RAPHAEL DA SILVA GOMES

**Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical
e ligamento periodontal *in vitro***

São Paulo

2020

RAPHAEL DA SILVA GOMES

**Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical
e ligamento periodontal *in vitro***

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

São Paulo

2020

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

Gomes, Raphael da Silva.

Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical e ligamento periodontal *in vitro* / Raphael da Silva Gomes; orientador Carla Renata Sipert. -- São Paulo, 2020.

77 p. : fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Hidróxido de Cálcio. 2. Ligante RANK. 3. Osteoprotegerina. 4. Células-tronco. 5. Papila apical. 6. Ligamento periodontal. I. Sipert, Carla Renata. II. Título.

Gomes RS. Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical e ligamento periodontal *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 20/01/2021

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Celso Luiz Caldeira

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a) Flaviana Bombarda de Andrade

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a) Marcela Claudino da Silva

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa

Julgamento: Aprovado

À Deus e minha família dedico esse trabalho!

À minha mãe que sempre esteve na primeira fileira torcendo para o sucesso de seus filhos, bem como a realização de seus objetivos e sonhos, quero dizer que esse trabalho é todo seu! Muito obrigado pelo amor, carinho, respeito e educação que a mim foram dedicados. Obrigado por me incentivar sempre, mesmo quando achava que não daria conta. Obrigado por sonhar cada sonho que tenho como se fosse o seu, me fazendo acreditar que tudo é possível. Obrigado por tentar, na medida do possível, fazer de tudo para que eu me sinta bem, confortável, feliz e amado. Tenho muito orgulho de ter tido a chance de ser um dos seus filhos e poder crescer em meio a muito amor. Amo-a infinitamente, além do que nossos olhos possam enxergar e espero poder retribuir ao menos uma pequena fração de todo sentimento puro e verdadeiro que você costuma despejar sobre nós. Que sorte a nossa em te ter como mãe. Obrigado!

À minha tia que dedicou parte da sua vida para seus sobrinhos e agora seus sobrinhos netos. Gostaria de deixar minha eterna gratidão aos dias passados, presentes e futuros que você me ampara. Obrigado por se preocupar em me ensinar a como ser um ser humano melhor, um cidadão melhor e um pai melhor. Obrigado por sempre estar disposta a me ajudar com tudo que preciso. Obrigado por ter me dado a chance de ter uma segunda mãe, pois é assim que eu sinto. Obrigado por acordar mais cedo para que eu tomasse café da manhã, por me levar até a esquina quando ia à escola, por se preocupar com minha saúde, com meu trabalho, com minha educação. São tantas as formas de demonstração de amor que escreveria um livro com tantos exemplos. Tenho muito orgulho em dizer que esse trabalho também é todo seu!

À minha vó amada que não está mais entre nós, mas que sempre esteve presente em minha vida. Sou muito grato à Deus por ter tido a oportunidade de conhecê-la como neto. Grato por ter tido a experiência de vivermos tantos momentos lindos juntos e minha maior gratidão dentre todas as outras, foi poder cuidar um pouco de você antes que nos deixasse. Tenho muita sorte em ter tido a chance de viver com três mulheres fantásticos e ter aprendido tanto com vocês.

Aos meus irmãos que mesmo distantes estão sempre torcendo pela minha vitória. Saibam que também torço pela vida de vocês. Sempre estarei aqui para ajudar no que for preciso assim como tenho certeza de que também estarão por mim.

Ao meu marido e filha por me proporcionarem um mundo mais feliz e mais cheio de amor. Obrigado por terem a capacidade de renovar minha força para enfrentar os desafios que muitas vezes penso não conseguir enfrentar. Um sorriso, uma palavra, um abraço são coisas simples que me dão energia para acordar e lutar por nossos sonhos. É muito bom poder dividir tudo isso com vocês. Sou grato também por ter tido a chance de encontrá-los nesse mundo e poder dividir experiências que jamais achei que viveria nesse plano. Tenho sorte em ser tão amado! E eu amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à FAPESP, por ter financiado a pesquisa através do auxílio (2016/13944-5) e à CAPES pela bolsa de mestrado (88882.376609/2019-01).

À **FOUSP**, pela possibilidade de realizar o mestrado nesta instituição que é reconhecida como uma das melhores faculdades de Odontologia do mundo, e a todos os alunos e graduação, pós-graduação e funcionários que me deram a oportunidade de trabalhar em um ambiente sadio, tornando meu sonho ainda mais real.

Gostaria de agradecer especialmente à minha orientadora **Professora Dra. Carla Renata Sipert**, por todas as experiências que vivemos juntos. Muito obrigado por estar sempre presente, por ensinar com tanto amor e dedicação. Obrigado por estar sempre disponível para qualquer assunto, por me ouvir e me respeitar com tanto carinho. Eu não acredito que consegui aprender tantas coisas nesses dois anos. Mas com sua dedicação como professora, tudo fica mais fácil. Nossas reuniões de quarta-feira durante todo o programa foram de extrema importância para me tornar um aluno com mais capacidade de pesquisar e discutir temas importantes para enriquecer nossa área. Sou muito grato de poder participar dessa equipe tão especial que você construiu. Uma equipe que realmente ama o que faz, ama trabalhar com células, desde o início em que coletamos o tecido até o final do experimento. Todos trabalham com muito amor e dedicação e tenho certeza de que isso só acontece porque temos o seu exemplo. Digo isso porque não existe um dia em que conversamos e não vejo seus olhos brilharem quando o assunto é biologia molecular. Estou certo de que essas atitudes me inspiram e vão continuar me inspirando independente do caminho que eu vá seguir. Em especial, quero agradecer a você pelos últimos meses que trabalhamos realmente juntos, passamos vários dias no laboratório terminando o experimento, e pude aprender tanta coisa nova em tão pouco tempo. Foi realmente um intensivo. Quero aproveitar a oportunidade para pedir desculpas se algum dia te decepcionei de alguma forma, ou por atitude ou na realização de trabalho. Saiba que fiz tudo com muito amor. Sinto-me muito honrado e feliz por ter sido orientado por você. Obrigado!

Também gostaria de agradecer ao Professor Fernando Nogueira por ter o poder cedido seu laboratório para que eu pudesse concluir meu projeto. Obrigado também por sempre estar disposto a conversar, me acalmar nos momentos mais estressantes. Obrigado pelo respeito que sempre teve comigo. Sou muito grato por ter tido a experiência de tê-lo conhecido.

Quero agradecer ao **todos os professores do departamento**, por terem me recebido de portas abertas e terem me dado todas as orientações necessárias para que eu pudesse entrar no programa. Por dividir momentos muito marcantes conosco, alunos da pós-graduação, nos congressos e cursos ao redor do Brasil. Obrigado por me auxiliarem a ter adquirido mais conhecimento durante nossas aulas, tenho uma admiração muito grande por vocês.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a **Silvia**, que sempre esteve presente na rotina laboratorial, sempre me ajudou no que fosse possível. Você é um exemplo de profissional. Sabe trabalhar com respeito, organização, competência. Você é realmente uma parceira. Obrigado por sempre estar disponível para responder minhas mensagens mesmo fora do horário. Desejo a você muito sucesso e que seja sempre muito feliz. Que sorte temos de conhecer pessoas como você na nossa vida acadêmica. Muito obrigado.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os amigos que esse programa me proporcionou. Muito obrigado **Cláudia**, por sempre estar disposta a me ajudar, desde o primeiro dia que comecei as práticas laboratoriais. Obrigado por me ajudar com os cálculos e por me auxiliar até hoje quando te mando mensagem pedindo socorro. **Patrícia e Letícia**, obrigado por todos os momentos que passamos juntos. Obrigado por sempre escolherem estar do meu lado, mesmo nos momentos mais críticos. Vocês sempre estavam dispostas a me ouvir e a me colocar para cima. Espero poder reencontrá-las novamente. **Juliana Rahal**, obrigado pelos momentos que passamos juntos e por dividir comigo um pouco da sua experiência laboratorial. Nunca vou esquecer os sábados e domingos que passamos no laboratório juntos. **Vitória e Giovana**, foi muito bom estar com vocês mesmo que por pouco tempo. Desejo que vocês voem alto. Essa equipe realmente é muito especial e muito bem estruturada. É triste saber que por um tempo estarei longe de vocês, mas levo todos em meu coração.

**“Muita gente não acredita.
Mas você pode ter uma vida eterna.
Apenas olhe para Henrietta.”**

Rebecca Skloot

RESUMO

Gomes RS. Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical e ligamento periodontal *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

A interação entre Receptor para a Ativação do Fator de Transcrição Nuclear kappaB (RANK), Ligante do ativador do Receptor do Fator Nuclear kappaB (RANKL), a Osteoprotegerina (OPG) e Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF), tem sido relatadas como as principais citocinas responsáveis para remodelação óssea. Considera-se de extrema relevância entender a relação entre eles nas células de papila apical (CPA) e ligamento periodontal (CLP) considerando que eles estão envolvidos no processo de revascularização pulpar e reabsorção óssea periapical em casos de periodontite apical. Sendo assim, o presente trabalho *in vitro* teve como objetivo esclarecer o papel do lipopolissacarídeo (LPS) nas CPA e CLP, detectar a expressão de RANKL e OPG e compreender a modulação dessas células. Para elucidar esses pontos, CPA e CLP foram estabelecidas em meio de cultura e estimuladas por LPS. Foi realizada análise de citotoxicidade por um ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células então foram estimuladas com a concentração definida após o experimento anterior com 0,01 µg/mL e depois de 1 hora com concentrações de 1000 e 250 µg/mL de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) para avaliar e quantificar a expressão de RANK-L, M-CSF e OPG por um ensaio *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Foi realizado novamente ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade do LPS e do Ca(OH)₂. Os resultados demonstraram aumento de OPG induzido por LPS em CPA, mas redução quando Ca(OH)₂ foi incubado na sequência. A produção de OPG nas CLP não demonstrou diferenças estatisticamente significativas. RANKL e M-CSF não foram detectados durante o experimento. Como conclusão, este estudo demonstrou em células de papila apical que o LPS pode aumentar os níveis de OPG enquanto, o Ca(OH)₂ pode diminuí-los. Esta modulação não foi detectada em células de ligamento periodontal. Sendo assim, LPS e Ca(OH)₂ podem influenciar a modulação dos eventos moleculares de reabsorção óssea por células de papila apical.

Palavras-chave: Hidróxido de Cálcio. RANKL. OPG. Células-tronco. Papila Apical. Ligamento Periodontal.

ABSTRACT

Gomes RS. Calcium Hydroxide in the modulation of cells of the apical papilla and periodontal ligament in vitro [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

The interaction between kappaB Nuclear Transcription Factor Activation Receptor (RANK), kappaB Nuclear Factor Receptor Activator Ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG) and Macrophage Colony Stimulator (M-CSF), has been reported as the main cytokines responsible for bone remodeling. It is considered extremely important to understand the relationship between them in the cells of the apical papilla (CPA) and periodontal ligament (CLP) considering that they are involved in the process of pulp revascularization and periapical bone resorption in cases of apical periodontitis. Thus, the present in vitro study aimed to clarify the role of lipopolysaccharide (LPS) in CPA and CLP, detect RANKL and OPG expression and understand the modulation of these cells. To clarify these points, CPA and CLP were established in culture medium and stimulated by LPS. Cytotoxicity analysis was carried out by a 3- (4,5-dimethylazol-2-yl) -2,5-diphenitetrazolium (MTT) Bromide assay. The Cells were then stimulated to the defined concentration after the previous experiment with 0.01 µg / mL and after 1 hour with concentrations of 1000 and 250 µg / mL of calcium hydroxide (Ca (OH) 2) to evaluate and quantify the expression of RANK-L, M-CSF and OPG by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) assay. CPA and CLP again by MTT assay to evaluate the cytotoxicity of LPS and Ca (OH) 2. The results showed an increase in OPG induced by LPS in CPA, but a reduction when Ca (OH) 2 was incubated in the sequence. The production of OPG in the PLCs did not show statistically significant differences. RANKL and M-CSF were not detected during the experiment. In conclusion, this study demonstrated in apical papilla cells that LPS can increase OPG levels while Ca (OH) 2 can decrease them. This modulation was not detected in cells of periodontal ligament. Thus, LPS and Ca (OH) 2 can influence the modulation of bone resorption molecular events by apical papilla cells.

