênico (formazan) no meio de cultura devido à atividade de enzimas mitocondriais. A mudança de coloração reflete a atividade celular, que é diretamente proporcional à absorbância obtida por análise em espectrofotômetro com filtro de 490 nm. Os dados foram tabulados e analisados com auxílio do programa Microsoft Office Excel®.

4.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR E *POPULATION DOUBLING*

Os grupos mobilizados e controle foram plaqueados a uma densidade de 10^4 células por poço em placas de 60 mm de diâmetro. O meio adicionado foi α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Depois de 24, 48 e 72 horas, as células foram tripsinizadas e contadas utilizando-se câmara de Neubauer com o auxílio do azul de tripan, o que permitiu que apenas as células viáveis fossem

consideradas. O experimento foi realizado em triplicata e o número de células presentes em cada placa foi obtido utilizando-se a seguinte equação:

$$\frac{N^{\circ} \text{ total de células nos quadrantes}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \quad (\text{Equação 2})$$

O tempo de dobra da população, ou *population doubling*, é a medida de vezes em que as populações dobraram numericamente em comparação com o número total de células iniciais no cultivo. Para avaliação do tempo de dobra dos grupos de estudo, as células foram plaqueadas seguindo a descrição anterior para a análise da curva de crescimento celular. Esse experimento também foi realizado em triplicata, e à contagem das células foi adicionada a seguinte equação:

$$\text{Populationdoubling} = \frac{1}{\log(2)} \times \log\left(\frac{C_x(t)}{C_x(0)}\right) \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo que: $C_x(t)$ é o número final de células contadas e $C_x(0)$ é o número inicial de células plaqueadas (10^4).

Todos os dados foram analisados quantitativamente por meio do programa Microsoft Office Excel®.

4.6 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células de todos os grupos foram semeadas em placas de 12 poços contendo lamínulas de vidro estéreis, na concentração de 10^4 células por poço. Depois de 24 horas, as células foram fixadas em formaldeído a 4% por 30 minutos. Em seguida,

foram realizadas reações de imunofluorescência para os seguintes anticorpos: anti-CD105, anti-NG2 e anti-CD34. Para isso, as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS 1x, seguido pelo bloqueio de sítios inespecíficos com solução de 1% de BSA por 30 minutos. Após, os anticorpos primários foram incubados em temperatura ambiente por 1 hora e trinta minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x por três vezes de cinco minutos cada, seguido pela incubação do anticorpo secundário anti-IgG, da mesma espécie do anticorpo primário utilizado, conjugado com FITC na diluição de 1:100 por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, as lamínulas foram lavadas novamente por três vezes de 5 minutos com PBS 1x e montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA). A diluição e as características dos anticorpos primários utilizados estão sumarizadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Diluição e características dos anticorpos primários

Anticorpo primário	Espécie	Diluição	Procedência
CD105	Camundongo	1:100	Abcam 114052 (monoclonal [3A9])
NG2	Camundongo	1:100	Abcam 50009 (monoclonal [132.38])
CD34	Camundongo	1:100	Abcam 8536 (monoclonal [QBEND-10])

Fonte: A autora

As marcações foram analisadas em microscópio de fluorescência com filtros para FITC (marcação de cor verde) e DAPI (marcação nuclear de cor azul). Os campos de maior intensidade de fluorescência foram selecionados e 500 células foram contadas para cada um dos marcadores em todos os grupos. Os dados foram tabulados e analisados no programa Microsoft Office Excel®.

4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA IN VITRO

As células mobilizadas e controle foram semeadas, em triplicata, na quantidade de 10^4 em placa de 24 poços acrescida de meio α -MEM com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, adicionou-se o meio de indução para diferenciação osteogênica constituído de α -MEM enriquecido com soro fetal bovino (10%), 5 nM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 10nM de dexametasona (Sigma-Aldrich). Como controle negativo, células foram cultivadas utilizando-se somente os meios de cultivo. Os meios de indução osteogênico e condrogênico foram trocados a cada 3 dias por 21 dias e, após, as amostras foram lavadas em PBS 1x e fixadas em formaldeído 4% por 30 minutos.

Para detecção de depósitos de cristais minerais, as células foram coradas com alizarina vermelha e as imagens foram adquiridas por meio de microscópio de luz invertida. Para avaliação quantitativa dos depósitos minerais, 800 μ l de solução de ácido acético a 10% foram incubadas em cada poço durante 30 minutos sob agitação. Após, as células foram aquecidas por 10 minutos a 85 °C e resfriadas em gelo por 5 minutos. Depois de serem centrifugadas por 15 minutos, 200 μ l de solução de hidróxido de amônia a 10% foram adicionadas ao sobrenadante para neutralização do ácido. Alíquotas foram lidas em placa de 96 poços e a absorbância foi analisada em espectrofotômetro com filtro de 490 nm.

4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICO IN VITRO

Células de todos os grupos de estudo foram plaqueadas, em triplicata, na quantidade de 10^6 em tubos Falcon e cultivadas em meio α -MEM com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, foi adicionado às células o meio de indução para diferenciação condrogênica (StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit #A1007101; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), o qual foi trocado a cada 3

dias por 21 dias. Como controle negativo, células foram cultivadas somente em α -MEM suplementado com soro fetal bovino.

A avaliação do potencial de diferenciação condrogênico foi qualitativa, de modo que após lavagem com PBS 1x e fixação em formaldeído 4% por 30 minutos, os pellets celulares foram processados para inclusão em parafina, cortados em espessura de 5 μ m, e corados por azul de toluidina, um corante com afinidade por proteoglicanos e glicosaminoglicanos presentes em matrizes celulares. As imagens foram adquiridas com o auxílio de microscópio de luz.

4.9 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO POR RT-PCR

As células mobilizadas e controle foram avaliadas por meio de RT-PCR convencional quanto à capacidade de transcrição de mRNA dos genes *ALP*, *RUNX2* e *CEMP1*, que codificam, respectivamente, as proteínas fosfatase alcalina, fator de transcrição relacionado à Runt-2 e a proteína do cimento-1, relacionadas à diferenciação osteogênica e cementogênica. Além do gene constitutivo de referência *GAPDH*, que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

As células de todos os grupos de estudo foram cultivadas em duas situações distintas: primeiramente, por 21 dias, atingindo 100% de confluência nas placas de cultivo, de modo a se estabelecer o contato célula-célula; e também pelo período necessário para atingirem 80% de confluência nas placas, em média, após 7 dias de cultivo celular.

