



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA

**IDENTIFICAÇÃO DE PERICITOS NO LIGAMENTO
PERIODONTAL E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO CÉLULAS
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS**

Piracicaba
2016

MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA

**IDENTIFICAÇÃO DE PERICITOS NO LIGAMENTO
PERIODONTAL E SUA CARACTERIZAÇÃO COMO CÉLULAS
MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora em
Clínica Odontológica, na Área de Periodontia.**

Orientadora: Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. KARINA
GONZALES SILVÉRIO RUIZ.

Piracicaba
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/14472-4; CNPq, 400157/2013-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

C914i Cunha, Mércia Jussara da Silva, 1986-
Identificação de pericitos no ligamento periodontal e sua caracterização como células mesenquimais indiferenciadas / Mércia Jussara da Silva Cunha. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Karina Gonzales Silvério Ruiz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Células-Tronco. 2. Ligamento Periodontal. 3. Pericitos. I. Ruiz, Karina Gonzales Silvério, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of pericytes in periodontal ligament and characterization as mesenchymal stem cells

Palavras-chave em Inglês:

Stem Cells

Periodontal Ligament

Pericytes

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Karina Gonzales Silvério Ruiz [Orientador]

Bruna Rabelo Amorim

Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa Lins

Denise Carleto Andia

Francisco Humberto Nociti Junior

Data de defesa: 06-10-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 06 de Outubro de 2016, considerou a candidata MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA aprovada.

PROF^a. DR^a. KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

PROF^a. DR^a. BRUNA RABELO AMORIM

PROF^a. DR^a. RUTHINÉIA DIÓGENES ALVES UCHÔA LINS

PROF^a. DR^a. DENISE CARLETO ANDIA

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por estar sempre presente, por toda força e coragem, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, por iluminar meus pensamentos e guiar meus sonhos.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.”
(PV. 16:9)

Ao meu pai José Noberto, que partiu durante esta caminhada, deixando muita saudade em meu coração. Tenho certeza, que estás ao lado do Pai Celestial, zelando e intercedendo por mim. Obrigada por todo carinho e incentivo. Obrigada por me ajudar a compreender o tempo de Deus para cada coisa na vida.

Quer saber quanto custa uma saudade
tenha amor, queira bem e viva ausente.
A saudade de alguém que foi embora
de um amigo, de um amor, de um parente
de alguém que não está mais entre a gente
com o peito adoentado a alma chora
feito gripe que de noite só piora
uma dor maior que 20 “dor” de dente
judiando “inté” do cabra mais valente
sem sentir pena, dó, nem piedade
Quer saber quanto custa uma saudade
tenha amor, queira bem e viva ausente.
Tanto amor no meu peito estocado
esperando por você que já partiu
tão depressa, nem sequer se despediu
vez por outra, eu me pergunto agoniado:
se a saudade mora mesmo no passado,
por que é que ela vive tão presente?
(Bráulio Bessa)

À minha mãe Maria José, por conhecer todos os meus defeitos e mesmo assim, me amar incondicionalmente. Pela paciência que teve em me mostrar a importância do estudo. Por todo incentivo, decisivo na minha formação profissional. Por ser a força que me mantém de pé nos momentos de insegurança.

Ao meu avô José João e à minha avó Luzia, pelo incentivo e, sobretudo, pelas orações durante os momentos mais importantes desta caminhada.

À minha irmã Bianca, por me mostrar que com determinação se vai longe. Por me ensinar a sonhar alto e não se abater com os obstáculos.

Às minhas sensacionais sobrinhas Leticia e Isadora, por me fazer rir feito boba a cada aprendizado. Por encher o meu coração de alegria.

A todos os meus familiares: tios, tias, primos e primas, pela confiança depositada. Obrigada por compreenderem minha ausência e por me incentivarem sempre.

À Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, minha querida orientadora, por ter acreditado em mim e ter me aberto as portas. Por me acolher nos momentos de dúvidas, por tentar me transmitir toda sua sabedoria e tranquilidade. Pela paciência e disponibilidade em me ensinar e tentar fazer com que eu entendesse coisas que antes pareciam impossíveis. Por me ajudar a ser uma profissional mais competente. Todo carinho, dedicação e humildade transmitida ao longo destes anos de convivência serão ensinamentos que levarei para sempre. Obrigada pela confiança e sobretudo paciência.

“Uns são homens, alguns são professores, poucos são Mestres. Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se; aos últimos, segue-se.”
(Raquel Eckert)

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior, pela atenção que sempre teve comigo, pelo incentivo constante, por me mostrar que eu posso fazer mais e melhor sempre. E acima de tudo, por me permitir desfrutar de tamanha experiência e sabedoria.

“Se pude ver mais longe, foi porque subi nos ombros de um gigante.”
(Isaac Newton)

Enfim, à todos os professores da Área de Periodontia da FOP-UNICAMP: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati e o Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, pela convivência agradável e por compartilharem de seus conhecimentos para meu aprimoramento profissional.

À Profa. Dra. Denise Carleto Andia, pela prontidão, disponibilidade e colaboração com o enriquecimento do nosso trabalho, pela solicitude em esclarecer qualquer dúvida, pelo convívio harmonioso e pelo exemplo de amor a profissão. Muito Obrigada!

À Profa. Dra. Bruna Amorim, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação científica, pela tranquilidade que transmite, pela disponibilidade e ajuda nos protocolos e reações de imunofluorescência. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, da Área de Histologia por nos abrir as portas e possibilitar a utilização dos laboratórios e microscópios para aquisição das imagens desse trabalho.

Prof. Dr. José Francisco Hofling da Área de Microbiologia e Imunologia por nos possibilitar a utilização dos laboratórios.

Ao adorável Prof. Dr. Eduardo Gomes Seabra da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por despertar em mim o interesse pela Periodontia.

À querida Profa. Dra. Lêda Bezerra Quinderé da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, minha primeira orientadora e que tanto contribuiu para que hoje eu estivesse aqui. A senhora é um exemplo de dedicação à vida acadêmica e certamente me inspirou a seguir este caminho. Tê-la como orientadora foi um presente de Deus. Muito obrigada!

“Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai sua influência.”
(Henry Brooks Adams)

À Profa. Dra. Isana Alvares Ferreira, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, e ao amigo José Sérgio Maia Neto, por confiar no meu trabalho, me incentivar e guiar meus primeiros passos na pós-graduação.

Às pós-doutorandas: Dra. Cristiane Ribeiro Salmon, por ter gentilmente me ensinado a técnica de perfusão transcardíaca utilizada nesse trabalho, ter me ajudado na interpretação e melhor apresentação das imagens histológicas, assim como tantas outras ajudas e contribuições dadas para o enriquecimento deste trabalho; Dra. Luciane Martins, por está sempre presente e disposta a ajudar; e à Dra. Samira Sameron, que chegou recentemente e logo tornou-se querida. Obrigada pela amizade sincera, pelo companheirismo, pela disponibilidade de sempre e pelas contribuições que fez para o enriquecimento do nosso trabalho.

À Mariana Fugolin, técnica do Laboratório de Periodontia, pela contribuição no processamento histológico, pelas conversas agradáveis, pelas palavras de incentivo, por toda colaboração e disponibilidade. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Às queridas funcionárias do Departamento de Prótese e Periodontia, Regina Caetano e Eliete Marin, pelo esforço em me ajudar sempre, pela torcida, por toda a atenção e forma carinhosa com que sempre me trataram.

Aos técnicos do laboratório de Histologia, Dr. Adriano Luis Martins, por ser sempre tão solícito e Dra. Flávia Sammartino, pela disponibilidade de sempre, pela troca de conhecimentos e por toda colaboração na aquisição e interpretação das imagens desse trabalho.

Ao técnico do laboratório de Patologia, Dr. Fábio pela imprescindível colaboração nas análises de Citometria de Fluxo.

Aos funcionários do biotério, em especial à Wanderlei Francisco Vieira, por cuidar dos meus animais.

À Ana Paula, secretária da pós-graduação, pela prontidão e disponibilidade em resolver as questões por mim solicitadas.

À toda minha turma de doutorado, Ana Regina Moreira, Camila Camarinha, João Paulo Sangiorgio, Miki Saito, Mayra Albiero, Tiago Taiete, Tiago Tarbes e Viviene Barbosa, agradeço pelo convívio harmonioso, pelas experiências vividas, pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Cada um de vocês tem uma parcela de contribuição na minha formação pessoal e profissional. Em especial, à Camila Camarinha, por tornar esse caminho mais leve; à Mayra Albiero, por toda a ajuda no laboratório, pela experiência transmitida, pela paciência e pelo tempo gasto auxiliando em meus experimentos; à Miki Saito e Tiago Taiete, pessoas de coração enorme. Obrigada por se fazerem presentes em tantos momentos importantes desta caminhada, sempre dispostos a ajudar e me acalmar, por partilharem das minhas dúvidas, me ouvirem e me aconselharem. A amizade de vocês me faz muito bem.

À Viviene Santana Barbosa, amiga que conquistei desde a prova de seleção para o doutorado, companheira fiel nesta caminhada. Obrigada por toda ajuda com os animais, por me ensinar a instalar as ligaduras e principalmente, obrigada pelo ombro amigo e incentivo, mesmo quando partilhávamos das mesmas dúvidas, angústias e medos. Obrigada por não me deixar desanimar e por acreditar que, juntas, poderíamos superar as dificuldades e alcançar os nossos sonhos.

À todos os amigos das outras turmas de doutorado e mestrado da Área de Periodontia da FOP-UNICAMP: Ana Livia Fileto, Guilherme Henrique Oliveira, Isabela França, Mabelle Monteiro, Marcela Di Moura, Amanda Bandeira, Elis Regina, Fernanda Felix, Manuela Rocha, Rafaela Videira, Rahyza Freire e Thiago Bueno, agradeço pelo convívio harmonioso, pelas experiências compartilhadas, pelas conversas e torcida de sempre. Em especial, à Guilherme Henrique Oliveira, amigo desde a época que morei em Bauru, companheiro inseparável. Obrigada pelas aventuras, pelas boas risadas, pela companhia e por guiar os meus primeiros passos dentro do laboratório.

À Larissa Miranda, bolsista de iniciação científica, pessoa especial sempre disponível para ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me ensinar a transmitir o pouco do meu conhecimento.

À amiga Laís Alcântara Pires, pela amizade sincera, pelas boas risadas, conselhos e motivação. Por está ao meu lado em todos os momentos não importando a distância.

À todos os meus amigos da turma de especialização no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Centrinho USP Bauru, Camila Camarinha, Débora Amgarten, Mariana Monteiro, Paula Pessôa, Rander Macedo, Gabriela Natalício e Vítor Garcia, pelo exemplo de união, pelos momentos prazerosos de aprendizado, de reflexão e de crescimento. Por partilharem dúvidas, dificuldades, alegrias e, sobretudo sonhos. Obrigada por mesmo de longe me incentivarem tanto e por tornarem os meus dias mais leves. Guardarei para sempre os momentos vividos!

Ao inesquecível “G8”: Ana Clara Soares, Cecília Schiefler, Brunna Moreira, Emanuelle Vieira, Luciana Jacome, Lucila Sarmiento e Sofia Mariz, um dos maiores presentes que a Graduação em Odontologia me deixou. Por torcerem tanto pelo meu sucesso, vibrarem com as minhas conquistas e por entender minhas visitas cada vez menos frequentes. É muito bom permanecer ligada a vocês, mesmo que a quilômetros de distância, compartilhando as alegrias, anseios, dúvidas e conquistas. Vocês estão em meu coração!

À todos os pacientes que atendi ou acompanhei durante essa jornada, em especial aos que doaram os dentes utilizados nessa pesquisa. A estas pessoas que não fazem idéia do quanto nos ensinam a cada dia com suas histórias, suas vidas, seus corações. É muito bom fazer algo por eles, mas o que eles fazem por nós é ainda melhor.

Aos animais utilizados nessa pesquisa, por cederem o bem mais precioso para que isto se tornasse concreto, a vida.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques. Agradeço por ter me acolhido e ter sido minha segunda casa durante esses três anos e meio, me proporcionando enriquecimento pessoal, profissional e agora um título que eu não imaginava um dia conseguir.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro via auxílio pesquisa (400157/2013-8).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro via bolsa de doutorado (2014/ 14472-4).

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa história e contribuíram para concretização deste sonho.

Muito obrigada!

“ Dificilmente esquecemos um período da vida que exigiu de nós um grande sacrifício. Aquilo, na verdade, passou. Mas nada restou? Coragem, alegrai-vos! Ficou para vós o santo e puro merecimento. O sacrifício passou, mas os merecimentos estão lá, belos, resplendentes, gloriosos, diante do olhar de Jesus, para serem transformados, um dia, numa coroa de pedras preciosas. Diga-se o mesmo de cada sacrifício grande ou pequeno que se suporta, todos os dias, a cada hora e minuto.”

Madre Clélia Merloni

RESUMO

Não está claro na literatura que as células do ligamento periodontal (PDL), caracterizadas como células mesenquimais indiferenciadas (MSC), correspondem as mesmas populações celulares identificadas como pericitos. Além disso, não existem evidências a respeito da distribuição destas células nos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela doença periodontal inflamatória crônica (DPIC). Sendo assim, este estudo teve como objetivos: 1) isolar e caracterizar fenotipicamente populações de pericitos provenientes do PDL de humanos e 2) avaliar a distribuição dos pericitos/MSC nos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela DPIC. Para isso, populações de pericitos (células CD146⁺) foram purificadas a partir de três populações celulares do PDL e as porções positivas e negativas foram caracterizadas quanto: 1) fenótipo mesenquimal indiferenciado (expressão dos marcadores CD105, CD166, STRO-1 e OCT-4) e fenótipo endotelial/hematopoiético (expressão dos marcadores CD34 e CD45) pela citometria de fluxo, 2) expressão do OCT4/POU5F1 pela imunocitoquímica e 3) potencial para diferenciação em fenótipo osteoblástico (ensaio de mineralização pelo vermelho de alizarina e expressão dos genes para *RUNX-2*, *ALP* e *OCN* pelo PCRq) e adipogênico (coloração do oil red O e expressão dos genes para *PPARγ2* e *LPL*). Para determinar o padrão de distribuição das células CD146⁺, CD166⁺, STRO-1⁺ nos tecidos periodontais, foi utilizado um modelo *in vivo* de indução experimental de DPIC, inserindo ligaduras de algodão subgingivalmente, no 1º molar inferior de 20 ratos *Wistar* machos. O molar contralateral serviu de controle (saudável). Após os períodos de 3 e 14 dias, os animais foram sacrificados, suas mandíbulas foram processadas e cortes histológicos foram analisados por histometria e imunohistoquímica. A análise de citometria de fluxo confirmou a eficiência da separação magnética com 95,14% (\pm 2,46%) das células expressando o marcador CD146. Mais de 90% das células PDL-CD146⁺ co-expressaram os marcadores CD105 e CD166. Somente uma das populações PDL-CD146⁺ não expressou o marcador CD166, contudo foi a única a expressar o STRO-1 e o fator de transcrição OCT4/POU5F1. Todas populações celulares PDL-CD146⁺ apresentaram potencial de diferenciação osteoblástica/cementoblástica com aumento significativo da expressão de *RUNX2*, *ALP* e *OCN* ($p < 0,05$), o que não ocorreu nas populações celulares PDL-CD146⁻. Quando submetidas à diferenciação adipogênica, somente a população PDL-CD146⁺ CD105⁺ CD166⁻ STRO1⁺ OCT4⁺ foi capaz de diferenciar-se em células semelhantes a adipócitos, mostrando aumento significativo na expressão de genes específicos (*LPL* e *PPARγ2*) ($p <$

0,05). Avaliando o padrão de distribuição das células CD146⁺, CD166⁺ e STRO-1⁺, observa-se que elas apresentam-se distribuídas na região do ligamento e tecido conjuntivo, próximas ao cimento radicular e tecido ósseo. Também foram visualizadas na parede dos vasos sanguíneos e aglomeradas próximas a eles, dando indícios de que estes possam ser seus nichos. Os achados deste estudo mostraram que somente as células que expressam concomitantemente os antígenos de superfície CD146 e STRO-1 e o fator de transcrição OCT4/POU5F1 são capazes de diferenciarem-se em osteoblastos e adipócitos. As células PDL-CD146⁻ não possuem a característica de multipotencialidade. Células imunomarcadas para os antígenos CD146, CD166 e STRO-1 encontram-se distribuídas no PDL e no espaço perivascular dos dentes com saúde e doença periodontal.

Palavras-chave: Células-Tronco. Ligamento Periodontal. Pericitos.

ABSTRACT

It is not clear in literature that the periodontal ligament cells (PDL), characterized as mesenchymal stem cells (MSC), correspond to the same cell populations identified as pericytes. Moreover, there is no evidence regarding to these cell distribution in healthy periodontal tissues and in tissues damaged by chronic inflammatory periodontal disease (DPIC). In this way, the aims of the present study were: 1) to isolate and to characterize phenotypically populations of pericytes from human periodontal ligament, and 2) to evaluate the distribution of pericytes/MSC in healthy periodontal tissues and in tissues damaged by DPIC. For this purpose, populations of pericytes (CD146⁺ cells) were purified as from three cell populations of PDL and the positive and negative portions were characterized about: 1) undifferentiated mesenchymal phenotype (expression of markers CD105, CD166, STRO-1, and OCT-4), and about endothelial/hematopoietic phenotype (expression of markers CD34 and CD45) using flow cytometry, 2) expression of OCT4/POU5F1 by immunocytochemistry, and 3) potential to differentiate into osteoblastic phenotype (mineralization assays by Alizarin Red and gene expression of *RUNX2*, *ALP*, and *OCN* by PCRq technique) and adipogenic phenotype (Oil Red O assay and gene expression of *PPAR γ 2* and *LPL*). In order to determine the distribution pattern of cells CD146⁺, CD166⁺, and STRO-1⁺ on periodontal tissues, it was used an *in vivo* model of DPIC experimental induction, placing subgingival cotton ligatures on first lower molar of 20 male Wistar rats. The contralateral molar was used as control (healthy). After 3 and 14 days, animals were sacrificed, its jaws were processed and histological sections were analyzed by histometry and immunohistochemistry. Flow cytometry analysis confirmed the efficiency of magnetic separation with 95.14% (\pm 2.46%) of cells expressing CD146 marker. More than 90% of the PDL-CD146⁺ cells co-expressed markers CD105 and CD166. Only one of the populations PDL-CD146⁺ did not express CD166 marker, nevertheless it was the only population to express STRO-1 marker and the transcriptional factor OCT-4/POU5F1. All PDL-CD146⁺ cell populations exhibited potential of osteoblastic/cementoblastic differentiation with a significant increase on expression of *RUNX2*, *ALP*, and *OCN* ($p < 0.05$), which did not occur in PDL-CD146⁻ cell populations. When undergoing to adipogenic differentiation, only population PDL-CD146⁺ CD105⁺ CD166⁺ STRO1⁺ OCT4⁺ was able to differentiate into adipocyte-like cells, showing a significant increase in the expression of specific genes (*LPL* e *PPAR γ 2*) ($p < 0.05$). Evaluating the pattern of distribution of cells CD146⁺, CD166⁺, and STRO-1⁺, it is observed

that these cells are distributed in the region of ligament and connective tissue, next to cementum and bone tissue. It was also seen on the wall of blood vessels and agglomerates close to it, evidencing that these may be its niches. These findings demonstrate that only cells that express concomitantly the surfaces antigens CD146 and STRO-1 and the transcriptional factor OCT-4/POU5F are able to differentiate into osteoblasts and adipocytes. The PDL-CD146⁺ cells do not have the characteristic of multipotentiality. Immunostained cells to antigens CD146, CD166, and STRO-1 are distributed in PDL and in perivascular space of healthy teeth and teeth with periodontal disease.

