

RAUL CANAL

**Avaliação do comportamento de células *osteolike* derivadas do  
periósteo cultivadas em ambiente de microgravidade simulada**

CAMPINAS

2025

RAUL CANAL

**Avaliação do comportamento de células *osteolike* derivadas do periósteo cultivadas em ambiente de microgravidade simulada**

Tese apresentada ao Centro de Pós-Graduação/CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Legal.

Orientador: Prof. Dr. André Antonio Pelegrine.

Formato: Artigo científico

CAMPINAS

2025

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS  
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

**Folha de Aprovação**

**PARA:**

Curso: Doutorado em Odontologia - área de concentração: Odontologia Legal.

Título da Dissertação ou Tese: Avaliação do comportamento de células osteolike derivadas do periôsteo cultivadas em ambiente de microgravidade simulada

Data defesa: .....

Informamos que aquela dissertação ou tese acima apontada foi apresentada por seu titular a Diretoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, perante a Comissão examinadora abaixo nominada, e cumpriu todas as exigências feitas por aquela Comissão tendo sido aprovada e recebido a competente liberação sob a supervisão da docência da orientação.

Campinas, .....

Prof. Dr. André Antonio Pelegrine  
Presidente

Prof. Dr. Antonio Carlos Aloise  
Membro Interno

Prof. Dr. Ademir Franco do Rosário Júnior  
Membro Interno

Membro Externo

Membro Externo

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada esposa, Fabiana Mancuso Attié Canal.

Com um coração repleto de gratidão, dedico este trabalho a você, que foi meu alicerce, meu apoio constante e a fonte de força durante todos os desafios desta jornada. Nos três anos de doutorado, você se tornou a minha base, compartilhando não só os momentos de vitória, mas também as dificuldades, as incertezas e as longas horas de dedicação.

A sua paciência, compreensão e amor foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente. Sei o quanto você abriu mão de momentos juntos, da sua própria paz e do seu tempo, para que eu pudesse me dedicar ao que parecia ser um caminho árduo e solitário. Seu apoio incondicional foi o que me manteve motivado quando as forças pareciam se esgotar.

Agradeço, do fundo do meu coração, por cada sorriso nos momentos mais difíceis, por cada palavra de incentivo quando a jornada parecia longa demais e por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava de mim mesmo. Este título é, também, seu. Você esteve comigo em cada passo, mesmo quando não podia ver ou entender o quanto cada desafio estava me consumindo.

Eu te amo e sou eternamente grato por tudo o que você fez por mim e pela nossa família, permitindo que este sonho se tornasse realidade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha mais sincera gratidão ao meu orientador Professor Doutor André Pelegrine por sua orientação impecável e apoio incondicional ao longo de toda a minha jornada doutoral. Sua expertise, dedicação e paciência foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. A sua constante disposição em me guiar nos momentos de incerteza e a confiança depositada em meu potencial, mesmo diante dos desafios, foram fontes de motivação que me impulsionaram a seguir em frente. Dr. Pelegrine chegou a transferir sua residência, temporariamente, para os Estados Unidos, ao longo de todo ano de 2023, acompanhado da esposa e duas filhas, a fim de dedicar-se integralmente à pesquisa junto ao laboratório da Universidade da Flórida, em Gainesville.

Gostaria também de agradecer à minha coorientadora, Professora Doutora Elizabeth Martinez, cujas contribuições valiosas, ideias inovadoras e olhar crítico foram essenciais para a realização deste projeto. Sua orientação minuciosa, tanto em relação ao desenvolvimento experimental quanto à análise dos resultados, foi indispensável para o avanço das pesquisas. Ela também se transferiu para a Flórida, acompanhada da filha adolescente e deixando o marido por um ano do Brasil. Dra. Martinez e Dr. Pelegrine vararam madrugadas no frio do laboratório, lidando com tubos, células, clinostatos, numa interminável repetição de ações e constante observação comportamental. Sem o trabalho de ambos, minha pesquisa não teria sido possível.

Agradeço, ainda, a todos os membros do grupo de pesquisa, Dr. José Ricardo Ferreira Muniz, Dr. Roberto Fanganiello, Dra. Yasmim Miranda e Dra. Fernanda Bombaldi, pela troca constante de ideias, pelo ambiente colaborativo e pelo apoio técnico e científico. A convivência com todos foi enriquecedora e estimulante, tornando esta jornada ainda mais especial.

Um agradecimento especial ao Jeff Michaelis da Michaelis Foundation For Global Education, à Dra. Jamie Foster pesquisadora do Space Life Science Lab, do Kennedy Space Center e ao Dr. Shannon Holliday, professor e pesquisador da Faculdade de Odontologia da Universidade da Flórida.

Agradeço também ao Professor Doutor Ademir Franco, coordenador do doutorado da Faculdade São Leopoldo Mandic, pela sua paciência, carinho e escuta ativa. Minha gratidão também à Professora Doutora Juliana Napimoga e a toda a sua equipe, notadamente o corpo docente da pós-graduação da SLM.

Por fim, sou grato a todos que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso desta pesquisa e para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Sem o apoio de cada um, esta realização não seria possível.

## EPÍGRAFE

*“Fica sempre um pouco de perfume  
nas mãos que oferecem rosas”*

Alberto Costa

## RESUMO

A microgravidade causa danos aos ossos ao prejudicar os osteoblastos e diminuir a densidade óssea ao longo do tempo. O periósteo contém células osteogênicas que têm funções importantes na homeostase óssea, mas ainda não foram estudadas em condições de microgravidade. Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de células *osteolike* do periósteo palatino humano cultivadas em microgravidade simulada. Células-tronco mesenquimais derivadas do periósteo foram induzidas à diferenciação osteogênica. Células *osteolike* do periósteo foram então expostas à microgravidade simulada (SMG) usando um clinostato 3D por até 48 horas. Como controle, células *osteolike* derivadas do periósteo foram mantidas em condições idênticas, mas sem exposição à microgravidade. A viabilidade celular, os analitos relacionados à osteogênese e a expressão gênica foram analisados em 3, 24 e 48 horas. A viabilidade celular sob microgravidade foi menor do que em controles de gravidade normal após 3 horas, mas foi significativamente maior após 24 horas. Não houve diferença entre os grupos em 48 horas. Houve uma maior expressão de vias associadas à inflamação em 3 horas, que foi atenuada em 24 horas e neutralizada em 48 horas. Notavelmente, células *osteolike* derivadas do periósteo cultivadas em microgravidade demonstraram três características, pelo menos em um dos três momentos, que podem corroborar um comportamento pró-osteogênico: (1) níveis mais elevados de osteoprotegerina, um inibidor de osteoclastos, e insulina, que facilitam a deposição da matriz óssea; (2) níveis mais baixos de DKK1 e TNF, o que favorece a diferenciação dos osteoblastos; e (3) regulação positiva de genes relacionados à osteogênese. Nossos dados sugerem que células *osteolike* derivadas do periósteo exibem comportamento pró-osteogênico incrementado em microgravidade simulada.

**Palavras-Chave:** Osteogênese; Periósteo; Células osteogênicas; Microgravidade simulada; Expressão gênica; Secretoma

## ABSTRACT

Microgravity causes damage to bones by impairing osteoblasts and decreasing bone density over time. Periosteum contains osteogenic cells that have important functions in bone homeostasis but has not yet been studied under microgravity conditions. This study aimed to evaluate the behavior of osteoblast-like cells from the human palatal periosteum cultured under simulated microgravity. Periosteum derived mesenchymal stem cells were induced to osteogenic differentiation. Periosteum osteoblast-like cells were then exposed to simulated microgravity (SMG) using a 3D clinostat for up to 48 hours. As a control, periosteum-derived osteoblast-like cells were maintained under identical conditions but without microgravity exposure. Cell viability, osteogenesis-related analytes and gene expression were analyzed at 3, 24 and 48 hours. Cell viability under microgravity was lower than in normal gravity controls after 3 hours but was significantly higher after 24 hours. There was no difference between the groups at 48 hours. There was a higher expression of pathways associated with inflammation at 3 hours, which was attenuated by 24 hours and neutralized at 48 hours. Notably, osteoblast-like cells derived from the periosteum cultivated under microgravity demonstrated three characteristics, at least in one of the three timepoints, that may support a pro-osteogenic behavior: (1) higher levels of osteoprotegerin, an osteoclast inhibitor, and insulin, which facilitate bone matrix deposition; (2) lower levels of DKK1 and TNF, that favor osteoblast differentiation; and (3) upregulation of genes related to osteogenesis. Our data suggest that periosteum-derived osteoblast-like cells exhibit enhanced pro-osteogenic behavior in simulated microgravity.

**Keywords:** Osteogenesis; Periosteum; Osteogenic cells; Simulated microgravity; Gene expression; Secretome

## **LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

- ACP – análise de componentes principais  
ACTH – hormônio adrenocorticotrófico  
BMP – proteína óssea morfogenética  
BM-MSCs – células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea  
DP – desvio padrão  
EGR – resposta de crescimento precoce  
FGF – fator de crescimento fibroblástico  
IL – interleucina  
MMP – metaloproteinase da matriz  
mRNA – RNA mensageiro  
NG – normogravidade  
OC – osteocalcina  
OPG – osteoprotegerina  
OPN – osteopontina  
PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas  
P-MSCs – células-tronco mesenquimais derivadas do periôsteo  
PTH – hormônio da paratireoide  
RPM – máquina de posicionamento aleatório  
SMG – microgravidade simulada  
TGF – fator de crescimento transformador  
TNF – fator de necrose tumoral

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DO CONHECIMENTO**

A microgravidade é a influência mais significativa ao organismo humano no espaço, impactando negativamente o tecido ósseo. Essa condição afeta células responsáveis pela formação óssea (osteoblastos) e contribui para a diminuição da densidade óssea ao longo do tempo. No entanto, apenas osteoblastos provenientes do interior do osso (endósteo) haviam sido estudados em microgravidade até o presente momento. Contudo, também existem células ósseas na membrana que reveste a parte externa do osso (periósteo) que ainda não haviam sido estudadas neste ambiente. Com isso, o nosso grupo de pesquisa, apoiado pela Faculdade São Leopoldo Mandic, pela ANADEM e pelo Kennedy Space Center International Academy (KSCIA), obteve permissão para estudar o comportamento de células semelhantes ao osteoblasto (*osteolike*) provenientes do periósteo em um simulador de microgravidade (clinostato), dentro do Laboratório de Ciências da Vida Espacial (Space Life Sciences Lab) do Kennedy Space Center (Merritt Island, EUA) e da Universidade da Florida (Gainesville, EUA). As células foram mantidas por um período de até 48 horas nos clinostatos, sendo o seu comportamento comparado ao de células mantidas fora do equipamento (em uma condição de gravidade normal). Os resultados mostraram que as células *osteolike* do periósteo performaram de uma maneira diferente daquilo que já conhecíamos sobre as células provenientes do endósteo. Além da viabilidade das células do periósteo não ter sido diminuída após 48 horas em microgravidade simulada, elas produziram níveis mais elevados de proteínas que inibem a reabsorção óssea e de proteínas que facilitam a deposição da matriz óssea. Além disso, as células do periósteo cultivadas em microgravidade simulada apresentaram uma expressão maior de genes relacionados à formação óssea. Com isso, nossos dados sugerem que as células *osteolike* derivadas do periósteo exibem comportamento que favorece a formação óssea quando da permanência em microgravidade simulada (por um período de 48 horas). A geração deste conhecimento pode contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento de condições que culminam com a diminuição da densidade óssea, tais como viagens espaciais de longa duração, pacientes acamados e osteoporose.