Após, foram tratadas com Trizol por 5 minutos para lise celular, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi coletado para obtenção do RNA. Após determinação da concentração de RNA por leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific), 1 μ g foi utilizado para as reações. A síntese do DNA complementar (cDNA) e a amplificação das amostras foram realizadas utilizando-se o kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System/Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para os seguintes iniciadores: *GAPDH*, *ALP*, *RUNX2* e *CEMP1*. Todos os iniciadores foram desenhados com auxílio do

programa OligoPerfect Primer Designer (Thermo Fisher Scientific). Os genes e as sequências analisadas estão resumidos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Genes e sequências dos primers analisados

Gene	Sequência
<i>GAPDH</i>	Forward: TGATGGGTGTGAACACGAG Reverse: AGTGATGGCATGGACTGTGG
<i>ALP</i>	Forward: CCAGACCCTGCAACCATCAT Reverse: AAACAGGGGAGTCGCTTCAG
<i>RUNX2</i>	Forward: CGCCTCACAAACAACACAG Reverse: GGTGCTCGGATCCCAAAGA
<i>CEMP1</i>	Forward: ATGGGCACATCAAGCACTGA Reverse: CTGAGAGGTGTGAGGTGCAG

Fonte: A autora

4.10 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os grupos das células mobilizadas pelo TGF- β 1 e pelo G-CSF foram avaliados quanto as suas propriedades “tronco” em comparação com as populações não mobilizadas. Os resultados foram tabulados para análise quantitativa com auxílio do programa GraphPadPrism 5.0. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi realizado para determinar a distribuição de dados das amostras. Determinado intervalo normal dos dados, testes de comparação de médias foram realizados utilizando o teste paramétrico ANOVA. Quando não houve aderência à distribuição normal das amostras, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi realizado. Em casos onde houve diferença estatística, foi aplicado os testes Post-Hoc de Tukey ou Dunn, respectivamente. O nível de significância utilizado em todas as análises foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Ao analisarmos o número de colônias formadas após 10 dias de cultivo, observamos que todos os grupos de estudo foram capazes de formar colônias (Figura 5.1). Ao compararmos eles entre si, observamos que o grupo de células com mobilização espontânea (membrana) foi aquele com a maior eficiência na formação de colônias, sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p=0,0001$) e aos grupos de células mobilizadas pelo G-CSF ($p=0,002$) e TGF- β 1 ($p=0,0001$). As células mobilizadas pelo G-CSF também exibiram maior eficiência em formar colônias em comparação com o controle, mas essa diferença não foi considerada significativa estatisticamente ($p=0,08$). Os grupos controle e TGF- β 1, por sua vez, exibiram porcentagens de eficiência de formação de colônias semelhantes entre si ($p=0,9$) (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Fotografias das placas evidenciando as unidades formadoras de colônias após 10 dias de cultivo nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D)

Fonte: A autora

Figura 5.2 - Gráfico da porcentagem de eficiência da formação de colônias nos quatro grupos de estudo. * $p < 0,0005$; ** $p < 0,0001$

Fonte: A autora

5.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA VIABILIDADE CELULAR

Na avaliação do número de células viáveis pelo ensaio de proliferação por MTS, observamos que, de maneira geral, os grupos analisados neste estudo exibiram um padrão de proliferação crescente após 24, 48 e 72 horas. A exceção ocorreu no grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1, em que após 48 horas observou-se um decréscimo no número de células, e após 72 horas houve novamente um aumento da sua proliferação celular.

Ao analisarmos os grupos entre si, após 24 horas observamos que as células do grupo controle foram mais proliferativas, sendo estatisticamente significante em relação às células mobilizadas pelo G-CSF ($p=0,01$) e pelo TGF- β 1 ($p=0,02$). Após 48 horas, o grupo controle também foi aquele que exibiu maior proliferação celular, sendo estatisticamente significante em relação aos demais que sofreram mobilização (G-CSF, $p=0,01$; TGF- β 1, $p < 0,0001$). Além disso, o grupo TGF- β 1 foi o menos proliferativo após esse período, de forma que, além do grupo controle, as células do grupo membrana também foram estatisticamente mais proliferativas em

comparação a ele ($p=0,01$). Após 72 horas, o grupo controle continuou exibindo a maior proliferação celular, e mais uma vez foi mais significativa em comparação com o grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1 ($p<0,0001$). O grupo mobilizado pelo TGF- β 1 foi também estatisticamente menos proliferativo em comparação ao grupo membrana ($p<0,001$).

Os resultados encontram-se sumarizados nos gráficos da Figura 5.3.

Figura 5.3 - Gráficos exibindo a média das absorvâncias (nm) obtidas no teste de viabilidade celular (MTS) em cada grupo para análise da proliferação celular após 24, 48 e 72 horas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Fonte: A autora

5.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO PELA ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR E *POPULATION DOUBLING*

Ao avaliarmos os grupos de estudo em relação ao potencial de proliferação por meio da contagem de células e da formação da curva de crescimento celular, observamos que os quatro grupos exibiram uma curva ascendente, denotando o aumento da quantidade de células com o passar das horas.

Analisando-os entre si, nota-se que após 24 e 48 horas, as células exibiram um padrão de proliferação semelhante nos grupos não mobilizados. O grupo de células mobilizadas pelo G-CSF, por sua vez, mostrou-se mais proliferativo nas primeiras 24 horas, embora não estatisticamente significante ($p>0,05$). Após 48 horas, os grupos controle e membrana exibiram maior potencial proliferativo, também não significante na análise estatística ($p>0,05$). Após 72 horas, o grupo mais proliferativo foi o membrana, embora mais uma vez esse dado não tenha sido estatisticamente significante em relação aos demais ($p>0,05$) (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Gráfico da curva de crescimento celular de todos os grupos de estudo após 24, 48 e 72 horas. Média ($\pm$ desvio padrão) do número de células viáveis

Fonte: A autora

Na análise do tempo de dobra (*population doubling*) de cada um dos grupos, observamos que em relação aos grupos controle e membrana, não houve alteração no número de células após 24 horas de cultivo, enquanto após 48 horas ambos dobraram em 1,12 vezes. Após 72 horas, esses dois grupos dobraram em 2,06 e 2,27 vezes, respectivamente. Nos grupos que sofreram mobilização pelos fatores quimiotáticos, observou-se um crescimento lento após 24 e 48 horas. Apenas após 72 horas de cultivo as células mobilizadas pelo G-CSF dobraram 1,8 vezes em relação ao número de células plaqueadas inicialmente, enquanto no grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1 essa dobra foi de 1,5 vezes (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Gráfico do tempo de dobra das populações em comparação com o número total de células plaqueadas inicialmente (1×10^4 células)

Fonte: A autora

5.4 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

Na análise das reações de imunofluorescência, observou-se que todos os grupos de estudo exibiram uma imunomarcagem positiva e membranar para os anticorpos anti-CD105 (Figura 5.6) e anti-NG2 (Figura 5.8).