Keywords: Calcium hydroxide. RANKL. OPG. Stem cells. Apical papilla. Periodontal ligament.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Processo de coleta de tecido para obtenção de células de papila apical (CPA) a partir de cultura primária com explantes. Papila apical de um terceiro molar com raiz dentária com rizogênese incompleta (A). Papila apical sendo removida da raiz dentária (B). Papila apical fragmentada na Placa de Petri (C). Papila apical fragmentada e tratada com antibiótico (D). Fragmentos de papila apical sendo posicionadas no frasco de cultivo celular (E). Tecido fragmentado da papila apical aderido no frasco de cultivo celular (F).....40
- Figura 4.2 - – Processo de coleta de tecido para obtenção de células do ligamento periodontal (CLP) a partir de cultura primária com explantes. Ligamento periodontal sendo removida da raiz dentária (A). Tecido do ligamento periodontal na Placa de Petri (B). Ligamento periodontal sendo fragmentado com bisturi (C). Fragmentos de ligamento periodontal sendo tratados com antibióticos (D). Tecido fragmentado do ligamento periodontal no Falcon de 25mL para ressuspensão (E)41
- Figura 5.1 - Primeiras células de papila apical (CPA) a soltarem do explante a partir de cultura primária (A). Células da papila apical expandidas no frasco de cultura celular (B). Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X45
- Figura 5.2 - Primeiras células do ligamento periodontal (CLP) a soltarem do explante a partir de cultura primária (A). Células do ligamento periodontal expandidas no frasco de cultura celular atingindo 90% de confluência (B). Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X.....46
- Figura 5.3 - Viabilidade e atividade metabólica de CPA frente ao estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação na presença de LPS nas concentrações de 1; 0,1; 0,01 e 0,001 μ /mL por 24 horas. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios47
- Figura 5.4 - Viabilidade e atividade metabólica de CLP frente ao estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação na presença de LPS nas concentrações de 1; 0,1; 0,01 e 0,001 μ /mL por 24 horas. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios47

- Figura 5.5 - Comparação dos níveis de viabilidade e atividade metabólica das CPA e CLP indicadas por (A) e (B). O resultado demonstrou-se satisfatório e indicou que as CLP têm mais atividade metabólica que as CPA desde o grupo controle até o grupo com 1 µ/mL de LPS 48
- Figura 5.6 - Quantificação da expressão de RANKL para escolha da concentração de LPS 49
- Figura 5.7 - Quantificação da expressão de OPG nas CPA. Os grupos LPS+1000 e LPS+250 demonstraram uma queda importante na expressão de OPG comparados aos outros grupo. Grupo α-MEM+1000 também demonstrou ligeira queda na produção de OPG 50
- Figura 5.8 - Quantificação da expressão de OPG nas CLP. O gráfico demonstra que houve um pequeno aumento na produção de OPG pelas células no grupo LPS e em seguida outra queda nos grupos LPS+1000 e LPS+250. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos..... 51
- Figura 5.9 - Viabilidade e atividade metabólica de CPA frente ao estímulo com 0,01 µg/mL de LPS e Ca(OH)₂ em concentrações de 1000 e 250 µg/mL. Células foram mantidas em meio de proliferação por 24 horas. Foi possível verificar uma ligeira queda na viabilidade do grupo α-MEM+1000. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios..... 52
- Figura 5.10-Viabilidade e atividade metabólica de CLP frente ao estímulo com 0,01 µg/mL de LPS e Ca(OH)₂ em concentrações de 1000 e 250 µg/mL. Células foram mantidas em meio de proliferação por 24 horas. Foi possível verificar uma ligeira queda na viabilidade do grupo α-MEM+1000. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios..... 53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	O tratamento endodôntico em dentes imaturos	23
2.2	O papel das células da papila apical	25
2.3	Papel das Células-tronco do Ligamento Periodontal.....	27
2.4	Ativação da Resposta Imune Inata	28
2.5	Produção de Citocinas na Resposta Inflamatória	30
3	PROPOSIÇÃO	37
3.1	Objetivo geral.....	397
3.2	Objetivos específicos.....	397
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Obtenção das células da papila apical e ligamento periodontal.....	39
4.2	Ativação das células de papila apical e ligamento periodontal	41
4.3	Viabilidade Celular – estímulo com LPS	42
4.4	Quantificação de RANKL nos sobrenadantes de CPA e CLP.....	42
4.5	Ativação das CPA e CLP – estímulo com LPS e Ca(OH)₂	43
4.6	Viabilidade Celular – após estímulo com LPS e Ca(OH)₂.....	43
4.7	Quantificação de RANKL, M-CSF e OPG nos sobrenadantes de CPA e CLP	44
4.8	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Obtenção das células da papila apical e ligamento periodontal.....	45
5.2	Ativação das células de papila apical e ligamento periodontal com LPS e avaliação da Viabilidade Celular	46
5.3	Quantificação de RANKL para escolha de concentração de LPS.....	49
5.4	Quantificação de RANKL, M-CSF e OPG nos sobrenadantes e ensaio de viabilidade celular após estímulo com LPS e Ca(OH)₂.....	49
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE	73
	ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

A Endodontia, como uma área clínica da Odontologia, tem como objetivo prevenir e tratar as doenças da polpa e dos tecidos periapicais. No processo inflamatório da polpa, a cárie (lesão causada por microrganismos) e injúrias, são fatores que, sem intervenção eficaz, podem levar ao desenvolvimento de um processo inflamatório da polpa, necrose pulpar e conseqüentemente à lesão periapical (Love et al., 2002). Em casos de dentes permanentes jovens, onde não ocorreu o processo completo de rizogênese, o ápice aberto, paredes delgadas e comprimento das raízes curto, são problemas que interferem de maneira crucial na conservação, durabilidade, resistência e longevidade desse elemento dental (Iwaya et al., 2001).

Vale ressaltar que, o tratamento de dentes com rizogênese incompleta com necrose pulpar é um grande desafio e a busca de técnicas, instrumentos, medicações entre outros, são os temas mais atuais de estudo e pesquisa na área da Endodontia. Os novos protocolos e métodos de terapia regenerativa para revascularização pulpar, viabilizam ao dente comprometido a chance de aumentar o espessamento das paredes radiculares, o fechamento apical, bem como o seu comprimento (Nosrat et al., 2011)

Embora esses protocolos no tratamento de dentes com rizogênese incompleta estejam em constante avanço, os processos de interrupção do desenvolvimento do elemento e de regeneração pulpar ainda deixam lacunas que precisam ser esclarecidas. Pressupõe-se que as células-tronco são fundamentais para a formação de um tecido revascularizado e, conseqüentemente, peças fundamentais para melhorar o prognóstico dos elementos tratados com terapia regenerativa. Isso porque, as células da papila apical têm a capacidade de diferenciar-se em célula odontoblástica, sendo esta responsável pela rizogênese (Banchs; Trope, 2004). Contudo, sabe-se que os microrganismos também desenvolvem um papel importante no processo inflamatório e necrótico quando a polpa dental é agredida. Sendo assim, é de extrema importância entender a interferência das bactérias nas células da papila apical (Lopes; Siqueira, 2010).

Pesquisas atuais mostram o papel fundamental dos Lipopolissacarídeos (LPS) no estímulo da osteoclastogênese. O LPS é capaz de modular a produção de citocinas responsáveis pela remodelação óssea, como o Ligante do Ativador do Receptor do Fator Nuclear Kappa B (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG), que quando em homeostasia, apresentam-se de forma bioequivalente promovendo constante reabsorção e deposição óssea. No entanto, quando existe um estímulo inflamatório, a relação RANKL/OPG aumenta nos tecidos periodontais e periapicais levando ao aumento da atividade dos osteoclastos e à reabsorção óssea patológica (Graves et al., 2011).

O Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2) vem sendo utilizado na Odontologia por décadas, promovendo a inviabilidade da proliferação bacteriana (Tavares et al., 2010). O Ca(OH)_2 também possui outras propriedades importantes para o tratamento de doenças infecciosas oriundas da polpa necrótica como biocompatibilidade, solvente de matéria orgânica, pH básico e indução de mineralização (Rodrigues et al., 2013)

Apesar de RANKL e OPG já terem sido encontrados no tecido periodontal e periapical (Yasuda et al., 1998; Graves et al., 2011), ainda não existem estudos que detectaram como essas citocinas se organizam quando estimuladas por microrganismos e substâncias antibacterianas sucessivamente. Para que haja progresso nos tratamentos clínicos de terapia regenerativa, é imprescindível que esse conhecimento seja entendido. A compreensão dessas alterações e interações biológicas e químicas poderão trazer abordagens futuras que poderão alterar o processo de reabsorção óssea e reversão desse quadro.

Em 2018, Franciscone et al. analisaram a expressão e distribuição de RANK, RANKL e OPG em cistos perirradiculares e encontraram maior expressão de RANK e RANKL no tecido conjuntivo durante a presença de infiltrado inflamatório crônico em comparação ao infiltrado inflamatório misto. Outro estudo investigou a possível associação entre as expressões de RANKL e OPG e infiltrado inflamatório na periodontite apical crônica, demonstrando que a expressão de RANKL estava aumentada no infiltrado inflamatório crônico contendo linfócitos (células T e B) e macrófagos (Armada et al., 2015).

Do exposto acima, esta dissertação apresenta uma avaliação da capacidade de células humanas de papila apical e ligamento periodontal em cultura em modular a osteoclastogênese *in vitro* por meio da produção de citocinas envolvidas neste processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O tratamento endodôntico em dentes imaturos

A preservação dos tecidos responsáveis pela formação da dentina e cemento ao decorrer do desenvolvimento dentário é imprescindível para a formação completa da raiz. Quando a polpa dentária sofre alguma injúria tanto bacteriana como trauma, a formação radicular completa é interrompida. Por conta desse fator, o dente que passou por um processo inflamatório e necrótico, sofrerá uma formação radicular inadequada (raízes curtas e paredes delgadas). Essa característica tende a deixar o dente mais frágil (Iwaya et al., 2001).

A apicificação é o tratamento endodôntico adequado para dentes necróticos com rizogênese incompleta. Este tratamento é realizado por trocas sucessivas de Ca(OH)_2 para que uma barreira mineralizada seja formada possibilitando que o canal radicular seja obturado. A necessidade da troca de Ca(OH)_2 por várias sessões é uma desvantagem para esse tratamento, tornando o resultado longo, além de que, essa medicação a longo prazo pode fragilizar a raiz por decorrência das propriedades higroscópicas e proteolíticas. O MTA surge como uma nova ferramenta para a formação do tampão apical por ser biologicamente compatível com os tecidos adjacentes e ter alta capacidade de selamento. Porém, esses dois protocolos terapêuticos, por mais que promovam um selamento apical, não permitem que a raiz, ainda em seu estado imaturo, seja capaz de se desenvolver a ponto de se tornar mais espessa para evitar a possibilidade de fratura do elemento dental (Nosrat et al., 2011).

Encontrar um plano de tratamento que possa melhorar o prognóstico de dentes necróticos com rizogênese incompleta é um dos temas mais explorados nas pesquisas de tratamento endodôntico na atualidade, especialmente após a introdução de procedimentos denominados como regenerativos. Os atuais planos de tratamento regenerativos que visam continuar o desenvolvimento radicular por meio da revascularização pulpar tornaram-se um método promissor para o tratamento endodôntico de dentes necróticos e imaturos. A formação de um novo tecido no canal

radicular passa então a ser uma vantagem, que permitirá o aumento da espessura e do comprimento da parede dentária (Iwaya et al., 2001).