Key Words: Stem Cells. Periodontal Ligament. Pericytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALCAM (CD166)	– Molécula de Adesão Celular Ativada por Leucócito (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)
ALP	– Fosfatase Alcalina (Alkaline Phosphatase)
AR-S	– Coloração por Vermelho de Alizarina (Alizarin Red Staining)
BSA	– Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
DPIC	– Doença Periodontal Inflamatória Crônica
FBS	– Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)
GAPDH	– Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)
LPL	– Lipoproteína lipase (Lipoprotein Lipase)
MCAM (CD146)	– Molécula de Adesão de Células de Melanoma (Melanoma cell adhesion molecule)
MSC	– Células Mesenquimais Indiferenciadas (Mesenchymal Stem Cells)
OCT-4	– Proteína Octamérica (Octameric protein – 4)
OCN	– Osteocalcina (Osteocalcin)
OM	– Meio osteogênico (meio de cultura padrão suplementado com 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato e 10 ⁻⁵ M de dexametasona)
PBS	– Solução Fosfato Salina (Phosphate Buffered- Saline)
PCRq	– Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real Quantitativa (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction)
PDL	– Ligamento Periodontal
RUNX2	– Fator de Transcrição Relacionado a Runt- 2 (Runt-Related Transcriptor Factor -2)
STRO-1	– Antígeno-1 Precursor do Estroma (Stromal Precursor Antigen-1)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO	68
Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas em Humanos	68
Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas em Animais	69

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que se caracteriza pela perda progressiva dos tecidos periodontais de suporte e consequente esfoliação do dente, quando não tratada (Loe et al., 1986, Seo et al., 2004, Chen et al., 2016). Considerada uma das doenças infecciosas mais prevalentes e a principal causa de perda dentária (Hugoson and Jordan, 1982, Seo et al., 2004, Chen et al., 2010, Chen et al., 2016), a doença periodontal é uma grande preocupação para pacientes e cirurgiões dentistas do sistema público e privado de saúde (Chen et al., 2012).

Diversas modalidades terapêuticas têm sido utilizadas visando à regeneração dos tecidos periodontais perdidos com a progressão da doença. Dentre elas pode-se destacar as técnicas de enxertos ósseos de diferentes origens, moléculas bioativas (como fatores de crescimento e proteínas derivadas da matriz do esmalte) e a regeneração tecidual guiada (GTR) (Karring et al., 1985, Pontoriero et al., 1987, Jepsen et al., 2002, Esposito et al., 2005, Needleman et al., 2005, Chitsazi et al., 2007, Sculean et al., 2008, Queiroz et al., 2015, Troiano et al., 2016). Todavia, esses procedimentos, quer sejam isolados ou em combinação, apresentam limitação em alcançar uma regeneração completa e previsível, especialmente em defeitos periodontais avançados (Chen et al., 2016, Santamaria et al., 2016).

Sabe-se hoje que o sucesso da terapia regenerativa depende da migração e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas (MSC) remanescentes na área do defeito, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e pela síntese de componentes da matriz tecidual (Bartold et al., 2006). Recentemente, estudos mostraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes e decíduos abriga populações celulares com características MSC, as quais expressam marcadores de superfície específicos tais como, CD105 (Endoglin), CD166 (ALCAM), CD73 e STRO1. Em condições apropriadas de cultura, essas células têm se mostrado capazes de diferenciarem-se em um fenótipo osteoblástico/cementoblástico, adipogênico e condrogênico (Seo et al., 2004, Nagatomo et al., 2006, Gay et al., 2007, Silverio et al., 2010, Kim et al., 2012), além de apresentarem, *in vivo*, formação ectópica de uma estrutura tecidual semelhante ao cimento dental e ligamento periodontal (Seo et al., 2004). Entretanto, até o momento, não existem evidências concretas a respeito da distribuição natural destas células nos tecidos periodontais. Alguns estudos sugerem que as MSC estariam localizadas na região perivascular dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, uma vez que expressam, *in vitro* (Seo et al., 2004, Gay et al., 2007) e *in situ* (Iwasaki et al., 2013), marcadores específicos para pericitos

(ex.CD146/MUC18/MCAM), os quais são definidos como pequenas células alojadas na região periférica vascular e que apresentam a capacidade de migrar e proliferar em caso de danos teciduais (Doherty et al., 1998, Farrington-Rock et al., 2004, Iwasaki et al., 2013). Contudo, a caracterização *in vitro* das MSC é realizada considerando a expressão de um conjunto de marcadores de superfície. Desta maneira, parece plausível a necessidade de empregar outros marcadores de fenótipo mesenquimal indiferenciado e avaliar a co-expressão destes marcadores com um marcador específico para pericito, a fim de se definir a real distribuição das MSC nos tecidos periodontais.

Além de conhecer o nicho natural das MSC no ligamento periodontal é de grande importância elucidar o impacto da doença periodontal inflamatória crônica (DPIC) sobre as propriedades biológicas destas células, tendo em vista que a regeneração dos tecidos periodontais depende da presença de MSC viáveis e proliferativas no interior dos tecidos remanescentes. Na área médica, estudos tem mostrado uma influência direta do processo inflamatório crônico sobre as propriedades biológicas das células-tronco. Em pacientes portadores de doença coronariana crônica (angina estável) tem sido observada uma maior mobilização de células progenitoras do tipo CD34⁺ (células-tronco hematopoiéticas) comparado aos pacientes saudáveis (Gaspardone et al., 2006). Na presença de um processo inflamatório crônico cerebral induzido em modelo animal através da injeção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e interferon- γ), Pluchino et al. (2008) mostraram haver um comprometimento significativo da migração, proliferação e da plasticidade das células-tronco da zona subventricular. Wei et al. (2016) mostraram em cultura de células da medula óssea de ratos, que a capacidade de sobrevivência e a migração das MSC foi significativamente inibida pelo TNF- α .

Avaliando o potencial regenerativo de células mesenquimais indiferenciadas isoladas de polpa dental inflamada, Alongi et al. (2010) observaram que o processo inflamatório pulpar comprometeu a capacidade de divisão celular, de diferenciação e o potencial para formação de matriz mineralizada *in vitro*. Park et al. (2011) isolaram e caracterizaram MSC de PDL, saudável e inflamado, e observaram uma menor formação de nódulos minerais e uma maior capacidade migratória das células do PDL inflamado. Diante disso, se faz necessário uma melhor elucidação a respeito da localização das MSC nos tecidos periodontais saudáveis e do impacto do processo inflamatório periodontal crônico sobre a mobilização destas células.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo utilizar modelos *in vitro* e *in vivo* para identificar pericitos no ligamento periodontal e caracterizá-los como sendo ou não, MSC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Periodontite e regeneração periodontal

Qualquer doença hereditária ou adquirida dos tecidos que envolvem e suportam os dentes (periodonto) pode ser definida como uma doença periodontal. Estas doenças podem ser de origem do desenvolvimento, inflamatória, traumática, neoplásica ou genética (Armitage, 2004). No entanto, o termo “doença periodontal” geralmente refere-se às desordens inflamatórias mais comuns, gengivite e periodontite, que são causadas por biofilme bacteriano (Armitage, 2004, Pihlstrom et al., 2005). Gengivite, a forma mais branda da doença periodontal, é uma inflamação gengival sem perda dos tecidos de inserção, facilmente reversível com uma boa higiene oral (Pihlstrom et al., 2005). Já a periodontite, causa destruição progressiva e alterações patológicas nos tecidos periodontais de suporte, podendo levar a perda dentária quando não tratada (Loe et al., 1986, Seo et al., 2004, Chen et al., 2016). Considerada uma doença altamente prevalente, é a principal causa de perda dentária em adultos (Hugoson and Jordan, 1982, Seo et al., 2004, Chen et al., 2010, Chen et al., 2016) e uma grande preocupação para o sistema público de saúde odontológica (Seo et al., 2004, Chen et al., 2012).

Controlar a inflamação induzida pelas bactérias periodontopatogênicas a fim de restabelecer a saúde periodontal, permitindo a preservação do dente e do sistema mastigatório como um todo, é o principal objetivo da terapia periodontal. Uma vez que o aspecto inflamatório da doença esteja controlado, a meta é a correção de defeitos anatômicos e a regeneração dos tecidos periodontais perdidos (Ivanovski, 2009). No entanto, estruturas intrínsecas do periodonto fazem da regeneração periodontal um processo extremamente complexo (Silverio et al., 2010, Hynes et al., 2012). Terapias mecânicas convencionais (não cirúrgica ou cirúrgica) falham em restaurar as estruturas de suporte perdidas com a progressão da doença (Polimeni et al., 2006), e o impacto negativo que a perda dessas estruturas causa na qualidade de vida do paciente ressalta a necessidade de condutas terapêuticas mais eficazes para esta condição (Lin et al., 2009).

Desde a década de 80, diversas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas na tentativa de promover regeneração periodontal, dentre elas pode-se destacar a utilização de enxertos ou substitutos ósseos, regeneração tecidual guiada (RTG), uso de proteínas derivadas do esmalte e fatores de crescimento (Karring et al., 1985, Pontoriero et al., 1987, Jepsen et al., 2002, Esposito et al., 2005, Needleman et al., 2005, Chitsazi et al., 2007, Sculean et al., 2008, Queiroz et al., 2015, Troiano et al., 2016). Todavia, esses procedimentos, quer sejam isolados ou em combinação, apresentam limitação em alcançar uma regeneração completa e previsível,

especialmente em defeitos periodontais avançados (Chen et al., 2016, Santamaria et al., 2016). Fatores como o padrão de higiene oral, características morfológicas dos defeitos periodontais e condições sistêmicas e comportamentais (diabetes e tabagismo) do paciente podem influenciar no sucesso da regeneração (Kornman and Robertson, 2000, Reynolds et al., 2010). Sabe-se hoje que, além de condições relacionadas ao paciente, o ponto chave para o sucesso da terapia regenerativa depende do recrutamento e proliferação de MSC remanescentes na área do defeito, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e pela síntese de componentes da matriz tecidual (Bartold et al., 2006).

Neste contexto, a aplicação da engenharia tecidual tem surgido como uma nova proposta na busca da regeneração dos tecidos periodontais, baseando-se em conceitos de biologia celular, molecular e engenharia de biomateriais, pela interação entre basicamente três elementos-chave: células, moléculas de sinalização e arcabouços, com o objetivo de aumentar a previsibilidade de obtenção de regeneração periodontal e também de ampliar as indicações dos procedimentos regenerativos (Langer and Vacanti, 1993, Bartold et al., 2000).

Células mesenquimais indiferenciadas na regeneração tecidual

As MSC são candidatas promissoras para a engenharia tecidual devido as suas características peculiares de autorrenovação ilimitada e diferenciação em diversos tipos celulares (Fischbach and Fischbach, 2004, Mo et al., 2016). Dessa forma, muitos estudos têm sido realizados para identificar, isolar e compreender os seus aspectos biológicos.

Baseando-se na sua origem, essas células podem ser classificadas em células tronco embrionárias quando isoladas nas primeiras fases da embriogênese, ou como células tronco adultas, quando isoladas de tecidos pós-natais (Kim et al., 2012, Zhang et al., 2012). Friedenstein et al. (1966, 1970) foram os primeiros a isolar a partir de medula óssea de roedores, células fibroblastóides formadoras de colônias que aderiram ao prato de cultura *in vitro*. Mais tarde, em 1991, Caplan nomeou essas células como mesenquimais indiferenciadas. Hoje sabe-se que as MSC podem ser isoladas não somente da medula óssea, mas também a partir de tecido adiposo (Zuk et al., 2002), placenta (Igura et al., 2004), cordão umbilical (Rogers and Casper, 2004), fluido amniótico (Tsai et al., 2004), músculos (Asakura et al., 2001), tendão (Salingcarnboriboon et al., 2003), pele (Toma et al., 2001), polpa dentária (Shi and Gronthos, 2003) e ligamento periodontal (Seo et al., 2004), em suma, de quase todos os tecidos pós-natais (da Silva Meirelles et al., 2006) e fetais (Crisan et al., 2008).

Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu critérios mínimos para definir MSC humanas. Dessa forma, as células precisam: 1) ser aderentes ao plástico, quando cultivadas em meio padrão em placas de cultura; 2) expressar os marcadores de superfície CD105, CD73, CD90; 3) e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14, CD79 α e HLA-DR; e 4) serem capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. Estes critérios tornaram-se base para a caracterização adicional destas células. Entretanto, o painel proposto de anticorpos não identifica exclusivamente MSC em comparação com outras células. A melhor identificação das MSC é feita através do fenótipo da superfície em conjunto com os outros critérios funcionais, de acordo com o estado atual do conhecimento (Dominici et al., 2006).

Atualmente, outros marcadores também são utilizados durante o processo de caracterização de MSC. O CD166, também conhecido como Molécula de Adesão Celular Ativada por Leucócito (ALCAM), é uma proteína transmembrana e um membro da superfamília das imunoglobulinas (van Kempen et al., 2001, Sun et al., 2015). Foi inicialmente identificado como ligante para para CD6, um receptor da superfície celular de linfócitos T (Bowen et al., 1995). Além de mediar ligações heterofílicas (ALCAM-CD6) medeia também ligações homofílicas (ALCAM-ALCAM) (van Kempen et al., 2001). É expresso em células hematopoiéticas, endoteliais, neurais (Arai et al., 2002) e vem sendo descrito como um importante marcador presente nas linhagens de células mesenquimais indiferenciadas (Silverio et al., 2010, Trubiani et al., 2010, Saito et al., 2014).

O Antígeno-1 Precursor do Estroma (STRO-1) é um antígeno de superfície celular expresso em cerca 10 a 20% dos elementos presentes no estroma de medula óssea humana, o que inclui unidades formadores de colônias e eritrócitos, mas não é expresso em células progenitores hematopoiéticas (Psaltis et al., 2010). Considerado um marcador de células precursoras mesenquimais por ter sido ligado à clonogenicidade e plasticidade dessas células (Gronthos et al., 1994, Dennis et al., 2002, Stewart et al., 2003), tem sido amplamente utilizado na identificação de MSC, estando relacionado com a diferenciação osteogênica e adipogênica (Fujii et al., 2008, El-Sayed et al., 2015).

Em uma revisão sistemática com 29 estudos sobre marcadores de superfície de MSC, Mafi et al. (2011) observou que o marcador mais reportado como positivo nas MSC foi o CD105, seguido dos marcadores CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54 e CD166. Já o marcador mais frequentemente reportado como negativo nas MSC foi o CD34, seguido dos marcadores CD14, CD45, CD11b, CD49d, CD106, CD10 e CD31. A literatura relata ainda que a expressão dos fatores de transcrição OCT-4, SOX-2 e NANOG,

conferem à estas células as propriedades de auto-renovação e pluripotência (Huang et al., 2009, Matic et al., 2016).

Esta diversidade de descrição dos marcadores de MSC demonstra que, na realidade, as MSC compreendem uma população de células heterogênea e em diferentes estágios de comprometimento com determinadas linhagens celulares (Stewart et al., 2003, Rada et al., 2011, Wang et al., 2011). Afim de identificar grupos menos heterogêneos de células, muito tem sido pesquisado na tentativa de obter-se culturas altamente enriquecidas para um marcador específico, utilizando técnicas de clonagem ou seleção positiva através de anticorpos específicos (Singhatanadgit et al., 2009). Dessa forma, investigações mais minuciosas nestas populações de MSC têm permitido a identificação de marcadores celulares que possibilitam selecionar células com maior potencial para diferenciação condroblástica e osteoblástica (Gronthos et al., 1994, Satomura et al., 2000, Stewart et al., 2003, Arufe et al., 2010, Rada et al., 2011), o que poderia aperfeiçoar os procedimentos de engenharia tecidual pela seleção de células com maior potencial para diferenciação nas linhagens celulares relacionados aos tecidos que se deseja regenerar.

Apesar de terem sido identificadas e serem estudadas há tantos anos, até o momento não existem evidências concretas a respeito do nicho natural das MSC nos diferentes órgãos/tecidos. Alguns estudos sugerem que elas estariam localizadas na região perivascular dos vasos sanguíneos apresentando características semelhantes a pericitos, uma hipótese que poderia explicar por que MSC podem ser isoladas de todos os órgãos vascularizados (Shi and Gronthos, 2003, Crisan et al., 2008, Murray et al., 2014, Chen et al., 2015).

Pericitos

Pericitos (células Rouget ou células murais) são células perivascularares que envolvem as células endoteliais em capilares e micro vasos (*peri*: em torno de, *cyte*: célula) (Gokcinar-Yagci et al., 2015). Foram descritas pela primeira vez por Charles Marie Benjamin Rouget como “células adventícias não pigmentadas” ou “células ramificadas com processos protoplasmáticos”. Seu nome foi dado a estas células até 1923, quando Zimmermann renomeou-as como pericitos (Ashton and de Oliveira, 1966).