## **SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os osteoblastos são células ósseas que possuem o potencial de depositar matriz óssea e podem ser provenientes do endósteo/medula óssea ou do periôsteo (Ten Cate et al., 2008). Essas células vêm sendo estudadas em ambientes microgravitacionais, já que é consensual o entendimento de que viagens espaciais de longa duração levam a uma significativa redução da densidade óssea. Apesar de algumas células apresentarem um potencial aumentado em microgravidade, tais como células progenitoras endoteliais, as quais revelam aumento da capacidade angiogênica no ambiente de microgravidade (Grimm et al., 2020), a literatura científica vem mostrando que as células osteoblásticas são afetadas negativamente pela microgravidade (Sonawane et al., 2025). Segundo Shi et al. (2025), a exposição de células ósseas à microgravidade reduziu a expressão de marcadores de diferenciação de osteoblastos e promoveu a fissão mitocondrial, conforme indicado por um aumento nas mitocôndrias puntiformes, uma diminuição no comprimento mitocondrial e uma redução na densidade das cristas.

A microgravidade vem sendo associada a um risco aumentado de fraturas ósseas (Baran et al., 2022), pois leva a uma diminuição tanto do número quanto da função dos osteoblastos envolvidos no processo de formação óssea (Hughes-Fulford & Lewis, 1996). Essa redução na formação óssea, associada à regulação prejudicada da reabsorção óssea pelos osteoclastos (Nabavi et al., 2011), resulta em perda óssea. Wang et al. (2025), ao estudarem o comportamento de osteoblastos provenientes do endósteo de ratos cultivados em microgravidade simulada, observaram a ocorrência de piroptose, a qual é um tipo de morte celular programada que se distingue da apoptose por ser um processo inflamatório. No entanto, os estudos sobre microgravidade tradicionalmente se concentram exclusivamente em células osteoblásticas provenientes do interior do tecido ósseo (endósteo/medula óssea), sem qualquer ênfase na investigação do desempenho de células osteoblásticas derivadas do periôsteo.

O periôsteo é uma membrana altamente vascularizada que reveste a superfície externa dos ossos, servindo como uma região de transição entre o

osso cortical e o tecido mole ou musculatura suprajacente. Ele é composto por duas camadas distintas: uma externa fibrosa e uma interna rica em células progenitoras osteogênicas. Essa estrutura desempenha um papel crucial na regeneração óssea, servindo como uma fonte significativa de células-tronco mesenquimais com alto potencial osteogênico. Estudos recentes destacam o periósteo como uma fonte primária de células-tronco esqueléticas essenciais para a reparação óssea. Essas células demonstram uma capacidade notável de diferenciação em linhagens osteogênicas e condrogênicas, contribuindo significativamente para a regeneração do osso e da medula óssea após lesões (Ono, 2022).

O periósteo possui extrema contribuição no processo de cicatrização óssea, sendo o principal responsável pela formação do calo ósseo quando da cicatrização de uma fratura óssea (Lin et al., 2014). Alguns dados sugerem que as células derivadas do periósteo possuem maior potencial de regeneração óssea do que células da medula óssea (Groeneveldt et al., 2020). Zhu et al. (2006) compararam, em um estudo em modelo animal, o potencial osteogênico de células da medula óssea, do osso alveolar e do periósteo, e verificaram que as células periosteais apresentaram o maior potencial para regeneração óssea. Neste sentido, Pranskunas et al. (2021) evidenciaram que proteínas secretadas por células-tronco derivadas do periósteo podem estimular a osteogênese, neurogênese e angiogênese, além de ter propriedades imunológicas.

Tecidos provenientes de ossos craniofaciais tendem a apresentar maior *turnover*, envelhecimento mais lento, e possuir mais marcadores osteoblásticos quando comparados com tecidos esqueletais apendiculares, como os da tíbia (Groeneveldt et al., 2020). Células-tronco periosteais promovem osteoblastos responsáveis pela formação óssea e favorecem a regeneração de vasos sanguíneos e nervos. O periósteo é facilmente acessível por meio de uma camada superficial na cavidade oral por toda a vida, o que representa uma vantagem com relação ao tecido fonte (Nagata et al., 2012). Células obtidas do periósteo oral demonstraram forte comprometimento com a linhagem osteoblástica em cultura (Ceccarelli et al., 2016; Pelegrine et al., 2024). Em geral, células-tronco derivadas do periósteo de regiões craniofaciais apresentam

maiores taxas de renovação, níveis elevados de marcadores ósseos e um processo de senescência mais lento em comparação às células-tronco provenientes de tecidos esqueléticos apendiculares, tais como a tíbia (Pranskunas et al., 2021).

Por ser uma membrana localizada externamente ao tecido mineralizado e de não ter uma função estrutural como a do osso, o periósteo é obviamente menos sujeito ao estresse mecânico (ou ausência de carga mecânica). Dessa forma, como a exposição à microgravidade tem sido associada à perda óssea semelhante à osteoporose, principalmente devido à redução da carga mecânica no esqueleto (Nabavi et al., 2011), nosso grupo levantou a hipótese de que células semelhantes a osteoblastos de tecidos menos expostos à carga mecânica, tal como o periósteo, podem exibir respostas diferentes daquelas localizadas em áreas de alta carga. Nesse contexto, como o periósteo é uma membrana que contém células osteogênicas intimamente associadas ao tecido ósseo, mas não inseridas nele, com total ausência de componentes estruturais ou mineralizados, é concebível que células *osteolike* do periósteo possam ser mais resistentes aos efeitos deletérios da microgravidade.

Como muitos tecidos adjacentes apresentam um mecanismo homeostático, onde células de um tecido frequentemente compensam o déficit de outro tecido correlacionado, é plausível especular que células periosteais semelhantes a osteoblastos (*osteolike*) podem até mesmo exibir potencial osteogênico aumentado sob microgravidade para contrabalançar danos às células endosteais. Esta hipótese é apoiada por evidências de que o periósteo pode aumentar a sua espessura, potencialmente levando ao aumento do osso cortical subjacente, em resposta a estímulos traumáticos (Tufts et al., 1982; Arni et al., 2009), infecciosos/inflamatórios (Hovmark et al., 1986) e farmacológicos (Hosokawa et al., 2020), indicando que é um tecido extremamente reativo. O estabelecimento dessa hipótese foi o principal motivo para o desenvolvimento do presente estudo, onde compararmos a performance de células *osteolike* derivadas do periósteo cultivadas em normogravidade com o comportamento dessas células cultivadas em ambiente de microgravidade simulada.

Com isso, para este estudo foi selecionado como tecido fonte o periósteo do palato, seguindo-se metodologias de coleta e cultivo celular previamente validados cientificamente pelo nosso grupo (Pelegrine et al., 2024). A confirmação da hipótese de que o cultivo de células *osteolike* provenientes do periósteo em microgravidade possa gerar um incremento no potencial osteogênico dessas células poderá abrir um novo campo de estudo para tratamento de desordens ósseas como a osteoporose, a qual afeta 1 em cada 10 pessoas com mais de 50 anos nos EUA (Wright et al., 2014).

## 2 ARTIGO

### **Comportamento pró-osteogênico aprimorado em células semelhantes a osteoblastos derivadas do periósteo sob microgravidade simulada**

#### **INTRODUÇÃO**

O periósteo é um tecido que reveste a superfície externa dos ossos e serve como zona de transição entre o osso cortical e os tecidos moles e músculos circundantes. Ele contém células osteogênicas que regulam a forma externa do osso e se coordenam com o endósteo cortical interno para controlar a espessura cortical, bem como o tamanho e o posicionamento espacial do osso[1]. As células-tronco mesenquimais derivadas do periósteo (P-MSCs) contribuem para a regeneração óssea e têm sido consideradas superiores às células derivadas da medula óssea nesse aspecto[2]. Além disso, o periósteo é a principal fonte de formação de calo durante a consolidação óssea[3] e, devido à sua alta vascularização, abriga muitos pericitos endoteliais[4].

De acordo com Pranskunas et al.[5], as proteínas secretadas pelas P-MSCs podem estimular a osteogênese, a neurogênese e a angiogênese, além de apresentar propriedades imunológicas. Foi descoberto que xenoenxertos biocerâmicos implantados com proteínas secretadas pelas P-MSCs aumentam a formação de novo osso. As P-MSCs foram isoladas de diversas localizações anatômicas, incluindo o joelho[6], o osso mastoide[7], a tíbia[8], o fêmur[9] e vários sítios orais[10,11]. Células obtidas do periósteo oral exibiram um forte comprometimento com a linhagem osteoblástica em cultura[10,11]. Em geral, as P-MSCs de regiões craniofaciais apresentam maiores taxas de renovação, níveis elevados de marcadores ósseos e um processo de senescência mais lento em comparação com as P-MSCs derivadas de tecidos esqueléticos apendiculares, como a tíbia[5].

O robusto potencial osteogênico e o perfil fisiológico distinto das P-MSCs, quando comparados a outras fontes de células mesenquimais, podem oferecer vantagens únicas em contextos em que a homeostase óssea é comprometida, como em condições de microgravidade encontradas durante voos espaciais.