Analisando individualmente cada um deles, observamos que para o marcador CD105, os grupos exibiram um padrão semelhante na frequência de células positivas. O grupo controle foi aquele com maior frequência de positividade, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Para o anticorpo anti-NG2, o grupo controle foi novamente aquele com a maior frequência de positividade, sendo estatisticamente significativa em relação aos grupos de células mobilizadas pelo G-CSF ($p=0,02$) e pelo TGF- β 1 ($p=0,006$). Ademais, os grupos mobilizados pelo TGF- β 1 exibiram a menor frequência de positividade para ambos os anticorpos (Figura 5.7 e Figura 5.9). Todos os grupos avaliados neste estudo exibiram marcação negativa para o anticorpo CD34.

Figura 5.6 - Marcação por imunofluorescência das células positivas para o anticorpo anti-CD105 nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D) (aumento de 400X)

Fonte: A autora

Figura 5.7 - Gráfico da frequência de células positivas ($\pm$ desvio padrão) para o anticorpo anti-CD105 em todos os grupos estudados

Fonte: A autora

Figura 5.8 - Marcação por imunofluorescência das células positivas para o anticorpo anti-NG2 nos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D) (aumento de 400X)

Fonte: A autora

Figura 5.9 - Gráfico da frequência de células positivas ($\pm$ desvio padrão) para o anticorpo anti-NG2 em todos os grupos de estudo. * $p < 0,05$

Fonte: A autora

5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO*

Na avaliação do potencial de diferenciação osteogênica por meio dos depósitos minerais corados com alizarina vermelha, observou-se que os quatro grupos de estudo formaram estruturas mineralizadas após 21 dias de indução (Figura 5.10). Ao quantificarmos as áreas coradas, observamos que o grupo controle exibiu a maior quantidade de depósitos minerais, sendo estatisticamente significativo em relação aos demais ($p < 0,0001$). O grupo membrana foi o segundo com a maior quantidade de depósitos minerais, sendo estatisticamente significativo em relação aos dois grupos de células mobilizadas pelos fatores G-CSF e TGF- β 1 ($p < 0,0001$) (Figura 5.11).

Figura 5.10 - Imagens capturadas em microscópio de luz invertida (aumento de 50X) evidenciando depósitos minerais dos grupos controle (A), membrana (B), G-CSF (C) e TGF- β 1 (D)

Fonte: A autora

Figura 5.11 - Gráfico exibindo a média das absorvâncias (nm) obtidas após quantificação dos depósitos minerais em cada grupo analisado. * $p < 0,0001$

Fonte: A autora

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA *IN VITRO*

Na avaliação qualitativa após 21 dias de indução condrogênica, observamos que, inicialmente, todos os grupos formaram *pellets* celulares, e que, macroscopicamente, o grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1 exibiu *pellets* de maior diâmetro. No entanto, após o processamento histológico para avaliação da presença de proteoglicanos com auxílio da coloração de azul de toluidina, observou-se que nos grupos controle, membrana e mobilizado pelo G-CSF, partes das estruturas dos *pellets* foram perdidas no processamento, não sendo suficiente para deposição de proteoglicanos, e por isso, observou-se ao microscópio de luz apenas um conjunto de células de morfologia esférica dispostas de maneira desorientada. Já no grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1, foi possível observar uma estrutura celular mais organizada, além de pequenas áreas de coloração rósea clara e de aspecto hialino, entremeando as células de morfologia esférica (Figura 5.12).

Figura 5.12 - Cortes histológicos corados por azul de toluidina em um aumento de 400x no grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1 (A) e grupo controle (B)

Fonte: A autora

5.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO POR RT-PCR

A análise da expressão dos fatores osteogênicos por meio de RT-PCR demonstrou que, com exceção do grupo controle com células cultivadas até atingirem 80% de sua confluência, todos os demais grupos expressaram o gene *ALP*. Observou-se bandas mais intensas nas células cultivadas por 21 dias em relação aos mesmos grupos quando cultivados em uma menor confluência, denotando uma maior expressão gênica. Ademais, os grupos de células mobilizadas pelos fatores G-CSF e TGF- β 1 exibiram uma maior expressão do gene *ALP* em comparação aos grupos controle e membrana. Em relação à expressão do gene *RUNX2*, as células cultivadas em alta confluência também exibiram uma maior expressão gênica, com exceção daquelas mobilizadas pelo TGF- β 1. O grupo que exibiu bandas mais intensas foi o de células mobilizadas pelo fator G-CSF (Figura 5.13).

Na análise da expressão de mRNA do gene *CEMP1*, bandas de maior intensidade foram observadas nas células do grupo controle, cultivadas nas duas situações avaliadas, assim como nas células dos grupos membrana e G-CSF cultivadas em alta confluência. Em relação ao grupo de células mobilizadas pelo TGF- β 1, aquelas cultivadas por 21 dias também exibiram uma maior expressão gênica em comparação com o grupo de células cultivadas até atingirem 80% de confluência, embora essa expressão seja menor em comparação com as células dos demais grupos de estudo (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Expressão de mRNA de *ALP*, *RUNX2* e *CEMP1* nas células cultivadas até 80% de sua confluência nos grupos controle (A), membrana (C), G-CSF (E) e TGF- β 1 (G); e nas células cultivadas por 21 dias nos grupos controle (B), membrana (D), G-CSF (F) e TGF- β 1 (H)

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

Atualmente, com o avanço das técnicas da engenharia de tecidos e o surgimento de novas terapias celulares para a regeneração tecidual, torna-se importante o aprimoramento dos métodos de isolamento, cultivo e expansão das células com característica tronco. Nesse sentido, a seleção de células com melhores propriedades, por meio de moléculas bioativas que induzam a sua mobilização, parece ser um passo importante para o estabelecimento de terapias mais eficazes e seguras, visando a sua utilização em futuras aplicações clínicas.

Este trabalho propôs investigar a capacidade mobilizadora dos fatores TGF- β 1 e G-CSF em populações de células isoladas do ligamento periodontal de ratos. Observamos que, de uma forma geral, todos os grupos de estudo exibiram positividade frente a marcadores conhecidos por serem expressos por células-tronco mesenquimais. Em relação a capacidade clonogênica dessas células, o grupo de células que sofreram mobilização espontânea foi aquele com a maior eficiência na formação de colônias, seguido pelo grupo de células mobilizadas pelo G-CSF. Já as células do grupo controle e as mobilizadas pelo TGF- β 1 exibiram um menor potencial clonogênico. O ensaio de formação de colônias é comumente utilizado para avaliação da capacidade de divisão celular e de geração de um conjunto de células idênticas, sendo importante para a sua caracterização como células-tronco mesenquimais (128).