Até hoje é um desafio isolar e caracterizar os pericitos já que um marcador geral ainda não foi definido. Os marcadores mais comumente utilizados para identifica-los são CD146, PDGFR- β (receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas) também conhecido como CD140b, RGS-5 (regulador da proteína G de sinalização), α -SMA (Alpha-smooth

muscle actin) e NG2 (neural/glial antigen 2) (Crisan et al., 2012, Wanjare et al., 2013, Chen et al., 2015, Gokcinar-Yagci et al., 2015).

Membro da superfamília das imunoglobulinas, o CD146, também conhecido como Mel-CAM, MUC18, antígeno A32 e S-Endo-1, é uma glicoproteína de membrana que funciona como uma molécula de adesão celular independente de Ca^{+2} envolvida em interações heterofílicas célula-célula (Shih, 1999, Mo et al., 2016). É um marcador perivascular expresso no endotélio vascular, nas células musculares lisas e por todos os pericitos, dessa forma pode ser utilizado para isolar os pericitos de suspensões de células heterogêneas obtidos a partir de tecidos humanos (Gokcinar-Yagci et al., 2015).

Crisan et al. (2008) isolaram pericitos de uma variedade de tecidos adultos incluindo, medula óssea, placenta, pâncreas e pulmão, utilizando os marcadores CD146 e NG2, e observaram que essas células possuíam capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Adicionalmente, essas células foram marcadas negativamente para os antígenos de superfície específicos para células endoteliais (CD34, CD144 e CD31) e hematopoiéticas (CD45), mostrando então, que os pericitos podem ser uma das populações de MSC residentes nos tecidos adultos.

Recentemente, estudos mostraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes e decíduos abrigam populações celulares com características de MSC, as quais expressam marcadores de superfície específicos tais como, CD105 (Endoglin), CD166 (ALCAM), CD73 e STRO1 (Seo et al., 2004, Nagatomo et al., 2006, Gay et al., 2007, Silverio et al., 2010), além de expressarem o gene para o Oct-4 (Oct-3, POU5f1), um fator de transcrição importante para a manutenção da pluripotencialidade e do estado celular indiferenciado (Kawanabe et al., 2006, Kellner and Kikyō, 2010, Silverio et al., 2010). Em condições apropriadas de cultura, essas células têm se mostrado capazes de diferenciarem-se em um fenótipo osteoblástico/cementoblástico, adipogênico e condrogênico (Seo et al., 2004, Nagatomo et al., 2006, Gay et al., 2007, Silverio et al., 2010, Kim et al., 2012), além de apresentarem *in vivo* formação ectópica de uma estrutura tecidual semelhante ao cimento dental e ligamento periodontal (Seo et al., 2004). Tendo em vista que a caracterização *in vitro* das MSC é realizada considerando a expressão de um conjunto de marcadores de superfície, parece plausível a necessidade de empregar marcadores de fenótipo mesenquimal indiferenciado e avaliar a co-expressão destes marcadores com um marcador específico para pericito, a fim de definir se os pericitos e as MSC residentes nos tecidos periodontais são a mesma população.

Em cultura primária de células do ligamento periodontal de humanos, Iwasaki et al. (2013) verificaram através da análise de citometria de fluxo que, a partir de populações caracterizadas como sendo 100% positivas para CD166, CD73 e CD90, cerca de 31 a 63% das células eram positivas para os marcadores CD146 e NG₂. Porém, na literatura não há trabalhos que avaliaram se culturas purificadas de pericitos residentes no ligamento periodontal dos dentes permanentes possuem características de MSC.

Utilizando amostras de tecido da medula espinhal de humanos, Chin et al. (2013) verificaram, pela técnica da imunohistoquímica, que as células identificadas como sendo de origem mesenquimal (células CD105⁺, CD90⁺ e CD73⁺) apresentavam co-localização positiva com o marcador específico para pericito (CD146), e negativa com o marcador de célula endotelial (CD31). Essa co-localização foi evidente também, em amostras de tecido que sofreram alguma lesão, desencadeando um processo inflamatório crônico. Nessas amostras, os autores observaram um aumento do número de células CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺ e CD146⁺ na região perivascular e nas áreas de injúria tecidual, sugerindo então, que essa população de MSC identificadas como pericitos migram em direção a área lesionada da medula espinhal na tentativa de promover o reparo local.

Nos tecidos periodontais, somente um estudo realizado por Chen et al. (2006) identificou através de imunohistoquímica a presença de uma população celular CD146⁺ e outra, STRO-1⁺ na região perivascular do ligamento periodontal, e um aumento na proporção destas células, tanto nessa região, como próximo ao cemento radicular de dentes extraídos devido à doença periodontal, sugerindo o envolvimento destas populações no processo de reparo tecidual. No entanto, tendo como base o resultado deste estudo, não é possível definir se as células CD146⁺ e STRO-1⁺ correspondem a populações celulares distintas ou se as MSC do ligamento periodontal correspondem aos pericitos, conforme observado por Chin et al. (2013), sendo necessário dessa forma, avaliar a co-expressão destes marcadores.

Processo inflamatório e seu efeito sobre as células mesenquimais indiferenciadas

Para alcançar os resultados clínicos desejados para qualquer estratégia regeneradora se faz necessário uma melhor compreensão do comportamento das MSC frente ao estímulo inflamatório e dos mecanismos que impulsionam o recrutamento e migração destas células para os tecidos alvo.

As células do ligamento periodontal respondem ao estímulo bacteriano produzindo citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) no local da inflamação (Han et al., 2016). A indução desses mediadores

primários, estimula a produção de mediadores secundários, incluindo quimiocinas, que atuam como citocinas quimiotáticas, e ciclo-oxigenases que produzem prostaglandinas. Isto conduz à amplificação da resposta inflamatória, indução das enzimas que degradam o tecido conjuntivo, e a reabsorção óssea osteoclástica (Graves and Cochran, 2003). A literatura mostra que a exposição a um ambiente assim, enriquecido por endotoxinas, pode afetar o potencial de diferenciação (Gilbert et al., 2000, Murphy et al., 2002, Lin et al., 2016) e migração das MSC (Pluchino et al., 2008, Tomchuck et al., 2008, Park et al., 2011, Wei et al., 2016).

Na área médica, estudos tem mostrado uma influência direta do processo inflamatório crônico sobre as propriedades biológicas das células-tronco. Em pacientes portadores de doença coronariana crônica (angina estável) tem sido observada uma maior mobilização de células progenitoras do tipo CD34⁺ (células-tronco hematopoiéticas) comparado aos pacientes saudáveis (Gaspardone et al., 2006). Na presença de um processo inflamatório crônico cerebral induzido em modelo animal através da injeção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e interferon- γ), Pluchino et al. (2008) mostraram haver um comprometimento significativo da migração, proliferação e da plasticidade das células-tronco da zona subventricular. Wei et al. (2016) mostraram em cultura de células da medula óssea de ratos, que a capacidade de sobrevivência e a migração das MSC foi significativamente inibida pelo TNF- α .

A fim de identificar as consequências genômicas e a resposta migratória do estímulo aos receptores Toll-like em MSC derivadas da medula óssea de adultos, Tomchuck et al. (2008) tratou esses receptores com vários ligantes e observou, através de análise de “*microarray*”, que o tratamento com lipopolissacarídeos (LPS) causou um aumento da expressão de diversos cDNAs, incluindo CXCL10 (IP10), interleucinas IL-6 e IL-8, IFN1- β (Interferon 1 beta) e NF-kB (factor nuclear kappa B). Mostrou que, em geral, o padrão de secreção das células tratadas com LPS parecem favorecer mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucinas IL-1 β e IL-6; e fator de necrose tumoral (TNF- α). E observou um aumento na resposta migratória das células quando tratadas com LPS.

Avaliando o potencial regenerativo de células mesenquimais indiferenciadas isoladas de polpa dental inflamada, Alongi et al. (2010) observaram que o processo inflamatório pulpar comprometeu a capacidade de divisão celular, de diferenciação e o potencial para formação de matriz mineralizada *in vitro*. Park et al. (2011) isolaram e caracterizaram MSC de PDL, saudável e inflamado, e observaram uma menor formação de nódulos minerais e uma maior capacidade migratória das células do PDL inflamado. Diante desses achados, se faz necessário uma melhor elucidação a respeito da localização das MSC nos tecidos periodontais

saudáveis e do impacto do processo inflamatório periodontal crônico sobre a mobilização destas células.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar fenotipicamente as populações de pericitos provenientes do ligamento periodontal de humanos; e posteriormente, avaliar sua distribuição nos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela doença periodontal inflamatória crônica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Objetivo #1: Isolar e caracterizar fenotipicamente as populações de pericitos provenientes do ligamento periodontal de humanos.

4.1 Obtenção das culturas primárias de células do ligamento periodontal de humanos

Inicialmente, foram selecionados 3 indivíduos adultos, com idade entre 19 e 23 anos, sistemicamente saudáveis, que não estavam grávidas, não-fumantes, sem história de medicação sistêmica nos últimos seis meses, e com indicação de extração de seus terceiros molares inclusos (superiores e inferiores). Todos os voluntários selecionados estavam em tratamento nas clínicas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e receberam todas as orientações referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do CNS. Para a obtenção da cultura primária de células do ligamento periodontal foi adotado o protocolo descrito por Silvério et al. (2010). Imediatamente após a extração, os dentes foram colocados em meio de biópsia composto por Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 250 µg/ml de sulfato de gentamicina, 5 µg/ml de anfotericina B, 100 µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). Em seguida, o ligamento periodontal do terço médio foi removido cuidadosamente com uma cureta, e então, digeridos em uma solução de colagenase/dispase (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA), por 1 hora a 37°C. Logo após, a suspensão de células do ligamento periodontal foi obtida passando as células através de um “cells trainer” de 100µm de diâmetro (BD - Labware). Então, essa suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos e o pellet celular obtido foi semeado em meio de cultura padrão composto por DMEM suplementado com 10% de FBS, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina até alcançarem subconfluência. Este e os demais cultivos citados neste trabalho foram realizados em uma incubadora (Sanyo MCO -18IAC, Moriguchi City, Osaka, Japão) a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂ e 98% de umidade.

4.2 Isolamento de células CD146⁺ (pericitos) e CD146⁻ a partir do ligamento periodontal de humanos

4.2.1 Separação magnética

Depois de alcançada a subconfluência (70-80% de confluência), as populações heterogêneas de células do ligamento periodontal foram purificadas para o antígeno de superfície CD146, utilizando a técnica de separação magnética (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. As células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a concentração foi ajustada para 1×10^7 células/ml. Brevemente, as células foram ressuspensas em 80µl de uma solução tampão composta por solução fosfato salino (PBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) suplementada com 0,5% de FBS e incubadas com 20µl do *microbead* CD146 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) por 15 minutos a uma temperatura de 6°C a 12°C. Então, foram lavadas duas vezes, ressuspensas em 500µl da solução tampão e aplicadas a uma coluna do tipo MS acoplada a um separador magnético (*MACS separator*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). As células que passaram diretamente pela coluna constituíam a fração CD146 negativa, enquanto que, as células que permaneceram retidas no interior da coluna, constituíam a população marcada positivamente para o antígeno CD146. A coluna magnética foi lavada três vezes com solução de tampão, as células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram coletadas e a sua proporção em relação ao número inicial de células foi determinada, utilizando um hemocitômetro. Em seguida, essas células foram expandidas em meio de cultura padrão e, após alcançarem subconfluência, foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, utilizando-se como meio de congelamento o *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium* (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). Somente as células entre a segunda e sexta passagem foram utilizadas, e os experimentos foram realizados simultaneamente para ambos grupos com as células dentro da mesma passagem.

4.3 Caracterização das populações de células PDL-CD146⁺ (pericitos) e PDL-CD146⁻ provenientes do ligamento periodontal de humanos

4.3.1 Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada tendo como objetivos, confirmar a eficácia da técnica de separação magnética na purificação de populações celulares positivas para o antígeno de superfície CD146 e caracterizar as populações celulares quanto à expressão de antígenos de superfície específicos para células mesenquimais indiferenciadas e

células endoteliais/hematopoiéticas. Para este ensaio, as células do ligamento periodontal identificadas como PDL-CD146⁺ (pericitos) e PDL-CD146⁻ foram semeadas em placas para cultura celular (100x20mm) e incubadas até alcançarem cerca de 80% de confluência. Então, foram lavadas com PBS e, em cada prato foi adicionada a solução de dissociação (TrypLE™ Select, Gibco). Em seguida, foi adicionado PBS gelado nas placas e todo o conteúdo centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram contadas e distribuídas nos tubos específicos para citometria de fluxo a uma concentração de 1×10^6 células/tubo. Então, foi adicionada a solução de bloqueio de Dunkey a 10% (Sigma-Aldrich, Milão, Itália) e as células foram incubadas por 40 minutos a 4^oC. Após esse período, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados mouse *anti-human* para CD146-APC, STRO1-Alexa Fluor 647 (BioLegend, USA), CD166-PE, CD105-PerCp 5.5, CD34-FITC e CD45-PerCp (BD, USA) a 4^oC por 1 horas. Como controle negativo APC, PE, FITC, PerCP e Alexa Fluor 647 conjugados a anticorpo mouse IgG1 foram utilizados como substitutos dos anticorpos primários. A seguir, as células foram submetidas à análise de citometria de fluxo (BD FACS Calibur™; BD Bioscience Pharmigen, San Jose, CA, EUA) e os resultados foram processados usando o software BD Cell Quest™ Pro (BD Bioscience Pharmigen).

4.3.2. Imunocitoquímica para Oct-4

O ensaio de imunofluorescência para OCT-4 foi realizado tendo como objetivo confirmar o fenótipo indiferenciado das populações de células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. Para tanto, as células foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 4×10^4 e mantidas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (pH 7,0) (Electron Microscopy Sciences, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Para prevenir ligação inespecífica, as células foram tratadas com Albumina Sérica Bovina a 3% (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) por 30 minutos. Em seguida foram incubadas overnight a 4^o C com o anticorpo primário monoclonal anti-OCT-4 humano (Abcam) diluídos em BSA a 1% em uma concentração de 1:1 e então, incubados com o anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 594 (Invitrogen) diluídos em BSA a 1% em uma concentração de 1:1000 por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, os núcleos foram corados com PureBlu™ Dapi (Bio-Rad) diluído em água Milli-Q em uma concentração de 1:4000 por 5 minutos. Como controle negativo da reação, as células foram tratadas da mesma maneira, porém sem incubar com o anticorpo primário, somente com BSA a 1%. A

reação foi visualizada no microscópio Apotome.2 (Zeiss) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

4.4 Avaliação *in vitro* da capacidade de diferenciação osteoblástica/cementoblásticas das populações de células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ provenientes do ligamento periodontal de humanos

4.4.1 Ensaio de vermelho de alizarina

As células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços a uma concentração de 2×10^5 células/poço e mantidas em meio de cultura padrão por 24 horas. Após 24 horas, o meio de três poços/população foi substituído pelo meio de cultura osteogênico (OM) constituído por meio de cultura padrão suplementado com 50µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, China), 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich, USA), e 10^{-5} M de dexametasona (Sigma-Aldrich, USA). Como controle negativo do experimento, outros três poços de cada população celular foram mantidos em meio de cultura padrão. Então, estas células foram cultivadas por 28 dias para permitir a formação do nódulo mineral, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Para análise qualitativa e quantitativa, a técnica de coloração por Vermelho de Alizarina (AR-S) (Sigma-Aldrich, Germany) foi utilizada. Ao final do período de 28 dias, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 30 minutos em temperatura ambiente. O etanol foi aspirado e as células lavadas com água destilada para remover o etanol remanescente. A cada poço foi adicionado 1 ml da solução AR-S (40mM, pH 4,2) em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação. As células foram então lavadas cinco vezes com água, a fim de remover a solução, e 1 ml de PBS foi adicionado a cada poço por 15 minutos sob agitação, a fim de reduzir a coloração inespecífica. A placa foi fotografada, e o procedimento de descoloração dos nódulos para a análise quantitativa foi realizado pela adição de 1 ml de uma solução de cloreto de cetilperidina (CPC) (10%, pH 7,0) (MP Biomedicals, France) por 15 minutos. Aliquotas desta solução foram transferidas para uma placa de 96 poços juntamente com uma curva padrão e a quantificação espectrofotométrica a 562nm foi realizada por comparação das amostras com a curva padrão utilizando um leitor de micro-placa (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.4.2 Expressão de genes marcadores de diferenciação osteoblástica/cementoblástica

As células das três populações PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram semeadas em duplicata em pratos para cultura (60 x 15mm) a uma densidade de 2×10^5 células/prato e cultivadas sob as mesmas condições descrita no item 4.4.1. Ao final dos períodos de 7, 14 e 21 dias, o ácido ribonucleico (RNA) total das células de cada grupo foi extraído, utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Então, as amostras de RNA foram suspensas em água MiliQ livre de RNase e armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 1µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA da amostras, utilizando-se um espectrofotômetro (Nanodrop 2000, ThermoScientific). O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (Turbo DNA-free[™], Ambion, Austin, TX, USA), e 1µg da amostra foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit First-Strand cDNA Synthesis (Roche Applied Science, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20µl.

Os “primers” para *GAPDH* (gene de referência), *RUNX2*, *ALP* e *OCN* foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar “primers” para o sistema o LightCycler[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), e a eficiência das reações para cada “primer” foi otimizada anteriormente ao início das reações de PCR em tempo real (PCRq) propriamente ditas (Tabela 1). As reações de PCRq foram realizadas com o sistema LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit “LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master” (Roche Applied Science, USA). Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o método $\Delta\Delta CT$ LightCycler[®] Relative Quantification Software (Roche Applied Science). *GAPDH* foi utilizado como o gene de referência (“housekeeping”) para a normalização dos valores.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para ampliações por PCR em tempo real

Gene	Primers (5'→3')	Amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento	Nº de Ciclos
<i>ALP</i>	Forward: CGGGCACCATGAAGGAAA	184	55°C	40
	Reverse: GGCCAGACCAAAGATAGAGTT			
<i>OCN</i>	Forward: AGCTCAATCCGGACTGT	150	55°C	40
	Reverse: GGAAGAGGAAAGAAGGGTGC			
<i>RUNX-2</i>	Forward: CCGTCCATCCACTCTACCAC	139	55°C	40
	Reverse: ATGAAATGCTTGGGAACTGC			
<i>PPARγ2</i>	Forward: GCTTATCTATGACAGATGTGATCT	153	55°C	40
	Reverse: AGCTTCTCCTTCTCGGC			
<i>LPL</i>	Forward: TGTTCTAGGGAGAAAGTGTCTCA	152	55°C	40
	Reverse: ACTTCATTCTTCACAGAATTCACAT			
<i>GAPDH</i>	Forward: ACATCATCCCTGCCTCTAC	171	55°C	40
	Reverse: CCACCTTCTTGATGTCATCATATTG			

ALP, alkaline phosphatase; *OCN*, osteocalcin; *RUNX2*, runt-related transcription factor 2; *PPAR γ 2*, peroxisoma proliferator-activated receptor gamma 2; *LPL*, lipoprotein lipase; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

4.5 Avaliação *in vitro* da capacidade de diferenciação adipogênicadas populações de células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ provenientes do ligamento periodontal de humanos.