Com a crescente ênfase na saúde dos astronautas durante missões espaciais de longa duração, a pesquisa em biologia espacial tem se concentrado cada vez mais em questões de saúde associadas à microgravidade[12-14]. Em termos de tecido ósseo, a microgravidade está associada a um risco aumentado de fraturas[15], principalmente devido à diminuição do número e da função dos osteoblastos envolvidos na formação óssea[16]. Essa redução na formação óssea, aliada à regulação prejudicada da reabsorção óssea pelos osteoclastos[17], resulta em perda óssea. No entanto, estudos sobre microgravidade tradicionalmente se concentram exclusivamente em células osteoblásticas derivadas de tecido ósseo (endósteo/medula óssea), sem investigar o desempenho de células osteoblásticas derivadas do periôsteo.

Dado que a exposição à microgravidade tem sido associada à perda óssea semelhante à osteoporose, principalmente devido à redução da carga mecânica sobre o esqueleto[17], nosso grupo levantou a hipótese de que células osteoblásticas de tecidos menos expostos à carga mecânica podem apresentar respostas diferentes daquelas localizadas em áreas de alta carga. Nesse contexto, como o periôsteo é uma membrana contendo células osteogênicas intimamente associadas ao tecido ósseo, mas não inseridas nele, carecendo de componentes estruturais ou mineralizados, é concebível que células periosteais semelhantes a osteoblastos possam ser mais resistentes aos efeitos deletérios da microgravidade.

O periôsteo e o endósteo, ambos considerados fontes primárias de células formadoras de osso durante a regeneração[18], ocupam compartimentos diferentes separados pelo osso cortical, contribuindo, assim, de forma diferente para a fisiologia óssea, mantendo *pools* celulares distintos[19]. Com base no princípio da homeostase entre tecidos correlacionados, onde células de um tecido frequentemente compensam o déficit de um tecido adjacente, é plausível especular que células periosteais semelhantes a osteoblastos podem até mesmo exibir potencial osteogênico aumentado sob microgravidade para contrabalançar os danos às células endosteais. Essa hipótese é provisoriamente apoiada por achados na dentina, que é outro tecido mineralizado. Está bem estabelecido que a polpa dentária, um tecido conjuntivo dinâmico circundado por dentina, desempenha um papel protetor ao induzir a dentinogênese, com deposição de

dentina terciária em resposta a lesões, como cárie, trauma ou infiltração microbiana[20]. Como resultado, vários estudos têm tentado desenvolver produtos terapêuticos que mimetizem a formação fisiológica da dentina terciária, por exemplo, no tratamento da hipersensibilidade dentinária em casos de perda de dentina[21-23]. Se o periôsteo, assim como a polpa dentária, um tecido conjuntivo dinâmico adjacente a estruturas mineralizadas, responder a desafios externos (como a microgravidade) de maneira semelhante, promovendo a mineralização, ele também pode servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos para tratar distúrbios ósseos. Essa hipótese é corroborada por evidências de que o periôsteo pode engrossar, potencialmente levando ao aumento do osso cortical subjacente, em resposta a estímulos traumáticos[24,25], infecciosos/inflamatórios[26] e farmacológicos[27], indicando que se trata de um tecido extremamente reativo. Embora numerosos estudos tenham avaliado o comportamento de células derivadas do endôsteo e da medula óssea em microgravidade, até o momento, nenhuma publicação investigou células periosteais nesse contexto.

Portanto, se a hipótese for confirmada – de que o cultivo de células osteoblásticas derivadas do periôsteo em microgravidade simulada aumenta seu potencial osteogênico – uma nova linha de pesquisa pode surgir para o tratamento de distúrbios ósseos como a osteoporose, que afeta um em cada dez indivíduos com mais de 50 anos nos Estados Unidos[28]. Além disso, considerando a perda significativa de densidade óssea experimentada por astronautas durante voos espaciais prolongados[15], o uso do estressor ambiental microgravidade como uma ferramenta potencial para a regeneração óssea pode representar uma dicotomia fascinante. Apesar da reconhecida importância do periôsteo no metabolismo e reparo ósseo, e dos efeitos prejudiciais da microgravidade na densidade óssea[29], a falta de estudos que avaliem o comportamento de células osteoblásticas derivadas do periôsteo em microgravidade chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa. Este estudo teve como objetivo avaliar células semelhantes a osteoblastos derivadas do periôsteo palatino humano, cultivadas em condições simuladas de microgravidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas, Brasil) sob o protocolo CAAE nº 56896122.3.0000.5374.

### **Cultura de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas do Periósteo**

Células-tronco mesenquimais adultas de um único doador foram isoladas do periósteo palatino, cultivadas, validadas e criopreservadas pela R-Crio Criogenia S.A. (Campinas, SP, Brasil), seguindo uma metodologia previamente publicada[11]. As células foram semeadas a uma densidade de 110 células/mm<sup>2</sup> em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Hildesheim, Alemanha) contendo DMEM de baixa glicose (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA), 100 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, EUA) e 100 µM de ácido ascórbico (Sigma St. Louis, EUA). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias, e a progressão da cultura foi monitorada usando um microscópio de contraste de fase invertido até que as células atingissem 80% de confluência.

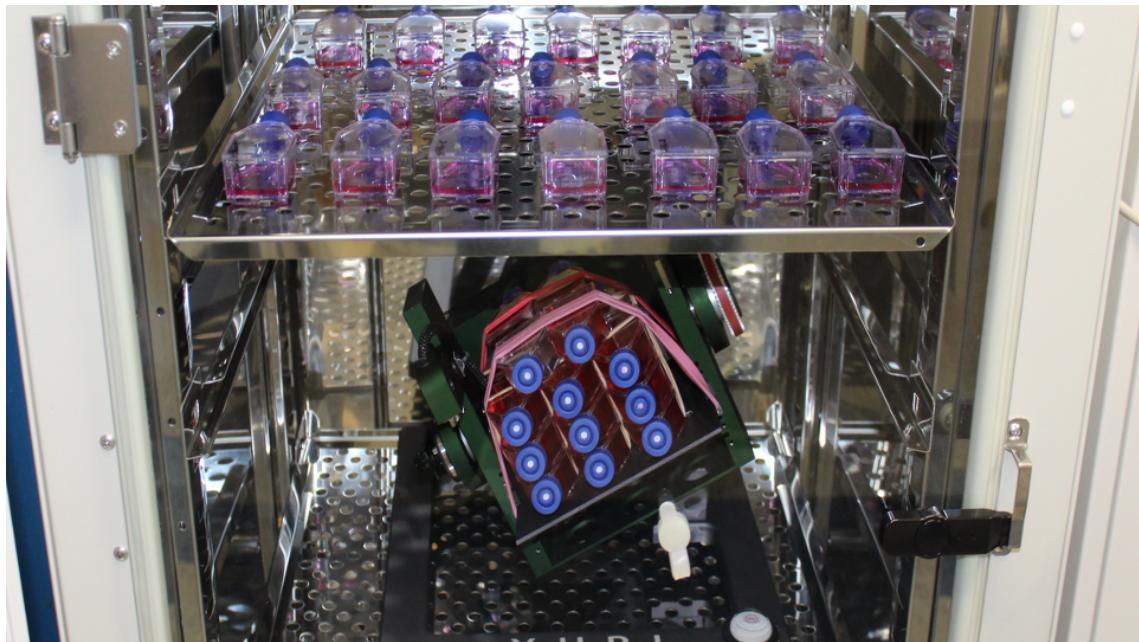
### **Diferenciação Osteogênica**

As células foram semeadas a uma densidade de 110 células/mm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, 7 mM de β-gliceroftofato, 0,1 µM de dexametasona e 50 µM de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, EUA), e mantidas por 14 dias.

### **Ambiente de Microgravidade Simulada (SMG)**

A microgravidade foi simulada utilizando um clinostato 3D RPM 2.0 (Yuri Gravity, Meckenbeuren, Alemanha) no Laboratório de Ciências da Vida Espacial (SLSL - Merritt Island, FL, EUA). Os frascos de cultura foram cuidadosamente preenchidos com meio, garantindo a ausência de bolhas de ar para evitar a tensão de cisalhamento do fluido. Os frascos foram selados com uma tampa sem filtro, para evitar vazamentos, o que impediu a troca gasosa durante o experimento. Os frascos foram fixados na plataforma do dispositivo e, em

seguida, colocados em uma incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Fisher, Waltham, EUA). Células osteoblásticas derivadas do periósteo foram expostas a um ambiente de SMG (<10<sup>-3</sup>g) por até 48 horas a 37°C. Como controle, células osteoblásticas derivadas do periósteo foram mantidas em condições idênticas, mas sem exposição à microgravidade (1g) (Figura 1).



**Figura 1. Imagem dos frascos contendo as células utilizadas no estudo, dispostos dentro da incubadora.** Os frascos do grupo controle (1 g) foram colocados na prateleira superior, e os frascos do grupo teste (microgravidade) foram posicionados na prateleira inferior, dentro do dispositivo clinostato 3D RPM 2.0.

### **Viabilidade Celular**

Células osteoblásticas cultivadas em diferentes condições foram avaliadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT. 3, 24 e 48 horas após o plaqueamento celular, 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) diluída em solução isenta de soro (DMEM Sigma, St. Louis, EUA) foram adicionados às culturas tratadas, que foram então incubadas por 3 horas a 37°C. Após o período de incubação, 100 µL de solução de DMSO (dimetilsulfóxido) a 10%, LGC, São Paulo, Brasil) foram adicionados. Após a solubilização dos cristais, a absorbância foi medida a 590 nm utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Epoch Biotek Instruments, Vermont, EUA). Os valores de densidade óptica

foram registrados. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas para cada ponto temporal.

### **Análise de Analitos Relacionados à Osteogênese**

Após 3, 24 e 48 horas, o sobrenadante foi coletado para ambas as condições (1 g e  $<10^{-3}$  g) e armazenado a -20 °C para análise subsequente. Todas as análises foram realizadas no Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia (ICBR) da Universidade da Flórida, FL, EUA. Os níveis de 12 biomarcadores humanos relacionados aos ossos — hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), dickkopf-1 (DKK-1), IL-6, insulina, leptina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), esclerostina (SOST), IL-1 $\beta$ , hormônio da paratireoide (PTH) e fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) — foram medidos usando um imunoensaio multiplex baseado em esferas fluorescentes com kits disponíveis comercialmente (Milliplex® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A, HCYTA-60K, EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA; Milliplex® Human Bone Magnetic Bead Panel, HBNMAG-51K, EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA) e um leitor de placas (Magpix®, EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram relatados como concentração total de analito (pg/mL) por célula, destacando as diferenças entre as condições e os pontos temporais.