Na avaliação do potencial proliferativo, as células mobilizadas pelos fatores quimiotáticos exibiram taxas menores de proliferação celular entre 24 e 72 horas nos dois ensaios utilizados nesse estudo. Embora os quatro grupos avaliados tenham exibido um padrão de crescimento ascendente na análise da curva de crescimento celular, ficou claro que, de forma geral, as células não mobilizadas e as células que sofreram mobilização espontânea exibiram um maior potencial proliferativo em todas as circunstâncias, enquanto as células mobilizadas pelo fator TGF- β 1 foram aquelas com menor potencial de proliferação celular.

Em relação ao TGF- β 1, acredita-se que ele exerça um efeito duplo na proliferação celular, e que o estágio de diferenciação das células em questão seja

determinante para a sua ação estimulante ou supressória. Um estudo recente demonstrou que PDLSCs tratadas com TGF- β 1 exibiram níveis aumentados das proteínas p16 e p21, assim como o aumento da atividade da enzima SA- β -Gal, todas relacionadas com o envelhecimento celular, indicando que o TGF- β 1 induz a senescência dessas células, principalmente por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (129). Por outro lado, quando associado a outros fatores de crescimento, como o bFGF, o TGF- β 1 foi responsável pelo aumento da proliferação celular em células do ligamento periodontal humanas (130). Ainda em um mesmo estudo, culturas primárias de células do ligamento periodontal humanas tratadas com TGF- β 1 exibiram grande potencial proliferativo, enquanto em uma linhagem celular imortalizada do ligamento periodontal, a sua proliferação celular foi atenuada (131).

Os eventos de proliferação e diferenciação celular frequentemente estão correlacionados (124), e de forma semelhante, acredita-se também que o TGF- β 1 possua um efeito bifásico na diferenciação de células-tronco de origem mesenquimal, principalmente na diferenciação de osteoblastos, uma vez que ele é abundantemente presente na matriz óssea (132). Em estágios precoces, ele estimula a diferenciação de osteoblastos e induz a migração de células-tronco mesenquimais, o que é potencializado pela sua combinação com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Em um período posterior, o TGF- β atua como um inibidor da diferenciação osteoblástica e da mineralização tardia, o que é mediado possivelmente pelas próprias citocinas presentes no microambiente ósseo (133-135). No entanto, vale ressaltar que além do estágio de diferenciação das células, outros fatores podem estar relacionados com as discrepâncias encontradas na literatura acerca do papel do TGF- β 1 nesses eventos, como por exemplo as condições de cultura, incluindo diferentes protocolos de cultivo celular, passagens celulares distintas, além das próprias espécies avaliadas e das diferenças individuais entre os pacientes (130).

Neste estudo, a metodologia utilizada para realização do ensaio de mobilização celular foi baseada no estudo pioneiro de Murakami e colaboradores (2013), em que células-tronco da polpa dental foram induzidas à migração por meio de uma membrana com poro de 8 μ m de diâmetro. No entanto, como as células-tronco mesenquimais exibem morfologia e tamanho heterogêneos (136), preferimos

utilizar insertos com membranas semipermeáveis com poros de 5 μm , pois acreditamos que poros de menor diâmetro incapacitariam a passagem de algumas dessas células, enquanto os poros de maior diâmetro facilitariam a livre migração, impossibilitando que houvesse uma adequada seleção celular.

Outro ponto relevante a ser analisado em relação à metodologia é a concentração adequada dos fatores de crescimento, uma vez que já se sabe que dependendo da concentração utilizada de TGF- β , por exemplo, o seu efeito pode ser mais uma vez alterado. Em culturas de células ósseas da calvária de fetos de ratos, o efeito do TGF- β na replicação celular e na síntese de DNA e de colágeno, após 23 horas de tratamento, sofreu alteração nas diferentes concentrações analisadas. Na concentração de 1,5 ng/ml o seu efeito foi positivo, enquanto nas concentrações de 0,15 ng/ml e 15 ng/ml o resultado observado foi oposto, e o TGF- β exerceu um efeito inibitório nessas células (137). Em células-tronco mesenquimais da medula óssea humana foram também testadas concentrações de 0,01 pg/ml até 10 ng/ml de TGF- β 1, e demonstrou-se que em concentrações muito baixas ou muito altas, um efeito negativo na osteogênese foi observado, enquanto em concentrações baixas ocorreu a indução da migração celular (138).

É importante destacar que, até onde sabemos, não há na literatura investigações prévias acerca da indução da mobilização de células-tronco do ligamento periodontal por meio de fatores quimiotáticos. Assim, baseando-se mais uma vez no trabalho do grupo de Murakami, em que foram testadas concentrações de 10, 100 e 500 ng/ml do fator G-CSF em DPSCs, nós fixamos a sua concentração ideal em 100 ng/ml. Em um estudo posterior que avaliou diferentes concentrações de fatores de crescimento em células-tronco da papila apical por meio do ensaio de migração celular, a concentração com a maior migração de células para o G-CSF também foi de 100 ng/ml. Em relação ao fator TGF- β 1, após avaliação das concentrações de 1, 10 e 100 ng/ml nessas células, observou-se que a concentração de 100 ng/ml foi mais uma vez a mais eficiente na migração das SCAPs, embora não estatisticamente significativa (8). Portanto, adotamos também para o TGF- β 1 a concentração ideal de 100 ng/ml.

Em ensaios de indução da diferenciação condrogênica utilizando-se a formação de *pellets* celulares ou micromassas, sabe-se que as células-tronco

mesenquimais de morfologia fusiforme e semelhante a fibroblastos se modificam com o passar dos dias de indução e adquirem uma morfologia esférica, semelhante aos condrócitos. Além disso, essas células passam a produzir matriz extracelular cada vez mais abundante em proteoglicanos, até que a coloração de Alcian blue ou azul de toluidina fica intensa, indicando a maturação dessa matriz cartilaginosa (139, 140). Os nossos resultados demonstraram que as células mobilizadas pelo TGF- β 1 formaram *pellets* celulares maiores, áreas de coloração rosada e aspecto hialino, que indicam a positividade para a coloração de azul de toluidina e o início da produção de uma matriz extracelular contendo proteoglicanos (139). Esse resultado é compatível com o fato de que o TGF- β é um importante fator na condrogênese, tanto que ele é um dos componentes presentes no meio classicamente utilizado para induzir diferenciação condrogênica. Embora o TGF- β 2 e o TGF- β 3 sejam os mais eficazes, os três subtipos de TGF- β estimulam os condrócitos e atuam na expressão e síntese de componentes da matriz cartilaginosa, como colágeno tipo II e proteoglicanos (141-143).