4.5.1 Coloração com Oil Red O e expressão de genes relacionados ao fenótipo adipogênico

As populações de células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram semeadas em pratos para cultura (60 x 15mm) e cultivadas em meio de cultura padrão até alcançarem 100% de confluência. Então, foi iniciada a indução da diferenciação adipogênica, utilizando o hMSC Adipogenic Bullet Kit (Lonza, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após 25 dias de indução, foi realizada a coloração com o Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA) para a identificação dos vacúolos de lipídio e o RNA total foi extraído, utilizando o reagente TRIzol®, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as reações de PCRq foram realizadas para a quantificação dos níveis de RNAm para os seguintes genes relacionados ao fenótipo adipogênico: PPAR γ 2 e LPL (Tabela 1). As reações de PCRq seguiram o protocolo descrito no item 4.4.2.

Objetivo # 2: Avaliar a distribuição dos pericitos/células mesenquimais indiferenciadas nos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela doença periodontal inflamatória crônica.

4.6 Características da amostra

Foram utilizados 20 ratos machos (Wistar), com idade de 12 semanas, pesando entre 250 e 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB–UNICAMP) e acondicionados no biotério central da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP–UNICAMP). Antes dos procedimentos experimentais, os animais passaram por um período de 5 dias de aclimação ao ambiente de laboratório, com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Durante todo o experimento, consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*.

4.7 Indução da Doença Periodontal (DP)

A indução da doença periodontal foi realizada empregando um modelo já descrito na literatura (Sallay, 1982, Bezerra et al., 2000, Meulman et al., 2011) o qual mimetiza diversos achados da periodontite humana, incluindo biofilme bacteriano, formação de infiltrado inflamatório, perda de inserção conjuntiva e de osso alveolar (Liu et al., 2006). Para a realização de todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Anasedan[®]; Vetbrands, Paulinia, Brasil) (0,03ml/kg) e cloridrato de ketamina (Dopalen[®]; Vetbrands, Paulinia, Brasil) (1ml/kg). Após anestesia, os animais foram posicionados no aparato de Doku modificado e os maxilares mantidos abertos por meio de bandas elásticas presas aos incisivos. Os dentes foram delicadamente espaçados com auxílio de um espaçador endodôntico modificado introduzido entre o primeiro e segundo molares inferiores. Subseqüentemente, com auxílio de sonda exploradora e porta agulha, ligaduras (fio de algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, BR) foram inseridas, unilateralmente, na região subgingival do primeiro molar inferior, para indução da doença periodontal através do acúmulo de biofilme. O primeiro molar contralateral serviu de controle e não recebeu ligadura (boca dividida). Os lados teste e controle foram escolhidos aleatoriamente por intermédio de sorteio. As ligaduras foram fixadas com três nós simples posicionados na face mesial do primeiro molar inferior. Os 20 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos: 3 e 14 dias de indução da doença periodontal.

4.8 Processamento histológico

Ao final dos períodos de 3 e 14 dias de indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados com solução de xilazina e ketamina e submetidos à eutanásia por meio de perfusão transcardíaca com solução salina a 0,9% por 1min na velocidade máxima de bombeamento de 19,6 ml/min, seguido de solução fixadora (paraformaldeído a 4%, pH 7,0) por 10 minutos na velocidade de 10.0 ml/min. Após a perfusão, as mandíbulas foram removidas, hemi-seccionadas em sua sínfise e imersas em paraformaldeído a 4% (pH 7,0) por mais 24 horas. Em seguida, as hemi-mandíbulas foram imersas em PBS e a solução trocada três vezes, sendo que a última troca foi mantida por mais 24 horas. Foram então, descalcificadas em solução de EDTA a 20% (Titriplex III[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany), com trocas diárias de solução à temperatura ambiente. Após a descalcificação, os espécimes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol (Sigma-Aldrich, USA) e incluídos em parafina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Secções longitudinais mesio-distais de 6 μ m de espessura foram obtidas com auxílio de um micrótomo (Leica RM2155, Germany).

4.9 Análise histométrica

Para quantificação da área de reabsorção óssea após a indução experimental da DPIC foi realizada análise histométrica da reabsorção óssea inter-radicular na região da bifurcação dos primeiros molares mandibulares. Para isto, dez cortes equidistantes foram selecionados por dente, foram corados com Hematoxilina e Eosina e então, as imagens da região da furca foram capturadas, utilizando-se o microscópio óptico em aumento de 50X (5X de objetiva e 10X de ocular; Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Alemanha). Com o auxílio do sistema de pontos de um retículo quadriculado (Image-Pro[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), foi mensurada a área de tecido conjuntivo proveniente da reabsorção do tecido ósseo da região inter-radicular. O retículo foi constituído de quadrados de 0,08 mm de aresta e 0,0064 mm² de área. O mesmo foi posicionado de maneira a incluir dentina coronária e radicular, e o tecido ósseo, sendo computados somente os pontos que coincidissem com as intersecções das arestas dos quadrados adjacentes que se encontrassem dentro da área de tecido conjuntivo inter-radicular (Figura 01). A área de reabsorção óssea foi calculada utilizando-se a fórmula *Área reabsorvida = n^o de pontos x área do quadrado*. A reabsorção óssea inter-radicular foi expressa em mm² como a média das leituras dos dez cortes equidistantes por dente.

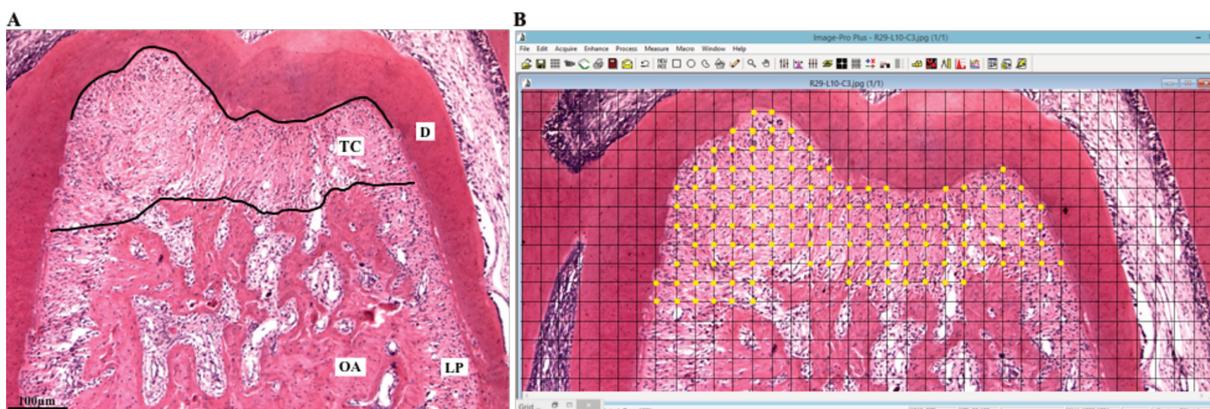


Figura 01. A- Ilustração indicando a área de mensuração da reabsorção óssea interradicular na região da bifurcação do primeiro molar inferior. B - sistema de pontos de um retículo quadriculado utilizado para mensuração. TC - tecido conjuntivo, D - dentina, OA - osso alveolar, LP - ligamento periodontal.

4.10 Ensaio de imunohistoquímica

Inicialmente, as secções foram diafanizadas em xilol e reidratadas utilizando diluições com concentração decrescente de etanol. Para restaurar os epítomos de ligação ao anticorpo foi feito recuperação antigênica com Proteinase K (Dako, USA) por 30min. Em seguida, afim de inibir a peroxidase endógena, as secções foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 30 min. Posteriormente para prevenir ligações inespecíficas, as secções foram incubadas BSA a 3% diluído em PBS-Tween (Tween 20 a 0,01% diluído em PBS) (Sigma-Aldrich, USA) por 30 minutos, sendo todos esses passo em temperatura ambiente. Logo após, as secções foram incubadas overnight a 4^oC com anticorpos primários monoclonais diluídos em BSA a 1% em uma concentração de 1:100 e então, incubados com o anticorpo secundário AdvanceTM HRP (Dako, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. A revelação foi feita utilizando o kit 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako, USA) por 5min, e as secções foram contra coradas com hematoxilina de Harris (Dinâmica®, Brasil) por 3min. Como controle negativo da reação, as secções foram tratadas da mesma maneira, porém sem incubar com o anticorpo primário, somente com BSA a 1%.

4.11 Análise estatística

As análises dos ensaios de imunofluorescências, imunohistoquímica, citometria de fluxo e formação de vacúolos de lipídios foram feitas de forma descritiva. Os dados obtidos pela análise histométria, expressão gênica e formação de nódulo mineral (ensaio de vermelho de alizarina) foram submetidos a análise estatística, utilizando o software Bioestat 5.3

(Sociedade Civil Mimirauá, Belém, PA, Brasil), sendo os valores apresentados na forma de média e desvio-padrão. As comparações intragrupos foram realizadas usando o teste ANOVA um critério, seguido pela análise múltipla pareada, utilizando o método de Tukey ($\alpha = 0,01$), enquanto que, o teste T pareado foi empregado para detectar as diferenças intergrupos ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento de células CD146⁺ pela técnica de separação magnética

A separação magnética realizada para o antígeno de superfície CD146 mostrou que, a partir de uma concentração inicial de 1×10^7 de células do PDL, a proporção de células CD146⁺ e CD146⁻, respectivamente, para cada população foi: 13,75% e 70,62% para população ALP, 17,44% e 42,61% para JAS e 21,70% e 57,91% para população NWB (Figura 2).

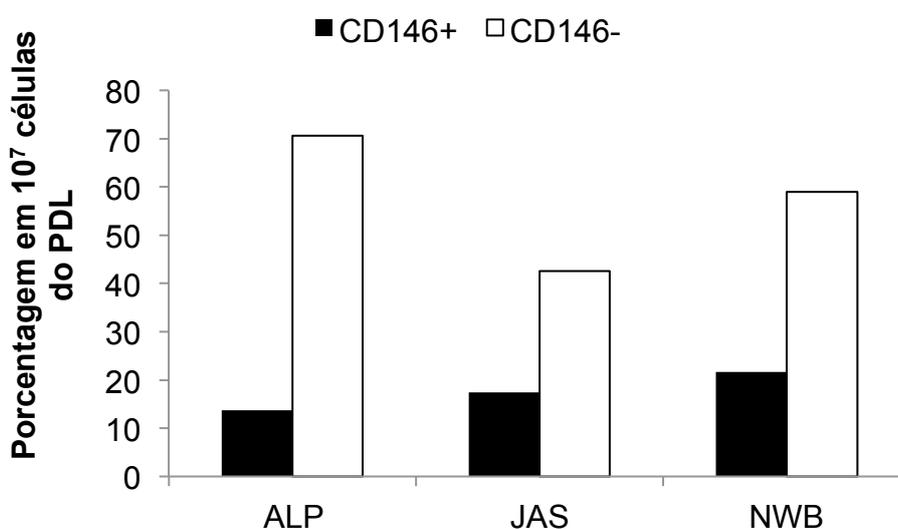


Figura 02. Separação magnética. Porcentagem de células CD146 positivas e negativas a partir de uma concentração de 10^7 células do PDL três populações celulares (ALP, JAS e NWB).

5.2 Análise de citometria de fluxo para expressão de marcadores de origem mesenquimal e endotelial/hematopoiético

A análise por citometria de fluxo mostrou que a proporção de células CD146⁺ isoladas do ligamento periodontal foi 92,4% ($\pm 2,56\%$), confirmando que o método da separação magnética foi eficaz para obtenção de populações celulares altamente purificadas para o antígeno de superfície CD146. Para melhor caracterizar as células do ligamento periodontal isoladas e identificadas como CD146⁺ e CD146⁻, ambas populações foram incubadas com outros anticorpos utilizados como marcadores endotelial/hematopoiético (CD45 e CD34) e marcadores de origem mesenquimal (CD105, CD166, STRO-1) e analisadas pelo citômetro de fluxo. Os resultados descritos na Tabela 2, representam a proporção de células CD146⁺ ou CD146⁻ positivamente marcadas com os outros anticorpos. Os dados mostraram que as células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram negativas para marcador hematopoiético, CD34, e para o

marcador endotelial, CD45 (Tabela 2). Em relação aos marcadores de origem mesenquimal, foi possível observar que as três populações estudadas (ALP, JAS e NWB) apresentaram uma variabilidade individual no padrão de expressão destes marcadores, independente de serem caracterizadas como células CD146 positivas ou negativas. O antígeno de superfície CD105 foi expresso em quase 100% (\cong 90-95%) das células PDL-CD146⁺, enquanto que as populações de células PDL-CD146⁻ apresentaram uma menor porcentagem de positividade para o CD105, variando entre 56% a 75% (Tabela 2). Em relação ao CD166 (ALCAM) somente duas populações de células PDL-CD146⁺ (JAS e NWB) expressaram esse marcador, apresentado cerca de 91% de positividade. Por outro lado, as três populações de células PDL-CD146⁻ expressaram o marcador CD166, com uma positividade variando entre 20% a 62% (Tabela 2). Quanto ao marcador STRO-1, somente a população ALP expressou esse antígeno de superfície tanto nas células PDL-CD146⁺ (0,24%) quanto nas PDL-CD146⁻ (1,93%). Vale ressaltar, que essa população celular, ALP, apresentou um perfil de expressão dos marcadores CD166 e STRO-1, distinto das outras duas populações (JAS e NWB), tanto nas células PDL-CD146⁺ como nas PDL-CD146⁻. Sendo que, para o marcador CD166, todas as células PDL-CD146⁺ foram negativas e somente, 20% das células PDL-CD146⁻ foram positivas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de citometria de fluxo dos antígenos de superfície expressos pelas células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. Resultados representam a porcentagem das células CD146 positivas e negativas que co-expressam os marcadores mesenquimais (CD105, CD166 e STRO-1) e marcadores endoteliais/hematopoiéticos (CD45 e CD34) para cada população estudada (ALP, JAS e NWB)

	Marcadores Mesenquimais			Marcadores Endoteliais / Hematopoiéticos	
	CD105+	CD166+	STRO-1+	CD34+	CD45+
ALP CD146+	90	0	0,24	0	0
JAS CD146+	95,11	91,9	0	0	0
NWB CD146+	92,11	91,3	0	0	0
ALP CD146-	75,5	20	1,93	0	0
JAS CD146-	61	62,8	0	0	0
NWB CD146-	56	51,7	0	0	0

5.3 Imunocitoquímica para expressão do fator de transcrição Oct-4

Os resultados do ensaio de imunofluorescência mostraram que, das populações de células avaliadas, somente a ALP-CD146⁺ apresentou marcação positiva para Oct-4 localizada no citoplasma.(Figura 3).

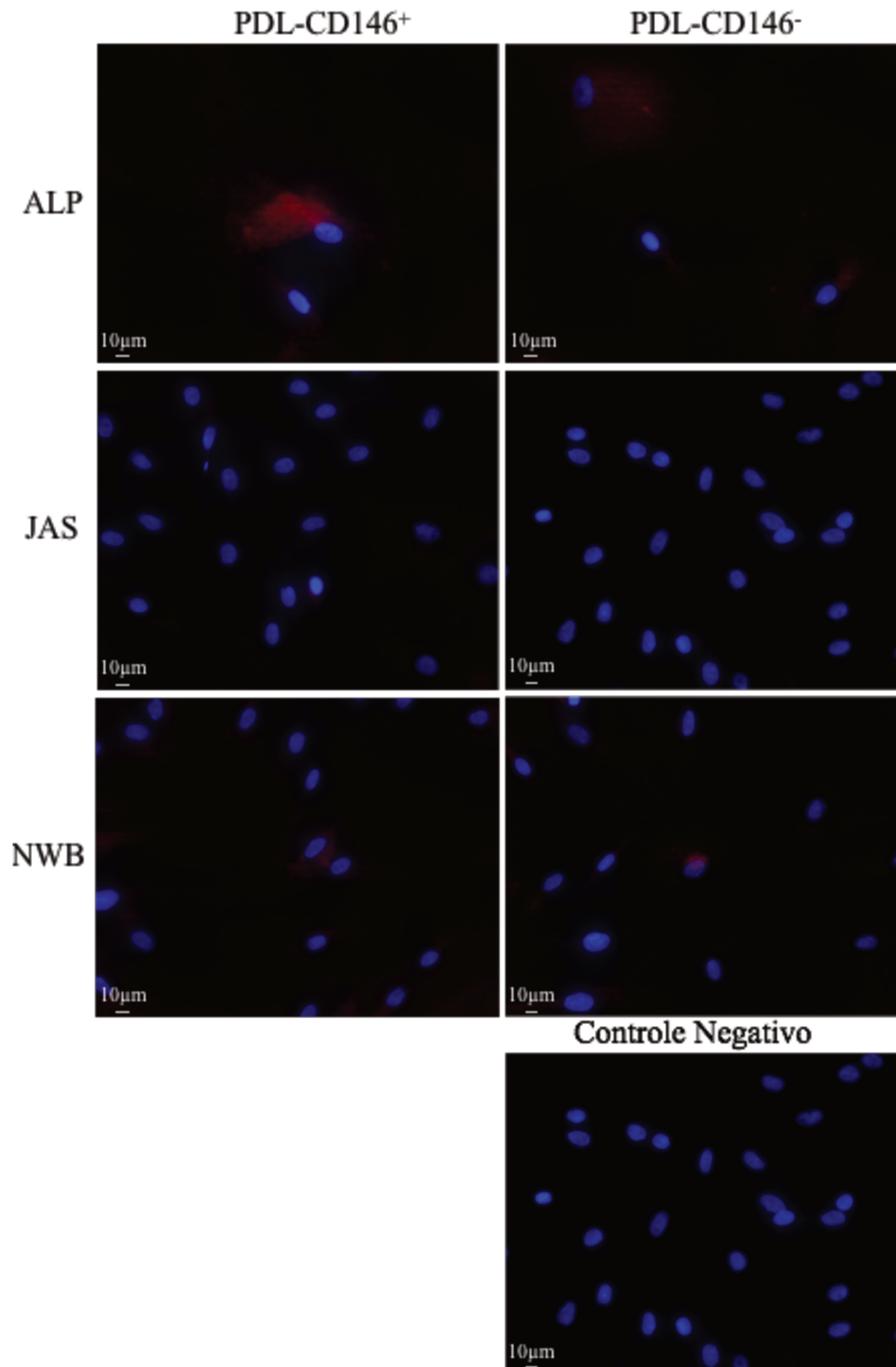


Figura 3. Imunofluorescência para Oct-4 das populações celulares PDL-CD146⁺ e CD146⁻. Expressão de Oct-4 visualizada em vermelho utilizando o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 com os núcleos contra-corados com PureBlu™ Dapi. A população ALP-CD146⁺ apresentou marcação positiva. Controle negativo sem a presença do anticorpo primário.