### **Análise da Expressão Gênica**

O RNA total foi extraído de células osteoblásticas derivadas do periôsteo cultivadas e preparado utilizando o Kit de Preparação de Bibliotecas de mRNA Stranded TruSeq® Illumina (Illumina, San Diego, EUA), que inclui seleção de poli(A) para enriquecimento de mRNA e incorporação de informações específicas da fita. As bibliotecas foram quantificadas, agrupadas e sequenciadas em uma plataforma Illumina NovaSeqX para gerar leituras de 150 pb pareadas. Os dados de sequenciamento de RNA bruto foram processados utilizando um pipeline padrão de RNA-seq, conforme descrito abaixo. A qualidade das leituras foi avaliada utilizando FastQC (v0.11.9), e as leituras de baixa qualidade e as sequências adaptadoras foram aparadas utilizando fastp.

As leituras de alta qualidade foram então alinhadas ao genoma de referência humano GRCh38 utilizando o alinhador STAR (v2.7.10a).

A quantificação gênica foi realizada utilizando featureCounts para produzir matrizes de contagem bruta para cada amostra. A análise de expressão diferencial foi avaliada usando DESeq2, aplicando normalização do tamanho da biblioteca e um modelo linear generalizado binomial negativo para identificar alterações transpcionais estatisticamente significativas entre as condições.

A visualização dos dados foi conduzida em R, incluindo análise de componentes principais (ACP) para avaliar o agrupamento de amostras, mapa de calor para representar perfis de expressão global e *volcano plot* para destacar genes com alterações significativas de expressão.

### Análise Estatística

Para a viabilidade celular e a análise do analito, após a realização de avaliações descritivas e exploratórias dos dados, e após a verificação de que os pressupostos para a aplicação de um modelo linear geral não foram atendidos, modelos lineares generalizados foram ajustados para avaliar os principais efeitos de grupo, tempo e sua interação. Todas as análises foram realizadas no software R, com nível de significância de 5%.

Para a expressão gênica, a análise da expressão diferencial foi realizada utilizando o pacote DESeq2 (v1.38.0) em R. As matrizes de contagem bruta foram normalizadas utilizando o método interno do DESeq2, que estima fatores de tamanho para ajustar as diferenças no tamanho da biblioteca e na profundidade do sequenciamento. Um modelo linear generalizado binomial negativo foi ajustado para cada gene para comparar a expressão entre as condições experimentais em cada ponto no tempo. Os valores de p resultantes foram ajustados utilizando o método de Benjamini-Hochberg para controlar a taxa de falsa descoberta. Genes com valor de p ajustado (*padj*) < 0,05 e variação absoluta do  $\log_2$  vezes ( $|\log_2\text{FC}|$ ) > 2 foram considerados significativamente diferencialmente expressos.

## RESULTADOS

### Viabilidade Celular

Os resultados de viabilidade celular para células-tronco mesenquimais diferenciadas no fenótipo osteoblástico são apresentados na Tabela 1. Observou-se uma diminuição na viabilidade celular em condições simuladas de microgravidade (SMG) em comparação com normogravidade (NG) após 3 horas de exposição. Após 24 horas, foi detectada maior viabilidade celular em SMG ( $<10^{-3}g$ ) em comparação com NG (1g). Em 48 horas, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular entre as condições estudadas.

**Tabela 1. Média (desvio padrão) de absorbância (densidade óptica a 590 nm) obtida do ensaio de MTT celular, usado para avaliar a viabilidade de (valores de absorbância) para células semelhantes a osteoblastos em normogravidade (1g) e microgravidade simulada ( $<10^{-3}g$ ) em diferentes pontos de tempo.**

Tempo	Condição Experimental	
	NG (1g)	SMG ( $<10^{-3}g$ )
	Média (DP)	Média (DP)
Baseline	2.29 (0.19)	-
3 horas	2.36 (0.06) Ac	2.25 (0.06) Bb
24 horas	*2.64 (0.06) Bb	*2.84 (0.11) Aa
48 horas	*2.93 (0.07) Aa	*2.89 (0.14) Aa

\*Diferente do grupo avaliado em baseline ( $p \leq 0,05$ ).  $p(\text{grupo})=0,8495$ ;  $p(\text{tempo})<0,0001$ ;  $p(\text{interação})=0,0002$ . Letras diferentes (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). NG = Normogravidade; SMG = Microgravidade simulada.

### Expressão de Analitos Relacionados à Osteogênese

Os resultados do fenótipo osteogênico estão resumidos na Tabela 2. Células osteolike expostas à SMG ( $<10^{-3}g$ ) exibiram consistentemente níveis mais elevados de osteoprotegerina (OPG) em todos os momentos, em comparação com os controles NG (1g) ( $p < 0,05$ ). Em 24 e 48 horas, os níveis de insulina também aumentaram significativamente sob SMG ( $<10^{-3}g$ ) em comparação com

NG ( $p < 0,05$ ). Em 48 horas, as células em SMG ( $<10^{-3}g$ ) apresentaram secreção reduzida de DKK1 e TNF, juntamente com níveis reduzidos de interleucina-6 (IL-6) em 24 e 48 horas, em relação à NG ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2. Média e desvio padrão das concentrações de analito (pg/mL) associadas ao fenótipo osteogênico medido pelo ensaio Luminex em células semelhantes a osteoblastos cultivadas em condições de normogravidade (1g) e microgravidade simulada ( $<10^{-3}g$ ).**

Variável	Tempo	Experimental Condition	
		NG	SMG
		Média (DP)	Média (DP)
ACTH	Baseline	2.26 (0.03)	-
	3 horas	2.22 (0.06) Aa	2.18 (0.02) Aa
	24 horas	2.20 (0.17) Aa	2.36 (0.09) Aa
	48 horas	2.41 (0.10) Aa	*3.56 (2.24) Aa
p-values		p(grupo)=0.2853; p(tempo)=0.1228; p(interação)=0.4107; p(grupo controle)=0.0469	
DKK1	Baseline	26.68 (3.71)	-
	3 horas	*5.62 (0.40) Ac	*4.89 (0.80) Ab
	24 horas	*420.40 (13.64) Ab	*514.41 (113.42) Aa
	48 horas	*741.15 (18.41) Aa	*468.87 (59.53) Ba
p-values		p(grupo)=0.0256; p(tempo)<0.0001; p(interação)=0.0002; p(grupo controle)<0.0001	
IL6	Baseline	26.25 (2.21)	-
	3 horas	*138.08 (24.43) Ac	*178.24 (17.58) Aa
	24 horas	*558.54 (229.98) Aa	*195.04 (20.69) Ba
	48 horas	*325.90 (37.40) Ab	*214.40 (26.66) Ba
p-values		p(grupo)=0.0243; p(tempo)<0.0001; p(interação)=0.0003; p(grupo controle)<0.0001	
Insulina	Baseline	80.37 (22.85)	-
	3 horas	104.30 (1.97) Aa	104.73 (1.29) Aa
	24 horas	*58.56 (13.54) Ba	107.03 (2.94) Aa
	48 horas	69.92 (21.25) Bb	*135.86 (48.08) Aa
p-values		p(grupo)<0.0001; p(tempo)=0.0378; p(interação)=0.0055; p(grupo controle)=0.0005	
Leptina	Baseline	35.37 (0.51)	-
	3 horas	34.82 (0.63) Ac	35.33 (0.41) Ac
	24 horas	36.64 (1.17) Ab	36.64 (0.55) Ab
	48 horas	*41.26 (1.36) Aa	*43.32 (1.77) Aa
p-values		p(grupo)=0.1255; p(tempo)<0.0001; p(interação)=0.3383; p(grupo controle)<0.0001	
TNF	Baseline	0.28 (0.13)	-

	3 horas	0.12 (0.00) Ab	0.15 (0.00) Aa
	24 horas	0.76 (0.08) Ab	*0.99 (0.09) Aa
	48 horas	*3.19 (1.14) Aa	0.72 (0.04) Ba
p-values	p(grupo)=0.0148; p(tempo)<0.0001; p(interação)<0.0001; p(grupo controle)<0.0001		
OPG	Baseline	1,885.17 (32.08)	-
	3 horas	*467.55 (30.63) Bc	*562.36 (43.33) Ac
	24 horas	1,970.55 (159.59) Bb	2,144.50 (429.76) Ab
	48 horas	*4,183.37 (322.27) Ba	*6,089.38 (1,333.15) Aa
p-values	p(grupo)=0.0418; p(tempo)<0.0001; p(interação)=0.3798; p(grupo controle)<0.0001		
Osteocalcina	Baseline	167.51 (35.33)	-
	3 horas	129.72 (22.24) Ab	134.05 (8.17) Ab
	24 horas	*343.23 (142.03) Aa	*324.61 (130.79) Aa
	48 horas	*328.20 (66.03) Aa	*525.74 (110.99) Aa
p-values	p(grupo)=0.5392; p(tempo)<0.0001; p(interação)=0.3480; p(grupo controle)<0.0001		
Osteopontina	Baseline	84.95 (28.28)	-
	3 horas	61.35 (43.56) Ab	78.59 (26.71) Ab
	24 horas	127.01 (38.21) Aa	152.74 (0.58) Aa
	48 horas	130.07 (59.78) Aa	*342.91 (106.00) Aa
p-values	p(grupo)=0.1263; p(tempo)=0.0013; p(interação)=0.6046; p(grupo controle)=0.0002		
SOST	Baseline	68.55 (16.23)	-
	3 horas	44.85 (5.91) Ab	56.07 (11.50) Ab
	24 horas	47.10 (6.40) Ab	58.37 (7.88) Ab
	48 horas	69.74 (36.39) Aa	*113.15 (60.78) Aa
p-values	p(grupo)=0.1027; p(tempo)=0.0109; p(interação)=0.9724; p(grupo controle)=0.0107		
IL1-beta	Baseline	0.23 (0.01)	-
	3 horas	0.15 (0.02) Ab	0.18 (0.01) Ab
	24 horas	0.35 (0.08) Aa	*0.41 (0.08) Aa
	48 horas	0.31 (0.02) Aa	*0.80 (0.82) Aa
p-values	p(grupo)=0.1555; p(tempo)=0.0004; p(interação)=0.4864; p(grupo controle)<0.0001		
EGF23	Baseline	5.72 (0.22)	-
	3 horas	5.49 (0.15) Aa	5.67 (0.38) Aa
	24 horas	5.69 (1.09) Aa	6.39 (0.28) Aa
	48 horas	5.26 (2.22) Aa	*9.89 (4.91) Aa
p-values	p(grupo)=0.0918; p(tempo)=0.4711; p(interação)=0.2335; p(grupo controle)=0.0286		