Ostby (1961) publicou um dos primeiros estudos a avaliar o papel dos coágulos sanguíneos no tratamento endodôntico. Este estudo provou que após a desinfecção do canal radicular, havia sangramento ou formação de coágulo sanguíneo no interior do canal em dentes de cães, o que pareceu essencial para formar uma estrutura de suporte afim de sustentar o tecido conjuntivo fibroso no canal radicular vazio.

Banchs e Trope (2004), propuseram uma técnica pioneira para revascularização de dentes permanentes jovens com periodontite apical e ápice aberto. De acordo com o caso relatado, uma grande quantidade de hipoclorito de sódio a 5,25% foi usada como substância química e, em seguida, uma pasta antibiótica tripla à base de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina foi usada como medicação intracanal por 28 dias. Após esse período, foi realizado o debridamento apical para produzir sangramento e formar um coágulo dentro do canal e, em seguida, o selamento coronário foi realizado. O acompanhamento clínico e radiológico revelou que a paciente era assintomática e a radiolusência apical havia desaparecido, acompanhada de fechamento apical e espessamento das paredes radiculares.

Os autores concluíram que quando esta técnica foi usada em combinação com a desinfecção do canal radicular, a formação de uma matriz de coágulo para fazer crescer um novo tecido em um selamento coronário eficaz, criou um ambiente suficientemente estável para uma revascularização bem-sucedida. Sendo assim, sugeriram que essa técnica seria uma boa alternativa para o tratamento da apicificação tradicional (Banchs; Trope, 2004; Kim et al., 2012)

Com o passar do tempo, foram observados casos de necrose pulpar e rizogênese incompleta que com o tratamento de revascularização, obtiveram sucesso clínico e radiográfico através de regressão da sintomatologia e lesão periapical, aumento do comprimento radicular, espessamento das paredes e fechamento apical (Thibodeau; Trope, 2007; Jung et al., 2008; Kim et al., 2012).

Os inúmeros casos de sucesso clínico e radiográfico na terapia regenerativa, despertaram a necessidade de mais investigação dos protocolos regenerativos entre os cientistas (Kim et al., 2012). Mas, para que esse tema seja realmente entendido, é

necessário que sejam explorados com mais rigor os mecanismos químicos, biológicos e moleculares que estão envolvidos tanto no processo de interrupção do desenvolvimento de dentes imaturos pós-infecção, bem como aqueles após a revascularização. E para que isso ocorra, é de suma importância entender a modulação e diferenciação das células envolvidas nesses processos.

2.2 O papel das células da papila apical

Em 2003, a equipe de Shi e Gronthos se tornou pioneira na pesquisa de células-tronco na área odontológica. Eles encontraram uma população de células indiferenciadas - DPSC (do inglês, *dental pulp stem cells*) na polpa dentária humana e observaram que as células foram capazes de regenerar o complexo dentino pulpar danificado produzindo uma espécie de matriz mineralizada com tubos finos, odontoblastos e tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos semelhantes aos dentes humanos (Gronthos et al., 2000).

Atualmente, vem sendo relatado com base na literatura, que não apenas as células da polpa dentária de dentes permanentes têm a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em diferentes linhagens, mas também as células derivadas dos dentes decíduos, papilas apicais, ligamento periodontal e folículo dentário também possuem as mesmas características (Miura et al., 2003; Seo et al., 2004; Morsczeck et al., 2005; Sonoyama et al., 2008).

Desde então, a papila apical é descrita como fonte de células-tronco mesenquimais, que foram isoladas pela primeira vez por Sonoyama et al. (2008). A equipe isolou células da papila apical e confirmou por citometria de fluxo que o tecido era positivo para marcadores de células-tronco mesenquimais.

Em 2008, Sonoyama et al., também observaram a capacidade das CPA de formarem colônias e diferenciação osteo/odontogênica. As CPA também expressaram altos níveis de survivina (uma proteína com a função de inibir a apoptose) e telomerase (enzima que tem como função adicionar sequências específicas e repetitivas de DNA à extremidade 3' dos cromossomos, onde se encontra o telômero),

ou seja, a survivina e a telomerase desempenham um papel fundamental na proliferação e sobrevivência celular. Para esclarecer o papel das CPAs, os autores removeram a papila apical dos molares de porcos nos estágios iniciais de desenvolvimento. Embora o tecido pulpar ainda estivesse intacto, esse processo interrompeu o desenvolvimento dessa raiz. De acordo com o autor, pode-se especular a partir deste estudo que as CPA são a fonte celular dos primeiros odontoblastos. No mesmo estudo de Sonoyama em 2008, usando partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como transportadores, as células-tronco da papila foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos. A estrutura dentinária semelhante foi regenerada e uma camada de dentina foi formada na superfície de hidroxiapatita/fosfato tricálcico com tecido conjuntivo.

Um estudo sequencial, caracterizou as CPA por histologia, imuno-histoquímica e análises de imunofluorescência, e foram comparadas com células-tronco da polpa dentária (CPD). A proliferação das CPA foram 2 a 3 vezes maior do que a das CPD. Ambas foram igualmente eficazes na formação e diferenciação óssea e dentinária, assim como as células-tronco da medula óssea. Além do mais, as CPA demonstram uma enorme diversidade de marcadores neurogênicos, como nestina e neurofilamento M após estimulação neurogênica. O trabalho concluiu que as CPA e CPD são semelhantes no que diz respeito à ambas serem fontes potentes e distintas de células-tronco (Sonoyama et al., 2008).

Em 2011, Bakopoulou et al., também compararam a diferenciação em potencial óssea/odontogênica de MSCs (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*) derivadas da polpa ou papila apical dos dentes permanentes em desenvolvimento *in vitro* e descobriram um potencial maior de multiplicação e mineralização comparando com CPD.

Sabe-se que as CPA podem se diferenciar em vários tecidos. Pesquisas têm relacionado certos fatores de crescimento à diferenciação odontogênica, osteogênica e condrogênica da CPA e comprovando seu grande potencial. Por mais que as CPA apresentem similaridades com as CPD, estudos sugerem que as CPA são a principal fonte de odontoblastos em dentes imaturos e que CPD são a fonte de odontoblastos para produzir dentina reparadora (Wang et al., 2010; Shrestha et al., 2020).

A papila apical, devido à sua localização (apicalmente a polpa dentária), pode sobreviver em casos de necrose pulpar por estar em contato com o osso alveolar e sua remoção em dentes imaturos, leva à interrupção do processo de desenvolvimento dentário (Tobias Duarte et al., 2014). Por estar localizada no ápice do dente e próxima ao osso alveolar, a papila dentária ainda pode sobreviver, apesar da ocorrência de necrose pulpar. Por outro lado, Huang et al. (2008) também descobriram que mesmo na presença de polpa dentária, a remoção cirúrgica do tecido nos estágios iniciais da formação da raiz pode causar interferência no processo de rizogênese.

Huang et al. (2008) demonstraram que o CPA tem a capacidade de se diferenciar em odontoblastos e é responsável pela revascularização e concluíram que, mesmo com o potencial de diferenciação odontogênica das CPA, o tratamento regenerativo não resultará na formação de dentina e tecido pulpar e que a revascularização de dentes necróticos está relacionada à deposição de tecido ósseo e cimento no espaço anteriormente ocupado pela polpa dentária, enquanto a dentina só é observada em dentes com pulpite irreversível (Huang et al., 2009).

As pesquisas citadas permitem especular que o processo inflamatório que ocorre no tecido pulpar que forma os dentes levará a alterações no fenótipo e na função das células da papila dentária, o que pode prejudicar a formação radicular desses dentes.

Essas descobertas iniciam diversos questionamentos em torno dos fenômenos celulares e moleculares causadores da interrupção da rizogênese em dentes comprometido, e indica a relevância para o entendimento dos acontecidos com a sobrevivência e funções celulares no conjunto e células que formam a papila apical.

2.3 Papel das Células-tronco do Ligamento Periodontal

Nos anos de 1980, as células-tronco de ligamento periodontal (CLP) passaram a representar uma ferramenta promissora para terapia regenerativa no tratamento de lesões dos tecidos periodontais. Pesquisadores desde então, vem tentando entender as características dessas células em diversos estudos. Na década de 1980, as células

que exibiam tamanho pequeno, uma alta proporção nuclear/citoplasmática e divisão celular lenta foram relatados como localizados em regiões adjacentes aos vasos sanguíneos, e essas células foram sugeridas como CLP (Gould, 1983; Gilles et al., 1997).

Em 2004, CLP humanas exibindo capacidade de diferenciação e multipotentes foram primeiramente isoladas do tecido do ligamento periodontal humano (PDL) por Seo et al. (2004). Desde então, as CLP passaram a exibir propriedades únicas e alguns autores demonstraram a plasticidade das CLP para se diferenciar em células osteoblásticas e adipocíticas (Huang et al., 2009; Chadipiralla et al., 2010).

Além disso, Seo et al. (2004), identificaram STRO-1 e CD146 como marcadores de superfície potentes das CLP. A porcentagem de células residentes no tecido do ligamento periodontal positivas para esses marcadores é muito baixa, no entanto, indicativa da dificuldade em adquirir um número suficiente dessas células de um paciente para uso clínico. Porém, depois desse trabalho, um ensaio clínico usando CLP humanas proliferativas foi conduzido em pacientes com perda óssea, revelando uma melhora significativa das doenças periodontais e sugerindo que o transplante de células poderia ser um tratamento seguro e promissor (Feng et al., 2010).

Um estudo *in vitro* realizado por Gebhardt et al. (2009), revelou que o colágeno e um polímero sintético são scaffolds úteis para a sobrevivência das CLP, também sugerindo a viabilidade da análise de longo prazo e complementa com a questão relacionada ao número de células disponíveis para tratamento regenerativo na prática clínica que permanece ainda sem solução.

2.4 Ativação da Resposta Imune Inata

Com esse processo evolutivo da doença endodôntica, é desencadeada notável alteração bioquímica e celular que, na atribuição de autoproteção do periápice e, conseqüentemente, do organismo, iniciam, coordenadamente, a destruição tecidual, com reabsorção óssea e cemento-dentinária. O processo de reabsorção óssea é consequência da resposta inflamatória frente a infecção endodôntica, denominada genericamente de lesão periapical, sendo a mesma identificada, radiograficamente,

mediante reabsorção da medula óssea e comprometimento parcial ou total da lâmina dura. A doença periodontal está entre as mais prevalentes patologias infecciosas, constituindo-se na principal causa da perda dental com implicações significativas ao nível de saúde pública (Leonardo et al., 2002; Desvarieux et al., 2003; Elter et al., 2003; Soares et al., 2006).

O estudo de Kakehashi et al. (1965) já demonstrava a relação entre a presença de uma infecção bacteriana e o desenvolvimento de uma lesão periapical, resultando em uma resposta imunológica adaptativa aos antígenos provenientes da infecção endodôntica.

Clinicamente, a rizogênese é interrompida pelo comprometimento da vitalidade da polpa dentária e consequente colonização de microrganismos na cavidade pulpar. Os microrganismos invadem o tecido pulpar levando à formação de processo inflamatório seguido de necrose (Sheehy et al., 1997).

As bactérias gram-negativas são os microrganismos mais comuns na polpa dentária em estágio necrótico (Ricucci; Siqueira Jr, 2010). O LPS é uma combinação de lipídeos polissacarídeos, um componente exclusivo da parede celular das bactérias gram-negativas. Essas endotoxinas são antígenos liberados pela morte e divisão celular (Morrison; Ryan, 1987).

Um estudo realizado por Herrera et al. (2015) confirmaram que a presença de bactérias e seus subprodutos em todas as amostras de dentes com infecções pulpares primárias, indica que as bactérias e o LPS têm uma forte correlação com a indução de periodontite apical. A concentração de LPS no canal radicular avaliada por LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) estava entre 0,001 e 0,1 µg / mL. No entanto, esta técnica pode coletar apenas um pequeno número de moléculas de LPS, e a concentração exata presente no canal radicular pode ser maior do que a concentração relatada por este método.