5.4 Avaliação do potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica das células PDL-CD146⁺ e CD146⁻

5.4.1 Ensaio de mineralização

Os resultados da AR-S mostraram que as três populações de células PDL-CD146⁺ foram capazes de depositar nódulos mineralizados somente quando cultivadas em meio osteogênico por 28 dias (Figura 4A). A quantificação da concentração da AR-S revelou que, a população NWB-CD146⁺ apresentou uma produção de matriz mineralizada significantivamente superior comparada as outras duas populações, ALP e JAS-CD146⁺ (Figura 4A). Em relação as células PDL-CD146⁻, somente a população NWB foi capaz de depositar nódulos mineralizados após 28 dias de indução osteogênica (Figura 4B). Contudo, essa deposição de matriz mineralizada foi significantivamente inferior comparada à população NWB-CD146⁺ (Figura 4C). Esse dado, também foi válido para as outras duas populações de células PDL-CD146⁺ (ALP e JAS), as quais apresentaram uma concentração de AR-S quase 1000 vezes a mais que as células PDL-CD146⁻ (Figura 4C).

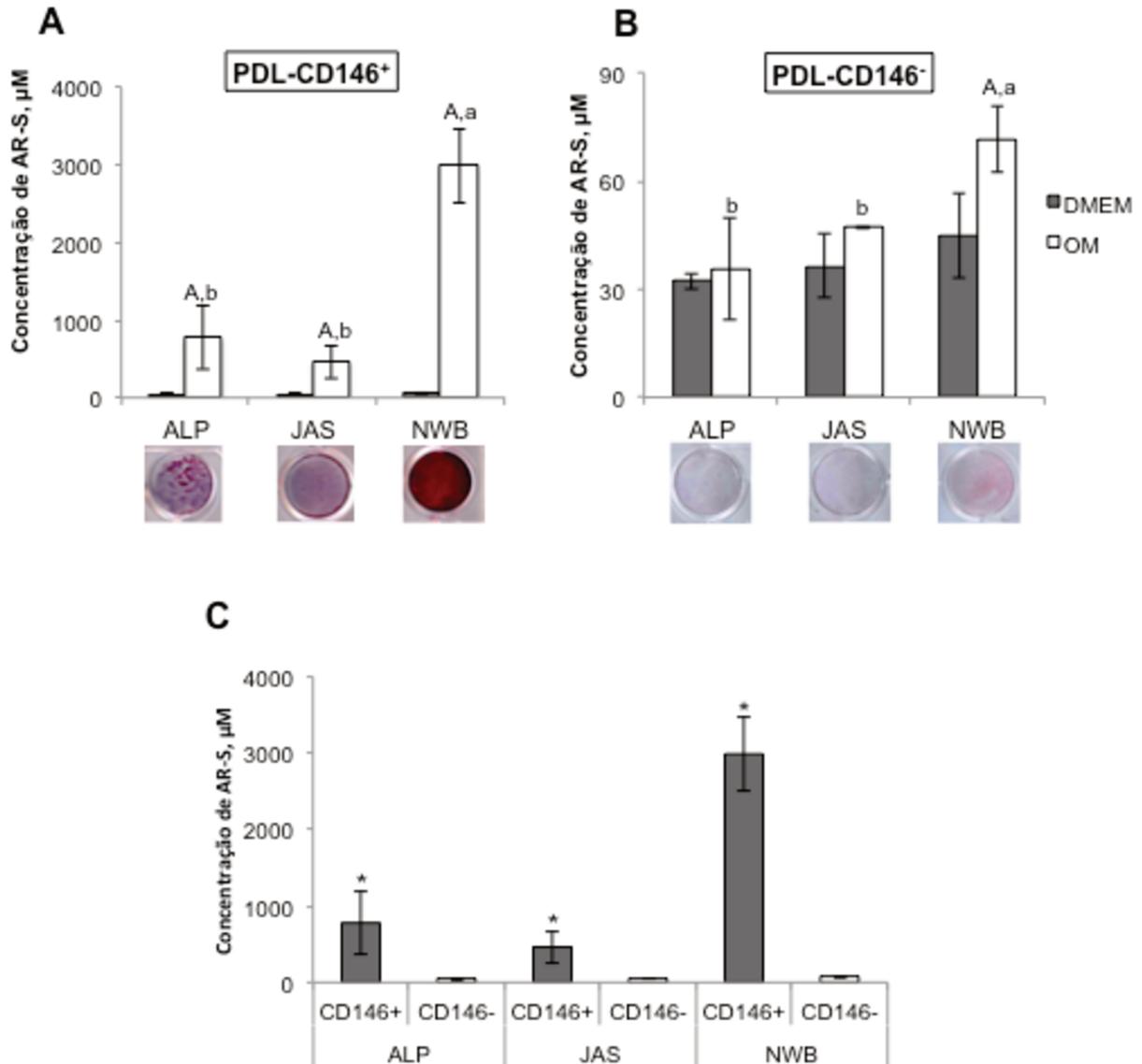


Figura 4. Expressão dos nódulos minerais pelas células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. Concentração da AR-S nas células cultivadas em DMEM e meio osteogênico (OM) durante 28 dias. (A) PDL-CD146⁺ e (B) PDL-CD146⁻. Dados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença intergrupo (DMEM x OM dentro da mesma população celular) determinada pelo Teste t pareado ($p < 0,05$) e letras minúsculas diferença intragrupo (OM x OM entre as populações), empregando o teste ANOVA um critério, seguido pela análise múltipla pareada, utilizando o método de Tukey ($p < 0,01$). (C) Comparação entre PDL-CD146⁺ versus CD146⁻ cultivadas em OM. A presença do símbolo (*) indica diferença estatisticamente significativa determinada pelo Teste t pareado ($p < 0,05$).

5.4.2 Expressão de genes marcadores de diferenciação osteobástica/cementobástica

Os resultados do PCRq foram analisados como fold-change, ou seja, aumento/redução na expressão dos genes pelas células cultivadas com meio de diferenciação osteogênica em relação ao grupo controle (DMEM), para os 3 períodos de observação (7, 14 e 21 dias). O cultivo das células PDL-CD146⁺ em meio osteogênico levou a um aumento significativo na expressão dos transcritos para *RUNX2*, *ALP* e *OCN*, o que não ocorreu, quando as células PDL-CD146⁻ foram cultivadas sob a mesma condição (Figuras 5A e 5B).

Os níveis de RNAm para *RUNX2*, um fator de transcrição importante para a fase inicial da diferenciação osteoblástica/cementoblástica, já estavam significativamente elevados nas células PDL-CD146⁺ após 7 dias em meio osteogênico ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle (Figura 5A). Por outro lado, sob indução osteogênica, as células PDL-CD146⁻ apresentaram níveis de RNAm para *RUNX2* semelhantes ao grupo controle (Figura 5B). Esse perfil de comportamento celular também foi observado para a expressão dos genes para *ALP* e *OCN*. Ou seja, as células positivas para o marcador CD146 já tiveram um aumento significativo na expressão do gene para *ALP* após 7 dias em meio osteogênico, com consequente redução na sua expressão após os períodos de 14 e 21 dias (Figura 5A). Também, aos 7 dias em meio osteogênico, as PDL-CD146⁺ apresentaram níveis significativamente elevados de transcritos para *OCN* ($p < 0,05$), mantendo esse padrão de expressão até o 21º dia (Figura 5A). Já as células PDL-CD146⁻, não apresentaram um aumento significativo na expressão destes genes (*ALP* e *OCN*) em nenhum dos períodos de observação (Figura 5B).

Ao comparar o padrão de expressão dos genes marcadores de osteoblastos entre as células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻, fica evidente que, o meio osteogênico promoveu um aumento dos transcritos para *RUNX2*, *ALP* e *OCN* somente nas células caracterizadas como pericitos. É possível observar pelas Figuras 6A e 6C, que os níveis de RNAm para *RUNX2* e *OCN* foram cerca de 2,5 vezes maior para as células PDL-CD146⁺ comparada as células negativas nos períodos de 7 e 21 dias. Adicionalmente, as células CD146 positivas expressaram 5 vezes mais *ALP* aos 7 dias em cultura (Figura 6B), confirmando o potencial destas células em apresentarem maturação no fenótipo osteoblástico/cementoblástico.

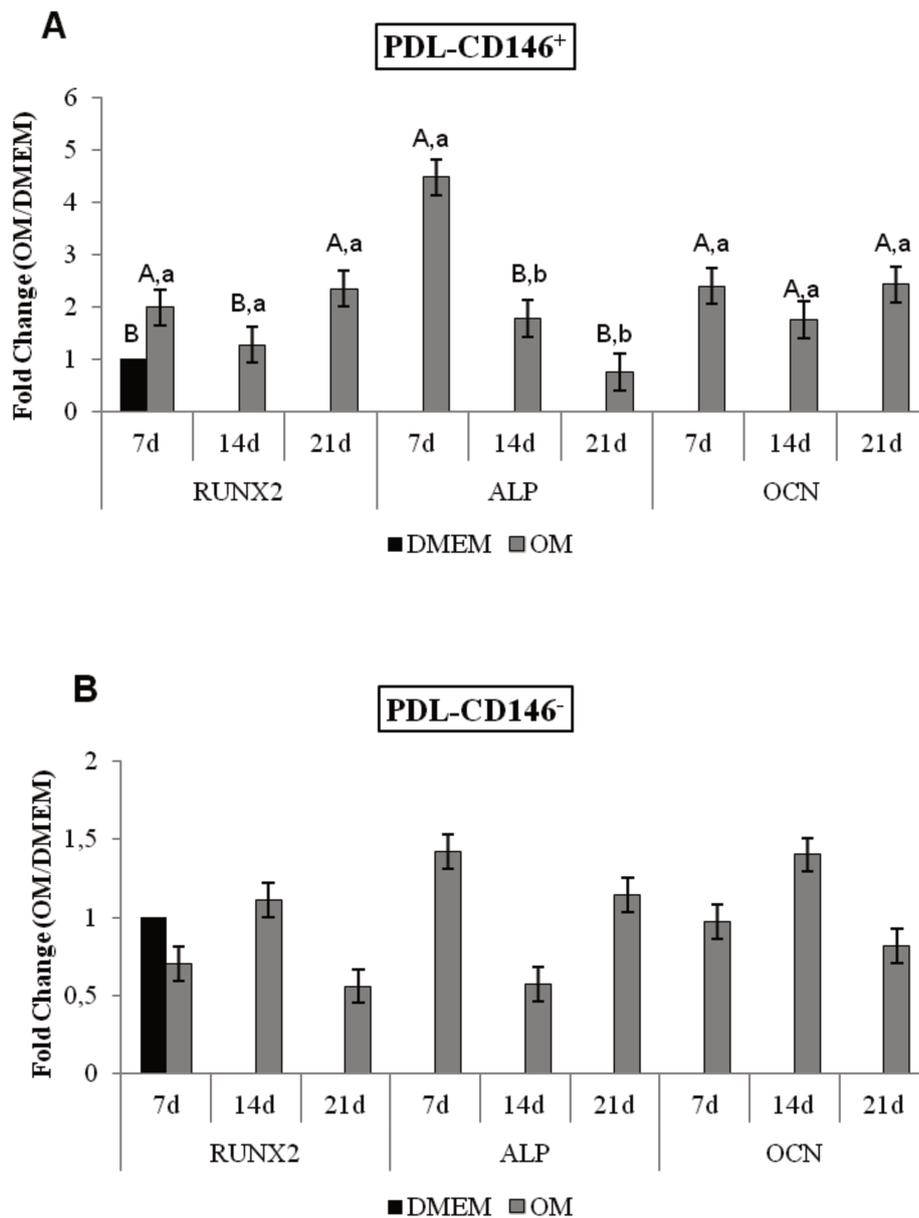


Figura 5. Expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico por qRT-PCR. (A) PDL-CD146⁺ e (B) PDL-CD146⁻. Médias e desvios-padrão para a expressão dos genes *RUNX2*, *ALP* e *OCN* após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica representam três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa intergrupo (DMEM x OM dentro de cada período) determinado pelo Teste t pareado ($p < 0,05$) e letras minúsculas diferença intragrupo (OM x OM entre os períodos), empregando o teste ANOVA, seguido pela análise múltipla pareada, utilizando o método Tukey ($p < 0,01$).

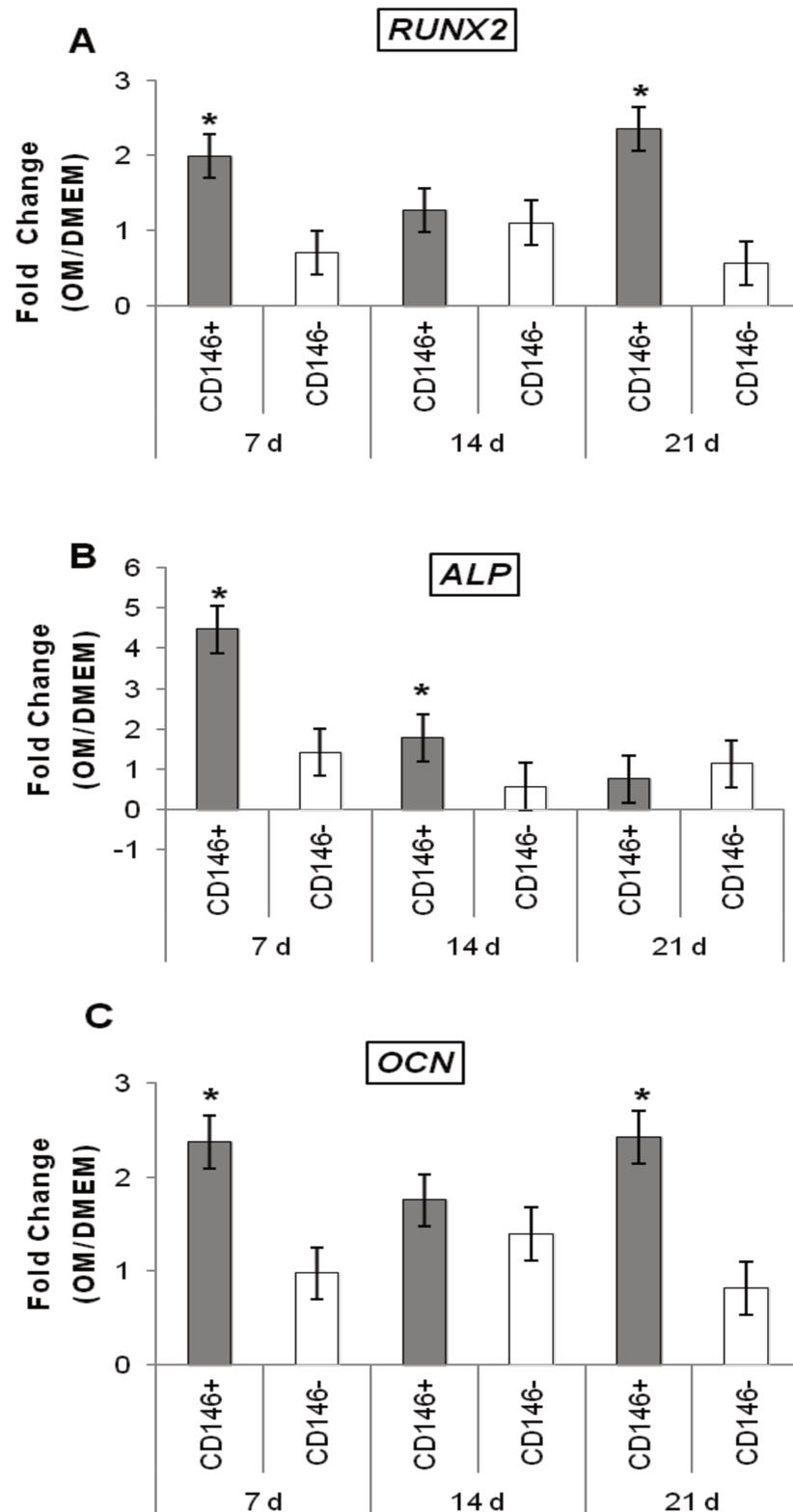


Figura 6. Análise comparativa da expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico entre as células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. (A) *RUNX2*, (B) *ALP* e (C) *OCN*. As barras representam as médias e desvios-padrão do *fold change* dos genes alvos expressos pelas células cultivadas em meio osteogênico (OM) em comparação ao meio controle (DMEM) após 7, 14 e 21 dias. A presença do símbolo (*) representa as diferenças estatisticamente significantes entre as células PDL-CD146⁺ versus CD146⁻ dentro de cada período, determinada pelo Teste t pareado ($p < 0,05$).