\*Diferente do grupo avaliado em baseline ( $p \leq 0,05$ ). Letras diferentes

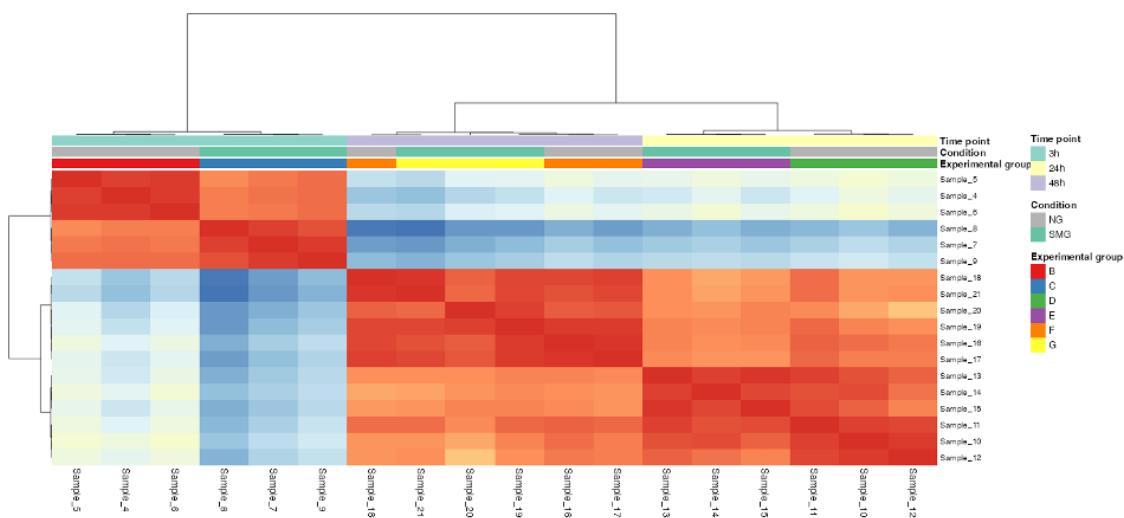
(maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças

estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). NG = Normogravidade; SMG =

Microgravidade simulada.

## Expressão Gênica

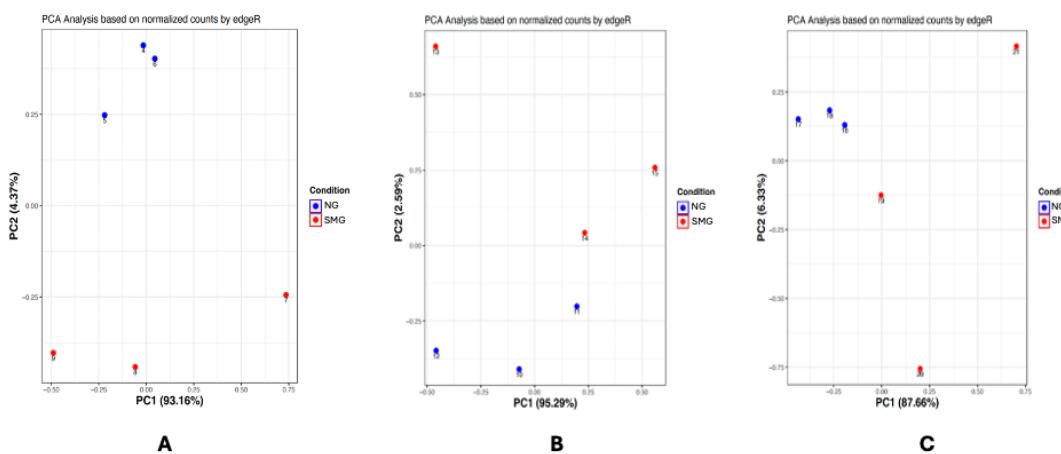
A análise de mapa de calor dos 1.000 genes mais variáveis revelou mudanças transcripcionais dinâmicas ao longo dos pontos temporais sob SMG (Figura 2). Da esquerda para a direita, as amostras correspondem a 3 horas, 48 horas e 24 horas. Em 3 horas, um conjunto distinto de genes foi regulado positivamente sob SMG em comparação com NG, enquanto outro conjunto foi regulado negativamente. Em 24 horas, os genes inicialmente regulados positivamente apresentaram expressão reduzida, e os genes inicialmente regulados negativamente tornaram-se regulados positivamente, indicando uma reversão nos padrões de expressão. De 24 a 48 horas, muitos desses mesmos genes exibiram uma segunda mudança, sugerindo um processo complexo de adaptação transcrecional. Essas mudanças dinâmicas podem refletir uma resposta celular precoce à microgravidade que se remodela ou atenua ao longo do tempo.



**Figura 2. Mapa de calor da expressão gênica em células semelhantes a osteoblastos em três pontos de tempo sob condições de NG e SMG.** As amostras foram agrupadas com base nos 1.000 genes mais variáveis. O mapa de calor exibe uma matriz de correlação entre as amostras, com agrupamento hierárquico e dendrogramas associados representando similaridade transcrecional. Cada coluna representa uma amostra e as linhas representam genes. Os grupos de amostras são codificados por cores: B (vermelho): NG em

3 horas; C (azul): SMG em 3 horas; D (verde): NG em 24 horas; E (roxo): SMG em 24 horas; F (laranja): NG em 48 horas e G (amarelo): SMG em 48 horas. Barras de anotação adicionais indicam condição de gravidade (NG = cinza; SMG = verde) e ponto de tempo (3 h = verde; 24 h = amarelo; 48 h = roxo). NG = Normogravidade; SMG = Microgravidade simulada.

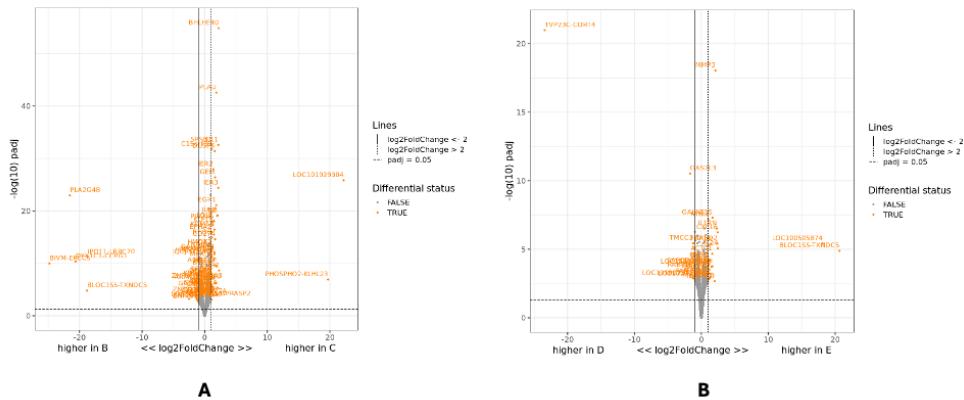
Os padrões de agrupamento da expressão gênica observados no mapa de calor foram ainda corroborados pela Análise de Componentes Principais (ACP). Após 3 horas, a ACP revelou uma clara separação entre as amostras de NG e SMG, com PC1 representando 93,16% da variância total. Essa tendência continuou após 24 horas (PC1 = 95,29%) e permaneceu alta após 48 horas (PC1 = 87,66%), reforçando o forte impacto da SMG no perfil transcrecional global ao longo do tempo (Figura 3).



**Figura 3. ACP para os pontos de tempo de 3 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C). [NG = Normogravidade; SMG = Microgravidade simulada]**

Os *volcano plots* destacaram genes diferencialmente expressos ( $\text{padj} < 0,05$ ,  $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$ ) entre NG e SMG nos três momentos. Um número substancial de genes foi regulado significativamente em 3 horas, seguido por uma redução em 24 horas, indicando uma resposta transcrecional robusta, porém transitória, à SMG. Esse declínio acentuado na responsividade transcrecional ao

longo do tempo sugere uma estabilização ou adaptação do programa de expressão gênica em resposta à exposição prolongada à microgravidade (Figura 4).



**Figura 4. Volcano plots para os pontos de tempo de 3 horas (A) e 24 horas (B).**

A SMG modulou a expressão de genes associados à sinalização osteogênica e à remodelação da matriz extracelular. GREM1, um antagonista de BMP envolvido no desenvolvimento esquelético e na diferenciação de osteoblastos, foi regulado positivamente. MMP3, que contribui para a degradação da matriz extracelular e a remodelação óssea, também apresentou expressão aumentada. Em contraste, SCUBE3, um modulador da via de BMP, e PDGFC, um fator de crescimento ligado ao recrutamento de células mesenquimais e ao reparo tecidual, foram regulados negativamente. SMURF2, um regulador da sinalização de TGF- $\beta$ /BMP, cuja ausência resulta em redução da massa óssea, também foi mais expresso sob SMG. Alguns genes-chave relacionados à osteogênese (colágeno, RUNX2, SOX9, BMP2, TGF- $\beta$  e FGF) foram mais expressos sob SMG em pelo menos um dos três momentos avaliados.

Em 3 horas, a SMG induziu uma resposta transcricional pronunciada em células semelhantes a osteoblastos, caracterizada pela regulação positiva de genes associados ao estresse celular, inflamação e diferenciação precoce. Os

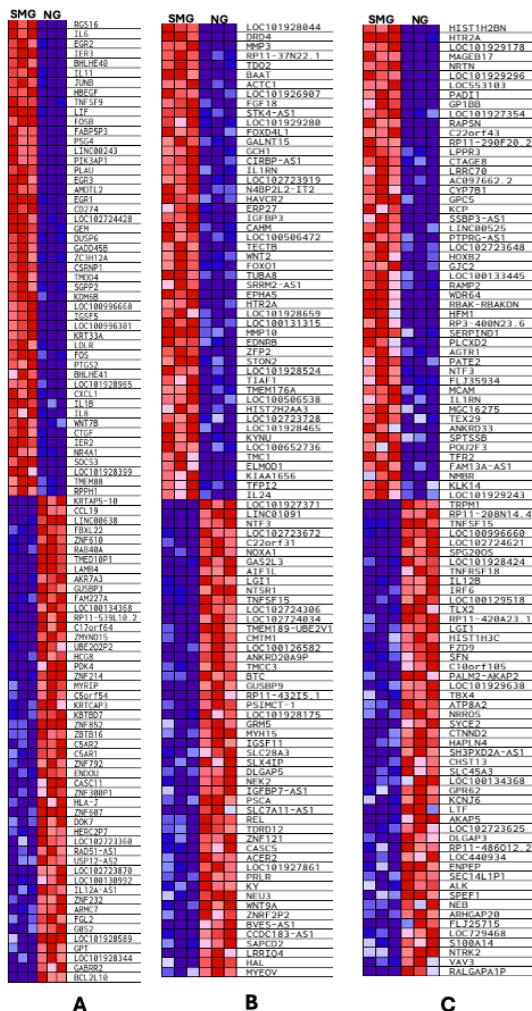
fatores de transcrição EGR1 ( $\log_2FC = 3,59$ ), EGR2 ( $\log_2FC = 4,89$ ), EGR3 ( $\log_2FC = 3,03$ ) e JUNB ( $\log_2FC = 4,24$ ) foram significativamente suprarregulados. Também foi observada expressão aumentada para os mediadores inflamatórios IL6 ( $\log_2FC = 4,17$ ), IL11 ( $\log_2FC = 4,48$ ), LIF ( $\log_2FC = 3,95$ ) e TNFSF9 ( $\log_2FC = 3,34$ ). Genes envolvidos na sinalização do crescimento e na proliferação celular, incluindo HBEGF ( $\log_2FC = 3,64$ ) e RGS16 ( $\log_2FC = 4,14$ ), também foram suprarregulados. MMP3 ( $\log_2FC = 2,17$ ) e PLAU ( $\log_2FC = 3,62$ ), associados à remodelação da matriz extracelular, apresentaram expressão aumentada, assim como o regulador de cromatina KDM6B ( $\log_2FC = 2,92$ ).

Em 24 horas, a SMG modulou a expressão de genes associados à inflamação, remodelação da matriz e sinalização do crescimento. Os mediadores pró-inflamatórios IL24 ( $\log_2FC = 5,61$ ) e IL1RN ( $\log_2FC = 4,89$ ) foram significativamente suprarregulados, juntamente com CXCL6 ( $\log_2FC = 5,37$ ), uma quimiocina envolvida na remodelação tecidual. A MMP3, uma metaloproteinase da matriz, também apresentou suprarregulação sustentada ( $\log_2FC = 4,31$ ), consistente com a atividade contínua de remodelação da matriz extracelular. O FGF18, um fator de crescimento de fibroblastos implicado na diferenciação dos osteoblastos, foi suprarregulado com um  $\log_2FC$  de 2,69. O WNT2, também envolvido na diferenciação dos osteoblastos, foi suprarregulado com um  $\log_2FC$  de 2,26. Os genes subrregulados incluíram GAS2L3 ( $\log_2FC = -3,19$ ), associado à regulação citoesquelética e à mitose.

Após 48 horas, a SMG induziu uma resposta transcrecional reduzida em células semelhantes a osteoblastos em comparação aos momentos anteriores (3 horas e 24 horas). Não foram detectados genes diferencialmente expressos associados à sinalização osteogênica, remodelação da matriz ou vias inflamatórias neste momento, sugerindo uma potencial estabilização ou adaptação do programa transcrecional após exposição prolongada à microgravidade.

A Análise de Enriquecimento de Conjuntos de Genes de conjuntos de genes característicos revelou modulação transcrecional dependente do tempo em resposta à SMG. Em 3 horas, a SMG levou a um enriquecimento robusto de vias associadas à inflamação (por exemplo, sinalização de TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B,

sinalização de IL6/JAK/STAT3), apoptose e hipóxia, indicando uma forte ativação precoce de programas de sinalização imunológica e responsiva ao estresse (Figura 5A). Em 24 horas, vias semelhantes permaneceram enriquecidas, embora a magnitude geral do enriquecimento tenha sido atenuada, sugerindo resolução parcial ou regulação da resposta inicial (Figura 5B). Em 48 horas, o enriquecimento do conjunto de genes foi acentuadamente diminuído, e o agrupamento entre os grupos NG e SMG foi menos distinto, refletindo divergência transcriptômica reduzida e apoiando a interpretação de adaptação ou estabilização transcracional ao longo da exposição prolongada (Figura 5C). Esses achados em nível de via reforçam a dinâmica temporal observada nas análises de expressão diferencial em nível de gene.



**Figura 5: Mapa de calor de enriquecimento dos conjuntos de genes Hallmark da GSEA em pontos de tempo de 3 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C). [NG = Normogravidade; SMG = Microgravidade simulada]**

## DISCUSSÃO

Pela primeira vez foram examinados os efeitos da microgravidade simulada (SMG) em células osteoblásticas derivadas do periósteo. Nossos dados sugerem que a resposta das células *osteolike* periosteais à microgravidade pode torná-las mais úteis para uso em engenharia de tecidos em um ambiente de baixa gravidade do que células *osteolike* de outras fontes.

Está bem estabelecido que as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BM-MSCs) e as células-tronco mesenquimais derivadas do periósteo (P-MSCs) contribuem de forma diferente para a manutenção e o reparo ósseo. Diferentes tipos de lesões ósseas são reparadas por células osteoprogenitoras de fontes distintas: as células periosteais são as principais responsáveis pela regeneração do estroma ósseo e da medula óssea após fraturas instáveis, enquanto as lesões por perfuração óssea são reparadas principalmente por células osteoprogenitoras derivadas da medula óssea[30]. Como a microgravidade pode ser vista como uma forma de desestabilização tecidual/celular causada pela redução da força gravitacional, levantamos a hipótese de que as P-MSCs podem desempenhar um papel mais proeminente na osteogênese sob microgravidade quando comparadas às células endosteais ou da medula óssea. Embora a literatura inclua estudos relatando uma redução no potencial osteogênico em pré-osteoblastos derivados de tecido ósseo[31,32] e da medula óssea[33,34] sob microgravidade, há uma completa falta de estudos avaliando o comportamento de células *osteolike* derivadas do periósteo neste contexto. O presente estudo empregou um clinostato 3D conhecido como Máquina de Posicionamento Aleatório (RPM), que muda continuamente a orientação das amostras em relação ao vetor de gravidade e é comumente usado para simular condições de microgravidade[35]. Os resultados deste estudo apoiam a hipótese de que células semelhantes a osteoblastos derivadas do periósteo desenvolvem maquinaria molecular que favorece a osteogênese em microgravidade.

Embora a viabilidade das células osteoblásticas derivadas do periósteo tenha sido reduzida após 3 horas sob microgravidade, essas células apresentaram maior viabilidade do que aquelas em normogravidade após 24 horas. Em 48 horas, não foi observada diferença significativa na viabilidade entre as duas condições. Além disso, crescimento celular evidente ocorreu dentro do período de 48 horas para os grupos tanto em normogravidade como em microgravidade (ver Tabela 1). Esse comportamento contrasta com o de osteoblastos derivados de osso e medula óssea cultivados em microgravidade, que tipicamente apresentam uma redução acentuada na viabilidade[16,33].

A análise de analitos relacionados à osteogênese mostrou que o cultivo de células osteoblásticas derivadas do periósteo em microgravidade aumentou a secreção de insulina, que é conhecida por auxiliar na formação e manutenção óssea. Além de seu papel no controle glicêmico, a insulina afeta diretamente os osteoblastos, promovendo atividade anabólica e facilitando a deposição da matriz óssea. Ela desempenha um papel crítico na homeostase óssea, modulando o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea[36]. Indivíduos com resistência à insulina ou diabetes frequentemente apresentam densidade óssea e metabolismo prejudicados, aumentando significativamente o risco de fraturas e outras complicações esqueléticas[37].

A microgravidade também aumentou a secreção de osteoprotegerina (OPG), que desempenha um papel fundamental na regulação da reabsorção óssea, atuando como um receptor chamariz para o RANKL (Receptor Ativador do Ligante do Fator Nuclear- $\kappa$ B), bloqueando assim a ativação dos osteoclastos[38]. Ao manter o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, a OPG é fundamental para a prevenção de condições como a osteoporose, na qual a reabsorção excede a formação[39]. Os resultados atuais contrastam fortemente com os achados em osteoblastos derivados do osso, onde a microgravidade demonstrou reduzir a secreção de OPG[32] e prejudicar a regulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos[17]. Apoiando o efeito anabólico das células periosteais semelhantes a osteoblastos em microgravidade, a redução observada na expressão de DKK1 e TNF contribui para o aumento da regeneração óssea, uma vez que ambas as moléculas são

conhecidas inibidoras da via de sinalização Wnt, que regula a diferenciação e a função dos osteoblastos[40].

Além disso, a secreção de IL-6 foi reduzida após 24 e 48 horas de exposição à microgravidade. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos nas respostas imunes, incluindo a ativação de células imunes e a indução da secreção de fator de crescimento[41]. Ela também desempenha um papel fundamental na homeostase óssea, estimulando a produção de RANKL nas células estromais da medula óssea, promovendo assim a reabsorção óssea[42]. Portanto, a redução de IL-6 observada neste estudo pode representar um mecanismo de proteção contra a reabsorção óssea. Novamente, esses achados contradizem estudos anteriores com osteoblastos derivados do endósteo, nos quais a microgravidade aumentou a secreção de IL-6[32,43].

ACP, *volcano plots* e mapas de calor demonstraram que a SMG exerceu forte influência na expressão gênica em comparação à normogravidade. Os resultados após 3 horas revelaram uma resposta celular imediata à microgravidade, incluindo alterações em genes relacionados ao estresse, inflamatórios e metabólicos. A ativação precoce das vias de resposta ao estresse sugere que as células percebem e reagem rapidamente ao novo ambiente. Os resultados após 24 horas mostram efeitos sustentados, potencialmente indicando regulação adaptativa e o envolvimento de vias adicionais. Em 48 horas, as células pareciam ter atingido um estado estável sob microgravidade, possivelmente refletindo adaptação celular ou reprogramação metabólica. A ausência de viabilidade celular reduzida nesse momento descarta a morte celular extensa. Assim, os dados de ACP, *volcano plot* e mapa de calor sugerem que a microgravidade induz uma resposta rápida de expressão gênica — iniciada já em 3 horas — que persiste em 24 horas, mas diminui significativamente em 48 horas, implicando adaptação celular ou diferenciação em um novo fenótipo adaptado à microgravidade.