Em 2017, um estudo conduzido por Lertchrakarn e Aguilar avaliou o efeito de LPS de *Porphyromonas gingivalis* na proliferação de células-tronco da papila apical e descobriu que todas as concentrações de LPS estudadas (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 µg/mL) não alteraram a viabilidade e proliferação celular. Outra pesquisa conduzida por Albiero et al. (2015) mostrou que a exposição a LPS de *Escherichia coli* reduz a

proliferação celular no ligamento periodontal e que a concentração de LPS também tem efeitos diferentes. O LPS de *E. coli* a 0,1 µg/mL aumentou a proliferação de células-tronco na polpa, já a 10µg / mL reduziu a multiplicação celular.

Lertchirakarn e Aguilar (2017) observaram a diferenciação osteogênica de células papilares na presença de lipopolissacarídeo a 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 µg / mL, não houve diferença na mineralização até 14 dias demonstrada pelo ensaio Vermelho de Alizarina. A presença de toxinas também não causou diferenças na expressão dos genes DSPP e OPN (osteopontina), ambos relacionados à mineralização da matriz extracelular.

He et al. (2015), descobriram nas células pulpares, o LPS de *E. coli* a 0,1; 1 e 10 µg/mL, comparado com o controle, os depósitos mineralizados aumentaram. Nas células do ligamento periodontal, não há alteração na mineralização do LPS (Albiero et al., 2020). Entre as células do folículo dentário, o processo de maturação do fenótipo osteoblástico/cementoblástico é prejudicado pela exposição ao LPS de *P. gingivalis*, levando à redução da formação de matriz mineralizada.

Esses trabalhos concluem que as toxinas bacterianas podem afetar o processo de proliferação e diferenciação celular em duas direções, e os resultados observados estão diretamente relacionados à origem das células mesenquimais, à concentração e ao tipo de LPS utilizado. É de grande importância entender que a interação entre as células localizadas na papila apical e as toxinas bacterianas, pois essas células desenvolvem papel essencial no processo de regeneração.

2.5 Produção de Citocinas na Resposta Inflamatória

A periodontite apical é uma lesão óssea infecciosa e inflamatória que ocorre na região do ápice de uma raiz dentária e promove a destruição do ligamento periodontal e osso apical. Essas lesões ocorrem seguindo os estágios: colonização bacteriana, inflamação e necrose da polpa, progressão da inflamação para a região periapical e reabsorção óssea dessa área. A resposta inflamatória envolve o recrutamento e ativação de leucócitos, promovendo a osteoclastogênese e consequentemente lesão

óssea no ápice do dente (Graves et al., 2011). No processo de reabsorção, as principais células envolvidas são os osteoclastos, que são células especializadas derivadas dos monócitos/macrófagos de linhagem hematopoiética que degradam a matriz óssea resultando na lesão óssea periapical (Boyle et al., 2003; Yao et al., 2005)

A diferenciação dos osteoclastos se dá pela fusão de seus precursores mononucleares, encontrados tanto na medula óssea como no sangue periférico, e pela capacidade de diferenciação que leva a um processo chamado osteoclastogênese (Yasuda et al., 1998). São células multinucleadas que descendem de precursores hematopoiéticos CD14+. Essas células são encontradas na medula óssea e na circulação do sangue periférico e se ligam na superfície óssea previamente à fusão e diferenciação. Os osteoclastos expressam níveis elevados de fosfatase ácida resistente ao tartarato (Tartrate Resistant Acid Phosphatase - *TRAP*) e acabam por causar reabsorção através da secreção de íons hidrogênio e enzimas líticas que são responsáveis pelo início dos eventos de remodelação. Esse processo exige uma interação de mecanismos parácrinos e celulares. Entre eles o (Macrophage Colony-Stimulating Factor - *M-CSF*) e (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand* - *RANKL*) que são fatores chaves no processo da osteoclastogênese (Rodrigues et al., 2013).

O *M-CSF* é um polipeptídeo de ação local que estimula a diferenciação de células precursoras da medula em macrófagos. É uma proteína do grupo de citocinas produzida por várias células, como, fibroblastos, osteoblastos, granulócitos, linfócitos, células endoteliais e tumorais (Siqueira Jr; Soboia-Dantas, 2000; Teitelbaum, 2007). Regula a osteoclastogênese por ser uma molécula que se liga ao seu receptor *c-Fms (colony-stimulating factor-1 receptor)* nas células precursoras osteoclásticas, promovendo sinais essenciais para sobrevivência e proliferação destas células (Teitelbaum, 2007). Significa que a expressão de *M-CSF* por células estromais osteoblásticas é necessária para células progenitoras se diferenciarem em osteoclastos (Boyce; Xing, 2008).

O *RANKL* é um polipeptídeo codificado pelo gene *TNFSF11* com 317 aminoácidos (Tyrovola et al., 2008; Chen et al., 2014; Guerrini; Takayanagi, 2014), se apresentando em duas formas: ligada a membrana (a mais comum), com 40-45 kDa e a forma solúvel, com 31kDa (Teitelbaum, 2007; Khosla, 2001). Ele foi descoberto em 1998, sendo considerada a mais importante citocina, atuando como indutor

fisiológico da osteoclastogênese, onde se liga diretamente ao RANK na superfície celular dos pré-osteoclastos e osteoclastos. Ao ativar o RANK, participa ativamente no processo de maturação e desenvolvimento destas células (Menezes et al., 2006; Giner et al., 2009; Braun; Schett, 2012; Rechenberg et al., 2014).

RANKL é expresso por osteoblastos, fibroblastos, linfócitos T e B e macrófagos. É uma citocina osteoclastogênica, considerada um fator crítico na diferenciação terminal dos osteoclastos (Kikuta et al., 2013; Guerrini; Takayanagi, 2014). Membro da superfamília TNF, é uma proteína residente na membrana de osteoblastos e em precursores que reconhecem seu receptor, RANK, nos macrófagos na medula, havendo a mudança para o fenótipo de osteoclasto. Embora seja expressa fisiologicamente, principalmente por células mesenquimais da linhagem dos osteoblastos, esta citocina osteoclastogênica é produzida em abundância por linfócitos T em processos inflamatórios. Nestes casos, podendo ser clivados da membrana celular e se apresentar como um ligante solúvel (Teitelbaum, 2007). A maioria dos fatores conhecidos para estimular a formação e ativação de osteoclastos induz a expressão de RANKL por células osteoblásticas (Boyce; Xing, 2008). Honma et al. (2014) sugerem que os osteócitos são fonte principal de RANKL em processos patológicos e fisiológicos da osteoclastogênese. Osteócitos irão fornecer RANKL aos precursores de osteoclastos através de interação direta de suas extremidades dendríticas.

OPG é representado por 380 aminoácidos, expressa pelo gene TNFRSF11b. É uma proteína solúvel, homóloga e membro da família de receptores do TNF encontrada principalmente no osteoblasto, é um receptor de RANKL que tem a função de inibir a ligação de RANK e RANKL. Os níveis de RANKL e OPG estão em equilíbrio em condições homeostáticas, onde há osteoclastogênese e reabsorção óssea de forma bioequivalentes promovendo a remodelação óssea. Quando existe um estímulo inflamatório, a relação RANKL/OPG aumenta nos tecidos periodontais e periapicais levando à estimulação da atividade dos osteoclastos e à reabsorção óssea patológica (Graves et al., 2011). Como o RANKL, a OPG é modulada por citocinas inflamatórias. A OPG é expressa por osteoblastos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais (Kuntz et al., 2001; Menezes et al., 2006; Boyce; Xing, 2008; Cochran, 2008; Giner et al., 2009).

RANK é uma proteína com 616 aminoácidos, sendo expressa pelo gene TNFRSF11a, encontrado na membrana de células precursoras dos osteoclastos e quando ativadas, promovem e orientam a diferenciação destes, aumentando sua atividade celular, como também retardando o seu processo de apoptose (Menezes et al., 2006; Tyrovola et al., 2008; Giner et al., 2009; Tekkesin et al., 2011; Guerrini; Takayanagi, 2014).

A ligação entre RANKL e OPG apresenta papel fundamental na biologia dos osteoclastos, sendo que a interação RANKL/RANK é essencial para a estimulação da osteoclastogênese e indução da reabsorção óssea. Esse evento acontece, pois, a ligação RANK/RANKL faz com que o monócito, célula precursora encontrada na medula óssea, se diferencie em osteoclasto. No entanto OPG também tem a capacidade de se ligar a RANKL inibindo a ligação RANK/RANKL e consequentemente a indução da osteoclastogênese. Em condições de homeostasia, a quantidade de OPG e RANKL é bioequivalente, ou seja, o processo de remodelação óssea são iguais no que se diz respeito à deposição e reabsorção óssea (Graves et al., 2011).

Em síntese a reabsorção óssea é iniciada a partir da ação de receptores e ligantes relacionados à grande família TNF (Fator de Necrose Tumoral), representados pelas proteínas RANK (Receptor Ativador Nuclear kB), RANKL (Ligante do Receptor Ativador Nuclear kB) e OPG (Osteoprotegerina) (Rechenberg et al., 2014). RANK, RANKL e OPG são moléculas-chave reguladoras da atividade biológica dos osteoclastos e metabolismo ósseo. A presença do RANKL ativará seu receptor RANK, que estimulará a diferenciação dos precursores dos osteoclastos. Em contrapartida, o receptor OPG se liga ao RANKL, bloqueando a ligação RANK/RANKL, inibindo a diferenciação dos osteoclastos e consequentemente a reabsorção óssea (Silva; Branco, 2011; Rechenberg et al., 2014).

Estudos sugerem que processos patológicos variados, como osteólise, periprotética, artrite reumatóide, talassemia, mieloma múltiplo, metástases tumorais, doença periodontal e periodontite apical tenham a proporção RANKL/ OPG como fator importante no processo de reabsorção óssea. (Goranova-Marinova et al., 2007; Ainola et al., 2008; Canon et al., 2008; Skordis et al., 2008; Wang et al., 2010; Rechenberg et al., 2014).

Belibasakis et al. (2013) conduziram uma revisão sistemática relacionada a RANKL e/ou OPG na polpa dentária e em doenças periapicais no período entre 1948 e 2011. Foram utilizadas as bases de dados da Medline, Biosis, Cochrane, Embase e Web Sciences. Os autores concluíram que há relativamente escassez de informação disponível que enfatize a participação específica do RANKL e OPG na polpa dentária e em lesões periapicais. Constataram também que a OPG pode agir de forma protetora contra a reabsorção radicular interna e que se a razão entre RANKL e OPG estiver crescente, poderá indicar a presença de um processo de reabsorção óssea.

Nos tecidos periodontais e periapicais, o balanço de RANKL/OPG é um fator importante para a regulação da reabsorção óssea. A diferenciação e ativação de osteoclastos são direcionadas pela interação do ativador do receptor do fator nuclear- κ B (RANK) presente nos monócitos com seu ligante, RANKL (Yasuda et al., 1998). A inibição de RANKL diminui a perda óssea na doença periodontal. Acredita-se que a progressão da doença periodontal se dá pela interação de vários fatores, incluindo a presença de bactérias, altos níveis de citocinas pró- inflamatórias e prostaglandinas, produção e ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e RANKL e níveis relativamente baixos de interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e OPG (Graves et al., 2011).

A presença de patógenos microbianos promove uma produção inicial de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL1 β , que estimulam a expressão e ativação de MMPs que degradam a matriz do tecido conjuntivo extracelular. As citocinas, como o TNF- α , estimulam a osteoclastogênese de forma independente, enquanto outras citocinas promovem a expressão do RANKL, que leva à diferenciação de osteoclastos e a exercer sua função (Graves et al., 2011).

Buck et al. (2001) em um estudo de LPS sobre o RANKL uma citocina do grupo TNF em osteoblastos de camundongos revelou um aumento do LPS no nível de RNAm para ODF. Demonstrando que a expressão do gene ODF está diretamente aumentada nos osteoblastos pelo LPS o que pode desempenhar papel importante na patogênese dos distúrbios ósseos. Wada et al. (2004) demonstraram que em fibroblastos de ligamento periodontal, o LPS induziu o aumento do RNAm de OPG e RANKL devido a estímulos de IL - 1 β ou TNF - α , no entanto, estas células não são

capazes de induzir a osteoclastogênese. Também resultados similares de aumento de RNAm de OPG e diminuição de RNAm de RANKL foram observados em cementoblastos estimulados com LPS de *P gingivalis*.