5.5 Avaliação do potencial para diferenciação adipogênica das células PDL-CD146⁺ e CD146⁻

5.5.1 Coloração com oil red O e expressão de genes marcadores de diferenciação adipogênica

Quando submetidos à diferenciação adipogênica, somente a população ALP das células PDL-CD146⁺ foram capazes de diferenciarem em células semelhantes a adipócitos, apresentando a formação de vacúolos de lipídeo no citoplasma corados com oil red O (Figura 7A). Adicionalmente, os resultados do PCRq mostraram um aumento na expressão de dois fatores de transcrição relacionados à diferenciação adipogênica, *LPL* e *PPARγ2* (Figura 7B). A análise dos dados mostrou que, as células PDL-CD146⁺ tiveram um aumento de 5 vezes nos níveis de RNAm para *PPARγ2*, o qual foi significativo comparado às células cultivadas em DMEM ($p < 0,05$) (Figura 7B). No entanto, vale ressaltar que esse resultado foi derivado somente da população ALP PDL-CD146⁺, já que as outras duas (JAS e NWB) não foram capazes de diferenciarem-se em células semelhantes à adipócitos.

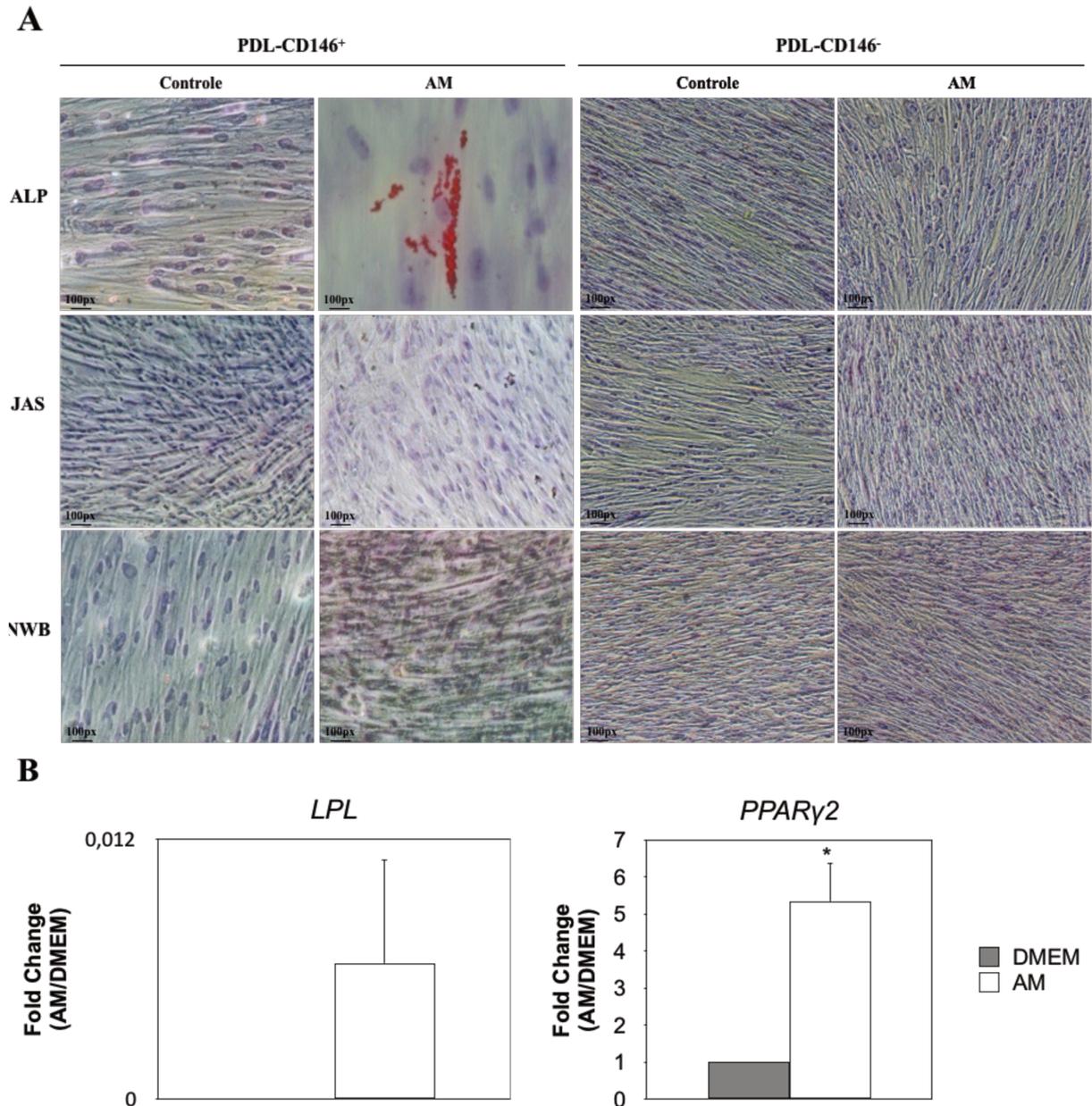


Figura 7. Expressão do fenótipo adipogênico pelas células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. (A) Depósito de vácuolos de lipídio corados com oil red O, mostrando que somente a população ALP das células PDL-CD146⁺ foram capazes de diferenciarem em células semelhantes a adipócitos. (B) Média e desvios-padrão para a expressão dos genes LPL e PPAR γ 2 após 25 dias de indução adipogênica pelas células PDL-CD146⁺. Dados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos DMEM versus AM (meio adipogênico), empregando o Teste t pareado ($p < 0,05$).

5.6 Análise histométrica

A análise histomorfométrica mostrou que, para períodos experimentais (3 e 14 dias), o grupo Saúde sempre apresentou médias de reabsorção óssea significativamente inferiores comparado ao grupo Doença (Tabela 3, Figura 8). Esse dado reflete a efetividade do modelo de doença periodontal induzida por ligadura aplicada neste estudo. Em relação ao tempo de indução da doença periodontal, não houve diferença significativa na média de reabsorção óssea entre os dois períodos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das médias e desvios-padrão das medidas de reabsorção óssea em mm² segundo o período de indução da doença periodontal.

Grupos	3 dias	14 dias	<i>p (Test t)</i>
Saúde	0,07±0,01 Aa	0,06±0,007 Aa	0,2
Doença	0,15±0,03 Ba	0,18±0,07 Ba	0,06
<i>p (Test t)</i>	0,0008	0,0001	

Letras maiúsculas distintas representam a diferença intergrupo (controle versus doença) e letras minúsculas representam a diferença intragrupo (3 versus 14 dias) identificadas pelo Teste t ($p < 0,05$)

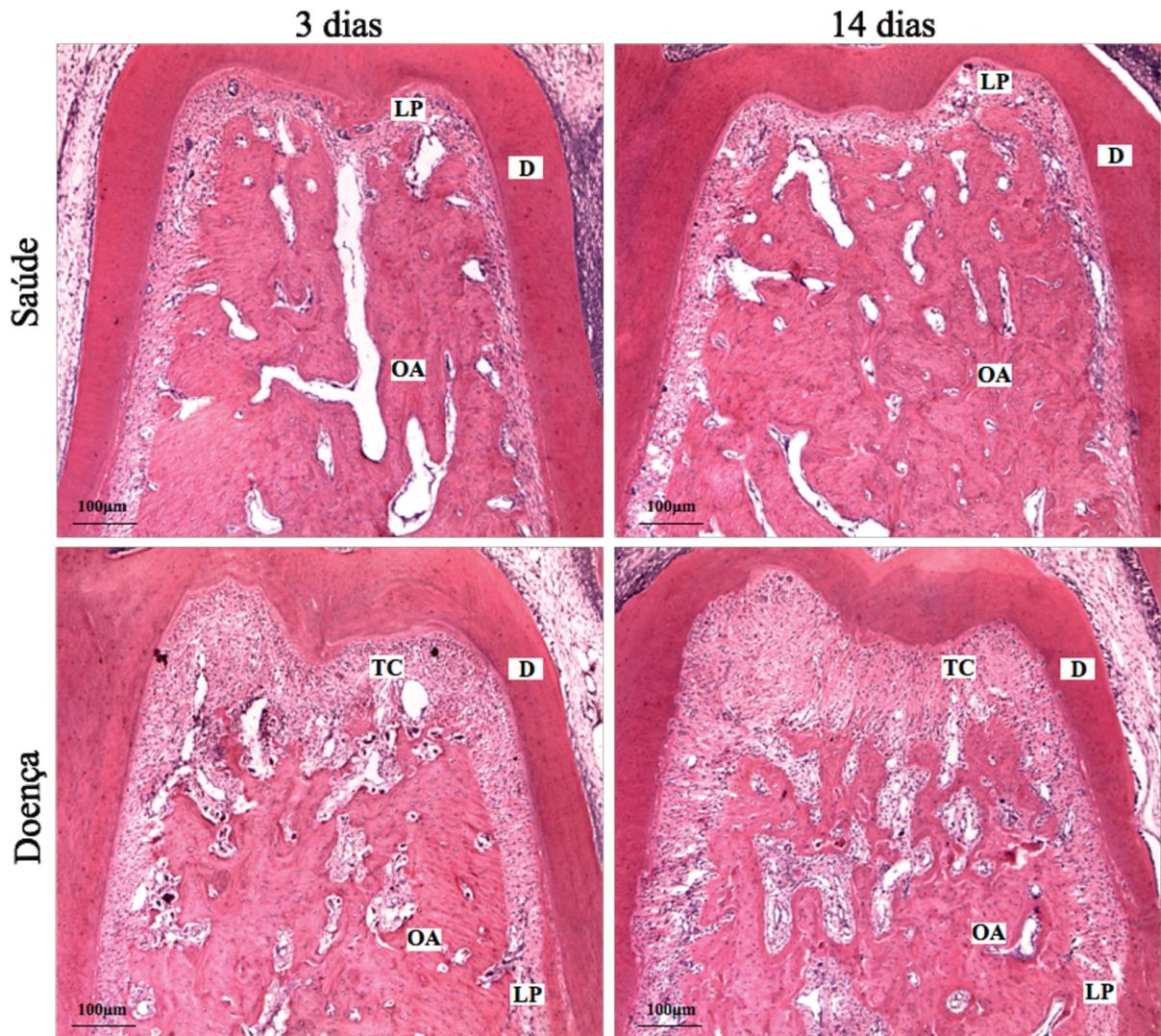


Figura 8. Fotomicrografias ilustrando área do ligamento periodontal e reabsorção óssea alveolar na região de furca dos 1^{os} molares inferiores durante os períodos experimentais de 3 e 14 dias de indução da doença periodontal. TC - tecido conjuntivo, D - dentina, OA - osso alveolar, LP - ligamento periodontal.

5.7 Ensaio de imunohistoquímica

Os resultados do ensaio de imunohistoquímica são representativos de reações realizadas nas amostras dos grupos controle e doença periodontal de três animais para cada período de observação (3 e 14 dias). Esses resultados serão apresentados de forma descritiva para cada anticorpo avaliado (CD146, CD166 e STRO1).

5.7.1. Imunolocalização para CD146

No grupo saúde periodontal, células positivamente marcadas para o anticorpo CD146 estavam distribuídas ao longo do ligamento periodontal e do osso alveolar (Figura 9A). Foi possível encontrar células positivas na parede de vasos sanguíneos em canais vasculares que comunicavam o osso alveolar com o ligamento periodontal (Figura 9C - seta vermelha). Essas células apresentavam núcleo e citoplasma mais alongados, semelhantes à morfologia das células endoteliais. Células positivamente marcadas foram também visualizadas na região extravascular em “clusters” localizados próximos aos vasos sanguíneos (Figura 9C - seta rosa), distribuídas ao longo do ligamento periodontal (Figura 9B - seta azul), em áreas próximas ao cemento radicular (Figura 9B - seta verde), além da presença de osteócitos CD146⁺ (Figura 9C - seta amarela). Esse grupo de células tinha uma morfologia arredondada e núcleo centralizado.

Aos 3 e 14 dias de indução da doença periodontal, foram visualizadas células imunomarcadas para CD146 no tecido conjuntivo, que ocupava a área de perda de osso alveolar (Figura 9B - seta azul). Essas células estavam localizadas principalmente, nas áreas próximas ao cemento radicular e distribuídas ao longo do teto da região de furca (Figura 9B e C - seta verde). Também foi possível visualizar células positivas na parede de vasos sanguíneos (Figura 9B e C - seta vermelha). Havia a presença de osteócitos CD146 positivos (Figura 9C - seta amarela) e embora, não tenha sido realizada uma análise quantitativa, os resultados sugerem a presença de um maior número de células imunomarcadas após 14 dias de indução da doença periodontal comparado ao 3 dias.

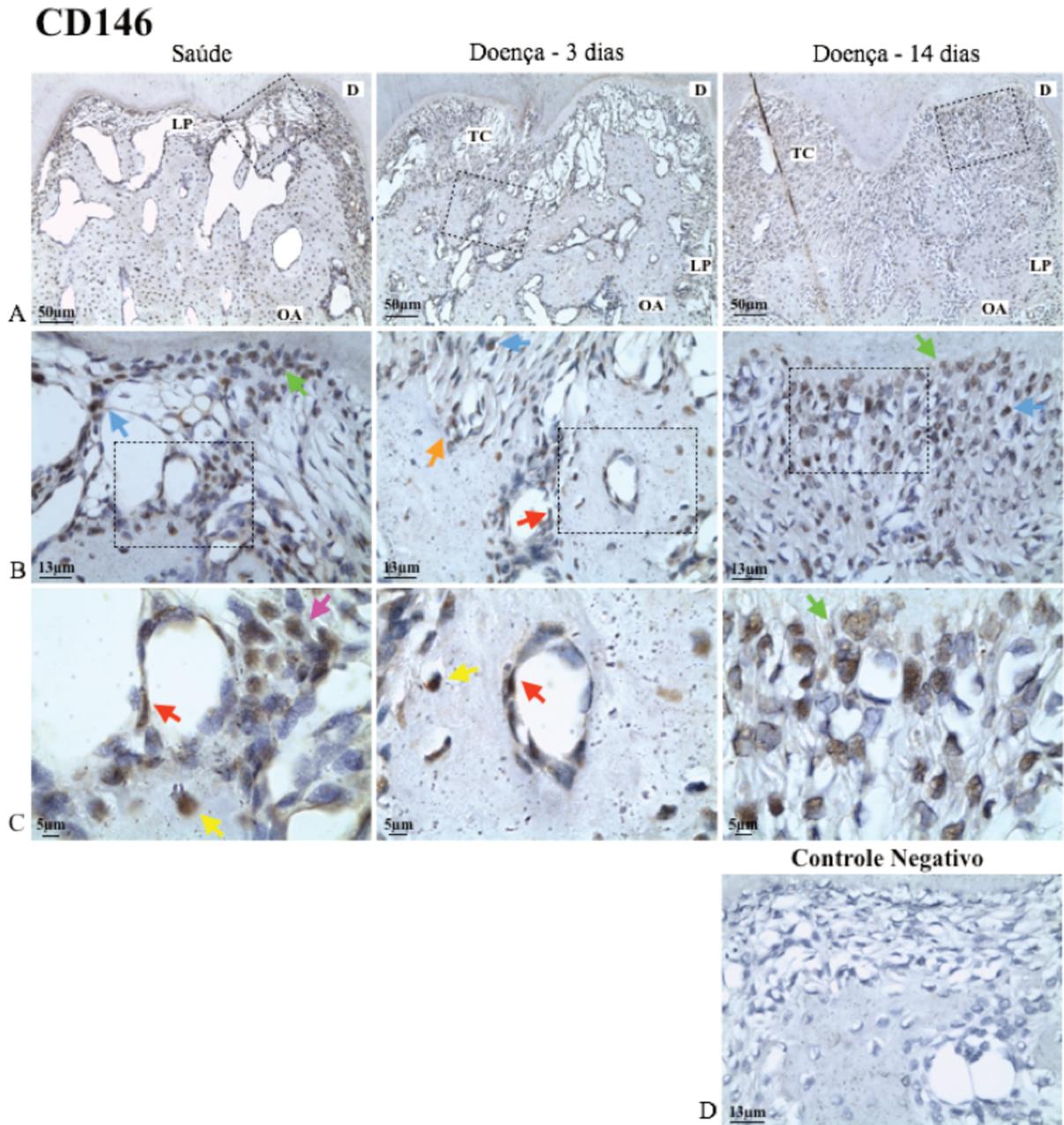


Figura 9. Imunolocalização para CD146. **A** - Ilustrações das áreas de furca nos diferentes grupos mostrando a distribuição de marcação positiva para CD146. **B** - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos A mostrando a presença de células CD146 positivas distribuídas ao longo do ligamento periodontal e tecido conjuntivo (setas azuis), próximas as áreas de cemento radicular (setas verdes), nas margens da crista óssea (seta laranja) e na parede dos vasos em canais vasculares (seta vermelha). **C** - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos B mostrando a presença de células CD146 positivas na parede de vasos sanguíneos (setas vermelhas), aglomeradas próximas aos canais vasculares (seta rosa), próximas as áreas de cemento radicular (seta verde) e em osteócitos (setas amarelas). **D** - Ilustração representativa do controle negativo da reação mostrando ausência de marcação positiva para CD146. **TC** - tecido conjuntivo, **D** - dentina, **OA** - osso alveolar, **LP** - ligamento periodontal.

5.7.2. Imunolocalização para CD166

O ensaio de imunohistoquímica para o antígeno CD166 revelou a presença de células positivas nas amostras de todos grupos, saúde e doença periodontal (Figura 10A). Nas amostras do grupo saúde, foi possível observar células CD166 positivas localizadas no interior do ligamento periodontal (Figura 10B - seta azul), na região do cemento radicular (Figura 10B - seta verde), na parede dos vasos sanguíneos (Figura 10B - seta vermelha), aglomeradas próximas a estes vasos (Figura 10B - seta rosa) e margeando o osso alveolar (Figura 10C - seta laranja). Na área de reabsorção óssea, os dados sugerem a presença de um maior número de células CD166 positivas quando comparado ao grupo saúde sendo essa observação mais evidente no período de 3 dias de indução da doença periodontal (Figura - 10A). Nessas amostras, as células imunomarcadas estavam presentes no tecido conjuntivo (Figura 10B - seta azul) e margeando o cemento radicular ao longo de toda a extensão da área de furca (Figura 10B - seta verde). Foi possível observar também células CD166 positivas localizadas no interior do cemento dental (Figura 10B - seta roxa), na parede dos vasos sanguíneos (Figura 10C - seta vermelha) e aglomeradas próximas a estes vasos (Figura 10C - seta rosa). Também existia a presença de osteócitos CD166 positivos (Figura 10C - seta amarela). Nas duas condições avaliadas (saúde e doença periodontal) as células positivas para CD166 apresentavam uma morfologia arredondada e a imunomarcagem estava localizada na parede celular.