Essas observações em nível de gene foram ainda mais apoiadas pela análise em nível de via usando a Análise de Enriquecimento de Conjuntos de Genes. Em 3 horas, conjuntos de genes característicos associados à sinalização

inflamatória (por exemplo, TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B, IL6/JAK/STAT3), apoptose e hipóxia estavam altamente enriquecidos em células expostas à SMG, refletindo estresse precoce e ativação imunológica. Em 24 horas, muitas dessas vias permaneceram ativas, mas apresentaram enriquecimento atenuado, sugerindo adaptação parcial. Em 48 horas, os padrões de enriquecimento diminuíram amplamente, indicando estabilização transcrional sob microgravidade prolongada. Essa mudança temporal na ativação da via se alinha com descobertas anteriores que mostram que o estresse precoce e as respostas inflamatórias frequentemente precedem a adaptação funcional em células-tronco ou progenitoras sob ambientes mecânicos alterados[44].

A análise de RNA-seq revelou regulação dependente do tempo de reguladores osteogênicos essenciais em células osteoblásticas derivadas do periôsteo expostas à SMG. Em 3 horas, genes como Sox9, BMP2, TGF- $\beta$ s1/2/3 e múltiplas isoformas de colágeno foram significativamente suprarregulados, sugerindo comprometimento precoce com a diferenciação osteogênica. Em 24 horas, o FGF18, um conhecido estimulador da proliferação osteoblástica, apresentou expressão aumentada e, em 48 horas, o RUNX2 foi suprarregulado, indicando progressão para estágios posteriores da programação osteogênica. Esses resultados diferem de estudos anteriores que relataram supressão de genes osteogênicos em microgravidade[45,46] e, em vez disso, corroboram um modelo no qual as células periosteais retêm e até aumentam o potencial osteogênico nessas condições.

A expressão elevada de Sox9, BMP2, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e genes relacionados ao colágeno em 3 horas sugere que células semelhantes a osteoblastos derivadas do periôsteo iniciam a programação da maturação precocemente, enquanto a secreção de proteínas relacionadas à osteogênese foi detectada apenas em 24 e 48 horas. A regulação positiva contínua dos genes do colágeno em 24 e 48 horas, e de Runx2 e FGFs em 48 horas, pode indicar estimulação osteogênica sustentada, correlacionando-se com aumento da secreção de insulina, diminuição de IL-6 e regulação negativa significativa de DKK1 e TNF — todos associados a efeitos promotores da osteogênese.

Dados de RNA-seq também mostram claramente uma resposta imediata ao estresse em 3 horas, com regulação positiva de genes inflamatórios e metabólicos (IER3, HBEGF, IL6, BHLHE40, RGS16, IL11, LIF, JUNB, EGR2, TNFSF9, PDK4). Em 24 horas, as células parecem se envolver em ajustes regulatórios e adaptação. Embora a expressão do gene IL-6 tenha sido elevada em 3 horas, sugerindo ativação da via inflamatória NF-κB, a análise do nível de proteína não revelou diferença na IL-6 entre os grupos neste momento e, de fato, uma diminuição significativa em 24 e 48 horas. Essa discrepância pode ser devido à rápida tradução e degradação de citocinas ou à regulação limitada na fase inicial. Em 24 horas, o aumento da expressão de MMP-3 sugere remodelamento da matriz extracelular e possível modulação da diferenciação osteogênica. Nenhum gene relacionado à osteogênese ou marcador inflamatório foi regulado significativamente neste momento, sugerindo estabilização transcripcional celular ou adaptação após a resposta inicial.

Em resumo, os resultados indicam que as P-MSCs exibem uma resposta adaptativa inicial à SMG envolvendo sinalização inflamatória e remodelação da matriz extracelular, potencialmente apoiando a osteogênese. Os dados apoiam a hipótese de que essas células desenvolvem programas moleculares favoráveis à osteogênese sob microgravidade, transitando de um perfil inflamatório para um pró-osteogênico. No entanto, é importante afirmar que usamos células de periôsteo derivadas do palato e que células de periôsteo de outros locais podem ter potenciais diferentes, pois, em condições de microgravidade, a densidade mineral óssea diminui nas extremidades inferiores, mas aumenta no crânio[47]. Além disso, também é conhecido que as P-MSCs de regiões craniofaciais apresentam maiores taxas de renovação, níveis elevados de marcadores ósseos e um processo de senescência mais lento em comparação com as P-MSCs derivadas de tecidos esqueléticos apendiculares, como a tíbia [5]. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para validar esses achados, fortalecer a hipótese proposta e esclarecer como as células osteoprogenitoras derivadas do periôsteo e os processos de regeneração óssea se comportam *in vivo* sob condições prolongadas de microgravidade. Além disso, como os sinais hormonais e as interações complexas entre tecidos podem afetar as respostas celulares em sistemas vivos, a pesquisa *in vivo* pode fornecer resultados mais

confiáveis. Também é essencial avaliar o comportamento celular em microgravidade real, pois os modelos baseados em clinostato apresentam limitações, incluindo aceleração residual, estresse de cisalhamento e mistura constante do meio[48]. Se confirmados *in vivo*, nossos achados podem abrir novos caminhos para o tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose, usando o secretoma dessas células. Além disso, dada a crescente demanda por missões espaciais de longo prazo, culturas de células periosteais derivadas dos próprios astronautas podem ser potencialmente usadas durante voos espaciais para mitigar a perda óssea induzida pela microgravidade.

## REFERÊNCIAS

1. Allen, M. R., Hock, J. M. & Burr, D. B. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*. 35, 1003-1012 (2004).
2. Duchamp de Lageneste, O. et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*. 9, 773 (2018).
3. Lin, Z. et al. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res*. 93, 109-116 (2014).
4. Diaz-Flores, L., et al. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 275, 280-286 (1992).
5. Pranskunas, M., et al. Assessment of the Bone Healing Process Mediated by Periosteum-Derived Mesenchymal Stem Cells' Secretome and a Xenogenic Bioceramic-An In Vivo Study in the Rabbit Critical Size Calvarial Defect Model. *Materials (Basel)*. 14, 3512 (2021).
6. Sakaguchi, Y., et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 52, 2521-2529 (2005).
7. Ringe, J., et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2, 136-146 (2008).
8. Ball, M.D., et al. Human periosteum is a source of cells for orthopaedic tissue engineering: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 11, 3085-3093 (2011).

9. Chang, H., et al. Arthritic periosteal tissue from joint replacement surgery: a novel, autologous source of stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 3, 308-317 (2014).
10. Ceccarelli, G., et al. Osteogenic Potential of Human Oral-Periosteal Cells (PCs) Isolated From Different Oral Origin: An In Vitro Study. *J Cell Physiol.* 231, 607-612 (2016).
11. Pelegrine, A.A., et al. A Minimally Invasive Surgical Procedure to Harvest Palate Periosteum as a Source of Mesenchymal Stromal/Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Dent J (Basel)*. 12, 172 (2024).
12. Ulbrich, C., et al. The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int.* 2014, (2014).
13. White R.J., & Averner, M. Humans in space. *Nature.* 409, 1115-1118 (2001).
14. Martinez, E.F., Pelegrine, A.A. & Holliday, L.S. Receptors Implicated in Microgravity-Induced Bone Loss. *Receptors.* 3, 280-303 (2024).
15. Baran, R. et al. Microgravity-Related Changes in Bone Density and Treatment Options: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 15, 8650 (2022).
16. Hughes-Fulford, M. & Lewis, M.L. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res.* 1, 103-109 (1996).
17. Nabavi, N., et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone.* 5, 965-974 (2011).
18. Bahney, C.S., et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 1, 35-50 (2019).
19. Debnath, S., et al. Discovery of a periosteal stem cell mediating intramembranous bone formation. *Nature.* 562, 133-139 (2018).
20. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 36, 223-232 (2002).
21. Choung, H.W., et al. Tertiary Dentin Formation after Indirect Pulp Capping Using Protein CPNE7. *J Dent Res.* 95, 906-912 (2016).
22. Lee Y.S., et al. Tubular Dentin Regeneration Using a CPNE7-Derived Functional Peptide. *Materials (Basel)*. 13, 4618 (2020).
23. Lee, J., et al. Desensitizing toothpastes for dentin sealing and tertiary dentin formation in vitro and in vivo: a comparative analysis. *BMC Oral Health.* 22, 483 (2022).

24. Tufts, E., Blank, E. & Dickerson D. Periosteal thickening as a manifestation of trauma in infancy. *Child Abuse Negl.* 6, 359-364 (1982).
25. Arni, D., et al. Insufficiency fracture of the calcaneum: Sonographic findings. *J Clin Ultrasound.* 37, 424-427 (2009).
26. Hovmark, A., Asbrink, E. & Olsson, I. Joint and bone involvement in Swedish patients with *Ixodes ricinus*-borne Borrelia infection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 263, 275-284 (1986).
27. Hosokawa, T., et al. Periosteal Reaction Possibly Induced by Pazopanib: A Case Report and Literature Review. *J Pediatr Hematol Oncol.* 42, e822-e825 (2020).
28. Wright, N.C., et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res.* 29, 2520-2526 (2014).
29. Vico, L., et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet.* 355, 1607-1611 (2000).
30. Jeffery, E.C., et al. Bone marrow and periosteal skeletal stem/progenitor cells make distinct contributions to bone maintenance and repair. *Cell Stem Cell.* 29, 1547-1561 (2022).
31. Hu, L.F., et al. Mineralization initiation of MC3T3-E1 preosteoblast is suppressed under simulated microgravity condition. *Cell Biol Int.* 39, 364-372 (2015).
32. Chatziravdeli, V., Katsaras, G.N. & Lambrou, G.I. Gene Expression in Osteoblasts and Osteoclasts Under Microgravity Conditions: A Systematic Review. *Curr Genomics.* 20, 184-198 (2019).
33. Dai, Z.Q., et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 40, 671-684 (2007).
34. Hu, Y., et al. The Critical Role of The Piezo1/β-catenin/ATF4 Axis on The Stemness of Gli1+ BMSCs During Simulated Microgravity-Induced Bone Loss. *Adv Sci (Weinh).* 10, e2303375 (2023).
35. Borst, A.G. & van Loon, J. Technology and developments for the random positioning machine, RPM. *Microgravity Sci Technol.* 21, 287-292 (2008).
36. Armutcu, F. & McCloskey, E. Insulin resistance, bone health, and fracture risk. *Osteoporos Int.* 35, 1909-1917 (2024).