As *cell sheets* são membranas celulares que consistem em camadas de células geradas a partir do seu cultivo *in vitro* em alta confluência, ou por cerca de 2 semanas. A vantagem desse tipo de abordagem é que as células mantêm proteínas da matriz extracelular e junções célula a célula (144), não havendo a necessidade de digestão enzimática prévia nem de arcabouços biodegradáveis, permitindo o seu transplante direto para os tecidos a serem regenerados (94). Classicamente, para a formação das *cell sheets* a partir de células-tronco mesenquimais, há necessidade do cultivo em placas de cultura sensíveis à temperatura, assim como a indução prévia da sua diferenciação. Já se sabe que o transplante de *cell sheets* provenientes de células-tronco do ligamento periodontal humanas e cultivadas em meios de diferenciação osteogênicos induzem a regeneração dos tecidos periodontais. Quando transplantadas em defeitos na mandíbula de ratos, por exemplo, essas células induziram a formação de cemento e de fibras do ligamento periodontal de origem humana (95).

Neste trabalho, o nosso objetivo não era o transplante das *cell sheets*, e sim a avaliação *in vitro* da capacidade de diferenciação das PDLSCs quando em 80% de confluência e após 21 dias de cultivo, já em alta confluência e com o contato célula-célula. Assim, optamos pela ausência de métodos de cultivo específicos, como

sistemas termoresponsivos, sistemas sensíveis ao pH ou magnéticos (145). Além disso, como estudos prévios realizaram o transplante de células-tronco indiferenciadas em modelos de cicatrização de feridas, e nos tecidos-alvos elas foram capazes de sofrer diferenciação (144, 146), o nosso objetivo foi avaliar inicialmente como as células-tronco do ligamento periodontal se comportavam *in vitro* sem a indução prévia da sua diferenciação.

Os nossos resultados demonstraram que as PDLSCs são capazes de expressar genes relacionados à diferenciação osteogênica e cementogênica mesmo na ausência de indução prévia. De maneira geral, células de todos os grupos de estudo expressaram mRNA para o gene *RUNX2*, e com exceção do grupo controle após 80% de confluência, os demais também expressaram o gene *ALP*, ambos relacionados com estágios iniciais da osteogênese. O fator de transcrição *RUNX2* é expresso em células osteoprogenitoras mesenquimais e exerce uma função importante na diferenciação osteogênica, principalmente em estágios precoces, por meio da maturação de osteoblastos, estando envolvido em várias vias de sinalização de diferenciação celular (147, 148). A expressão do *ALP*, por sua vez, está relacionada à maturação da diferenciação osteogênica, provavelmente por atuar na mineralização da matriz óssea por meio da regulação da via de sinalização Wnt (149, 150).

Destaca-se ainda o fato de que as bandas foram mais intensas nas células cultivadas por 21 dias, denotando uma maior expressão de mRNA nessas populações. Isso demonstra que as PDLSCs expressam genes relacionados a diferenciação osteogênica mesmo na ausência da sua indução, ou seja, de forma espontânea quando em alta confluência. Esse resultado é corroborado por um estudo recente que demonstrou uma expressão elevada de marcadores relacionados a formação do tecido periodontal em *cell sheets* de PDLSCs humanas cultivadas em um substrato termorresponsivo nanotopográfico, em comparação com aquelas cultivadas em superfícies planas (149), indicando que a topografia e o microambiente fornecido pelas *cell sheets* têm uma influência direta na diferenciação dos tecidos periodontais.

Enquanto no ensaio de indução osteogênica as células mobilizadas exibiram uma menor deposição mineral em comparação com os grupos controle, após análise

por RT-PCR, as células mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF revelaram bandas maiores e mais intensas, o que sugere uma maior expressão de genes associados a osteogênese. Embora esse não seja um método quantitativo, por comparação em uma mesma eletroforese pode-se inferir que a quantidade inicial de mRNA era maior ou menor em determinada amostra. Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que apesar dessas células expressarem o mRNA para os genes em questão, não necessariamente eles serão traduzidos em proteínas naquele momento específico, pois essa atividade é regulada por diversas modificações pós-transcricionais. Isso revela a importância da união de várias técnicas laboratoriais para a interpretação dos resultados, uma vez que há também a sensibilidade inerente a cada método de análise (151). Há ainda o fato da osteogênese ser um processo complexo que envolve a associação de vários genes, que irão codificar diversos fatores de transcrição e de crescimento simultaneamente (152). Assim, quando as populações sofrem estimulação da sua diferenciação, por fatores ou meios indutores, é possível que elas ativem vias de sinalização diferentes daquelas que são ativadas pelas células em seu estado natural de confluência.

O CEMP1 é uma molécula relacionada à cementogênese que é expressa por cementoblastos e por populações de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal. Como regulador local desse processo, o CEMP1 vem sendo relacionado com a diferenciação celular e com a deposição de cristais minerais (153, 154). No nosso estudo, de uma forma geral, todos os grupos de estudo expressaram mRNA em níveis variados para esse gene, destacando-se as células mobilizadas pelo G-CSF cultivadas em alta confluência. Esses achados são concordantes com estudos anteriores que demonstraram que a expressão de CEMP1 por populações de PDLSCs pode estar relacionada com o fato dessas populações serem uma fonte importante de precursores de cementoblastos e de osteoblastos (154-156). Em relação à associação dos fatores mobilizadores G-CSF e TGF- β 1 com a cementogênese, é necessário a avaliação de outras moléculas relacionadas a esse processo, como por exemplo o HACD1, ou proteína de adesão do cimento (CAP, do inglês *cementum attachment protein*), para que se possa estabelecer melhor uma relação direta entre as células mobilizadas e a expressão desses genes cementogênicos, o que pretendemos fazer em um futuro próximo.

Desse modo, já se sabe que proliferação celular, clonogenicidade e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica são importantes propriedades desejáveis em células mesenquimais com característica tronco, no entanto, o fato das PDLSCs mobilizadas pelos dois fatores analisados nesse estudo expressarem sem indução importantes genes relacionados aos processos de osteogênese e cementogênese indicam que a mobilização celular pode ser um importante passo para induzir a migração de células mais diferenciadas. Assim, nesse sentido, tanto o G-CSF quanto o TGF- β 1 podem ser futuramente possíveis moléculas sinalizadoras com potencial para estratégias de “*homing*” celular.

7 CONCLUSÃO

As células-tronco do ligamento periodontal de ratos não mobilizadas e de mobilização espontânea apresentam melhores propriedades clonogênicas e proliferativas em comparação com as células mobilizadas por TGF- β 1 e G-CSF. Por outro lado, a mobilização das células pelos dois agentes quimiotáticos foi responsável por uma maior expressão de mRNA da proteína fosfatase alcalina e do fator de transcrição relacionado à Runt-2 (RUNX2).

As células mobilizadas e controle foram capazes de expressar mRNA para genes relacionados a osteogênese e cementogênese sem indução prévia, principalmente quando cultivadas em alta confluência.

REFERÊNCIAS¹

1. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. doi: 10.1080/14653240500319234.
2. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010 May;20(5):510-8. doi: 10.1038/cr.2010.44.
3. Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int*. 2006 Nov;79(5):310-7. doi: 10.1007/s00223-006-0040-4.
4. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008 Apr;26(4):1065-73. doi: 10.1634/stemcells.2007-0734.
5. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul;364(9429):149-55. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.
6. Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 2008 Feb;132(4):612-30. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.041.
7. Bensinger W, DiPersio JF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Feb;43(3):181-95. doi: 10.1038/bmt.2008.410.
8. Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod*. 2017 Aug;43(8):1288-93. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.012.
9. Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, et al. The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

- dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(36):9036-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.011.
10. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 2006;40:164-72. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00139.x.
 11. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:253-69. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240113.x.
 12. A N. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 8 ed. United States of America, 2012.
 13. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2014 Jun;59 Suppl 1:117-30. doi: 10.1111/adj.12100.
 14. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:41-75. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00095.x.
 15. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x.
 16. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2017 Dec;52(6):965-74. doi: 10.1111/jre.12477.
 17. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:20-40. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00094.x.
 18. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:216-48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00199.x.
 19. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov;366(9499):1809-20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.

20. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontol 2000*. 2007;43:245-53. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00171.x.
21. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2066-74. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2066.
22. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Papapanou PN, et al. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke*. 2003 Sep;34(9):2120-5. doi: 10.1161/01.STR.0000085086.50957.22.
23. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis*. 2006 Jul;12(4):358-63. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01253.x.
24. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2008 Jun;53(2):108-21. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00019.x.
25. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontol 2000*. 2000 Feb;22:44-50. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2220104.x.
26. Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, et al. Periodontal regeneration. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1601-22. doi: 10.1902/jop.2005.76.9.1601.
27. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997 Apr;276(5309):75-81. doi: 10.1126/science.276.5309.75.
28. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 3):1251-61.
29. Bartold PM, Clayden AM, Gao J, Haase H, Li H, Stevens M, et al. The role of growth factors in periodontal and pulpal regeneration. *J N Z Soc Periodontol*. 1998(83):7-14.

30. Tassi SA, Sergio NZ, Misawa MYO, Villar CC. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies. *J Periodontal Res.* 2017 Oct;52(5):793-812. doi: 10.1111/jre.12455.
31. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 2012 Jun;59(1):203-27. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00443.x.
32. Smith B, Caffesse R, Nasjleti C, Kon S, Castelli W. Effects of citric acid and fibronectin and laminin application in treating periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1987 Aug;14(7):396-402. doi: 10.1111/j.1600-051x.1987.tb01543.x.
33. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982 Jul;9(4):290-6. doi: 10.1111/j.1600-051x.1982.tb02095.x.
34. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976 May;47(5):256-60. doi: 10.1902/jop.1976.47.5.256.
35. Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, Fisher A, Hutmacher DW. Tissue engineered periodontal products. *J Periodontal Res.* 2016 Feb;51(1):1-15. doi: 10.1111/jre.12275.
36. Nevins M, Kao RT, McGuire MK, McClain PK, Hinrichs JE, McAllister BS, et al. Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *J Periodontol.* 2013 Apr;84(4):456-64. doi: 10.1902/jop.2012.120141.
37. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2011 Jan;90(1):35-40. doi: 10.1177/0022034510384616.
38. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991 Jul;62(7):458-67. doi: 10.1902/jop.1991.62.7.458.

39. Ripamonti U, Renton L. Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration. *Periodontol* 2000. 2006 May;41:73-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00155.x.
40. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:9-27. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x.
41. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep;24(9 Pt 2):658-68. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00247.x.
42. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. 1998 Mar;16(3):247-52. doi: 10.1038/nbt0398-247.
43. Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng*. 1995;1(1):3-13. doi: 10.1089/ten.1995.1.3.
44. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
45. Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):88-91. doi: 10.1038/35102150.
46. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
47. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
48. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):183-93. doi: 10.1038/nrm.2016.8.
49. De Vos J, Bouckenheimer J, Sansac C, Lemaître JM, Assou S. Human induced pluripotent stem cells: A disruptive innovation. *Curr Res Transl Med*. 2016 Apr-Jun;64(2):91-6. doi: 10.1016/j.retram.2016.04.001.

50. Bongso A, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *J Cell Biochem*. 2008 Dec;105(6):1352-60. doi: 10.1002/jcb.21957.
51. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):118-21. doi: 10.1038/35102181.
52. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun;441(7097):1075-9. doi: 10.1038/nature04957.
53. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):11-21. doi: 10.1038/nrm2319.
54. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60. doi: 10.1002/9780470513637.ch4.
55. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-74.
56. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017 Sep;17(9):573-90. doi: 10.1038/nri.2017.53.
57. Crisan M, Dzierzak E. The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development*. 2016 Dec;143(24):4571-81. doi: 10.1242/dev.114231.
58. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95. doi: 10.1091/mbc.e02-02-0105.
59. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000 Apr;109(1):235-42. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.
60. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000 Aug;2(6):477-88. doi: 10.1186/ar130.

61. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797.
62. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Péault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):2851-60. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01617.x.
63. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell*. 1998 Feb;30(1):127-35. doi: 10.1016/s0040-8166(98)80014-1.
64. Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther*. 2015 Jul;151:107-20. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.03.006.
65. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
66. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun;119(Pt 11):2204-13. doi: 10.1242/jcs.02932.
67. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar;311(5769):1880-5. doi: 10.1126/science.1110542.
68. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
69. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb;21(2):216-25. doi: 10.1038/cdd.2013.
70. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb;2(2):141-50. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014.

71. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1301-9. doi: 10.3324/haematol.12857.
72. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan;107(1):367-72. doi: 10.1182/blood-2005-07-2657.
73. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008 May;371(9624):1579-86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.
74. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. 2015 Apr;2015:394917. doi: 10.1155/2015/394917.
75. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009 Mar;4(3):206-16. doi: 10.1016/j.stem.2009.02.001.
76. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul;143(13):2273-80. doi: 10.1242/dev.134189.
77. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May;100(10):5807-12. doi: 10.1073/pnas.0937635100.
78. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005 Apr;24(2):155-65. doi: 10.1016/j.matbio.2004.12.004.
79. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2005 Mar;20(3):399-409. doi: 10.1359/JBMR.041117.
80. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006 Dec;1:e79. doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

81. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008 May;76(5):495-505. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x.
82. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec;183(12):7787-98. doi: 10.4049/jimmunol.0902318.
83. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr;18(3):487-96. doi: 10.1089/scd.2008.0113.
84. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007 Aug;10(3):149-60. doi: 10.1111/j.1601-6343.2007.00399.x.
85. Dapeng L, Xiaojie L, Ping G, Yan D, Gang S. Erk1/2 signalling is involved in the differentiation of periodontal ligament stem cells to Schwann cells in dog. *Arch Oral Biol*. 2014 May;59(5):487-91. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.010.
86. Ng TK, Yung JS, Choy KW, Cao D, Leung CK, Cheung HS, et al. Transdifferentiation of periodontal ligament-derived stem cells into retinal ganglion-like cells and its microRNA signature. *Sci Rep*. 2015 Nov;5:16429. doi: 10.1038/srep16429.
87. Eleuterio E, Trubiani O, Sulpizio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Marchisio M, et al. Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PLoS One*. 2013 Aug;8(8):e71101. doi: 10.1371/journal.pone.0071101.
88. Martínez C, Smith PC, Rodriguez JP, Palma V. Sonic hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):483-8. doi: 10.1177/0022034510391797.
89. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*. 2010 May;223(2):415-22. doi: 10.1002/jcp.22050.
90. Shin C, Kim M, Han JA, Choi B, Hwang D, Do Y, et al. Human periodontal ligament stem cells suppress T-cell proliferation via down-regulation of non-

classical major histocompatibility complex-like glycoprotein CD1b on dendritic cells. *J Periodontal Res.* 2017 Feb;52(1):135-46. doi: 10.1111/jre.12378.

91. Liu O, Xu J, Ding G, Liu D, Fan Z, Zhang C, et al. Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein 1. *Stem Cells.* 2013 Jul;31(7):1371-82. doi: 10.1002/stem.1387.
92. Liu D, Xu J, Liu O, Fan Z, Liu Y, Wang F, et al. Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation. *J Clin Periodontol.* 2012 Dec;39(12):1174-82. doi: 10.1111/jcpe.12009.
93. Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials.* 2005 Nov;26(33):6415-22. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.061.
94. Iwata T, Washio K, Yoshida T, Ishikawa I, Ando T, Yamato M, et al. Cell sheet engineering and its application for periodontal regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Apr;9(4):343-56. doi: 10.1002/term.1785.
95. Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol.* 2008 Dec;35(12):1066-72. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01326.x.
96. Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TR, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH, et al. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2012 Apr;39(4):377-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01858.x.
97. Mrozik KM, Wada N, Marino V, Richter W, Shi S, Wheeler DL, et al. Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regen Med.* 2013 Nov;8(6):711-23. doi: 10.2217/rme.13.66.
98. Ripamonti U. Redefining the induction of periodontal tissue regeneration in primates by the osteogenic proteins of the transforming growth factor- β supergene family. *J Periodontal Res.* 2016 Dec;51(6):699-715. doi: 10.1111/jre.12356.
99. Bright R, Hynes K, Gronthos S, Bartold PM. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. *J Periodontal Res.* 2015 Apr;50(2):160-72. doi: 10.1111/jre.12205.

100. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.* 2010 Jan;16(1):20-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01593.x.
101. Chen FM, Gao LN, Tian BM, Zhang XY, Zhang YJ, Dong GY, et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Feb;7:33. doi: 10.1186/s13287-016-0288-1.
102. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(6):425-34. doi: 10.1038/nrc2843.
103. Deng J, Zou ZM, Zhou TL, Su YP, Ai GP, Wang JP, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurol Sci.* 2011 Aug;32(4):641-51. doi: 10.1007/s10072-011-0608-2.
104. Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood.* 1992 Nov;80(10):2513-21.
105. Bernitz JM, Daniel MG, Fstckchyan YS, Moore K. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes dormant hematopoietic stem cells without proliferation in mice. *Blood.* 2017 Apr;129(14):1901-12. doi: 10.1182/blood-2016-11-752923.
106. Gross-Weege W, Dumon K, Dahmen A, Schneider EM, Röher HD. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) serum levels in surgical intensive care patients. *Infection.* 1997 Jul-Aug;25(4):213-6. doi: 10.1007/bf01713146.
107. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity.* 2016 Nov;45(5):963-73. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.
108. Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J Endod.* 2014 Apr;40(4 Suppl):S26-32. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.020.
109. Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, et al. A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Jul;2(10):818. doi: 10.5966/sctm.2012-0132.

110. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J*. 2018 Apr;51(4):405-19. doi: 10.1111/iej.12868.
111. Lim WH, Liu B, Mah SJ, Chen S, Helms JA. The molecular and cellular effects of ageing on the periodontal ligament. *J Clin Periodontol*. 2014 Oct;41(10):935-42. doi: 10.1111/jcpe.12277.
112. Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold LI, Cronstein BN, Haines KA, et al. Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug;88(15):6805-9. doi: 10.1073/pnas.88.15.6805.
113. Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective potency of TGF- β 1 on maintenance and regeneration of periodontal tissue. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013 Jun;304:283-367. doi: 10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3.
114. Gonçalves LF, Fernandes AP, Cosme-Silva L, Colombo FA, Martins NS, Oliveira TM, et al. Effect of EDTA on TGF- β 1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. *Braz Oral Res*. 2016 Dec;30(1):e131. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0131.
115. Vaahtokari A, Vainio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor beta 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development*. 1991 Nov;113(3):985-94.
116. Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A, et al. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*. 1995 May;129(3):853-65. doi: 10.1083/jcb.129.3.853.
117. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*. 1990 Aug;5(8):825-30. doi: 10.1002/jbmr.5650050805.
118. Adams DH, Hathaway M, Shaw J, Burnett D, Elias E, Strain AJ. Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J Immunol*. 1991 Jul;147(2):609-12.
119. Zhang F, Tsai S, Kato K, Yamanouchi D, Wang C, Rafii S, et al. Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone

marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2009 Jun;284(26):17564-74. doi: 10.1074/jbc.M109.013987.

120. Zhang H, Ahmad M, Gronowicz G. Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials.* 2003 May;24(12):2013-20. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00616-6.
121. Salkın H, Gönen ZB, Ergen E, Bahar D, Çetin M. Effects of TGF- β 1 Overexpression on Biological Characteristics Of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Stem Cells.* 2019 Mar;12(1):170-82. doi: 10.15283/ijsc18051.
122. Liang YY, Brunicardi FC, Lin X. Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):140-8. doi: 10.1038/cr.2008.321.
123. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008 Jul;112(2):295-307. doi: 10.1182/blood-2007-07-103697.
124. Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, et al. Exposure to transforming growth factor- β 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. *Cell Tissue Res.* 2013 May;352(2):249-63. doi: 10.1007/s00441-012-1543-0.
125. Katagiri T, Lee T, Takeshima H, Suda T, Tanaka H, Omura S. Transforming growth factor-beta modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages. *Bone Miner.* 1990 Dec;11(3):285-93. doi: 10.1016/0169-6009(90)90025-b.
126. Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun;357(4):917-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.031.
127. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T, Kitagawa S, Kitagawa M, Shiba H, et al. Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential

- enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. *Bone*. 2006 May;38(3):420-6. doi: 10.1016/j.bone.2005.08.021.
128. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
129. Fan C, Ji Q, Zhang C, Xu S, Sun H, Li Z. TGF- β induces periodontal ligament stem cell senescence through increase of ROS production. *Mol Med Rep*. 2019 Oct;20(4):3123-30. doi: 10.3892/mmr.2019.10580.
130. Silverio-Ruiz KG, Martinez AE, Garlet GP, Barbosa CF, Silva JS, Cicarelli RM, et al. Opposite effects of bFGF and TGF-beta on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine*. 2007 Aug;39(2):130-7. doi: 10.1016/j.cyto.2007.06.009.
131. Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, et al. Effects of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. *Cell Tissue Res*. 2010 Nov;342(2):233-42. doi: 10.1007/s00441-010-1037-x.
132. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*. 2005 Oct;26(6):743-74. doi: 10.1210/er.2004-0001.
133. de Gorter DJ, van Dinther M, Korchynskyi O, ten Dijke P. Biphasic effects of transforming growth factor β on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2011 Jun;26(6):1178-87. doi: 10.1002/jbmr.313.
134. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):757-65. doi: 10.1038/nm.1979.
135. Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J*. 2004 Feb;23(3):552-63. doi: 10.1038/sj.emboj.7600067.
136. Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, Zhao RC, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and

stroke. *Stem Cell Rev Rep*. 2014 Apr;10(2):295-303. doi: 10.1007/s12015-013-9492-x.

137. Centrella M, Massagué J, Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology*. 1986 Nov;119(5):2306-12. doi: 10.1210/endo-119-5-2306.
138. Labour MN, Riffault M, Christensen ST, Hoey DA. TGFβ1 - induced recruitment of human bone mesenchymal stem cells is mediated by the primary cilium in a SMAD3-dependent manner. *Sci Rep*. 2016 Oct;6:35542. doi: 10.1038/srep35542.
139. Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2013 Jan;22(1):102-13. doi: 10.1089/scd.2012.0127.
140. Toh WS, Liu H, Heng BC, Rufaihah AJ, Ye CP, Cao T. Combined effects of TGFβ1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors*. 2005 Dec;23(4):313-21. doi: 10.1080/08977190500252763.
141. Chen MJ, Whiteley JP, Please CP, Ehlicke F, Waters SL, Byrne HM. Identifying chondrogenesis strategies for tissue engineering of articular cartilage. *J Tissue Eng*. 2019 Apr;10:2041731419842431. doi: 10.1177/2041731419842431.
142. Chen K, Xiong H, Xu N, Shen Y, Huang Y, Liu C. Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo. *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov;72(8):664-72. doi: 10.3109/00016357.2014.888756.
143. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001 Aug;268(2):189-200. doi: 10.1006/excr.2001.5278.
144. Chen L, Xing Q, Zhai Q, Tahtinen M, Zhou F, Xu Y, et al. Pre-vascularization Enhances Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell Sheets in Full Thickness Skin Wound Repair. *Theranostics*. 2017 Jan;7(1):117-31. doi: 10.7150/thno.17031.

145. Li M, Ma J, Gao Y, Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2019 Jan;21(1):3-16. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.10.013.
146. Kato Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Kuroda H, Morikawa S, et al. Creation and Transplantation of an Adipose-derived Stem Cell (ASC) Sheet in a Diabetic Wound-healing Model. *J Vis Exp*. 2017 Aug;(126). doi: 10.3791/54539.
147. Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res*. 2015 Dec;7(12):2527-35.
148. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, et al. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004;14(1-2):1-41.
149. Kim JH, Ko SY, Lee JH, Kim DH, Yun JH. Evaluation of the periodontal regenerative properties of patterned human periodontal ligament stem cell sheets. *J Periodontal Implant Sci*. 2017 Dec;47(6):402-15. doi: 10.5051/jpis.2017.47.6.402.
150. Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y. Activation of the Canonical Wnt Signaling Pathway Induces Cementum Regeneration. *J Bone Miner Res*. 2015 Jul;30(7):1160-74. doi: 10.1002/jbmr.2445.
151. Krause U, Seckinger A, Gregory CA. Assays of osteogenic differentiation by cultured human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:215-30. doi: 10.1007/978-1-60761-999-4_17.
152. Ozdemir T, Bowers DT, Zhan X, Ghosh D, Brown JL. Identification of Key Signaling Pathways Orchestrating Substrate Topography Directed Osteogenic Differentiation Through High-Throughput siRNA Screening. *Sci Rep*. 2019 Jan;9(1):1001. doi: 10.1038/s41598-018-37554-y.
153. Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One*. 2015 May;10(5):e0127286. doi: 10.1371/journal.pone.0127286.
154. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal

ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int*. 2012 Feb;36(2):129-36. doi: 10.1042/CBI20110168.

155. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 2012 Feb;227(2):649-57. doi: 10.1002/jcp.22770.
156. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006 Mar;38(3):409-19. doi: 10.1016/j.bone.2005.09.009.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso em Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuafu@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de células mobilizadas do ligamento periodontal (MPDLSCs) de Rattus Novergius na engenharia tecidual" registrada com o nº 011/2018, sob a responsabilidade de Marília Trieverler Martins, Aline Campos de Quiroz, Cibele Pelissari dos Santos, Adriana Fraga Costa Paris, Elisa dos Santos e Elisangela Chinen que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 09/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/04/2018 A 09/04/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	200g / 6–8 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB - USP

São Paulo, 12 de abril de 2018.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
 Coordenador do CEUA-FOUSP