5.7.3. Imunolocalização para STRO-1

A análise dos resultados mostrou imunomarcagem positiva para STRO-1 no ligamento periodontal das amostras de saúde e doença periodontal (Figura 11A). No grupo saúde, a imunomarcagem estava presente nas fibras do ligamento periodontal, próximas ao cemento radicular (Figura 11A, seta verde), na parede dos vasos sanguíneos (Figuras 11C, seta vermelha), em aglomerados celulares localizados na margem da crista óssea alveolar próximos aos vasos sanguíneos (Figuras 11C, seta laranja) e em osteócitos (Figuras 11C, seta amarela). Na presença da doença periodontal, os resultados também mostraram existir células STRO1 positivas ao longo do tecido conjuntivo que ocupava a área de reabsorção óssea (Figuras 11B, seta azul), margeando o cemento radicular ao longo do teto da furca (Figura 11B, seta verde), na parede dos vasos sanguíneos (Figura 11C - seta vermelha) e aglomeradas próximas aos vasos (Figura 11C - seta rosa). As células STRO-1 positivas apresentavam uma morfologia oval a arredondada, com a imunomarcagem localizada na parede celular.

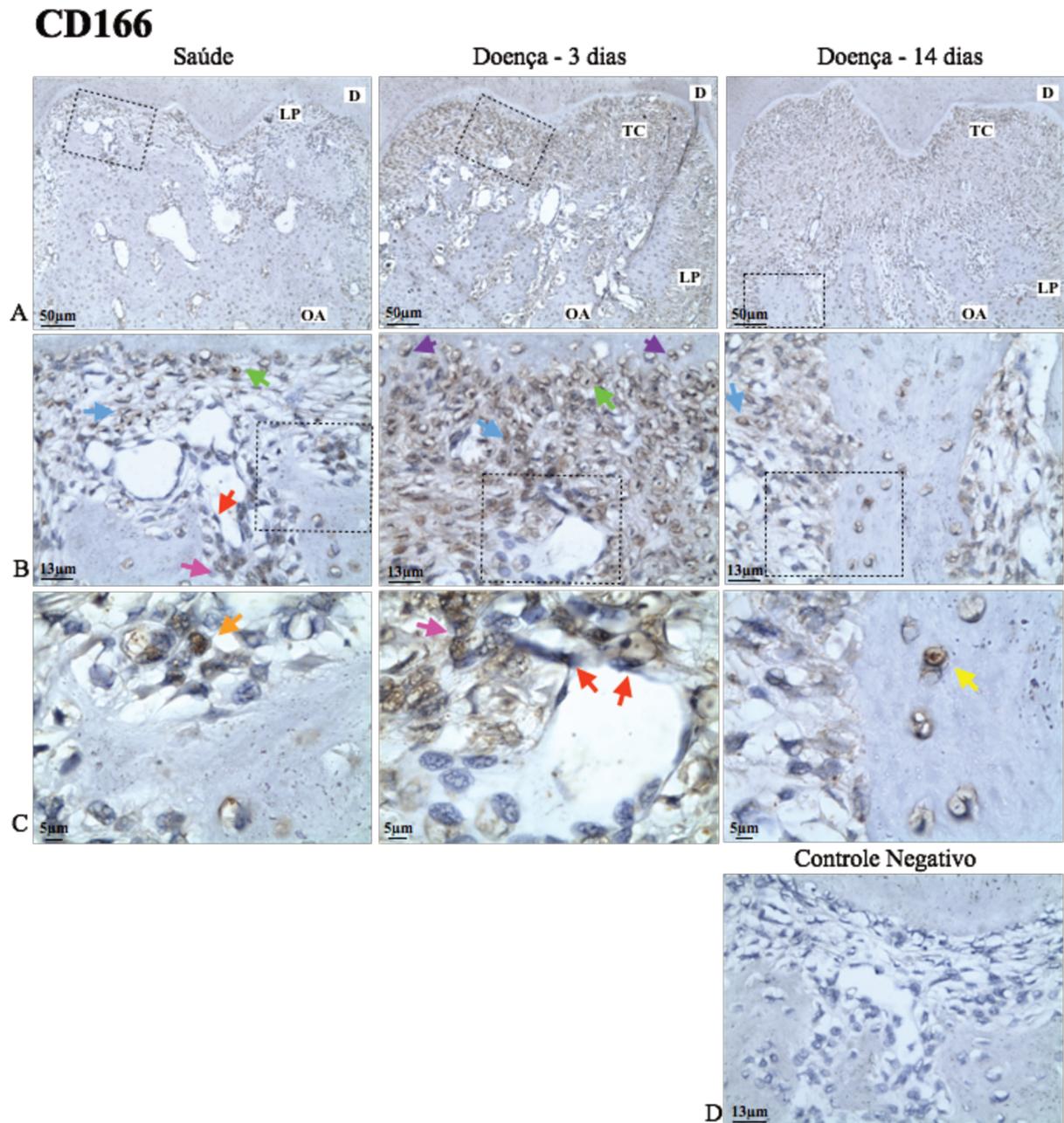


Figura 10. Imunolocalização para CD166. A - Ilustrações da área de furca nos diferentes grupos mostrando a distribuição de marcação positiva para CD166. B - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos A mostrando a presença de células CD166 positivas distribuídas ao longo do ligamento periodontal e tecido conjuntivo (setas azuis), próximas as áreas de cemento radicular (seta verde), no interior do cemento dental (seta roxa), na parede dos vasos sanguíneos (seta vermelha) e aglomeradas próximas aos canais vasculares (seta rosa). C - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos B mostrando a presença de células CD166 positivas nas margens da crista óssea (seta laranja), na parede de vasos sanguíneos (setas vermelhas) e em osteócitos (seta amarela). D - Ilustração representativa do controle negativo da reação mostrando ausência de marcação positiva para CD166. TC - tecido conjuntivo, D - dentina, OA - osso alveolar, LP - ligamento periodontal.

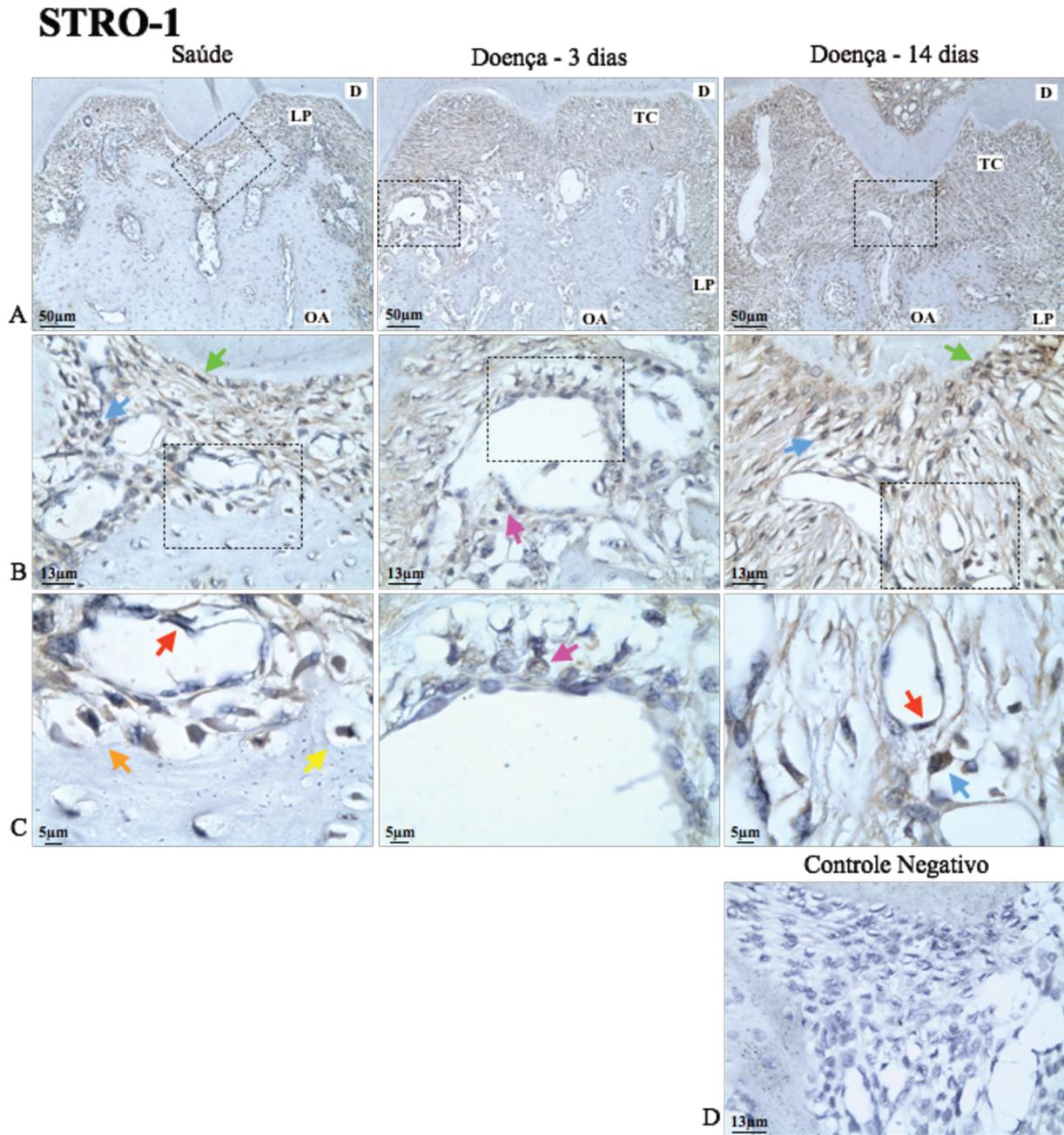


Figura 11. Imunolocalização para STRO-1. **A** - Ilustrações da área de furca nos diferentes grupos mostrando a distribuição de marcação positiva para Stro1. **B** - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos A mostrando a presença de células STRO-1 positivas distribuídas ao longo do ligamento periodontal e tecido conjuntivo (setas azuis), próximas as áreas de cemento radicular (seta verde) e aglomeradas próximas aos canais vasculares (seta rosa). **C** - Ilustrações em maior aumento das áreas destacadas nas fotos B mostrando a presença de células STRO-1 positivas nas margens da crista óssea (seta laranja), na parede de vasos sanguíneos (setas vermelhas), aglomeradas próximas aos canais vasculares (seta rosa), em osteócitos (seta amarela) e ao longo do tecido conjuntivo (seta azul). **D** - Ilustração representativa do controle negativo da reação mostrando ausência de marcação positiva para STRO-1. **TC** - tecido conjuntivo, **D** - dentina, **OA** - osso alveolar, **LP** - ligamento periodontal.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo estudar populações celulares do ligamento periodontal identificadas como pericitos, avaliando as suas propriedades como células mesenquimais indiferenciadas e, avaliar *in vivo* a localização dos pericitos/células mesenquimais indiferenciadas nos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela doença periodontal inflamatória crônica. Os pericitos são definidos como células que residem na interface entre o endotélio e o tecido circunjacente de diferentes tipos de vasos sanguíneos (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Essas células perivasculares exercem um importante papel na angiogênese, atuando como regulador do desenvolvimento, maturação e remodelamento do sistema vascular (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Também, tem sido sugerido que os pericitos possuem a capacidade de migrarem da parede dos vasos sanguíneos para o interior do tecido circunjacente em resposta a um processo inflamatório, auxiliando o sistema imune na apresentação de antígeno (Balabanov et al., 1999), ou durante a cicatrização tecidual, apresentando a capacidade de diferenciarem-se em células específicas, as quais irão sintetizar uma nova matriz tecidual (Sundeberg et al., 1996).

Em função dessa capacidade dos pericitos migrarem para o interior dos tecidos, tem sido sugerido que as células mesenquimais indiferenciadas teriam uma origem perivascular (Caplan, 2008, Crisan et al., 2008, Stopp et al., 2013, Espagnolle et al., 2014). Com o intuito de avaliar se as células mesenquimais indiferenciadas presentes no ligamento periodontal (Seo et al., 2004, Silverio et al., 2010) apresentam origem perivascular, células positivas para o marcador de pericito, CD146, foram isoladas e caracterizadas *in vitro*, e comparadas com as células CD146 negativas obtidas dos mesmos doadores.

Cerca de 20% das células de culturas primárias do ligamento periodontal apresentaram positividade para o CD146. Esse resultado é inferior ao encontrado pelo estudo de Zhu et al. (2013), o qual obtiveram uma taxa de positividade média de aproximadamente 43%, realizando o “cell sorting” com o citômetro de fluxo. Essa diferença de resultados pode estar relacionada à técnica de obtenção das células CD146[±], já que no presente estudo foram utilizados microbeads conjugados ao anticorpo anti-CD146 associado à coluna de separação magnética. Essa técnica tem se mostrado eficiente para purificação de populações celulares específicas (Silverio et al., 2010), porém menos sensível no momento da seleção celular comparada ao citômetro de fluxo. Contudo, após a expansão das células PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻, foi possível verificar pela análise de citometria de fluxo, que 95% das células realmente expressavam ou não esse antígeno de superfície, confirmando a purificação das populações celulares.

Para testar a hipótese de que as células CD146 positivas compartilhavam o fenótipo mesenquimal indiferenciado, estas foram avaliadas quanto à expressão de antígenos de superfície específicos (CD105, CD166 e STRO1), expressão do fator de transcrição Oct-4/POU5F1 e potencial para diferenciação em fenótipos celulares como, osteoblastos e adipócitos. Os resultados mostraram que o único marcador de origem mesenquimal consistentemente expresso pelas três populações de células PDL-CD146⁺ positivas foi o CD105 ou Endoglin. Esse dado foi válido também, para as células CD146 negativas. No entanto, a taxa de positividade para o antígeno CD105 foi mais elevada entre as células CD146⁺ (≅ 95%) comparada às células CD146⁻ (≅75%).

Através da análise dos marcadores CD166 (ALCAM) e STRO1 foi possível observar uma heterogeneidade significativa entre as três populações de PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻. As células da população ALP-CD146⁺ não expressaram o antígeno CD166. Ao mesmo tempo, somente as células CD146⁺ e CD146⁻ da população ALP, expressaram o marcador de superfície STRO1, embora a taxa de positividade tenha sido baixa em ambos grupos celulares (0,24% e 1,93%, respectivamente). Estudos prévios que avaliaram a dupla positividade para CD146 e STRO1 no *pool* de células do ligamento periodontal, encontram um resultado médio de 2,6 % (Xu et al., 2009) e 2,4% (Alvarez et al., 2015). Essa taxa de positividade mesmo sendo baixa, ainda é superior à observada no presente estudo. No entanto, vale ressaltar que, os estudos avaliaram populações celulares distintas (células enriquecidas para CD146 *versus* a população toda do ligamento periodontal), o que pode ter contribuído para diferença dos resultados.

Em relação à expressão dos marcadores de origem endotelial/hematopoiético (CD45 e CD34), a totalidade de células de ambos grupos, PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻, foram negativas para os dois antígenos. Em concordância com estudos prévios (Crisan et al., 2008, Zhu et al., 2013) esse resultado mostra que as células CD146⁺ constituem um grupo celular específico, a qual possui origem perivascular, porém não podem ser consideradas células endoteliais ou hematopoiéticas, já que não expressam os respectivos marcadores CD45 e CD34. Desta maneira, considerando que essas células expressam os antígenos de superfície para CD105, CD166 e STRO1, é possível afirmar que estas expressam fenótipo mesenquimal.

Uma vez que, as populações PDL-CD146⁺ e PDL-CD146⁻ foram caracterizadas como sendo de origem mesenquimal, o próximo passo do presente estudo consistiu em avaliar a multipotencialidade destas células através da expressão do fator de transcrição Oct-4/POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor-1*) e do potencial para diferenciação em células de linhagem mesodérmica tais como, osteoblastos e adipócitos. Os resultados

mostraram que somente as populações celulares PDL-CD146⁺ foram capazes de formarem nódulos mineralizados e sofrerem maturação em fenótipo osteoblástico, confirmado pelo aumento da expressão dos genes para *RUNX2*, *ALP* e *OCN*. Após o período de indução adipogênica, somente as células da população ALP caracterizada como, CD146⁺ CD105⁺ STRO1⁺ CD166⁻ foram capazes de depositar vacúolos de lipídeo e de expressarem níveis elevados de RNAm para os dois fatores de transcrição adipogênicos, *PPARγ2* e *LPL*, confirmando a diferenciação em células semelhantes a adipócitos. Adicionalmente, a população ALP-CD146⁺ foi a única a apresentar marcação positiva para o Oct-4/POU5F1, o qual tem sido identificado como um fator de transcrição crítico para manutenção da pluripotencialidade e do estado indiferenciado das células tronco embrionárias humanas (Huang et al., 2009).

Dois aspectos são relevantes nesses resultados. Primeiro, a expressão do marcador CD146 conferiu às células do ligamento periodontal capacidade para diferenciação osteoblástica e segundo, somente as células positivas concomitantemente para os antígenos de superfície CD146 e STRO1 e para o fator de transcrição Oct-4/POU5F1, apresentaram a característica de multipotencialidade. Desta maneira, estes achados sugerem que, somente a população ALP-CD146⁺ CD105⁺ STRO1⁺ CD166⁻ Oct-4⁺ poderia ser definida como célula mesenquimal indiferenciada. A expressão do Oct-4/POU5F1 tem sido investigada em células tronco mesenquimais adultas com o intuito de caracterizar fontes de células pluripotentes como alternativa às células tronco embrionárias humanas. Os poucos estudos que avaliaram a expressão do Oct-4/POU5F1 pelas células do ligamento periodontal verificaram tal como no presente trabalho que, as células positivas para Oct-4 apresentam capacidade para diferenciação em células de linhagem mesodérmica como, osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Huang et al., 2009, Kawanabe et al., 2010, Silverio et al., 2010). Adicionalmente, células PDL-Oct4⁺ foram capazes de diferenciarem-se em células de origem ectodérmica como células semelhantes a neurônios (Huang et al., 2009), mostrando a importância da expressão deste marcador na definição da pluripotencialidade celular.