37. Abdul-Ghani, M., Maffei, P. & DeFronzo, R.A. Managing insulin resistance: the forgotten pathophysiological component of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 12, 674-680 (2024).
38. Hofbauer, L.C. & Heufelder, A.E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*. 79, 243-253 (2001).
39. Weitzmann, M.N. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*. 2013, 125705 (2013).
40. Pinzone, J.J., et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*. 113, 517-525 (2009).
41. Tanaka, T., Narasaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6, a016295 (2014).
42. Hashizume, M., et al. IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatol Int*. 29, 1449-1454 (2009).
43. Kumei, Y., et al. Microgravity induces prostaglandin E2 and interleukin-6 production in normal rat osteoblasts: role in bone demineralization. *J Biotechnol*. 47, 313-324 (1996).
44. Subramanian, A., et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 15545-15550 (2005).
45. Kabir, A., et al. Protein bioactive complexes promote osteogenesis under microgravity environment. *Int J Biol Macromol*. 303, 140483 (2025).
46. Braveboy-Wagner, J. & Lelkes, P.I. Impairment of 7F2 osteoblast function by simulated partial gravity in a Random Positioning Machine. *NPJ Microgravity*. 8, 20 (2022).
47. Miyamoto, A., et al. Medical baseline data collection on bone and muscle change with space flight. *Bone*. 22, 79S-82S (1998).
48. Grimm, D., et al. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 9, 882-894 (2020).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de cultivo de células *osteolike* do periósteo palatino em microgravidade avaliada neste estudo pode representar uma nova alternativa para a produção de biofármacos relacionados à problemática da perda óssea. Isso pode vir a ser válido tanto para o tratamento dos processos de perda óssea por traumas, exodontias e infecções, como também para a tratamento da diminuição da densidade óssea decorrente da osteoporose e de viagens espaciais de longa duração, as quais representam um dos maiores empecilhos orgânicos para a colonização de outros planetas.

De forma antagônica àquilo que a literatura científica vem demonstrando com relação às células osteoblásticas provenientes do endósteo e da medula óssea, as células periosteais produzem proteínas ligadas ao aumento da osteogênese e diminuição da osteoclaase quando cultivadas em microgravidade simulada. No presente estudo, a expressão destes analitos foi consubstanciada pelo padrão de expressão gênica, levando o nosso grupo à conclusão de que o grupo celular estudado no presente trabalho, quando cultivado em microgravidade, exibe comportamento pró-osteogênico.

Esses achados destacam o potencial desta metodologia para ampliar as opções terapêuticas no campo da engenharia de tecidos, oferecendo uma alternativa terapêutica promissora aos tratamentos padrão, tais como o uso de bisfosfonatos na osteoporose. Esses medicamentos, apesar de contribuírem para o aumento da densidade óssea no tratamento da osteoporose, podem apresentar importantes efeitos colaterais (e.g. osteonecrose dos maxilares) por atuarem especialmente na inibição da osteoclaase. Neste sentido, o desenvolvimento de um produto que farmacodinamicamente, além de inibir a reabsorção óssea, estimule a formação óssea, parece representar um futuro promissor para a sociedade.

Se esse comportamento for comprovado *in vivo*, pode-se abrir uma nova frente para tratamento de doenças ósseas que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, seja por meio da utilização de células vivas ou seja por meio do

uso do secretoma dessas células. Além disso, frente à demanda crescente para viagens espaciais de longa duração, o cultivo de células periosteais dos próprios astronautas no ambiente microgravitacional, durante as missões espaciais, pode vir a servir de alento ao tratamento da perda de densidade óssea mineral enfrentado por eles. Dessa forma, o “veneno” pode eventualmente tornar-se a “cura”.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Arni, D., et al. Insufficiency fracture of the calcaneum: Sonographic findings. *J Clin Ultrasound.* 37, 424-427 (2009).
- Baran, R. et al. Microgravity-Related Changes in Bone Density and Treatment Options: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 15, 8650 (2022).
- Ceccarelli, G., et al. Osteogenic Potential of Human Oral-Periosteal Cells (PCs) Isolated From Different Oral Origin: An In Vitro Study. *J Cell Physiol.* 231, 607-612 (2016).
- Grimm, D., et al. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 9, 882-894 (2020).
- Groeneveldt, L.C., et al. The bone-forming properties of periosteum-derived cells differ between harvest sites. *Front Cell Dev Biol.* 8, 554984 (2020).
- Hosokawa, T., et al. Periosteal Reaction Possibly Induced by Pazopanib: A Case Report and Literature Review. *J Pediatr Hematol Oncol.* 42, e822-e825 (2020).
- Hovmark, A., Asbrink, E. & Olsson, I. Joint and bone involvement in Swedish patients with *Ixodes ricinus*-borne *Borrelia* infection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 263, 275-284 (1986).
- Hughes-Fulford, M. & Lewis, M.L. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res.* 1, 103-109 (1996).
- Lin, Z., et al. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 93, 109-116 (2014).
- Nabavi, N., et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone.* 5, 965-974 (2011).
- Nagata, M., et al. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: Coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone.* 50, 1123-1129 (2012).
- Ono N. The mechanism of bone repair: Stem cells in the periosteum dedicated to bridging a large gap. *Cell Rep Med.* 3,100807 (2022).
- Pelegrine, A.A., et al. A Minimally Invasive Surgical Procedure to Harvest Palate Periosteum as a Source of Mesenchymal Stromal/Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Dent J (Basel).* 12, 172 (2024).
- Pranskunas, M., et al. Assessment of the Bone Healing Process Mediated by Periosteum-Derived Mesenchymal Stem Cells' Secretome and a Xenogenic Bioceramic-An In Vivo Study in the Rabbit Critical Size Calvarial Defect Model. *Materials (Basel).* 14, 3512 (2021).

<sup>1</sup> De acordo com o Manual de Normalização para Monografias da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2019, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Ten Cate, A.R., et al. Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. Elsevier Health Sciences, 414 páginas (2008).

Shi, Q., et al. Inhibition of Mitochondrial Fission Reverses Simulated Microgravity-Induced Osteoblast Dysfunction by Enhancing Mechanotransduction and Epigenetic Modification. Research (Wash D C). 8, 0602 (2025).

Sonawane, R., et al. Effect of microgravity on bone Tissue: Mechanisms of osteodegeneration and advanced treatment modalities. Biochem Biophys Res Commun. 771, 152055 (2025).

Tufts, E., Blank, E. & Dickerson D. Periosteal thickening as a manifestation of trauma in infancy. Child Abuse Negl. 6, 359-364 (1982).

Wang, M., et al. Mechanisms of pyroptosis in modulating osteoblast function under simulated microgravity. BMC Musculoskelet Disord. 26, 406 (2025).

Wright, N.C., et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. J Bone Miner Res. 29,2520-2526 (2014).

Zhu, S.J., et al. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101, 164-169 (2006).

1 De acordo com o Manual de Normalização para Monografias da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2019, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

## ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA

B em.bone.0.93e5a7.e7236d94@editorialmanager.com em nome de BONE (EJS) <em@  
Para:  ANDRE ANTONIO PELEGRI  
Sex, 06/06/2025 09:33

i Parte do conteúdo desta mensagem foi bloqueada porque o remetente não está na sua lista de Remetentes confiáveis.

[Remetente confiável](#) [Mostrar conteúdo bloqueado](#)

RE: Enhanced pro-osteogenic behavior in Osteoblast-like Cells Derived from the Periosteum Under Simulated Microgravity  
Raul Canal; Elizabeth F. Martinez; Jamie S. Foster; Fernanda Carla Bombaldi de Souza; Marcelo Marcos Morales; Marcos Cesar Pontes; Daniel N. da Rocha; Renata Francielle Bombaldi de Souza; Lexie S. Holliday; Fahong Yu; Anderson Tadeu Silva; Roberto D. Fanganiello; José Ricardo M. Ferreira; André Pelegrine  
Full length article

Dear Professor André Pelegrine,

Your submission entitled "Enhanced pro-osteogenic behavior in Osteoblast-like Cells Derived from the Periosteum Under Simulated Microgravity" has been received by Bone. It has been assigned the following manuscript number: **BONE-D-25-00844**.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/bone/>.

Your username is: [andre.pelegrine@slmandic.edu.br](mailto:andre.pelegrine@slmandic.edu.br)

If you need to retrieve password details, please go to: [click here to reset your password](#)

Thank you for submitting your work to this journal.

## ANEXO B - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIAIDO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito da microgravidade em células-tronco periosteais: estudo in vitro  
**Pesquisador:** Elizabeth Ferreira Martinez  
**Área Temática:**  
**Versão:** 2  
**CAAE:** 56896122.3.0000.5374  
**Instituição PropONENTE:** Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic/Faculdade de  
**Patrocinador Principal:** R-CRIO CRIOPENIA SA

#### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.370.761

##### Apresentação do Projeto:

Conforme transrito do parecer Número 5.358.278:  
As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram transcritas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1909845.pdf) e/ou do Projeto Detalhado/ Brochura do Investigador. Com o recente aumento da demanda pelo longa permanência no ambiente espacial, e considerando que a meta para a chegada do homem a Marte deve ocorrer em poucos anos, pesquisas têm se concentrado em entender o efeito da microgravidade simulada e real nos tecidos e células (Ulrich et al., 2014; White e Averne 2001). No ambiente espacial, a atmosfera microgravitacional pode afetar diversos processos biológicos, especialmente envolvidos com metabolismo e citoesqueleto celular incluindo a processo de diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, o que pode prejudicar algumas funções biológicas (Strauch et al., 2019), como perda óssea (Vico et al., 2000), atrofia muscular (Fitts et al. 2001), descondicionamento cardiovascular (Aubert et al. 2005) e desregulação do sistema imunológico, diminuindo a capacidade fagocítica de células imunes (Kaur et al., 2005; Cruciani et al. 2008). Ainda, mudanças estruturais e funcionais são observadas nas células do tecido ósseo em microgravidade devido a redução de cargas mecânicas, ocasionando impacto importante na densidade óssea mineral, e consequente aumento de risco a fraturas (Grimm et al., 2016). Isto porque, há diminuição do número e a função dos osteoblastos envolvidos na formação óssea (HughesFulford e Lewis 1998).

FACULDADE SÃO LEOPOLDO  
MANDIC



Continuação do Parecer: 5.370.761

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Abril de 2022

Assinado por:  
**Marcelo Sperandio**  
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Waldemar Blatkauskas, 72  
 Bairro: Swift  
 UF: SP  
 Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3518-3601  
 E-mail: cep@almandic.edu.br

Página 01 de 06