O início de uma cascata de inflamação em lesões endodônticas tem como gatilho a interação de vários tipos de células envolvendo a ativação de células endoteliais, polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e osteoclastos, levando à rápida destruição óssea. A resposta do hospedeiro envolve células da resposta imune inata e adaptativa. A destruição do osso encontrada nas lesões endodônticas é iniciada por múltiplas bactérias ou seus subprodutos, incluindo lipopolissacarídeos (LPS) (Graves et al., 2011).

O LPS é uma endotoxina liberada na multiplicação e na morte celular dos microrganismos, causando efeitos que promovem uma reação inflamatória e reabsorção óssea. Esses microrganismos responsáveis pela necrose pulpar e periodontite apical são em grande parte bactérias Gram-negativas que liberam endotoxinas no interior do canal radicular infectado (Oliveira et al., 2012).

O hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) vem sendo utilizado na Odontologia por décadas, tendo como mecanismo de ação principal a manutenção do pH alcalino promovendo assim, a inviabilidade da proliferação bacteriana. O hidróxido de cálcio também possui outras propriedades importantes para o tratamento de doenças infecciosas oriundas da polpa necrótica como biocompatibilidade, solvente de matéria orgânica e devido ao seu pH elevado tem capacidade de inibir a reabsorção óssea e induzir consequentemente a sua mineralização. Esse mecanismo está relacionado com a sua dissociação em íons hidroxila e íons cálcio e à mudança do pH do meio (Rodrigues et al., 2013).

Safavi et al. (1993) avaliaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano da bactéria *Salmonella typhimurium* com hidróxido de cálcio em pó ou água esterilizada. Como resultado, o LPS tratado com Ca(OH)_2 mostrou elevadas quantidades de ácidos graxos hidrolisados, concluindo-se que o MIC é capaz de hidrolisar a cadeia lipídica do lipopolissacarídeo bacteriano. A alta efetividade do Ca(OH)_2 como MIC é atribuída ao grupo hidroxila que promove um ambiente alcalino. Além da baixa solubilidade, a dissociação do íon hidroxila aumenta o PH do meio, o suficiente para eliminar as bactérias e inativar o LPS bacteriano.

O Ca(OH)_2 tem a capacidade de aumentar a taxa de mineralização *in vitro* (Rahhal et al., 2019). O aumento na mineralização celular por Ca(OH)_2 pode ser devido à modulação da liberação do fator de crescimento (Jaunberzins et al., 2000) e em células da polpa dentária *in vitro*, os materiais contendo cálcio aumentaram a produção de TGF- β 1 (Rashid et. al., 2003).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Investigar a capacidade de células humanas da papila apical e ligamento periodontal em cultura em modular a osteoclastogênese por meio da produção de citocinas envolvidas neste fenômeno.

3.2 Objetivos específicos

Investigar a produção de OPG, RANKL e M-CSF por células de papila apical e ligamento periodontal moduladas por LPS de *E. coli* e tratamento com hidróxido de cálcio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Parecer nº3.612.591, CAAE 21469419.0.0000.0075, Anexo A).

A execução do experimento foi dividida em seis fases. Na primeira, as células da papila apical e ligamento periodontal foram obtidas. Em seguida, as células da papila apical e ligamento periodontal foram ativadas com LPS e submetidas ao ensaio de MTT e para avaliação da viabilidade celular. Na terceira fase, foi realizada a quantificação de RANKL para escolha da concentração de LPS. Na quarta fase desse experimento, as CPA e CLP foram estimuladas com LPS e Ca(OH₂). Na quinta fase, as CPA e CLP foram submetidas ao ensaio de MTT e por fim, foi realizada a quantificação das citocinas.

4.1 Obtenção das células da papila apical e ligamento periodontal

Terceiros molares com ápice incompleto foram doados por voluntários da clínica de cirurgia da FOUSP mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) (n=2). Os dentes foram lavados, a papila apical e o ligamento periodontal foram removidos gentilmente da raiz dentária com auxílio de pinça clínica e bisturi do tipo 15C com técnica asséptica. Os tecidos foram fragmentados em porções menores que 1mm, novamente com o auxílio de um bisturi, e dispostos em placas de tipo Petri (Corning Inc., NY, EUA) (Figura 4.1). As culturas celulares de papila apical ou ligamento periodontal foram obtidas por meio de técnica de explante. As células foram cultivadas em α -Modified Eagle Medium (α -MEM) (Gibco) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), 100 μ M de L-ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100U/mL de penicilina (Invitrogen), 100 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen). Essa composição de meio de cultura foi nomeada Meio de Proliferação (MP). Os fragmentos, ou explantes, foram então mantidos em cultivo,

incubados em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, para que células começassem a migrar dos explantes para o fundo das placas (Figura 4.2). Após atingirem 90% de confluência, 20 dias após o início do experimento, células foram subcultivadas empregando solução de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,05% (Invitrogen) (Sonoyama et al., 2008).

Figura 4.1 – Processo de coleta de tecido para obtenção de células de papila apical (CPA) a partir de cultura primária com explantes. Papila apical de um terceiro molar com raiz dentária com rizogênese incompleta (A). Papila apical sendo removida da raiz dentária (B). Papila apical fragmentada na Placa de Petri (C). Papila apical fragmentada e tratada com antibiótico (D). Fragmentos de papila apical sendo posicionadas no frasco de cultivo celular (E). Tecido fragmentado da papila apical aderido no frasco de cultivo celular (F)

Fonte: Cardoso, PS; Gomes, RS; Santos, LM.

Figura 4.2 – Processo de coleta de tecido para obtenção de células do ligamento periodontal (CLP) a partir de cultura primária com explantes. Ligamento periodontal sendo removida da raiz dentária (A). Tecido do ligamento periodontal na Placa de Petri (B). Ligamento periodontal sendo fragmentado com bisturi (C). Fragmentos de ligamento periodontal sendo tratados com antibióticos (D). Tecido fragmentado do ligamento periodontal no Falcon de 25mL para ressuspensão (E)

Fonte: Cardoso, PS; Gomes, RS; Santos, LM.

4.2 Ativação das células de papila apical e ligamento periodontal

Células foram distribuídas em placas de 48 poços na quantidade de 1×10^4 cels/poço. As células foram cultivadas em α -Modified Eagle Medium (α -MEM) (Gibco) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco). Depois de 24, horas foi realizada a troca de meio α -Modified Eagle Medium (α -MEM) (Gibco) sem suplementação com SBF.

Após 24 h, as células foram estimuladas com concentrações decrescentes ($1 \mu\text{g/mL}$ – $0,001 \mu\text{g/mL}$) de LPS de *Escherichia coli* (L4391 – Sigma-Aldrich) (Sipert et al., 2014) e as células foram cultivadas novamente com α -Modified Eagle Medium (α -MEM) (Gibco) ainda sem SBF por 1 dia para detecção da viabilidade celular e coleta de sobrenadantes.

4.3 Viabilidade Celular – estímulo com LPS

As placas onde as CPA e CLP foram estimuladas e em seguida houve a coleta de sobrenadantes. As células foram usadas para a realização do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) para avaliação da viabilidade celular e atividade metabólica. Foi adicionado em cada poço 20 µL de uma solução de MTT (Sigma) a 5mg/mL em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) diluídos em 180 µL de meio de cultura suplementado com 10% de SBF. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e protegidas da luz por quatro horas.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e imediatamente foram adicionados 200 µL de DMSO em cada poço, para dissolver os cristais de formazan formados após redução do sal de MTT. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro (Synergy H1. Biotek, Winooski, EUA) no comprimento de onda 570nm.

4.4 Quantificação de RANKL nos sobrenadantes de CPA e CLP

Para quantificação de RANKL nos sobrenadantes de CPA e CLP, foi empregado ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA*). Foi utilizado o kit Duoset (R&D Systems). Placas de 96 poços foram cobertas e incubadas com anticorpos de captura diluídos em PBS durante 15-18 h a TA. Após essa incubação, as placas foram lavadas com PBS Tween 20 0,5% (PBS-T) e incubadas com solução bloqueadora (PBS com BSA a 1%) durante 2 h/TA. As placas foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células ou com quantidades conhecidas de proteínas recombinantes durante 1h/TA. Após esse período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpos de detecção por 2h/TA. Foi feita nova lavagem seguida de incubação com peroxidase em PBS/BSA por 30 min. As placas foram lavadas novamente e o substrato adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda a 490 nm em um

espectrofotômetro para placas (Bio-Rad, Hercules, EUA) (Sipert et al. 2014; Meneses et al. 2020; Pizzatto et al. 2020).

4.5 Ativação das CPA e CLP – estímulo com LPS e Ca(OH)_2

As CPA e CLP foram distribuídas em placas de 24 poços cada. As células foram cultivadas em α -Modified Eagle Medium (α -MEM) suplementado com 15% de SBF. Depois de 24 horas, foi realizada a troca de meio sem suplementação.

Após 24 h, a placa foi dividida em dois grupos de células, sendo o primeiro grupo mantido em meio somente enquanto no segundo, as células foram estimuladas com LPS a 0,01ug/mL. Após 1 h, foi adicionado Ca(OH)_2 (1000 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$).

Após 24 horas de estímulo, foi realizada a coleta dos sobrenadantes celulares e eles foram armazenados a -20°C para realização no próximo experimento enquanto as células foram submetidas a ensaio de MTT. Estes experimentos foram realizados empregando-se meio de cultura sem SBF.

4.6 Viabilidade Celular – após estímulo com LPS e Ca(OH)_2

As placas onde as CPA e CLP foram estimuladas e, em seguida, houve a coleta de sobrenadantes. As placas foram usadas para a realização do ensaio de MTT para uma nova avaliação de viabilidade celular por meio da atividade metabólica. Foi adicionado em cada poço 20 μL de uma solução MTT (5mg/mL em PBS) diluídos em 180 μL de meio de cultura suplementado com 10% de SBF. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e protegidas da luz por quatro horas.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e imediatamente foram adicionados 200 μL de DMSO em cada poço, para dissolver os cristais de formazan formados após redução do sal de MTT. A leitura de absorbância foi feita em

espectrofotômetro (Synergy H1. Biotek, Winooski, EUA) no comprimento de onda 570nm.

4.7 Quantificação de RANKL, M-CSF e OPG nos sobrenadantes de CPA e CLP

Para a quantificação de RANKL, M-CSF e OPG no meio condicionado de CPA ou CLP, foi empregado ensaio ELISA. Foram utilizados os kits Duoset (R&D Systems) para RANKL (DY626), M-CSF (DY 215) e OPG (DY626).

Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com os anticorpos de captura diluídos em PBS durante 15-18 h a temperatura ambiente (TA). Após essa incubação, as placas foram lavadas com PBS Tween 20 0,5% (PBS-T) e incubadas com solução bloqueadora (PBS com BSA a 1%) durante 2 h / TA. As placas foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células ou com quantidades conhecidas de proteínas recombinantes durante 1 h / TA. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção por 2 h / TA.

Foi feita nova lavagem seguida de incubação com peroxidase em PBS/BSA por 30 min. As placas foram lavadas novamente e o substrato adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm em um espectrofotômetro para placas (Bio-Rad, Hercules, EUA) (Sipert et al., 2014; Meneses et al. 2020; Pizzatto et al. 2020).

4.8 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicatas. A análise dos resultados obtidos foi realizada por meio de análise de variância seguido de teste de Tukey. Foram adotados como significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das células da papila apical e ligamento periodontal

A técnica usada para realização e estabelecimento de cultura primária de células da papila apical e ligamento periodontal a partir de explantes se mostrou passível de reprodução durante a execução do trabalho. As células começaram a soltar na segunda semana após o início do processo. Os experimentos foram iniciados após as células terem atingido a segunda passagem. A Figura 5.1 ilustra cultura de células da papila apical em dois estados ainda na cultura primária. A Figura 5.2 ilustra a cultura de células do ligamento periodontal em seu processo de expansão para que também fossem usadas durante o estudo.

Figura 5.1 – Primeiras células de papila apical (CPA) a soltarem do explante a partir de cultura primária (A). Células da papila apical expandidas no frasco de cultura celular (B). Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X

Fonte: O autor.

Figura 5.2 – Primeiras células do ligamento periodontal (CLP) a soltarem do explante a partir de cultura primária (A). Células do ligamento periodontal expandidas no frasco de cultura celular atingindo 90% de confluência (B). Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X

Fonte: O autor.

5.2 Ativação das células de papila apical e ligamento periodontal com LPS e avaliação da Viabilidade Celular

Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT demonstraram que o uso de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de LPS para os experimentos seguintes seria adequado.

A representação do ensaio de MTT realizado para análise das CPA ativadas com LPS está demonstrada na Figura 5.3. As mesmas análises do ensaio de MTT nas CLP estão representadas na Figura 5.4. Tanto para o ensaio realizado com CPA quanto CLP, o resultado demonstra que não houve diferença significativa entre as amostras. A Figura 5.5 está representando e comparando os níveis de atividade metabólica das CPA e CLP frente ao estímulo de LPS e o resultado indicou que as CLP têm mais atividade metabólica que as CPA desde o grupo controle até o grupo com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS.

O estímulo com LPS nas diferentes concentrações não afetou a viabilidade das CPA e CLP.

Figura 5.3 – Viabilidade e atividade metabólica de CPA frente ao estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação na presença de LPS nas concentrações de 1; 0,1; 0,01 e 0,001 μmL por 24 horas. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios

Fonte: O autor.

Figura 5.4 – Viabilidade e atividade metabólica de CLP frente ao estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação na presença de LPS nas concentrações de 1; 0,1; 0,01 e 0,001 μmL por 24 horas. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios

Fonte: O autor.

Figura 5.5 – Comparação dos níveis de viabilidade e atividade metabólica das CPA e CLP indicadas por (A) e (B) respectivamente. O resultado demonstrou-se satisfatório e indicou que as CLP têm mais atividade metabólica que as CPA desde o grupo controle até o grupo com 1 μ /mL de LPS

Fonte: O autor.

5.3 Quantificação de RANKL para escolha de concentração de LPS

No ensaio ELISA realizado para a quantificação de RANKL, foi possível observar sua expressão em maior quantidade quando as células foram estimuladas com LPS em concentração de 0,01 μmL .

Figura 5.6 – Quantificação da expressão de RANKL para escolha da concentração de LPS

Fonte: O autor.

5.4 Quantificação de RANKL, M-CSF e OPG nos sobrenadantes e ensaio de viabilidade celular após estímulo com LPS e Ca(OH)_2

Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT demonstraram que as células se encontraram viáveis entre todos os grupos (Figura 5.9). Porém, nas CPA foi possível verificar que o grupo $\alpha\text{-MEM}+1000$ de Ca(OH)_2 sofreu uma queda em sua atividade metabólica (Figura 5.10).

As CLP também demonstraram viabilidade e atividade metabólica e todos os grupos não apresentaram diferença significativa entre eles.

Após estímulo das CPA e CLP com 0,01 μmL de LPS e Ca(OH)_2 nas concentrações de 1000 e 250 μmL , as citocinas RANKL e MCS-F não foram expressas em quantidade relevantes.

No entanto, a citocina OPG, que desenvolve um papel importante na reabsorção óssea, foi produzida pelas CPA e CLP e passível de avaliação de quantificação tanto no grupo controle como nos grupos estimulados com 0,01 μmL de LPS e Ca(OH)_2 nas concentrações de 1000 e 250 μmL . Nas CPA é interessante ressaltar que, mesmo sem estímulo, as células já expressam por si só uma alta quantidade de OPG. Quando as células foram expostas ao estímulo de LPS e Ca(OH)_2 , as mesmas demonstraram uma queda significativa de expressão de OPG, o que nos leva a entender que o Ca(OH)_2 teve papel fundamental em sua diminuição (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Quantificação da expressão de OPG nas CPA. Os grupos LPS+1000 e LPS+250 demonstraram uma queda significativa na expressão de OPG comparados aos outros grupo. Grupo $\alpha\text{-MEM}$ +1000 também demonstrou ligeira queda na produção de OPG

Fonte: O autor.

Já nas CLP, a expressão de OPG sofreu um aumento nas células estimuladas com LPS e uma ligeira queda nos grupos LPS+1000 e LPS+250 sem diferença significativa entre os grupos (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Quantificação da expressão de OPG nas CLP. O gráfico demonstra que houve um pequeno aumento na produção de OPG pelas células no grupo LPS e em seguida outra queda nos grupos LPS+1000 e LPS+250. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Fonte: O autor.

Figura 5.9 – Viabilidade e atividade metabólica de CPA frente ao estímulo com 0,01 µg/mL de LPS e Ca(OH)_2 em concentrações de 1000 e 250 µg/mL. Células foram mantidas em meio de proliferação por 24 horas. Foi possível verificar uma ligeira queda na viabilidade do grupo α -MEM+1000. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios

Fonte: O autor.

Figura 5.10 - Viabilidade e atividade metabólica de CLP frente ao estímulo com 0,01 µg/mL de LPS e Ca(OH)_2 em concentrações de 1000 e 250 µg/mL. Células foram mantidas em meio de proliferação por 24 horas. Foi possível verificar uma ligeira queda na viabilidade do grupo α -MEM+250. Não houve diferença significativa pela análise de variância de dois critérios

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

As respostas nos tecidos pulpare e perirradiculares causadas pelo contato da polpa dental com microrganismos gera uma série de eventos esta região que se inicia com um processo inflamatório, em seguida com necrose pulpar e, quando esse processo não é interrompido com um tratamento endodôntico, lesão periapical (Love, 2002). Além disso, em casos de dentes imaturos, onde não ocorreu a rizogênese completa ou a formação completa da raiz, o contato bacteriano também interrompe o desenvolvimento natural no elemento dentário. Essa interrupção causa diversos efeitos deletérios como: paredes delgadas, ápice aberto e comprimento da raiz curto. Esses interferem na conservação, durabilidade, resistência e longevidade do elemento dental (Iwaya et al., 2001). Os métodos e protocolos novos para tratamento endodôntico de dentes com rizogênese incompleta viabilizam a chance a esse elemento dentário de formar uma raiz mais espessa, longa e fechamento apical (Nosrat et al., 2011). O ligamento periodontal e papila apical exercem um papel crucial nesse processo. Esses tecidos podem sobreviver apesar da ocorrência de necrose pulpar graças a sua proximidade com o osso alveolar (Alshiwaimi et al., 2009). Isso porque, a papila apical (Gilles et al., 1997) e o ligamento (Stashenko et al., 1992) periodontal tem a capacidade diferenciação. De fato, as CPA e CLP são células-tronco multipotentes altamente proliferativas e capazes de se diferenciarem em diversos tecidos (Gilles et al., 1997). Porém, é necessário que sejam entendidos os processos imunológicos que ocorrem em casos de dentes com rizogênese incompleta desde o início da infecção até a resposta frente a um tratamento endodôntico regenerativo.

A presença bacteriana no tecido resulta em uma resposta inflamatória. Durante esse processo, as células presentes liberam citocinas, quimiocinas, leucotrienos e prostaglandinas para a área. Esses mediadores inflamatórios elaboram a defesa do tecido infectado o que ocasionalmente resulta em perda tecidual local (Nair, 2004). Em tecido ósseo, RANKL e OPG são citocinas que participam desse processo, pois o balanço entre elas é um fator importante na regulação da reabsorção óssea nas regiões periodontais e periapicais (Menezes et al., 2006). A diferenciação de osteoclastos e sua ativação está diretamente ligada a interação de RANKL/RANK. OPG por sua vez, é um receptor-isca que se liga à RANKL e inibe a interação

RANKL/RANK impedindo assim a osteoclastogênese (Lacey et al., 1998; Silva; Branco, 2011). Em um ambiente de homeostase, existe um equilíbrio entre essas citocinas favorecendo a remodelação óssea. Já em um ambiente infectado por microrganismos e com o estímulo inflamatório, a proporção RANKL/OPG aumenta nos tecidos periapicais e periodontais e leva ao estímulo de atividade de osteoclastogênese e reabsorção óssea patogênica (Takahashi et al., 1999; Graves et al., 2011; Recehnberg et al., 2014).

Um dos principais fatores relacionados à resposta imunológica elaborada em frente a uma infecção bacteriana é o LPS: uma toxina liberada na multiplicação e na morte celular dos microrganismos e exerce um papel fundamental na ativação da resposta inflamatória desencadeando o processo de defesa do hospedeiro e interferindo na regulação da bioequivalência de RANKL/OPG (Graves et al., 2011). Neste presente trabalho foi possível verificar, de forma inédita, um aumento de RANKL quando as células de papila apical foram estimuladas com 0,01 µg/mL de LPS.

Uma das ferramentas usadas na Endodontia para o tratamento da infecção que resulta na periodontite apical é o uso do Ca(OH₂) como medicação intracanal por ter propriedades essenciais para o tratamento de dentes infectados por microrganismos: antimicrobiana, manutenção do pH alcalino promovendo a inviabilidade da proliferação bacteriana e propriedade anti-endotoxina (Safavi; Nichols, 1993; Tavares et al., 2010). Sabe-se também que o Ca(OH₂) tem a capacidade de inibir a reabsorção óssea e induzir a sua mineralização (Rodrigues et al., 2013), mas nenhum trabalho avaliou se o Ca(OH₂), quando usado como medicação intracanal, alterou a modulação de de RANKL e OPG induzida pelo processo inflamatório. RANKL é um fator regulador da osteoclastogênese e diferenciação de osteoclastos e as células T ativadas podem induzir diretamente os pré-osteoclastos a osteoclastos, expressando os altos níveis de RANKL (Li et al., 2019). No periodonto, a expressão de RANKL é de importância fisiológica e exerce função na adaptação do periodonto às forças oclusais, durante a erupção dentária (Wise et al., 2000) e ordenando a movimentação dentária ortodôntica (Garlet et al., 2008). No tecido periodontal, RANKL também é produzido por células mesenquimais como osteoblastos e CLP (Kajiya et al., 2010). RANKL também tem papel fundamental em regiões com doença periodontal e estudos *in vitro* demonstraram seu envolvimento na reabsorção óssea bem como seu aumento e interação com OPG quando células de ligamento periodontal e fibroblasto gengival

foram estimuladas com LPS (Belibasakis et al., 2013). Porém, nenhum trabalho investigou a influência da medicação de $\text{Ca}(\text{OH}_2)$ na expressão de RANKL/OPG em células estimuladas com LPS. Neste presente trabalho, as CPA e CLP estimuladas com LPS bacteriano e em seguida com $\text{Ca}(\text{OH}_2)$ passaram por um processo de quantificação de citocinas (RANKL/OPG) para que pudesse ser elucidado o efeito que essa medicação tem sobre elas e como essas citocinas se comportam quando em contato com uma medicação usada com tanta frequência em procedimentos endodônticos em casos de necrose pulpar e periodontite apical e inclusive terapia regenerativa de dentes com rizogênese incompleta. No ensaio de concentração-resposta para detecção de RANKL, esta proteína foi detectada em células de papila apical quando estimuladas com 0,01ug/mL de LPS. Entretanto, no segundo bloco de experimentos, RANKL não foi detectado em nenhuma condição experimental, inclusive na condição eleita como controle positivo (0,01ug/mL de LPS). Estes achados sugerem que a produção de RANKL *in vitro* por células de papila apical e ligamento periodontal pode ser considerado um achado eventual e inconsistente. Condições como a ausência total de SBF e outros estímulos, como prostaglandina, deverão ser futuramente investigadas.

OPG é produzido por células mesenquimais e por outros tipos de células incluindo as células de linhagem osteoblástica (Georges et al., 2009). OPG pertence à família dos receptores TNF e é descrita como uma citocina anti-reabsorção (Baud'huin et al., 2013). OPG também é expressa e exerce papel importante em outros tecidos como no periodonto saudável onde OPG é continuamente produzida por fibroblastos de tecido conjuntivo periodontal residentes e células potencialmente endoteliais (Kobayashi-Sakamoto et al. 2004), mas não células epiteliais (Sakata et al., 1999), ou células T (Belibasakis et al. 2017). Estudos *in vitro* investigaram expressão de OPG em células de ligamento periodontal quando estimuladas com LPS e demonstraram o aumento de expressão dessa citocina em níveis altos (Lerner, 2004; 2006; Garlet et al., 2008). No entanto, nenhum estudo avaliou a medicação de hidróxido de cálcio na regulação desta citocina. Neste presente trabalho, no ensaio para quantificação de OPG o resultado mostrou-se diferente, inclusive entre as CPA e CLP. Nas CPA, OPG mostrou uma queda importante quando estimulado com LPS e $\text{Ca}(\text{OH}_2)$, porém essa diminuição não foi grande a ponto de impedir a quantificação

de OPG. Nas CLP, os estímulos não foram capazes de alterar significativamente a produção de OPG.

Os resultados do presente estudo demonstram que, nas condições experimentais empregadas, células de papila apical e ligamento periodontal produziram quantidades importantes de OPG sendo que a medicação de hidróxido de cálcio reduziu a produção desta proteína, de forma ainda mais expressiva em células pré-ativadas com LPS. Este fenômeno não foi observado em células de ligamento periodontal. Por fim, estes dados sugerem que a medicação intracanal de hidróxido de cálcio utilizada no controle da infecção pode reduzir a produção constitutiva de OPG em células de papila apical, mas não no ligamento periodontal. Estes dados podem trazer conhecimento importante em relação à participação de diferentes populações celulares na inibição da reabsorção óssea periapical em dentes com rizogênese incompleta.

Esse conhecimento é primordial para o desenvolvimento dos protocolos regenerativos, pois as CPA e CLP são essenciais para o processo de rizogênese. Isso porque, abordagens com foco direcionados às citocinas responsáveis pela remodelação óssea são positivas para a revascularização pulpar em dentes necróticos com rizogênese incompleta.

7 CONCLUSÕES

- O LPS na concentração de 0,01µg/mL foi capaz de produzir o aumento de OPG e RANKL nas CPA e CLP.
- As CPA quando estimuladas com LPS e Ca(OH)₂ não expressaram RANKL e diminuíram a quantidade de OPG.
- As CLP não expressaram queda na quantidade de OPG e RANKL não foi produzido.
- O Ca(OH)₂ não regula de forma bioequivalente a quantidade de RANKL e OPG.

REFERÊNCIAS¹

Ainola M, Mandelin J, Liljeström M, Konttinen YT, Salo J. Imbalanced expression of RANKL and osteoprotegerin mRNA in pannus tissue of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Mar-Apr;26(2):240-6. PMID: 18565244.

Albiero LR, de Andrade MF, Marchi LF, Landi-Librandi AP, de Figueiredo-Rinhel ASG, Carvalho CA, Kabeya LM, de Oliveira RDR, Azzolini AECS, Pupo MT, da Silva Emery F, Lucisano-Valim YM. Immunomodulating action of the 3-phenylcoumarin derivative 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and in rats with acute joint inflammation. *Inflamm Res*. 2020 Jan;69(1):115-130. doi: 10.1007/s00011-019-01298-w. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31786615.

AlShwaimi E, Purcell P, Kawai T, Sasaki H, Oukka M, Campos-Neto A, Stashenko P. Regulatory T cells in mouse periapical lesions. *J Endod*. 2009 Sep;35(9):1229-33. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.006. PMID: 19720221; PMCID: PMC2778286.

Armada L, Marotta Pdos S, Pires FR, Siqueira JF Jr. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1281-7. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.025. Epub 2015 May 5. PMID: 25956608.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011 Jul;56(7):709-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.12.008. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21227403.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200. doi: 10.1097/00004770-200404000-00003. PMID: 15085044.

Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, Redini F, Heymann MF, Heymann D. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Oct;24(5):401-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.06.001. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23827649.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J*. 2013 Feb;46(2):99-111. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02105.x. Epub 2012 Aug 17. PMID: 22900632.

Belibasakis GN, Bostanci N, Hashim A, Johansson A, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Hughes FJ. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog*. 2007 Jul;43(1):46-53. doi: 10.1016/j.micpath.2007.03.001. Epub 2007 Mar 15. PMID: 17448630

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18395508; PMCID: PMC2413418.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658. PMID: 12748652.

Braun T, Schett G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep*. 2012 Jun;10(2):101-8. doi: 10.1007/s11914-012-0104-5. PMID: 22527726.

Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod*. 2001 May;27(5):325-7. doi: 10.1097/00004770-200105000-00003. PMID: 11485249.

Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):119-29. doi: 10.1007/s10585-007-9127-1. Epub 2007 Dec 5. PMID: 18064531.

Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, Stelnicki EJ. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2010 May;340(2):323-33. doi: 10.1007/s00441-010-0953-0. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20309582.

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int*. 2014;2014:731039. doi: 10.1155/2014/731039. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24719884; PMCID: PMC3955606.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1569-76. doi: 10.1902/jop.2008.080233. PMID: 18673012.

Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN, Sacco RL; Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke*. 2003 Sep;34(9):2120-5. doi: 10.1161/01.STR.0000085086.50957.22.

Elter JR, Offenbacher S, Toole JF, Beck JD. Relationship of periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. *J Dent Res*. 2003 Dec;82(12):998-1001. doi: 10.1177/154405910308201212..

Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, Wang BB, Huang GT, Wang S, Shi S. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):20-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01593.x. PMID: 20355278; PMCID: PMC2848819.

Francisconi CF, Vieira AE, Azevedo MCS, Tabanez AP, Fonseca AC, Trombone APF, Letra A, Silva RM, Sfeir CS, Little SR, Garlet GP. RANKL Triggers Treg-Mediated Immunoregulation in Inflammatory Osteolysis. *J Dent Res*. 2018 Jul;97(8):917-927. doi: 10.1177/0022034518759302. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29499125; PMCID: PMC6728554.

Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine*. 2008 Jun;42(3):330-5. doi: 10.1016/j.cyto.2008.03.003. Epub 2008 Apr 11. PMID: 18406624.

Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):63-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.09.020. Epub 2008 Nov 7. PMID: 19084127.

Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Feb;20(1):29-41. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.005. Epub 2008 Nov 28. PMID: 19041277.

Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod*. 1997 Jul;23(7):419-22. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80294-4. PMID: 9587293.

Giner M, Rios MA, Montoya MA, Vázquez MA, Naji L, Pérez-Cano R. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Jan;113(1-2):46-51. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.11.005. Epub 2008 Nov 27. PMID: 19073256.

Gould TR. Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament. *J Dent Res*. 1983 Aug;62(8):873-6. doi: 10.1177/00220345830620080401. PMID: 6575034.

Goranova-Marinova V, Goranov S, Pavlov P, Tzvetkova T. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratio in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. Clinical correlations. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):1000-1. doi: 10.3324/haematol.10943. PMID: 17606458.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304. PMID: 21547019; PMCID: PMC3087239.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797. PMID: 11087820; PMCID: PMC17626.

Guerrini MM, Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:118-23. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.003. Epub 2014 Jun 12. PMID: 24929185.

He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res*. 2015 Dec;25(12):1285-98. doi: 10.1038/cr.2015.139. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26611636; PMCID: PMC4670995.

Herrera DR, Silva EJ, Santos CC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Root canal content from primary endodontic infection and upregulation of gelatinases in fibroblast cells. *Int Endod J*. 2015 Dec;48(12):1168-74. doi: 10.1111/iej.12421. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25491749.

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep*. 2014 Mar;12(1):115-20. doi: 10.1007/s11914-014-0189-0. PMID: 24477414.

Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen Med*. 2009 Nov;4(6):809-21. doi: 10.2217/rme.09.55. Erratum in: *Regen Med*. 2010 Jan;5(1):150. Bendala, Juan Dominguez [corrected to Dominguez-Bendala, Juan]. PMID: 19903001.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):645-51. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.001. PMID: 18498881; PMCID: PMC2653220.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7. doi: 10.1034/j.1600-9657.2001.017004185.x. PMID: 11585146.

Jaunberzins A, Gutmann JL, Witherspoon DE, Harper RP. TGF-beta 1 alone and in combination with calcium hydroxide is synergistic to TGF-beta 1 production by osteoblasts in vitro. *Int Endod J*. 2000 Sep;33(5):421-6. doi: 10.1046/j.1365-2591.2000.00326.x. PMID: 11307460.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):876-87. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.023. Epub 2008 May 16. PMID: 18571000.

Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol*. 2010 Nov 8;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532. PMID: 21523224; PMCID: PMC3084575.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0. PMID: 14342926.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050-5. doi: 10.1210/endo.142.12.8536. PMID: 11713196.

Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada GH, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest*. 2013 Feb;123(2):866-73. doi: 10.1172/JCI65054. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23321670; PMCID: PMC3561830.

Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, Shin SI, Kim SY. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci.* 2012 Jun;4(2):109-13. doi: 10.1038/ijos.2012.23. PMID: 22627612; PMCID: PMC3421481.

Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Chiba I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 27;315(1):107-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.024. PMID: 15013432.

Kuntz KA, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. An immunohistochemical study of osteoprotegerin in the human dental pulp. *J Endod.* 2001 Nov;27(11):666-9. doi: 10.1097/00004770-200111000-00003. PMID: 11716077.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x. PMID: 9568710.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):596-607. doi: 10.1177/154405910608500704. PMID: 16798858.

Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan 1;15(2):64-81. doi: 10.1177/154411130401500202. PMID: 15059943.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod.* 2002 Dec;28(12):815-8. doi: 10.1097/00004770-200212000-00006. PMID: 12489650.

Lertchirakarn V, Aguilar P. Effects of lipopolysaccharide on the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *J Endod.* 2017 Nov;43(11):1835-140. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.024. Epub 2017 Aug 16. PMID: 28822568.

Li F, Li X, Liu G, Gao C, Li X. Bone marrow mesenchymal stem cells decrease the expression of RANKL in collagen-induced arthritis rats via reducing the levels of IL-22. *J Immunol Res*. 2019 Nov 7;2019:8459281. doi: 10.1155/2019/8459281. PMID: 31828174; PMCID: PMC6885301.

Lopes HP, Siqueira JF Jr (2010). *Endodontia: Biologia e Técnica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 951p.

Love RM. Bacterial adhesins--their role in tubule invasion and endodontic disease. *Aust Endod J*. 2002 Apr;28(1):25-8. doi: 10.1111/j.1747-4477.2002.tb00363.x. PMID: 12360678.

Meneses CCB, Pizzatto LN, Andrade FFF, Sipert CR. Prostaglandin E₂ affects interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1/ccl2 production by cultured stem cells of apical papilla. *J Endod*. 2020 Mar;46(3):413-418. doi: 10.1016/j.joen.2019.12.001. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31987595.

Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, Granjeiro JM. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Sep;102(3):404-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.054. Epub 2006 Apr 21. PMID: 16920551.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12. doi: 10.1073/pnas.0937635100. Epub 2003 Apr 25. PMID: 12716973; PMCID: PMC156282.

Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med*. 1987;38:417-32. doi: 10.1146/annurev.me.38.020187.002221. PMID: 3555304.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005 Apr;24(2):155-65. doi: 10.1016/j.matbio.2004.12.004. Epub 2005 Feb 12. PMID: 15890265.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81. doi: 10.1177/154411130401500604. PMID: 15574679.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):562-7. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.011. PMID: 21419310.

Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961 Dec;19:324-53. PMID: 14482575.

Pizzatto LN, Meneses CCB, Diniz EA, Dionísio TJ, Santos CF, Sipert CR. Angiotensin II regulates proliferation and function of stem cells of apical papilla. *J Endod.* 2020 Jun;46(6):810-817. doi: 10.1016/j.joen.2020.03.015. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32331838.

Rahhal JG, Rovai EDS, Holzhausen M, Caldeira CL, Santos CFD, Sipert CR. Root canal dressings for revascularization influence in vitro mineralization of apical papilla cells. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180396. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0396. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30994774; PMCID: PMC6459230.

Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, Ogawa T, Kawaguchi H, Kurihara H. The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod.* 2003 Feb;29(2):104-7. doi: 10.1097/00004770-200302000-00004. PMID: 12597707.

Rechenberg DK, Bostanci N, Zehnder M, Belibasakis GN. Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. *Cytokine.* 2014 Sep;69(1):116-9. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.014. Epub 2014 Jun 14. PMID: 25022970.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007. Epub 2010 Jun 14. PMID: 20647081.

Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):833-8. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.001. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23683288.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993 Feb;19(2):76-8. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81199-4. PMID: 8509740.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0. PMID: 15246727.

Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J*. 1997 Oct 11;183(7):241-6. doi: 10.1038/sj.bdj.4809477. PMID: 9364090.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696. PMID: 12674330.

Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin conditioning with bioactive molecule releasing nanoparticle system enhances adherence, viability, and differentiation of stem cells from apical papilla. *J Endod*. 2016 May;42(5):717-23. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.026. Epub 2016 Mar 5. PMID: 26960576.

Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*. 2011 Jul-Sep;36(3):209-18. PMID: 22113597.

Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, Campanelli AP, Kuo WP, Santos CF. In vitro regulation of CCL3 and CXCL12 by bacterial by-products is dependent on site of origin of human oral fibroblasts. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):95-100. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.031. Epub 2013 Oct 27. PMID: 24331998; PMCID: PMC5464602.

Siqueira JF, Jr, Saboia-Dantas CJ. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro. Brasil: Medsi, 2000.

Skordis N, Efstathiou E, Kyriakou A, Toumba M. Hormonal dysregulation and bones in thalassaemia--an overview. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2008 Oct;6 Suppl 1:107-15. PMID: 19337163.

Soares JA, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Ito IY. Histomicrobiologic aspects of the root canal system and periapical lesions in dogs' teeth after rotary instrumentation and intracanal dressing with Ca(OH)₂ pastes. *J Appl Oral Sci*. 2006 Oct;14(5):355-64. doi: 10.1590/s1678-77572006000500011. PMID: 19089058; PMCID: PMC4327228.

- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):166-71. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021. PMID: 18215674; PMCID: PMC2714367.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):422-6. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80841-1. PMID: 9796508.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1089-125. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1089. PMID: 10508230.
- Tavares AR, Beumer J, Pereira RR, Masiero AV. CFC: uma alternativa para as infecções endodônticas resistentes? *Rv Bras Odontol*. 2010 jan-jun; 67(1):123-7. doi: 10.18363/rbo.v67n1.p.123.
- Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):427-35. doi: 10.2353/ajpath.2007.060834. PMID: 17255310; PMCID: PMC1851862.
- Tekkesin MS, Mutlu S, Olgac V. The role of RANK/RANKL/OPG signalling pathways in osteoclastogenesis in odontogenic keratocysts, radicular cysts, and ameloblastomas. *Head Neck Pathol*. 2011 Sep;5(3):248-53. doi: 10.1007/s12105-011-0271-1. Epub 2011 Jun 5. PMID: 21643971; PMCID: PMC3173533.
- Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007 Jan-Feb;29(1):47-50. PMID: 18041512.
- Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marçal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, Dezan-Júnior E, Angelo Cintra LT. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. *J Endod*. 2014 Apr;40(4):538-42. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.015. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24666907.
- Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci*. 2008 Dec;50(4):367-76. doi: 10.2334/josnusd.50.367. PMID: 19106463.

Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 2004 Sep;35(3):629-35. doi: 10.1016/j.bone.2004.04.023. PMID: 15336598.

Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lee SS, Hou SM. Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(1):77-82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.017. Epub 2009 Sep 25. PMID: 19781765.

Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. *J Dent Res*. 2000 Dec;79(12):1937-42. doi: 10.1177/00220345000790120301. PMID: 11201042.

Yao GQ, Itokawa T, Paliwal I, Insogna K. CSF-1 induces fos gene transcription and activates the transcription factor Elk-1 in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 2005 May;76(5):371-8. doi: 10.1007/s00223-004-0099-8. Epub 2005 Apr 11. PMID: 15812575.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597-602. doi: 10.1073/pnas.95.7.3597. PMID: 9520411; PMCID: PMC19881. 602.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está em tratamento na clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e o convidamos para participar como voluntário da pesquisa título: **“Estudo da modulação de células de papila apical e ligamento periodontal por antimicrobianos na indução de osteoclastogênese in vitro”**. O trabalho será realizado pelo cirurgião-dentista Raphael da Silva Gomes sob a responsabilidade da Prof^ª Dr^ª Carla Renata Sipert.

Esta pesquisa tem como objetivo estudar de que forma a medicação utilizada no tratamento de canal pode interferir com o sucesso deste tratamento realizado em pacientes jovens. A sua participação nesta pesquisa consiste apenas na **doação voluntária do dente extraído**. Você tem liberdade para escolher ou não participar desta pesquisa, sem que sua decisão interfira no tratamento odontológico. O participante da pesquisa pode desistir a qualquer momento, inclusive retirando o seu consentimento, sem explicar os motivos e sem comprometer o seu tratamento na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Quaisquer gastos oriundos desta participação serão devidamente ressarcidos.

O dente doado será utilizado para a remoção da papila apical (tecido mole da extremidade da raiz do dente) e do ligamento periodontal (parte mole que reveste o dente) a partir dos quais serão estabelecidas cultura de células que serão utilizadas para o estudo. Após a pesquisa, o seu dente e as células cedidas para a pesquisa serão armazenados no Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo conforme procedimentos padrão. Caso você concorde, este material biológico poderá ser utilizado em pesquisas futuras. No entanto, seu consentimento para o uso das células ou do dente pode ser retirado a qualquer momento.

Os riscos envolvidos com sua participação na pesquisa são mínimos, já que apenas estruturas do dente serão utilizadas por meio da sua doação. Os riscos do procedimento serão inerentes a qualquer intervenção cirúrgica, como hemorragia, fratura de maxila ou mandíbula ou edema; porém todas as medidas necessárias para a realização do procedimento serão devidamente tomadas, assim como uma avaliação prévia do seu estado de saúde. Em caso de danos oriundos da participação na pesquisa científica, você será devidamente ressarcido e indenizado. O participante da pesquisa não terá nenhum benefício direto, mas a doação do seu dente extraído poderá ajudar a trazer melhorias no tratamento odontológico realizados em dentes que não se desenvolveram por completo. Os dados fornecidos pelo participante serão confidenciais, de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis. O participante da pesquisa não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados.

O participante da pesquisa não terá nenhum benefício direto, mas a doação do seu dente extraído poderá ajudar a trazer melhorias no tratamento odontológico realizados em dentes que não se desenvolveram por completo. Os dados fornecidos pelo participante da pesquisa serão confidenciais, de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis. O participante da pesquisa não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados.

Rubrica	Rubrica
Pesquisador responsável	Participante da pesquisa

Em caso de necessidade, entrar em contato com a pesquisadora responsável, Profª Drª Carla Renata Sipert por meio do endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Departamento de Dentística ou por meio do telefone (11) 3091-7839.

Em caso de dúvida sobre a ética da pesquisa contactar o CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – 1º Andar – Sala 02 da Administração - Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento é de segunda a sexta-feira das 9 as 12h e das 14 as 16h (exceto em feriados e recesso universitário). Em caso de greve ou recesso institucional os contatos e procedimentos ficarão disponíveis no endereço http://fo.usp.br/?page_id=7497. O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador responsável, concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa, por meio da doação do dente extraído nesta ocasião.

O Sr(a) autoriza a utilização dos dados ou do material biológico coletado em outras pesquisas?

() NÃO autorizo a utilização de dados ou material biológico coletado em outra pesquisa.

() SIM, autorizo a utilização de dados ou material biológico coletado em outra pesquisa, sem a necessidade de consulta prévia.

Este documento será elaborado em duas vias sendo uma do participante da pesquisa e outra do pesquisador responsável.

Nome: _____

Endereço: _____

Tel: _____

São Paulo, ____/____/____

Participante de Pesquisa

Profª Drª Carla Renata Sipert
Pesquisadora Responsável

Pesquisadora Responsável: Drª Carla Renata Sipert
Endereço: Av. Professor Lineu Prestes, 2227
São Paulo- SP CEP: 05508-000 Telefone: (11) 3091-7841

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da modulação de células de papila apical e ligamento periodontal por antimicrobianos na indução de osteoclastogênese in vitro

Pesquisador: Carla Renata Sipert

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21469419.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.612.591

Apresentação do Projeto:

A periodontite apical é uma lesão óssea infecciosa e inflamatória que ocorre na região do ápice de uma raiz dentária e promove a destruição do ligamento periodontal e osso apical. Em dentes com rizogênese incompleta, este evento ocorre em paralelo com a interrupção da formação radicular. O efeito de substâncias utilizadas na medicação intracanal neste contexto não é completamente conhecido. Sendo assim, o objetivo desse presente trabalho é investigar a capacidade do hidróxido de cálcio em modular a produção de fatores envolvidos com o metabolismo ósseo por células de papila apical e ligamento periodontal humanos em cultura. Culturas de células de papila apical (CPA) e ligamento periodontal (CLP) serão estabelecidas a partir de terceiros molares extraídos. Terceiros molares com ápice incompleto serão doados por voluntários da clínica de cirurgia da Fousp mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A papila apical e o ligamento periodontal serão removidos com técnica asséptica. Culturas celulares de papila apical (CAP) ou ligamento periodontal (CLP) serão obtidas por meio de técnica de explante utilizando -Modified Eagle Medium (-MEM) com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF). Células serão distribuídas em placas de 48 poços na quantidade de 1×10^4 cels/poço. Após 24 h, as células serão estimuladas com concentrações crescentes ($0,001 - 1 \mu\text{g/mL}$) de LPS de *E. coli* ou LTA de *E. faecalis* por 1, 3 e 5 dias para coleta de sobrenadantes. As células serão ativadas in vitro para determinação das

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOUSP

Continuação do Parecer: 3.612.591

condições experimentais que alteraram a produção de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), ligante do receptor do fator nuclear kappa- (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). Uma vez estabelecida esta condição, as células serão tratadas com hidróxido de cálcio e a quantificação destes fatores será novamente realizada. Os dados serão analisados por meio de análise de variância a dois critérios. Serão considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a capacidade de células humanas de papila apical e ligamento periodontal em cultura em ativar a osteoclastogênese in vitro por mecanismos parácrinos; investigar a modulação da diferenciação de osteoclastos in vitro por meio condicionado por células de papila apical ou ligamento periodontal em condição fisiológica e previamente ativadas com LTA de *E. faecalis* e LPS de *E. coli* e investigar a modulação da diferenciação de osteoclastos in vitro por meio condicionado por células de papila apical ou ligamento periodontal após ativação e tratamento com hidróxido de cálcio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes à cirurgia de exodontia (trismo, parestesia, alveolite).

Não há benefícios diretos ao paciente que fará a doação do dente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo importante para a área de endodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados o TCLE, as informações básicas do projeto, a folha de rosto, o projeto detalhado, a autorização para uso da clínica odontológica e a autorização da professora responsável pelas disciplinas de cirurgia para coleta do material, estando todas conformes.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOUOSP**

Continuação do Parecer: 3.612.591

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1425632.pdf	18/09/2019 10:28:15		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	18/09/2019 10:27:56	Carla Renata Sipert	Aceito
Outros	Autor_Cirurgia.pdf	17/09/2019 17:35:17	Carla Renata Sipert	Aceito
Outros	Autor_Clinica.pdf	17/09/2019 17:35:00	Carla Renata Sipert	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CEP.pdf	17/09/2019 17:34:13	Carla Renata Sipert	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MESTRADO.pdf	30/08/2019 11:37:19	Carla Renata Sipert	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Outubro de 2019

**Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))**

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br