Em relação aos marcadores de células mesenquimais indiferenciadas, a Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu como um dos critérios para identificação das MSCs a expressão positiva para CD105 (Dominici et al., 2006). Contudo, os resultados do presente estudo sugerem que a pluripotencialidade celular não foi dependente da expressão deste marcador, já que todas as populações foram positivamente marcadas para esse antígeno de superfície. A Molécula de Adesão Celular Ativada por Leucócito (ALCAM/CD166) é outro antígeno de superfície que vem sendo empregado em conjunto com outros marcadores para

caracterização do fenótipo mesenquimal indiferenciado (Silverio et al., 2010, Trubiani et al., 2010, Saito et al., 2014). Tal como observado para o CD105 (Endoglin), a expressão do antígeno CD166 (ALCAM) não foi determinante para conferir a característica de pluripotencialidade às populações celulares isoladas no presente estudo, já que as células CD46⁺ /CD166⁺ apresentaram somente potencial para diferenciação osteoblástica. De fato, estudos prévios observaram maior potencial osteogênico em células da medula óssea e do ligamento periodontal que expressavam a molécula CD166 (Devlin and Sloan, 2002, Chitteti et al., 2013), enquanto que, à indução da expressão do ALCAM pelas células tronco embrionárias humanas levou a perda da sua pluripotencialidade (Scavone et al., 2013).

O STRO-1 tem sido amplamente utilizado na identificação de MSCs, pois a sua expressão confere às células capacidade clonogênica e de plasticidade. Além disso, células STRO-1 positivas apresentam maior potencial para diferenciação osteogênica e adipogênica, tal como observado na população ALP-CD146⁺ do presente estudo (Simmons and Torok-Storb, 1991, Dennis et al., 2002). Em relação ao antígeno CD146 ou conhecido também, como MCAM (melanoma cell adhesion molecule), Kang et al. (2006), mostraram que o *knockdown* do gene CD146 induzia a uma supressão da migração e proliferação de células perivasculares para o interior da matriz extracelular e conseqüentemente, uma redução na formação de novos vasos sanguíneos. Em células da medula óssea de humanos, o silenciamento do gene CD146 levou a uma redução significativa da atividade metabólica, da proliferação e da migração celular (Stopp et al., 2013). Adicionalmente, esses autores observaram uma supressão da atividade da fosfatase alcalina, da capacidade de formação de nódulos mineralizados e de vacúolos de lípideo, quando essas células foram cultivadas sob condições osteogênicas e adipogênicas (Stopp et al., 2013). Em conjunto, esses dados sugerem uma forte relação da expressão da proteína CD146 (MCAM) com o perfil de multipotencialidade das células mesenquimais indiferenciadas além, de ser uma molécula importante para promover a angiogênese durante a cicatrização tecidual.

O antígeno de superfície CD146 (MCAM) não é a única proteína utilizada para a caracterização de pericitos. Outros dois marcadores, o neural/glial antígeno 2 (NG2) e o CD140b/PDGFR- β (receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas), também tem sido utilizados na identificação de células perivasculares (Gerhardt and Betsholtz, 2003, Crisan et al., 2008, Iwasaki et al., 2013). No presente estudo, a identificação e isolamento dos pericitos do ligamento periodontal foi realizada com base somente na expressão do CD146. Isto por quê, de acordo com o estudo de Crisan et al. (2008), os quais identificaram a

distribuição nativa das células CD146⁺ em diferentes tipos teciduais (músculo, pâncreas, tecido adiposo e placenta), todas as células perivasculares CD146⁺ expressaram também, o NG2 e o CD140b. Além disso, esses autores observaram que, independente da origem tecidual, somente as células CD146 positivas apresentavam *in vitro* as características de células tronco mesenquimais comparadas as células CD146 negativas.

Empregando o modelo de doença periodontal experimental em ratos, a distribuição de células CD146, CD166 e STRO1 positivas foram avaliadas na região da furca dos primeiros molares, após os períodos de 3 e 14 dias de indução da doença e comparada com o lado controle (saúde periodontal). Os resultados da imunohistoquímica mostraram a presença de células positivas para os três antígenos de superfície, distribuídas no interior do ligamento periodontal, próximas ao cemento radicular, na região do defeito de furca e nos nichos perivasculares, independente do período de observação. Além disso, os dados mostraram uma maior abundância de células CD166 e STRO1 positivas nos dentes acometidos pela doença periodontal comparados ao grupo controle (saúde) localizadas principalmente, nas áreas adjacentes ao cemento radicular. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Chen et al. (2006), os quais observaram uma maior proporção de células STRO1⁺ e CD146⁺ distribuídas no ligamento periodontal de dentes humanos extraídos devido à periodontite avançada comparados com aqueles extraídos por razão ortodôntica.

Analisando em conjunto os dados *in vitro* e *in vivo* do presente estudo, é possível sugerir que as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal possuem origem na região perivascular porém, nem todo pericito será uma célula progenitora de uma MSC. Ainda, é possível supor que o processo inflamatório induza a um aumento do número de células mesenquimais indiferenciadas na região do defeito periodontal, as quais podem ser resultantes da proliferação de células já residentes nos tecidos periodontais e que tiveram origem na região perivascular. Entretanto, para elucidar melhor a origem das MSC durante o processo de progressão da doença periodontal, é importante como próximo passo do estudo, realizar a co-localização *in situ*, dos marcadores mesenquimais e para pericito, a fim de determinar se as células CD166 e STRO1 correspondem as células perivasculares que expressam CD146.

7 CONCLUSÃO

Com base no resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) O ligamento periodontal de humanos abriga células CD146 positivas, as quais expressam pelo menos, dois tipos de marcadores para células de origem mesenquimal (CD105 e STRO-1 ou CD105 e CD166);
- 2) As células CD146 positivas apresentam potencial para diferenciação osteoblástica/cementoblástica. No entanto, somente as células que expressam concomitantemente os antígenos de superfície CD146 e STRO-1, e o fator de transcrição Oct-4/POU5F1 apresentam a característica de multipotencialidade, podendo ser classificadas como mesenquimais indiferenciadas;
- 3) As células do ligamento periodontal identificadas como CD146 negativas, mesmo expressando marcadores mesenquimais, não possuem a característica de multipotencialidade, uma vez que não apresentaram diferenciação em fenótipo osteoblástico/cementoblástico e adipogênico;
- 4) Células imunomarcadas para os antígenos CD146, CD166 e STRO-1 encontram-se distribuídas no osso alveolar, no ligamento periodontal, no cimento radicular e no espaço perivascular dos dentes com saúde e doença periodontal.

REFERÊNCIAS

1. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative medicine*. 2010 Jul;5(4):617-31.
2. Alvarez R, Lee HL, Wang CY, Hong C. Characterization of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from human periodontal ligament based on cell surface markers. *International journal of oral science*. 2015 Dec;7(4):213-9.
3. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Jun 17;195(12):1549-63.
4. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34:9-21.
5. Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *Journal of cellular biochemistry*. 2010 Nov 1;111(4):834-45.
6. Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*. 2001 Oct;68(4-5):245-53.
7. Ashton N, de Oliveira F. Nomenclature of pericytes. Intramural and extramural. *The British journal of ophthalmology*. 1966 Mar;50(3):119-23.
8. Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *Journal of neuroscience research*. 1999 Mar 1;55(5):578-87.
9. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*. 2000 Oct;24:253-69.
10. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2006;40:164-72.
11. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. 2000 Jun;71(6):1009-14.
12. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, et al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *The Journal of experimental medicine*. 1995 Jun 1;181(6):2213-20.
13. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell stem cell*. 2008 Sep 11;3(3):229-30.
14. 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 research & therapy*. 2016;7:33.
15. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(27):6320-44.
16. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(31):7892-927.
17. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2006 Dec;41(6):547-53.

18. Chen WC, Peault B, Huard J. Regenerative Translation of Human Blood-Vessel-Derived MSC Precursors. *Stem cells international*. 2015;2015:375187.
19. Chin S, Furukawa K, Ono A, Asari T, Harada Y, Wada K, et al. Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in ossified human spinal ligaments. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013 Jul 12;436(4):698-704.
20. Chitsazi MT, Mostofi Zadeh Farahani R, Pourabbas M, Bahaeddin N. Efficacy of open flap debridement with and without enamel matrix derivatives in the treatment of mandibular degree II furcation involvement. *Clinical oral investigations*. 2007 Dec;11(4):385-9.
21. Chitteti BR, Cheng YH, Kacena MA, Srour EF. Hierarchical organization of osteoblasts reveals the significant role of CD166 in hematopoietic stem cell maintenance and function. *Bone*. 2013 May;54(1):58-67.
22. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012 Dec;16(12):2851-60.
23. 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 11;3(3):301-13.
24. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
25. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells, tissues, organs*. 2002;170(2-3):73-82.
26. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2002 Dec;31(6):641-5.
27. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998 May;13(5):828-38.
28. 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.
29. El-Sayed KM, Paris S, Graetz C, Kassem N, Mekhemar M, Ungefroren H, et al. Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. *International journal of oral science*. 2015 Jun;7(2):80-8.
30. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensebe L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014 Jan;18(1):104-14.
31. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005 (4):CD003875.
32. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2226-32.
33. Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy, and ethics. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Nov;114(10):1364-70.
34. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*. 1970 Oct;3(4):393-403.

35. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1966 Dec;16(3):381-90.
36. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *Journal of cellular physiology*. 2008 Jun;215(3):743-9.
37. Gaspardone A, Menghini F, Mazzuca V, Skossyрева O, Barbato G, de Fabritiis P. Progenitor cell mobilisation in patients with acute and chronic coronary artery disease. *Heart*. 2006 Feb;92(2):253-4.
38. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & craniofacial research*. 2007 Aug;10(3):149-60.
39. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003 Oct;314(1):15-23.
40. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):3956-64.
41. Gokcinar-Yagci B, Uckan-Cetinkaya D, Celebi-Saltik B. Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering. *Stem cell reviews*. 2015 Aug;11(4):549-59.
42. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2003 Mar;74(3):391-401.
43. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4164-73.
44. Han P, Lloyd T, Chen Z, Xiao Y. Proinflammatory Cytokines Regulate Cementogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells by Wnt/Ca(2+) Signaling Pathway. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2016 May;36(5):328-37.
45. Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regenerative medicine*. 2009 Nov;4(6):809-21.
46. Hugoson A, Jordan T. Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1982 Aug;10(4):187-92.
47. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2012 Jun;59(1):203-27.
48. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy*. 2004;6(6):543-53.
49. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Australian dental journal*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S118-28.
50. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, et al. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *Journal of periodontology*. 2013 Oct;84(10):1425-33.
51. Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *Journal of clinical periodontology*. 2002;29 Suppl 3:103-16; discussion 60-2.

52. Kang Y, Wang F, Feng J, Yang D, Yang X, Yan X. Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells. *Cell research*. 2006 Mar;16(3):313-8.
53. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *Journal of clinical periodontology*. 1985 Jan;12(1):51-60.
54. Kawanabe N, Murakami K, Takano-Yamamoto T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Jun 16;344(4):1278-83.
55. Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, et al. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation; research in biological diversity*. 2010 Feb;79(2):74-83.
56. Kellner S, Kikyo N. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histology and histopathology*. 2010 Mar;25(3):405-12.
57. Kim SS, Kwon DW, Im I, Kim YD, Hwang DS, Holliday LS, et al. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments. *Korean journal of orthodontics*. 2012 Dec;42(6):307-17.
58. Kornman KS, Robertson PB. Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontology 2000*. 2000 Feb;22:22-43.
59. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.
60. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. 2009;51:239-51.
61. Lin TH, Gibon E, Loi F, Pajarinen J, Cordova LA, Nabeshima A, et al. Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF-kappaB activity. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2016 Apr 22.
62. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *Journal of dental research*. 2006 Jun;85(6):510-4.
63. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *Journal of clinical periodontology*. 1986 May;13(5):431-45.
64. Matic I, Antunovic M, Brkic S, Josipovic P, Mihalic KC, Karlak I, et al. Expression of OCT-4 and SOX-2 in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2016 Mar 15;4(1):9-16.
65. Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, Goncalves PF, Sallum EA, Casati MZ, et al. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *Journal of periodontal research*. 2011 Oct;46(5):629-36.
66. Mo M, Wang S, Zhou Y, Li H, Wu Y. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016 May 3.
67. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002 Mar;46(3):704-13.
68. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014 Apr;71(8):1353-74.

69. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*. 2006 Aug;41(4):303-10.
70. Needleman I, Tucker R, Giedrys-Leeper E, Worthington H. Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects--a Cochrane Systematic Review. *Periodontology 2000*. 2005;37:106-23.
71. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of clinical periodontology*. 2011 Aug;38(8):721-31.
72. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov 19;366(9499):1809-20.
73. Pluchino S, Muzio L, Imitola J, Deleidi M, Alfaro-Cervello C, Salani G, et al. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain : a journal of neurology*. 2008 Oct;131(Pt 10):2564-78.
74. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology 2000*. 2006;41:30-47.
75. Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *Journal of clinical periodontology*. 1987 Nov;14(10):618-20.
76. Psaltis PJ, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, et al. Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *Journal of cellular physiology*. 2010 May;223(2):530-40.
77. Queiroz LA, Santamaria M, Casati M, Silverio K, Nociti-Junior F, Sallum E. Enamel matrix protein derivative plus synthetic bone substitute for the treatment of mandibular Class II furcation defects: a case series. *Quintessence international*. 2015 Mar;46(3):199-205.
78. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem cell reviews*. 2011 Mar;7(1):64-76.
79. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dental clinics of North America*. 2010 Jan;54(1):55-71.
80. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2004 Dec;18(6):893-908.
81. Saito MT, Salmon CR, Amorim BR, Ambrosano GM, Casati MZ, Sallum EA, et al. Characterization of highly osteoblast/cementoblast cell clones from a CD105-enriched periodontal ligament progenitor cell population. *Journal of periodontology*. 2014 Jun;85(6):e205-11.
82. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental cell research*. 2003 Jul 15;287(2):289-300.
83. Sallay K. [Periodontal bone destruction]. *Fogorvosi szemle*. 1982 Aug;75(8):225-9.
84. Santamaria S, Sanchez N, Sanz M, Garcia-Sanz JA. Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies. *Clinical oral investigations*. 2016 Jun 6.

85. Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gehron Robey P. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2000 Jun 6;78(3):391-403.
86. Scavone A, Capiluppo D, Mazzocchi N, Crespi A, Zoia S, Campostrini G, et al. Embryonic stem cell-derived CD166+ precursors develop into fully functional sinoatrial-like cells. *Circulation research*. 2013 Aug 2;113(4):389-98.
87. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *Journal of clinical periodontology*. 2008 Sep;35(8 Suppl):106-16.
88. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.
89. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003 Apr;18(4):696-704.
90. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *The Journal of pathology*. 1999 Sep;189(1):4-11.
91. Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *Journal of periodontology*. 2010 Aug;81(8):1207-15.
92. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):55-62.
93. Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I. Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. *Tissue engineering Part A*. 2009 Sep;15(9):2625-36.
94. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell and tissue research*. 2003 Sep;313(3):281-90.
95. Stopp S, Bornhauser M, Ugarte F, Wobus M, Kuhn M, Brenner S, et al. Expression of the melanoma cell adhesion molecule in human mesenchymal stromal cells regulates proliferation, differentiation, and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica*. 2013 Apr;98(4):505-13.
96. Sun Y, Wang Y, Cao Q, Yu H, Zheng D, Wang Y, et al. Expression and Role of CD166 in the Chronic Kidney Disease. *Iranian journal of pediatrics*. 2015 Oct;25(5):e543.
97. Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest*. 1996 Feb;74(2):452-66.
98. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*. 2001 Sep;3(9):778-84.
99. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem cells*. 2008 Jan;26(1):99-107.
100. Troiano G, Laino L, Dioguardi M, Giannatempo G, Lo Muzio L, Lo Russo L. Mandibular Class II Furcation Defects Treatment: Effects of the Addition of Platelet Concentrates to Open Flap. A Systematic Review and Meta-analysis of RCT. *Journal of periodontology*. 2016 May 4:1-15.

101. Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, Marchisio M, Giancola R, Pizzicannella J, et al. Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2010 Oct;225(1):123-31.
102. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction*. 2004 Jun;19(6):1450-6.
103. van Kempen LC, Nelissen JM, Degen WG, Torensma R, Weidle UH, Bloemers HP, et al. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 13;276(28):25783-90.
104. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et al. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue engineering Part A*. 2011 Apr;17(7-8):1015-26.
105. Wanjare M, Kusuma S, Gerecht S. Perivascular cells in blood vessel regeneration. *Biotechnology journal*. 2013 Apr;8(4):434-47.
106. Wei B, Bai X, Chen K, Zhang X. SP600125 enhances the anti-apoptotic capacity and migration of bone marrow mesenchymal stem cells treated with tumor necrosis factor-alpha. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016 Jul 8;475(4):301-7.
107. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem cells and development*. 2009 Apr;18(3):487-96.
108. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:793823.
109. Zhu W, Tan Y, Qiu Q, Li X, Huang Z, Fu Y, et al. Comparison of the properties of human CD146+ and CD146- periodontal ligament cells in response to stimulation with tumour necrosis factor alpha. *Archives of oral biology*. 2013 Dec;58(12):1791-803.
110. 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. *Molecular biology of the cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas em Humanos




COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Identificação de pericitos no ligamento periodontal e sua caracterização como células mesenquimais indiferenciadas", protocolo nº 054/2015, dos pesquisadores Karina Gonzales Silverio Ruiz e Mércia Jussara da Silva Cunha, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/06/2015.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "Identification of pericytes in periodontal ligament and characterization as mesenchymal stem cells", register number 054/2015, of Karina Gonzales Silverio Ruiz and Mércia Jussara da Silva Cunha, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Jun 10, 2015.



Prof. Dra. Fernanda Miori Pascon
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 - Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas em Animais

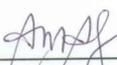
CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

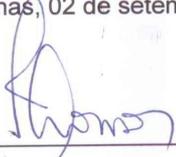
Certificamos que o projeto "Identificação de células mesenquimais indiferenciadas nos tecidos periodontais durante a evolução da doença periodontal experimental" (protocolo nº 3131-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz / Mércia Jussara Da Silva Cunha, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de setembro de 2013.

Campinas, 02 de setembro de 2013.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva