

CLAUDIA CAROLINE BOSIO MENESES

**Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco
de Papila Apical *in vitro***

São Paulo

2020

CLAUDIA CAROLINE BOSIO MENESES

**Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco
de Papila Apical *in vitro***

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

São Paulo

2020

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

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

Meneses, Claudia Caroline Bosio.

Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco de Papila Apical *in vitro* / Claudia Caroline Bosio Meneses; orientador Carla Renata Sipert. -- São Paulo, 2020.

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

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

Versão corrigida.

1. Células-tronco de papila apical. 2. Endocanabinoides. 3. Expressão gênica. 4. Receptores canabinóides. 5. TRPV-1. I. Sipert, Carla Renata. II. Título.

Meneses CCB. Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco de Papila Apical *in vitro*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 03/09/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anibal Diogenes

Instituição: University of Texas Health Science at San Antonio (UTHSCSA)

Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)

Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Marinella Holzhausen Caldeira

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)

Julgamento: APROVADA

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por permitir que eu vivesse essa experiência incrível e por todas as bênçãos, conquistas e aprendizados adquiridos neste caminho.

À minha avó Santina,

Por quem sinto imensa saudade e admiração, e que permanecerá para sempre viva em meu coração.

Aos meus pais,

Marlene, minha inspiração, a verdadeira mulher maravilha, de quem sigo todos os passos e por quem daria a minha vida se preciso fosse! Nos comunicamos não só por palavras, mas principalmente por pensamentos! Estaremos para sempre conectadas, independentemente de onde estivermos! Obrigada por me apoiar sempre em minhas escolhas mesmo que elas impliquem em nos manter distantes fisicamente. Obrigada por ter me ensinado desde criança o valor do estudo e do trabalho! Tenho muita sorte em ter uma mãe como você!

Cláudio, que nunca mediu esforços para nos proporcionar sempre o melhor que pudesse, nos ensinando princípios de honestidade e retidão desde crianças, e que usaremos para o resto de nossas vidas!

A vida nos apresentou diferentes problemas nos últimos tempos, mas nós apresentamos a ela diferentes soluções! Deus estará sempre agindo em nossos corações para nos mostrar os caminhos até Ele!

Ao meu amor,

Pedro, meu príncipe, que aposta em todos os meus projetos como se fossem dele, que acredita no meu potencial como ninguém e que me incentiva a buscar sempre o ponto mais alto da montanha! Você é minha luz, meu destino e minha direção, todos os caminhos me levam a você! Te amarei de janeiro a janeiro, até o mundo acabar!

Ao meu irmão Matheus e minha cunhada Cíntia,

Que nos deram o presente mais precioso da face da terra, a princesa **Ana Beatriz**: doce, delicada e amorosa. Obrigada por nos concederem a missão divina de ser padrinhos deste tesouro!

À minha sogra, Inês, pela força inspiradora e carinho com que sempre me tratou! A senhora estará para sempre presente em nossas memórias e corações!

Com todo o meu carinho e admiração, dedico a vocês, **pessoas mais importantes da minha vida**, este trabalho!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora **Carla Renata Sipert**, que inicialmente idealizou este projeto, e que confiou-o a mim para sua execução e desenvolvimento. Obrigada por ter me recebido e acreditado em mim quando cheguei ao final de 2016 à sua sala, sem conhecê-la, procurando uma orientadora, uma pesquisa e muitos conselhos! Obrigada por todos os ensinamentos durante estes 3 anos, por todas as vezes que foi ao laboratório me ensinar o passo a passo de um novo experimento e por todas as vezes que me incentivou a buscar o máximo que eu pudesse conquistar! Sem dúvida este foi um período de intenso aprendizado para mim, no qual pude amadurecer pessoal e profissionalmente, e você teve grande participação nisso!

Ao Professor **Anibal Diogenes**, meu orientador no exterior, que me recebeu de portas abertas em seu laboratório na University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA) com muito respeito e dedicação. Tenho muita consideração e admiração pelo seu trabalho e pela pessoa incrível que és. Obrigada pela oportunidade de passar 6 meses em seu laboratório convivendo com toda a equipe de professores e alunos do seu departamento! Obrigada pelo seu precioso tempo e recursos financeiros dedicados à mim e a este projeto, obrigada pelas suas pacientes explicações e por todos os seus ensinamentos! Muito obrigada pela sua preocupação com o meu bem estar durante estes 6 meses e pela oportunidade de conhecer sua família: Danuza, Lia e Lucas! Jamais esquecerei o período que vivi em San Antonio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela Bolsa de Doutorado (Processo 2017/01737-8), pela Bolsa BEPE (Processo 2018/21869-9) e pelo Auxílio à Pesquisa (Processo 2016/13944-5).
Ao **National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR)** pelo Auxílio (RO1 DE0227929), concedido ao Prof. Dr. Anibal Diogenes.

À **FOUSP**, representada pelo seu atual diretor **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha** e pelo seu vice diretor **Prof. Dr. Giulio Gavini**, pela possibilidade de realizar o doutorado nessa instituição renomada e reconhecida internacionalmente.

A todos os mestres e funcionários desta instituição, que através de seu esmerado trabalho permitiram que todo este processo se tornasse realidade!

Agradeço ao **Laboratório de Pesquisa Básica Edmir Matson**, em nome da **Professora Dra. Márcia Martins Marques**, pela estrutura e suporte técnico no desenvolvimento de grande parte desta pesquisa.

Aos professores da disciplina de Endodontia da FOUSP, **Prof. Dr. Giulio Gavini, Prof. Dr. Celso Caldeira, Prof. Dra. Carla Sipert, Prof. Dr. José Luiz Lage Marques, Prof. Dra. Ericka Tavares Pinheiro, Prof. Dra. Maine Skelton, Prof. Dr. Marcelo dos Santos, Prof. Dr. Manoel Machado e Prof. Dr. Igor Prokipowitsch** pela dedicação e ensinamentos durante o período do Doutorado.

Agradecimento especial ao **Professor Celso Luiz Caldeira**, pela amizade e pelas diversas oportunidades criadas aos seus alunos! Você foi um dos professores que me entrevistou durante a prova de seleção para o Doutorado, e não esquecerei a pergunta que você me fez: “Por quê deveríamos selecionar a Claudia para esta vaga?”. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar e incentivar!

À **Professora Maine Skelton**, obrigada pela sua alegria contagiante e alto astral! Você deixa tudo mais colorido por onde passa e sua voz soa como música! Obrigada pela sua preocupação comigo e pelas oportunidades que você me proporcionou ao longo do Doutorado. Jamais esquecerei os momentos que me estendeu a mão. Obrigada de coração, e saiba que estarei sempre pronta a lhe ajudar no que precisar!

À **Professora Ericka Tavares Pinheiro**, obrigada pela sua tranquilidade, didática incomparável e dedicação em todas as aulas da incrível disciplina de Microbiologia!

Ao **Professor Fernando Neves Nogueira**, pela amizade e por ter nos permitido utilizar o laboratório de Bioquímica Oral para que pudéssemos realizar diversos experimentos desta pesquisa.

À **Professora Marinella Holzhausen Caldeira**, da disciplina de Periodontia, pessoa muito inteligente, querida e admirada por seus alunos, e por quem tenho profunda admiração! Obrigada pelas sugestões em meus projetos de pesquisa e pela parceria estabelecida com sua equipe de trabalho! Saiba que desta parceria conquistei preciosas amizades! Muito obrigada por estar sempre disposta a nos emprestar reagentes naquelas horas “especiais” de “aperto”!

Ao **Professor Victor Arana**, por nos ceder seu laboratório de Biologia Oral para que pudéssemos executar os ensaios de PCR desta pesquisa! Muito obrigada pela sua colaboração a este projeto!

Aos professores, pós graduandos e equipe do departamento de Endodontia da **UTHSCSA**, com quem tive a oportunidade de conviver durante 6 meses e participar da rotina laboratorial, clínica e das reuniões de departamento. **Dr. Kenneth Hargreaves, Dr Anibal Diogenes, Dr. Glenn Walters, Dr. Asma Khan, Dr. Nikita Ruparel, Dr. Armen Akropian, Dr. Vanessa Chrepa, Dr. Obadah Austah, Dr. Shivani Ruparel, Dominic Arris, Katherine Lillis, Erin Locke, Peter Lococo, Qun Li, Feng Dong, Kathy Lagleder, Sarah Saenz, Meilinn Tram, Emiliano Puente, Michelle Bendele, Brett Chapa, Amber Ather, Biraj Patel, Aki Osada.** Me senti muito bem recebida e acolhida por todos desde o primeiro dia em que cheguei a San Antonio! Agradeço especialmente ao meu orientador, Dr. Anibal Diogenes e ao Dr. Obadah Austah, com quem tive o primeiro contato ao chegar em San Antonio e que me apresentou a Universidade e o laboratório onde eu iria trabalhar. Dr. Asma Khan, de quem guardo amizade e grande admiração! Dr. Glenn Walters, o primeiro professor titular do departamento de Endodontia, que sempre me tratou com muito respeito e carinho! Katherine Lillis, com quem tive a oportunidade de dividir alguns experimentos e conhecimento! Kathy Lagleder , secretária do departamento, que me ajudou do primeiro ao último dia no Texas. Os meus sinceros e profundos agradecimentos a cada um de vocês!

À minha colega e amiga **Laís Nicolay Pizzato**, que considero um grande e precioso presente que o Doutorado me deu! Fomos parceiras de pesquisa, de laboratório e de sala de aula, mas também de boas risadas, choros, desesperos, festas e churrascos! Sua amizade é algo tão precioso para mim que me sinto de certa forma responsável por você! Obrigada pela sua felicidade contagiante, pelas suas gargalhadas e por sua alegria de viver! Não existe ser humano capaz de não gostar de você! Sei que você vibra com minhas conquistas e torce incansavelmente pela minha felicidade! O mesmo peço a Deus que reserve a você! Conte comigo para sempre, loira!

Às minhas amigas do Paraná, **Anne Caroline Figueiredo Marassi**, que sempre torceu por mim e acompanhou cada conquista e dificuldade desta trajetória, obrigada por me escutar, por pedir meus conselhos, por me dar ideias, por me enviar orações e por fazer grandes planos profissionais para nós! Sua amizade é um presente de Deus em minha vida! **Luana Bevilaqua**, obrigada pela sua preciosa amizade, pelas conversas, por estar sempre pronta para me buscar e levar para o aeroporto, por se fazer presente em minha vida mesmo estando tão longe! Você é uma amiga para todas as horas, todos os momentos, independentemente de data ou local! **Marcia Busato**, obrigada pela sua amizade e por me enviar energias positivas e mensagens de carinho! Conte sempre comigo quando precisar! **Tatiana Assumpção Iachinski**, obrigada por torcer pelas minhas conquistas e vitórias. Admiro demais sua força e inteligência! **Daniela Tecchio Painelli**, **Jacqueline Maffessoni**, **Roberta Maffessoni**, **Scheila Kazmierski**, minhas amigas super poderosas que tudo resolvem, tudo descobrem e tudo programam! Amo nossas reuniões, conversas e risadas! Tenho imensas saudades de vocês!

Satio Inagaki, o ninja da Endodontia, meu mestre e, principalmente, meu grande amigo! Sei que posso contar contigo em todos os momentos e espero que saibas que estarei sempre pronta a lhe ajudar, no que precisar!

Hermano Paiva, meu amigo e “irmão mais novo”, como ele mesmo diz! Você é precioso, um diamante sendo lapidado! Você é exemplo de simplicidade, comprometimento, dedicação e respeito por tudo o que faz! Obrigada pelas vezes que confiou em mim e compartilhou comigo suas dúvidas, ensinamentos, dilemas e

decisões! Você tem um futuro brilhante pela frente e é exemplo e inspiração para muitos colegas e alunos! Tenho muito orgulho de ter convivido contigo na FOU SP!

À **Juliana Couto**, pela amizade e companheirismo na FOU SP! Obrigada por lembrar de mim todas as vezes que viajava para casa, me trazendo os maravilhosos bombons paraenses! Obrigada por abrir sua casa a todos os colegas da pós graduação para churrascos, mesmo que isso incluísse multas de condomínio quase todas as vezes! À **Luiza Paz**, amiga que me ensinou várias lições de vida neste período! Você é um exemplo, me ensinou a enxergar e a entender sempre da maneira mais positiva possível tudo o que acontece em minha vida! Você tem luz própria, e sem dúvida ilumina a vida de muitas pessoas ao seu redor!

Ao **Bruno França**, meu amigo e companheiro em diversos experimentos, que me ajudou em diferentes momentos e me ensinou muito sobre Alizarina, Imunomarcção e ELISA! Será uma honra ser sua colega de trabalho e poder conviver mais contigo, agora como docentes! **Ana Clara**, muito obrigada pela sua prestatividade sempre que precisei de ajuda para encontrar algo no laboratório, para fazer contas de diluição ou plaqueamentos! São incontáveis as vezes que você parou o que estava fazendo para poder me ajudar, me explicar ou tirar dúvidas!

À **Priscila Lucena**, minha amiga e colega de laboratório que chegou de mansinho, cheia de educação e delicadeza e conquistou meu coração! Percebi a pessoa incrível e de bom coração que você é desde o primeiro momento em que te vi! Obrigada pela sua amizade, pelos conselhos, pelos sonhos divididos e até pelos planos de sociedade que fizemos! Tenho certeza de que tudo se tornará realidade um dia! Admiro muito sua história e suas lutas! Conte sempre comigo!

À **Pamela Bonin**, o que dizer de uma aluna de iniciação científica que ensinou mestrandas e doutorandas no laboratório? Aprendi muito com você, que já tinha muita experiência com cultivo celular quando eu estava apenas “chegando ao laboratório”! O que posso dizer da sua dedicação? Parabéns pelo capricho e foco com que você faz tudo o que se compromete a realizar! Obrigada pela sua amizade e pelos intermináveis conselhos e ideias que trocamos sempre!

Aos meus colegas, **Marlus Pedrosa**, obrigada pelos inúmeros cafezinhos descafeinados com água destilada (ou Milli-Q) que você preparou para mim entre um experimento e outro. Pelos momentos em que você queria explicar uma nova teoria mas eu não podia perder o foco no experimento, me desculpe por não te ouvir! **Juliana Garuba Rahal e Raphael Gomes**, com quem dividi inúmeros experimentos, cálculos, desenhos de plaqueamentos, contagem de células, risadas, correções nas contagens de células, novos cálculos...Só peço a vocês que nunca esqueçam disto: $C_1V_1 = C_2V_2$!

Aos colegas e amigos de pós graduação do departamento de Dentística, **Fernanda Bruno, Giovanni, Amanda Willers, Rennan, Letícia, Olívia, Karin, Ítallo, Erika, Fernanda, Juan, Lucas, Carlinhos, Sávio, Sandra, Laís Prado, Leonardo, Laura, Bruna Gontijo, Carol, Samuel, Iandara, Vanessa, Carolina, Felipe e Gustavo**. A salinha da pós graduação não existe sem a energia de vocês, sem as risadas e as reclamações...de lá saem grandes publicações e grandes histórias! Obrigada pelo companheirismo durante todos estes anos!

Aos colegas e amigos de pós graduação do departamento de Periodontia, **Emanuel Rovai, Letícia Gasparoni e Tomaz**, pela amizade e convivência nos laboratórios, trocas de experiências, dicas e pela ajuda durante os experimentos! Obrigada Letícia por ser minha parceira nos descongelamentos e limpezas de freezers!

Às pós doutorandas de Endodontia **Dra. Laila Freire e Dra. Elaine Iglecias**, obrigada pela amizade de vocês, pelas nossas conversas, pelos almoços “corridos” entre um experimento e outro e pela dedicação inspiradora de vocês!

À **Silvana**, técnica do laboratório de Pesquisas Básicas. Sil, muito obrigada pela sua doçura e competência! Você é uma pessoa muito especial e admirável. Sempre agiu com muita educação, até quando precisava “colocar ordem na bagunça”. Obrigada por manter nosso laboratório sempre organizado para que pudéssemos nos preocupar apenas com nossos experimentos.

Alessandra, Giovana, Lucas, Diego, Fernanda, Carol e Elisa: com alguns convívio pouco, com outros, muito! Obrigada pela ajuda e cuidado com nossas células, trocas de meio de cultura e plaqueamentos de finais de semana! Trabalhar em equipe exige muita dedicação, foco e força de vontade, nunca esqueçam disto!

Selminha, Aldo e David, muito obrigada pela amizade e pelo trabalho indispensável que vocês fazem na secretaria do departamento de Dentística! Muito obrigada pelas conversas, pela amizade e por imprimir relatórios às pressas para que não perdêssemos nosso prazos!

Douglas, técnico do laboratório de Bioquímica Oral, obrigada por todas as vezes que me esclareceu dúvidas sobre cálculos, como utilizar determinado reagente ou onde encontrar determinada substância. Obrigada pelos momentos de descontração entre os experimentos.

Elisângela, técnica do laboratório de Biologia Oral, obrigada pela sua prestatividade e disponibilidade em agendar os meus milhares de PCRs neste laboratório.

Débora França, técnica do laboratório de Pesquisas Básicas, obrigada pelo seu trabalho e organização no laboratório!

Marilyn e Randy, meus “pais americanos”, anjos da guarda que Deus colocou em meu caminho antes mesmo que eu saísse do Brasil para o Texas. Vivemos uma linda história durante os 6 meses que passei em San Antonio e continuaremos para sempre vivendo nos corações uns dos outros! Sem dúvida foi um presente de Deus esse lindo e inacreditável encontro entre nós! Vocês cuidaram de mim e me levaram para todos os cantos como se me conhecessem há muito tempo! E quando perguntavam se eu era filha de vocês, respondiam: sim, é nossa filha brasileira! Vocês se preocuparam comigo, me buscaram e levaram milhares de vezes para casa! Viajamos juntos, fomos a shows, eventos, igreja, restaurantes, museus, concertos, jantares, almoços... “eating anyway”, como costumávamos dizer! Obrigada por essa experiência incrível que muitas pessoas não tem a oportunidade de viver em uma vida inteira! Obrigada por me apresentar a pessoas especiais que

estarão para sempre em meu coração: **Trina e Denny, Scott e Shelley, Mitzi e Mike, Cynthia e Rob, Ben Young e todos os amigos do grupo de estudo bíblico!**

À **Camila Pachêco**, minha amiga brasileira/canadense, com quem tive a honra de morar 3 meses em San Antonio. Digo honra, pois sei de todos os pré-requisitos necessários para morar contigo! Você foi um maravilhoso presente que o Texas me deu! Nunca esquecerei nossos filmes “mamão com açúcar” depois de um dia inteiro no laboratório, quando não aguentávamos mais “pensar”, dos banhos de piscina com as “super” bóias que você comprou, dos picolés baratos e deliciosos que comprávamos para encher o freezer, e os meus sempre acabavam antes... e do único dia que consegui te “carregar” para a academia do condomínio... Nossa amizade é muito preciosa para mim e levarei nossas lembranças para sempre em meu coração!

À **Debora Melo van Lent**, minha amiga poliglota, linda, simpática e que me ensinou que um bom “barbecue” pode sim, ser feito por mulheres! Você é mais um dos presentes que o Texas me deu e que eu trouxe para o Brasil em meu coração! Espero poder revê-la logo e matar as saudades das nossas conversas cheias de conselhos que nunca deixamos de ter, mas que agora precisam ser “online” ao invés de “ao vivo”!

Marilynn, minha “irmã americana”, obrigada pela sua amizade e por ser esta pessoa incrível e cativante! Obrigada pela sua dedicação e preocupação comigo! Você estará para sempre em meu coração e em minhas orações!

Aos pacientes da clínica de Cirurgia da FOUSP e da Fundação da Faculdade de Odontologia (Fundecto) que gentilmente doaram os seus dentes para esta pesquisa, o meu agradecimento especial, saibam que sem vocês a pesquisa não seria desenvolvida.

A todos os alunos de graduação do curso de Odontologia da FOUSP, pelo respeito, paciência e presentes recebidos ao longo destes anos. Vocês, mesmo sem perceber, nos deram a oportunidade de sermos mestres, contribuindo não somente

para o aprimoramento técnico e intelectual de vocês, mas principalmente, pelo nosso crescimento como docentes!

Aos funcionários responsáveis pela limpeza e segurança do campus da Universidade de São Paulo (USP), cujo trabalho foi essencial para que pudéssemos realizar as nossas pesquisas em ambiente limpo, tranquilo e seguro, seja nos dias úteis, finais de semana ou feriados. O meu profundo e sincero agradecimento a vocês.

À Vania e Glauce, bibliotecárias da FOUSP, que fizeram um trabalho incrível e muito rápido na formatação desta tese! Muito obrigada pela dedicação e carinho neste momento tão importante de minha vida!

A todas as pessoas que me auxiliaram de maneira direta ou indireta durante este período de pós graduação, os meus mais sinceros agradecimentos e gratidão!

“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”

Walt Disney

RESUMO

Meneses CCB. Papel de Endocanabinóides na modulação de células-tronco de Papila Apical *in vitro* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida

A papila apical representa uma fonte de odontoblastos primários, importantes durante a rizogênese. A instalação de um processo inflamatório na polpa pode evoluir para a necrose e interrupção da rizogênese. Dentre os mediadores envolvidos nestes processos inflamatórios estão os Endocanabinóides (ECbs) Anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que podem modular diferentes funções celulares através da ativação dos receptores canabinóides (CB) 1 e 2, ou do receptor potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1). O objetivo deste estudo foi investigar a expressão gênica de componentes do Sistema Endocanabinóide (ECS) e de TRPV1 em células-tronco de papila apical (*stem cells of the apical papila*, SCAPs), bem como o papel dos ECbs na modulação de funções celulares. SCAPs obtidas a partir de terceiros molares foram isoladas e estimuladas com LPS para avaliar a viabilidade celular, diferenciação, produção de citocinas e expressão gênica dos componentes do ECS, compondo as Fases 1 e 2 deste estudo. Na Fase 3, SCAPs foram tratadas com o antagonista de TRPV1 capsazepina (CPZ) e LPS. Na fase 4, SCAPs foram ativadas com os ECbs exógenos AEA e 2-AG para avaliar a viabilidade, diferenciação celular, produção de citocinas e a expressão gênica de marcadores de mineralização. Após 7 dias, não houve alteração na viabilidade de SCAPs após tratamento com LPS, mas ocorreu aumento na diferenciação celular no grupo tratado com LPS (0,1µg/mL), quando comparado ao grupo controle. Observou-se redução na produção de Osteoprotegerina (OPG) nos grupos estimulados com LPS a 0,1 e 10µg/mL e aumento de MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein*)/CCL-2 nos grupos com LPS a 1 e 10µg/mL, após 24h. A expressão gênica dos componentes do ECS e de TRPV1 foi observada em SCAPs, porém, não se observou expressão de CB1 e CB2. A ativação celular com LPS (10µg/mL) e CPZ não promoveu alteração na viabilidade celular (72h), diferenciação (14 dias) e produção de OPG e CCL-2 (24h), se comparados ao controle, independentemente do tratamento com CPZ. Os ECbs exógenos promoveram uma redução na viabilidade celular de maneira dose-dependente, porém, AEA não

interferiu na diferenciação celular, independentemente de CPZ. Já 2-AG, em altas concentrações, inibiu a diferenciação celular. Não se observou diferença estatística na produção de RANKL (*Receptor activator of nuclear kappa-B ligand*) e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) em nenhum grupo experimental. Houve aumento na produção de OPG nos grupos estimulados com AEA (com e sem LPS) e no grupo com 2-AG+LPS+CPZ. Ocorreu aumento na produção de IL-6 e CCL-2 nos grupos tratados com 2-AG, porém, não houve alteração nos grupos tratados com AEA. Observou-se redução na expressão de DMP-1 (*Dentin matrix acidic phosphoprotein-1*) no grupo tratado com AEA e aumento da expressão de DSPP no mesmo grupo no período de 1 dia, comparado ao controle. Ocorreu aumento na expressão de TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β -1*) nos grupos tratados com AEA (com e sem CPZ) no período de 1 dia. Conclui-se que os principais componentes do ECS e TRPV-1 estão expressos em SCAPs, com exceção de CB1 e CB2. Em altas concentrações, os ECbs afetam a viabilidade e diferenciação de SCAPs.

Palavras-chave: Células-tronco de papila apical. Endocanabinoides. Expressão gênica. Receptores canabinóides. TRPV-1.

ABSTRACT

Meneses CCB. The role of Endocannabinoids in the modulation of stem cells of the Apical Papilla *in vitro* [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

The apical papilla is a source of primary odontoblasts, which play an important role during the root formation process. The initiation of an inflammatory process in the pulp can lead to pulp necrosis and the interruption of root formation. Among the mediators involved in inflammatory processes are the endocannabinoids (ECBs), anandamide (AEA), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which can modulate different cell functions by activating cannabinoid receptors (CB) 1 and 2, and the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV-1). The aim of this study was to investigate the gene expression of the components of the endocannabinoid system (ECS) and TRPV-1 in the stem cells of the apical papilla (SCAPs) as well as the role of ECBs in the modulation of cell functions. SCAPs were isolated and stimulated using LPS to assess cell viability, differentiation, cytokine production, and the gene expression of the ECS components; these experiments represent phases 1 and 2 of this study. In phase 3, the SCAPs were treated with the TRPV-1 antagonist capsazepine (CPZ) and LPS. In phase 4, SCAPs were activated using exogenous ECBs, AEA, and 2-AG to assess viability, cell differentiation, cytokine production, and the gene expression of mineralization markers. After seven days of treatment with LPS, there was no change in SCAP viability; however, there was an increase in cell differentiation in the group treated with 0.1 µg/mL LPS, when compared with the control. A reduction in the production of osteoprotegerin (OPG) was observed in the groups stimulated using 0.1 and 10 µg/mL LPS along with an increase in MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) / CCL-2 in the groups treated with 1 and 10 µg/mL LPS after 24 h. The gene expression of the components of ECS and TRPV-1 was observed in the SCAPs; however, expression of CB1 and CB2 was not observed. Cellular activation with LPS (10 µg/mL) and CPZ did not affect cell viability (72 h), differentiation (14 days), or the production of OPG and CCL-2 (24 h), compared with the control, regardless of treatment with CPZ. Exogenous ECBs promoted a reduction in cell viability in a dose-dependent manner; however, AEA did not inhibit cell differentiation, regardless of the presence of CPZ. At high concentrations, 2-AG inhibited cell differentiation. No

statistical difference was observed in the production of RANKL (receptor activator of nuclear kappa-B ligand) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) between any of the experimental groups. There was an increase in OPG production in the groups stimulated by AEA (with or without LPS) and in the group stimulated by 2-AG + LPS + CPZ after 24h. There was an increase in the production of IL-6 and CCL-2 in the groups treated with 2-AG; however, there was no change in the groups treated with AEA. A reduction in the expression of DMP-1 (dentin matrix acidic phosphoprotein-1) was observed in the group treated with AEA and an increased expression of DSPP was observed in the same group in 1 day, in comparison with the control. There was an increase in the expression of TGF- β 1 (transforming growth factor β -1) in the groups treated with AEA (with and without CPZ) within 1 day. Thus, we concluded that the main components of the ECS and TRPV-1 are expressed in the SCAPs. However, CB1 and CB2 are not expressed in the SCAPs. Additionally, at high concentrations, ECbs may affect SCAP viability and mineralization.

Keywords: Stem cells of the apical papilla. Cannabinoid receptors. Endocannabinoids. Gene expression. TRPV-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Opções de tratamento de acordo com o diagnóstico e estágio de formação radicular	42
Figura 2.2 - Representação esquemática da produção, liberação e hidrólise dos ECbs ..	67
Figura 4.1 - Células de papila apical (SCAPs) obtidas a partir de cultura primária com a técnica de explante	82
Figura 5.1 - Células de papila apical (SCAPs) obtidas a partir de cultura primária. Imagens capturadas em microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 100x	97
Figura 5.2 - Representação em <i>dot plot</i> da imunomarcaç�o para CD146, CD24, CD34, CD45 e STRO-1 por citometria de fluxo	98
Figura 5.3 - Indu�o de diferencia�o osteo/odontog�nica em c�lulas de papila apical	99
Figura 5.4 - Viabilidade de SCAPs ap�s est�mulo com LPS. C�lulas foram mantidas em meio de prolifera�o ou diferencia�o na presen�a de LPS nas concentra�es de 0,1; 1 e 10 µg/mL.....	101
Figura 5.5 - Indu�o de diferencia�o osteo/odontog�nica em c�lulas de papila apical ativadas com LPS.....	102
Figura 5.6 - Diferencia�o Osteo/ Odontog�nica – 14 dias. Quantifica�o de deposi�o mineral por Vermelho de Alizarina S.....	103
Figura 5.7 - Produ�o de CCL-2 (pg/mL) pelas c�lulas da papila apical em Meio de Prolifera�o (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentra�es (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora.....	104
Figura 5.8 - Produ�o de CCL-2 (pg/mL) pelas c�lulas da papila apical em Meio de Prolifera�o (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentra�es (0,1; 1 e 10 µg/mL) em 24h.....	104
Figura 5.9 - Produ�o de OPG (pg/mL) pelas c�lulas da papila apical em Meio de Prolifera�o (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentra�es (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora.....	105
Figura 5.10 - Produ�o de OPG (pg/mL) pelas c�lulas da papila apical em Meio de Prolifera�o (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentra�es (0,1; 1 e 10 µg/mL) em 24h.....	105

Figura 5.11 - Expressão gênica de DAGL em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	106
Figura 5.12 - Expressão gênica de DAGL em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	107
Figura 5.13 - Expressão gênica de DAGL em SCAPs após 3 e 7 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	108
Figura 5.14 - Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	109
Figura 5.15 - Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	110
Figura 5.16 - Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 3 e 7 dias de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	111
Figura 5.17 - Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	102
Figura 5.18 - Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	113
Figura 5.19 - Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 3 e 7 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	114
Figura 5.20 - Expressão gênica de FAAH em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	115
Figura 5.21 - Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	116
Figura 5.22 - Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	117

Figura 5.23 - Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 3 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH.....	118
Figura 5.24 - Viabilidade celular de SCAPs após tratamento com diferentes concentrações de capsazepina (CPZ).....	119
Figura 5.25 - Viabilidade celular de SCAPs após tratamento com diferentes concentrações de capsazepina (CPZ) e LPS (10µM).....	120
Figura 5.26 - Diferenciação osteo/odontoblástica em SCAPs tratadas com CPZ (5µM).....	121
Figura 5.27 - Produção de CCL-2 (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com CPZ e/ou LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL), após 24h.....	122
Figura 5.28 - Produção de OPG (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com CPZ e/ou LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL), após 24h.....	123
Figura 5.29 - Ensaio OZBlue (piloto) para avaliar a viabilidade celular de SCAPs tratadas com AEA em 6 concentrações.....	124
Figura 5.30 - Ensaio de viabilidade celular utilizando (CellTiter Glo) de SCAPs após tratamento com AEA.....	125
Figura 5.31 - Ensaio de viabilidade celular utilizando (CellTiter Glo) de SCAPs após tratamento com 2-AG.....	126
Figura 5.32 - Ensaio de viabilidade e diferenciação celular de SCAPs estimuladas com AEA após 14 dias	127
Figura 5.33 - Ensaio de viabilidade e diferenciação celular de SCAPs estimuladas com 2-AG após 14 dias.....	128
Figura 5.34 - Quantificação da produção de RANKL por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	129
Figura 5.35 - Quantificação da produção de TNF-α por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	130
Figura 5.36 - Quantificação da produção de OPG por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	131
Figura 5.37 - Quantificação da produção de IL-6 por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	132

Figura 5.38 - Quantificação da produção de CCL-2 por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	133
Figura 5.39 - Quantificação da produção de M-CSF por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.....	134
Figura 5.40 - Expressão gênica de ALP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	135
Figura 5.41 - Expressão gênica de BGLAP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	136
Figura 5.42 - Expressão gênica de CEMP-1 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	137
Figura 5.43 - Expressão gênica de DMP-1 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	138
Figura 5.44 - Expressão gênica de DSPP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	139
Figura 5.45 - Expressão gênica de RUNX-2 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	140
Figura 5.46 - Expressão gênica de TGF- β por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequência de primers utilizados para amplificação do cDNA no experimento qPCR.....	89
Tabela 4.2 - Sequência de primers utilizados para amplificação do cDNA no experimento qPCR.....	94
Tabela 5.1 - Porcentagem dos marcadores celulares em SCAPs	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AEA	Anandamida
2-AG	2-Araquidonoilglicerol
ALP	<i>alkaline phosphatase</i>
AMT	<i>Anandamide Membrane Transporter</i>
ANOVA	Análise de Variância
BGLAP	<i>Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein</i>
BMSCs	<i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells</i>
BMP-4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
°C	graus Celsius
CB1	<i>Cannabinoid receptor 1</i>
CB2	<i>Cannabinoid receptor 2</i>
cDNA	DNA complementar
CEMP-1	<i>Cementum Protein-1</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COL1A1	Colágeno tipo1 A1
COX-2	<i>Ciclooxygenase-2</i>
C _T	cycle threshold
DAGL	Diacilglicerol lipase
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DEPC	Água com Dietil Pirocarbonato
DFSCs	<i>Dental Follicle Stem Cells</i>
DLX-5	<i>Distal-less homeobox 5</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMP-1	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein</i>
DPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
DSPP	<i>Dentin Sialophosphoprotein</i>

ECbs	Endocannabinóides
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECS	<i>Endocannabinoid System</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAAH	Amida Hidrolase de ácidos graxos
FGFs	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
G	força G
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase
IGFs	<i>Insulin Growth Factors</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina- 6
IL-8	Interleucina- 8
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido Lipoteicóico
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
M-CSF	Estimulador de Colônias de Macrófagos
MD	Meio de Diferenciação
MD-2	<i>Myeloid differentiation protein</i>
mL	mililitros
mM	milimolar
mg	miligramas
MP	Meio de Proliferação
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTA	Agregado Trióxido Mineral
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAPE-PLD	<i>N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D</i>
NF-KappaB	Fator de Transcrição Nuclear kappaB
NK	Natural Killer

ng	nanogramas
nm	nanometros
nmol	nanomol
OCT 3/4	<i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>
ODF	Fator Diferenciador de Osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
pg	picogramas
<i>P.gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAMPs	<i>Patogens-associated molecules patterns</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDLCS	<i>Periodontal ligament cells</i>
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qPCR	<i>quantitative-Polimerase Chain Reaction</i>
RANK	Receptor para a Ativação do Fator de Transcrição Nuclear kappa-B
RANKL	Receptor para a Ativação do Ligante do Fator de Transcrição Nuclear kappa-B
RET	<i>Regenerative Endodontic Treatment</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RUNX-2	<i>Runt- Related Transcription Factor 2</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SCAPs	<i>Stem Cells of the Apical Papilla</i>
SHEDs	<i>Stem Cells from Human Exfoliated deciduous teeth</i>
SOX	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
STRO-1	<i>Stromatin-1</i>
TA	Temperatura ambiente
TGFBRI	<i>Transforming Growth Factor-B Receptor Type 1</i>
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>

TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
TRPV-1	<i>transient receptor potential vanilloid-1</i>
α -MEM	<i>α-Modified Eagle Medium</i>
μ g	microgramas
μ L	microlitro
μ M	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	37
2	REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1	RIZOGÊNESE	39
2.2	NECROSE PULPAR E INTERRUPÇÃO DA RIZOGÊNESE	41
2.2.1	Apicigênese	42
2.2.2	Apicificação	43
2.2.3	Terapia Endodôntica Regenerativa (RET)	44
2.3	CÉLULAS-TRONCO DA POLPA (DPSCs)	47
2.4	CÉLULAS-TRONCO DA PAPILA APICAL (SCAPs).....	48
2.4.1	SCAPs e Lipopolissacarídeo	53
2.4.2	SCAPs e Fatores de Crescimento	57
2.4.3	SCAPs, Citocinas e Mediadores Inflamatórios	59
2.5	SISTEMA ENDOCANABINÓIDE (ECS).....	64
2.5.1	Caracterização do ECS em Células Dentais	72
3	PROPOSIÇÃO	77
3.1	OBJETIVO GERAL	77
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
4	MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1	FASE 1	79
4.1.1	Obtenção das Células da Papila Apical (SCAPs)	79
4.1.2	Caracterização Fenotípica de SCAPs	82
4.1.3	Caracterização Funcional de SCAPs - <i>Diferenciação celular</i>	83
4.2	FASE 2	84
4.2.1	Viabilidade Celular – Estímulo com LPS	84
4.2.2	Diferenciação Celular – Estímulo com LPS	85
4.2.3	Deteção de Produção <i>in vitro</i> de MCP-1/CCL2 e OPG – Estímulo com LPS	85
4.3	FASE 3	86
4.3.1	Deteção da Expressão Gênica dos Componentes do Sistema Endocanabinóide (ECS) em SCAPs	86

4.3.2	Papel de TRPV1 na Viabilidade, Diferenciação e Produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs – Bloqueio Farmacológico de TRPV1 com Capsazepina	89
4.3.2.1	<i>Viabilidade celular</i>	90
4.3.2.2	<i>Diferenciação osteo/odontogênica</i>	90
4.3.2.3	<i>Detecção de produção de MCP-1/CCL2 e OPG por SCAPs</i>	90
4	FASE 4	91
4.4.1	Papel dos ECbs em SCAPs <i>in vitro</i>	91
4.4.1.1	<i>Viabilidade celular</i>	91
4.4.1.2	<i>Diferenciação celular</i>	92
4.4.1.3	<i>Detecção da produção de citocinas inflamatórias</i>	93
4.4.1.4	<i>Detecção da expressão gênica de marcadores de mineralização</i>	93
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
5	RESULTADOS	97
5.1	FASE 1	97
5.1.1	Obtenção das Células da Papila Apical	97
5.1.2	Caracterização Fenotípica das Células da Papila Apical	97
5.1.3	Caracterização Funcional: diferenciação Celular	99
5.2	FASE 2	100
5.2.1	Viabilidade Celular – Estímulo com LPS	100
5.2.2	Diferenciação Celular – Estímulo com LPS	102
5.2.3	Detecção de Produção <i>in vitro</i> de MCP-1/CCL2 e OPG – Estímulo com LPS	103
5.3	FASE 3	106
5.3.1	Detecção da Expressão Gênica dos Componentes do Sistema Endocanabinóide (ECS) em SCAPs	106
5.3.2	Papel de TRPV1 na Viabilidade, Diferenciação e Produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs – Bloqueio Farmacológico de TRPV1 com Capsazepina	118
5.3.2.1	<i>Viabilidade celular</i>	118
5.3.2.2	<i>Diferenciação osteo/odontogênica</i>	121
5.3.2.3	<i>Produção de MCP-1/CCI2 e OPG por SCAPs</i>	121
5.4	FASE 4	123
5.4.1	Papel dos ECbs em SCAPs <i>in vitro</i>	123

5.4.1.1	<i>Viabilidade celular</i>	123
5.4.1.2	<i>Diferenciação celular</i>	127
5.4.1.3	<i>Detecção da produção de citocinas inflamatórias</i>	129
5.4.1.4	<i>Detecção da expressão gênica de marcadores de mineralização</i>	134
6	DISCUSSÃO	143
7	CONCLUSÕES	157
	REFERÊNCIAS	159
	ANEXOS	179

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do elemento dental se inicia com a formação do germe dental em tecido intra-ósseo e finaliza-se após a erupção dentária, com a conclusão da formação radicular. Se durante esta fase ocorrer a instalação de processos patológicos no elemento dental, decorrentes de cárie ou trauma, que resultem em necrose do tecido pulpar e inflamação periapical, poderá ocorrer a interrupção da rizogênese. Este fenômeno implica em significativo comprometimento estrutural do dente afetado, que permanece com comprimento radicular deficiente e com suas paredes dentinárias finas e friáveis (Cvek, 1992; Andreasen et al., 2002). Neste contexto, o tratamento endodôntico convencional não poderá ser executado, já que o elemento dental não apresenta características que permitam o preparo mecânico e a obturação convencionais. Uma das opções de tratamento para estes casos é a Apicificação, cujo objetivo é fornecer condições para que haja a deposição de tecido mineralizado na região apical do elemento dental, permitindo sua obturação. Mais recentemente, Terapias Endodônticas Regenerativas (*Regenerative Endodontic Treatment*, RET) baseadas em princípios de engenharia tecidual vem sendo desenvolvidas, com o objetivo de fornecer condições para que a neoformação tecidual ocorra, permitindo a conclusão da rizogênese (Iwaya et al., 2001; Banchs; Trope, 2004; Diogenes; Hargreaves, 2017).

A papila apical é uma estrutura presente na porção mais apical da raiz dental, e suas células-tronco (*stem cells of the apical papila*, SCAPs), em condições fisiológicas, exercem um papel fundamental no desenvolvimento radicular. A papila apical é conhecidamente uma fonte de odontoblastos para o tecido pulpar, sendo estes os responsáveis pela dentinogênese, exercendo importante função no processo de formação radicular (Zhang et al., 2013). SCAPs apresentam maior potencial para regeneração dentinária do que as células-tronco da polpa dental (*dental pulp stem cells*, DPSCs), expressando níveis mais elevados de importantes moléculas que atuam na mediação da proliferação e diferenciação celular (Sonoyama et al., 2006). Por este motivo, células indiferenciadas deste tecido têm sido foco de diversos estudos na área da Endodontia relacionada aos tratamentos regenerativos (Sonoyama et al., 2008).

Ainda que se associe clinicamente os processos de necrose pulpar e interrupção da rizogênese, os mecanismos moleculares, bem como os mediadores inflamatórios envolvidos neste processo, ainda não são completamente conhecidos.

Dentre os mediadores sintetizados durante processos inflamatórios estão os Endocanabinoides (ECbs) que são derivados do ácido araquidônico, e produzidos endogenamente pelo sistema nervoso e outros sistemas do organismo (Rettori et al., 2012). Os dois principais ECbs são a Anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que ativam principalmente os receptores canabinóides (CB) 1 e 2, e receptores vanilóides, como o receptor potencial transitório vanilóide-1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid-1*, TRPV-1) (Scutt; Williamson, 2007), modulando diversas atividades celulares (Bari et al., 2011) como proliferação e diferenciação (Paria; Dey, 2000). Os ECbs, juntamente com seus receptores e enzimas que participam da sua síntese e degradação, constituem o Sistema Endocanabinóide (ECS).

A investigação do papel destes mediadores na modulação de funções e respostas celulares a diferentes estímulos, bem como o entendimento do processo de interrupção da rizogênese, é essencial para o progresso das terapias regenerativas, cujo objetivo é o restabelecimento de tecidos dentais perdidos. Apesar de já ter sido previamente caracterizado em diversos tipos celulares como células do sistema imunológico (Howlett et al., 2002), células-tronco de medula óssea (Scutt; Williamson, 2007), células-tronco embrionárias (Bari et al., 2011), odontoblastos (Que et al., 2017) e células de ligamento periodontal (Qian et al., 2010), o ECS ainda não foi caracterizado em SCAPs.

Diante disso, a hipótese do presente estudo *in vitro* é a de que exista expressão gênica dos componentes do ECS e de TRPV-1 em SCAPs, e que os ECbs atuem na modulação de funções celulares como proliferação, diferenciação, expressão gênica de marcadores de mineralização e produção de citocinas inflamatórias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RIZOGÊNESE

A odontogênese é um processo fisiológico complexo que compreende os estágios histológicos de botão, capuz e campânula, formação radicular e erupção dental (Huang; Chai, 2012). A maioria das estruturas dentais deriva do ectomesênquima dental, composto por uma zona de células condensadas, provenientes do ectoderma oral. O ectomesênquima oral é formado por diversas populações celulares incluindo células da crista neural, células provenientes do mesoderma e mesênquima (Goldberg; Smith, 2004). Diversos tipos celulares derivam da crista neural craniana, dentre eles, neurônios, melanócitos, adipócitos, células mesenquimais, fibroblastos, condroblastos, condrócitos, osteoblastos, osteócitos, odontoblastos, cementoblastos, dentre outros (Dupin et al., 2018). Já foi demonstrado que sinais provenientes do ectoderma oral induzem a expressão da identidade odontogênica de células da crista neural (Jernvall; Thesleff, 2000). Durante a morfogênese dental, do estágio de botão ao de capuz, o ectomesênquima odontogênico dá origem a 2 linhagens celulares: células da papila dental, que são circundadas pelo órgão do esmalte (epitélio do esmalte), e células do folículo dental, que formam as camadas celulares que revestem todo o germe dental (Tziafas; Kodonas, 2010). Existe pouca discussão na literatura em relação aos limites anatômicos entre papila e polpa dental durante o desenvolvimento da coroa dental. É aceito que todo o ectomesênquima dental presente no interior do órgão do esmalte durante o final do estágio de campânula pode ser caracterizado como papila dental (Thesleff et al., 2001). A papila dental assume uma posição apical em relação à polpa à medida que a formação da coroa dental progride. Surgem então os primeiros odontoblastos e a dentinogênese é iniciada (Tziafas; Kodonas, 2010).

Após a morfogênese da coroa dental, com a formação da matriz extracelular do esmalte e dentina, o germe dental em desenvolvimento inicia a formação da raiz, estabelecendo conexões com o osso alveolar circundante (Thomas, 1995). Durante o processo de rizogênese, todo o tecido mineralizado da estrutura radicular será originado basicamente por três estruturas: papila dental, folículo dental e bainha epitelial de Hertwig, que formarão todo o complexo apical (Huang; Chai, 2012).

Quando a deposição de esmalte e dentina na coroa alcançam a alça cervical do órgão do esmalte, onde células do epitélio interno e externo estão contíguas, forma-se a bainha epitelial radicular, ou bainha epitelial de Hertwig. Esta estrutura é composta basicamente de duas partes: a bainha propriamente dita, que localiza-se entre a papila e o folículo dental, e o diafragma radicular, que se projeta para o interior da papila dental, circundando o forame apical primário.

A proliferação das células da bainha epitelial radicular invade a região radicular apical, estimulando a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos que formarão a dentina radicular. A localização anatômica destas células mesenquimais indiferenciadas não foi totalmente elucidada, podendo corresponder à polpa ou à papila apical. Sabe-se que as células mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido pulpar são capazes de se diferenciar para repor os odontoblastos originais perdidos. Já as células presentes na papila apical funcionam como uma fonte de odontoblastos primários, que produzirão dentina primária e secundária para constituir a polpa e dentina radicular. Os odontoblastos de reposição, provenientes do tecido pulpar, produzirão dentina terciária ou reparativa (Sonoyama et al., 2008). Juntamente com este processo, ocorre a proliferação de células do folículo dental, resultando no desenvolvimento e determinação da futura conformação radicular (Thomas; Kollar, 1989).

A bainha epitelial de Hertwig apresenta importante papel na liberação de moléculas sinalizadoras essenciais para a ativação de células da papila e folículo dental. Dentre elas, a Laminina 5, proteína indutora de migração, adesão, diferenciação e proliferação celular (Mullen et al., 1999), e o fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β), que induz a diferenciação odontoblástica de células da papila dental (Unterbrink et al., 2002). Se houver comprometimento da estrutura da bainha epitelial de Hertwig nessa fase, haverá falhas na ativação celular da papila dental, fornecedora de odontoblastos primários para o complexo dentino-pulpar, comprometendo o processo de dentinogênese radicular.

Após a conclusão da rizogênese, a bainha epitelial de Hertwig começa a sofrer fragmentações em sua estrutura, permitindo que as células do folículo dental contactem a dentina radicular recém formada. Estas células, juntamente com células

da bainha epitelial que sofrem uma transição epitélio-mesenquimal, se diferenciam em cementoblastos, originando o cimento. Concomitantemente, fibras colágenas secretadas por células do folículo dental serão imersas na nova matriz cementária, realizando a união entre a superfície radicular e o osso alveolar (Huang; Chai, 2012).

2.2 NECROSE PULPAR E INTERRUPÇÃO DA RIZOGÊNESE

Após a erupção do elemento dental na cavidade oral, a rizogênese se completará, em média, em 24-36 meses (Shah et al., 2008). Se durante este período algum processo patológico comprometer a integridade dos tecidos responsáveis pela formação da dentina e do cimento, a formação radicular poderá ser comprometida.

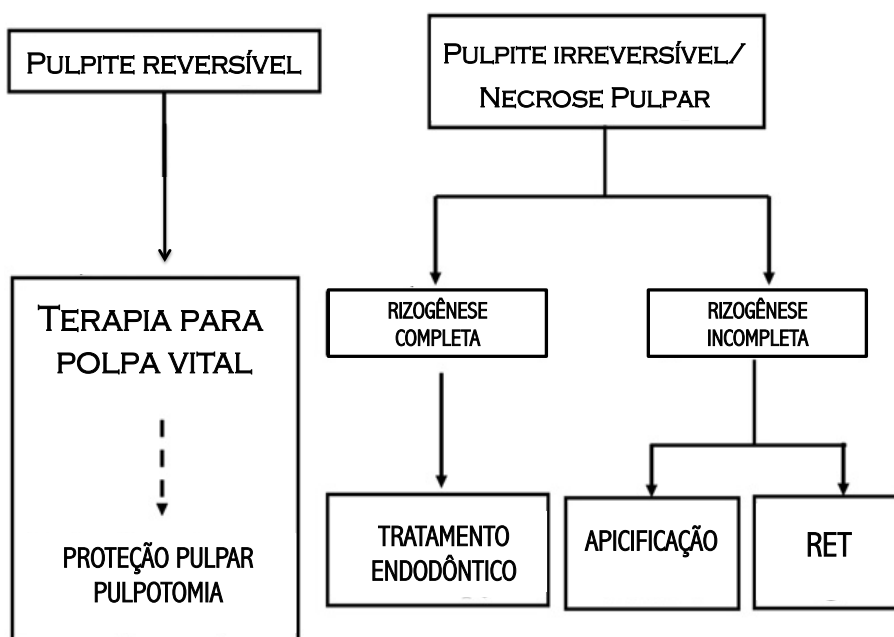
A necrose pulpar, decorrente de cárie, trauma ou malformações dentais (*dens invaginatus* ou *dens evaginatus*), associada à reação inflamatória periapical em dentes com rizogênese incompleta, está comumente associada à interrupção da formação radicular. Este fenômeno resulta em significativo comprometimento estrutural do dente afetado, que permanecerá com paredes dentinárias finas e frágeis, além do comprimento radicular deficiente (Cvek, 1992; Shah et al., 2008).

O tratamento endodôntico em dentes com rizogênese incompleta representa uma série de desafios para o clínico, já que o preparo mecânico e modelagem do canal radicular não podem ser realizados conforme o tratamento endodôntico convencional, tampouco a obturação tradicional poderá ser completada. Isto ocorre porque as paredes dentinárias encontram-se finas e frágeis, contra indicando qualquer procedimento que promova o seu desgaste, mesmo para a redução da contaminação presente na cavidade pulpar (Shah et al., 2008). O travamento de um cone de guta percha, bem como o confinamento do material obturador no interior do canal radicular é um processo extremamente complexo nestes casos, pela ausência de constrição e conclusão da formação apical. Logo, a eliminação bacteriana através dos procedimentos convencionais de limpeza e modelagem preconizados por Schilder, seguida pela obturação tridimensional do espaço correspondente ao canal radicular, não são alcançados nestes casos clínicos (Schilder, 2006).

2.2.1 Apicigênese

Em casos de dentes com rizogênese incompleta e polpa vital, sendo necessária a intervenção endodôntica, é imprescindível a manutenção da vitalidade da polpa radicular para que a rizogênese se complete fisiologicamente. Nestes casos, o tratamento mais indicado é a pulpotomia, cujo objetivo é remover a porção da polpa irreversivelmente afetada e proteger o remanescente pulpar com um material biocompatível, mantendo-o fisiologicamente hígido (Witherspoon, 2008) (Figura 2.1). De acordo com a Associação Americana de Endodontia (*American Association of Endodontics, AAE*), pulpotomia é a técnica na qual realiza-se a remoção da porção coronária da polpa, com o objetivo de preservar a polpa radicular, permitindo a continuação da formação da raiz (Taha; Abdulkhader, 2018). Apicigênese é o processo fisiológico de formação radicular, incluindo o fechamento apical. Este processo permite o aumento na espessura e comprimento radicular, incluindo a conclusão da formação apical sem alterações em sua morfologia original (Witherspoon, 2008).

Figura 2.1 – Opções de tratamento de acordo com o diagnóstico e estágio de formação radicular



Fonte: Figura modificada de Shabahang (2013).

2.2.2 Apicificação

Nos casos de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar, o tratamento comumente preconizado é a Apicificação. Tal procedimento objetiva, além da descontaminação do canal radicular, dar condições para que ocorra a formação de uma barreira de tecido mineralizado na região apical do elemento dental, permitindo que a obturação do canal radicular seja executada.

A apicificação inclui o processo de descontaminação química da cavidade pulpar, realizada com o auxílio de soluções irrigadoras, seguida pela utilização de uma medicação intracanal, composta pela pasta de hidróxido de cálcio. Desta forma, a redução microbiana obtida através de métodos químicos será complementada pela medicação intracanal. Numa segunda sessão será realizado o procedimento cujo objetivo é fornecer condições para a formação de uma barreira apical calcificada, permitindo a obturação do canal radicular de maneira convencional.

Para a realização deste procedimento, existem duas opções de técnicas de apicificação a serem empregadas: mediata ou imediata. Na técnica mediata é realizada a descontaminação do canal radicular seguida por trocas sucessivas de medicação intracanal (hidróxido de cálcio) até a constatação de formação de barreira mineralizada na região apical, que pode demorar de 6 a 24 meses (Shah et al., 2008). As desvantagens deste recurso terapêutico compreendem a necessidade de várias sessões até a conclusão do tratamento, além da possibilidade de maior fragilização da estrutura radicular pela presença do hidróxido de cálcio a longo prazo, devido às suas propriedades higroscópicas e proteolíticas (Andreasen et al., 2002). A barreira mineralizada, quando formada, apresenta-se comumente porosa, não contínua e frágil, não proporcionando um eficiente selamento apical (Shah et al., 2008). Já a técnica imediata consiste na realização de um tampão/plug apical com Agregado de Trióxido Mineral (*Mineral Trioxide Aggregate*, MTA) ou outro cimento reparador biocerâmico após a descontaminação do canal radicular, seguido pela obturação. Esta técnica resulta em um tratamento mais rápido, podendo ser realizado em 1 ou idealmente 2 sessões, com a utilização de material biocompatível e com propriedades osteoindutoras, como o MTA ou outros cimentos biocerâmicos.

Entretanto, apesar destas técnicas permitirem a resolução dos sinais e sintomas clínicos da doença, não permitem o restabelecimento da estrutura pulpar

e/ou a continuidade do desenvolvimento radicular. Neste caso, é observada a manutenção das características morfológicas originais da raiz, equivalentes ao início do tratamento, que compreendem paredes dentinárias finas e frágeis, e a manutenção de elevado risco de fratura nestes elementos dentais (Iwaya et al., 2001; Bose et al., 2009).

2.2.3 Terapia Endodôntica Regenerativa (RET)

A pesquisa por alternativas de tratamentos em dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta que permitissem a continuação do desenvolvimento radicular, denominado também maturogênese (Weisleder; Benitez, 2003), introduziu à Endodontia princípios técnicos de engenharia tecidual, objetivando a regeneração de tecidos. Foi criada, desta forma, a terapia endodôntica regenerativa (*Regenerative Endodontic Therapy*, RET), que possui como principal objetivo o restabelecimento da vitalidade do tecido presente no interior do canal radicular, permitindo que a conclusão da rizogênese seja possível, mesmo após a necrose pulpar (Conde et al., 2016). Esta terapia é representada por um conjunto de procedimentos embasados biologicamente e destinados a permitir o reparo de lesões periapicais e a reposição de células e tecidos do complexo dentino-pulpar (Murray et al., 2007).

A determinação de um importante princípio para este tratamento foi estabelecido por Ostby (1961), quando o autor ressaltou a importância do coágulo sanguíneo para a reestruturação de um novo tecido no interior do canal radicular. O autor descreveu, através de estudos histológicos em cães, que o coágulo sanguíneo parecia atuar como um suporte tridimensional para a estruturação de um novo tecido conjuntivo fibroso em um canal radicular vazio e previamente descontaminado.

Iwaya et al. (2001) publicaram o primeiro caso clínico de terapia regenerativa na literatura, denominada pelos autores de revascularização. Um elemento dental com rizogênese incompleta, necrose pulpar e com presença de fístula foi tratado através de descontaminação da cavidade pulpar com solução irrigadora e utilização de medicação antibiótica intracanal. Os autores ressaltaram que a porção coronária da polpa contaminada foi removida, permitindo que as células pulpare da região apical proliferassem no espaço vazio do canal radicular, restabelecendo um novo tecido nesta região. Afirmaram ainda que quando a apicificação é o tratamento de escolha para estes casos, o preenchimento do canal

radicular com a pasta de hidróxido de cálcio até a obtenção de uma barreira mineralizada apical impede que células viáveis proliferem no espaço preenchido pela pasta, eliminando a chance de que uma revascularização ocorra.

Banchs e Trope (2004) propuseram um protocolo para a técnica de revascularização realizada em elemento dental com rizogênese incompleta e necrose pulpar. A técnica consistia na combinação de desinfecção do canal radicular através de solução irrigadora e utilização de uma pasta tripla antibiótica composta por Ciprofloxacino, Metronidazol e Minociclina, previamente sugerida por Hoshino et al. (1996) como medicação intracanal. Numa segunda sessão, os autores realizaram a estimulação apical através da introdução de um instrumento explorador no canal radicular até que um tecido vital fosse alcançado. A partir daí, um sangramento apical foi induzido, permitindo a formação de coágulo no interior do canal radicular e um selamento coronário duplo foi realizado, utilizando MTA e material restaurador. O coágulo, segundo os autores, funciona como uma matriz para a proliferação celular e formação de novo tecido. Os autores afirmam que, a despeito do tecido pulpar necrótico e altamente infectado, é possível a permanência de tecido pulpar vital na região apical, juntamente com a bainha epitelial de Hertwig, permitindo que um novo tecido se estabeleça na cavidade pulpar após a descontaminação e atenuação do processo inflamatório previamente instalado.

Lovelace et al. (2011) demonstraram em estudo clínico que o influxo de sangramento apical para o canal radicular após sua descontaminação está associado à considerável entrada de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells*, MSCs), juntamente com o sangramento. Este fato é relevante no campo do tratamento endodôntico regenerativo, comprovando que estes procedimentos são, de fato, baseados em células-tronco. Esta constatação de que células-tronco do próprio paciente poderiam ser disponibilizadas para influxo no interior do canal radicular sem a necessidade de procedimentos laboratoriais adicionais, levou clínicos e pesquisadores a considerar princípios de engenharia tecidual para aprimorar tratamentos e protocolos, consolidando a terapia endodôntica regenerativa (Diogenes et al., 2016).

Langer e Vacanti (1993) afirmam que deve-se atender à tríade clássica da engenharia tecidual composta por células-tronco, matriz ou *scaffold* e fatores de crescimento sempre que se desejar neoformação tecidual. Diogenes e Hargreaves (2017) preconizam a adição de um quarto fator de grande importância à tríade,

correspondente à descontaminação da cavidade pulpar, essencial para a obtenção de maior previsibilidade e chances de sucesso no tratamento regenerativo, já que a presença de elevados níveis de contaminação podem comprometer ou alterar a capacidade de reparo ou regeneração celular.

Inúmeros casos clínicos de dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta submetidos a tratamentos endodônticos regenerativos vem sendo publicados na literatura. Dentre as evidências de sucesso clínico, estão: ausência de sintomatologia dolorosa, manutenção fisiológica do elemento dental e preservação estética. Dentre as evidências de sucesso radiográfico, estão: regressão da rarefação óssea periapical (se existente), aumento na espessura das paredes dentinárias, aumento do comprimento radicular e fechamento apical (Thibodeau; Trope, 2007; Jung et al., 2008; Kim et al., 2012). A explicação para a continuação da formação radicular nestes casos está relacionada à sobrevivência de células pulpares, mesmo após diagnóstico clínico e radiográfico de lesão periapical (Tobias Duarte et al., 2014).

Ainda que se conheça a relação causal entre necrose pulpar e interrupção da formação radicular, os mecanismos moleculares envolvidos na interrupção da rizogênese após danos ao tecido pulpar, bem como os mediadores inflamatórios envolvidos neste processo, ainda não são completamente conhecidos. Da mesma forma, os processos celulares que se instalam após a realização de terapias regenerativas pulpares, bem como a migração e diferenciação de células-tronco para a neoformação tecidual, ainda não foram devidamente explorados e elucidados. Diversas pesquisas científicas vem sendo desenvolvidas a fim de permitir a identificação, isolamento e estudo de populações de células mesenquimais provenientes do elemento dental e áreas adjacentes, permitindo a exploração dos mecanismos envolvidos nos processos regenerativos.

Neste contexto, populações de células mesenquimais da polpa dental (Gronthos et al., 2000) e, mais recentemente, da papila apical (Sonoyama et al., 2006) foram identificadas, isoladas e caracterizadas. Isto permitiu o estudo do papel destas células tanto durante processos fisiológicos de formação do elemento dental, bem como diante de situações envolvendo patologias pulpares e tratamentos regenerativos.

2.3 CÉLULAS-TRONCO DA POLPA (DPSCs)

Durante a odontogênese, interações entre as células epiteliais do órgão do esmalte e células mesenquimais da papila dental induzem à diferenciação de odontoblastos e ameloblastos, que produzem uma matriz especializada e mineralizada, correspondendo, respectivamente, à dentina e esmalte. Uma vez formadas, essas matrizes não sofrem remodelação como o tecido ósseo, que sofre reabsorção e deposição fisiológica contínuas ao longo da vida pós natal. Desta forma, um dano à estrutura dentinária devido a um trauma mecânico, substâncias químicas ou processos patológicos induzirá à formação de dentina terciária, com o objetivo de proteger a estrutura pulpar (Gronthos et al., 2000).

Esta dentina terciária pode ser classificada como reacional ou reparadora, dependendo do tipo celular que a origina: odontoblastos no primeiro caso, e células semelhantes a odontoblastos, ou *odontoblasts-like*, no segundo caso. Quando a injúria responsável pela lesão tecidual é de intensidade tal que não promova a destruição dos odontoblastos, a dentina terciária será formada por estas células. Porém, quando o dano provoca a destruição dos odontoblastos, ocorrerá a sua substituição por células semelhantes a odontoblastos. Estas células migram da polpa para a região da lesão, e então produzem o tecido reparador. Nestes casos, o processo de formação dentinária é mais complexo, já que há necessidade de recrutamento e migração de células-tronco da polpa para o local da injúria, proliferação e indução de diferenciação celular, para que então sejam formadas células semelhantes a odontoblastos, que iniciarão a formação de matriz dentinária (Duncan et al., 2019). A exata origem e localização destas células-tronco pulpares ainda não foi totalmente esclarecida, porém, o seu fenótipo corresponde ao de células presentes em regiões perivasculares (Shi; Gronthos, 2003). Há relatos de que diferentes populações de MSCs poderiam originar células semelhantes a odontoblastos (Hargreaves et al., 2013), e que fibroblastos poderiam também representar estas células que dão origem a células *odontoblasts-like* (Ricucci et al., 2014). A possibilidade de recrutamento de células progenitoras e odontoblastos do tecido pulpar para originar esse tecido reparativo levou à suposição de que o tecido pulpar poderia representar uma fonte de células indiferenciadas ainda não identificadas.

Gronthos et al. (2000) identificaram e isolaram uma população de células de polpa adulta, observando que essas células eram altamente proliferativas, capazes

de formar colônias e de regenerar um tecido, propriedades que efetivamente permitiam classificá-las como células-tronco, recebendo a denominação de células-tronco da polpa dental ou *dental pulp stem cells* (DPSCs).

Os autores demonstraram, *in vivo*, a capacidade dessas células em originar uma estrutura semelhante ao complexo dentino-pulpar após serem transplantadas utilizando a hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carreadores, em tecidos de ratos imunocomprometidos. Neste experimento, observou-se a formação de uma estrutura mineralizada semelhante à dentina composta por túbulos, células semelhantes a odontoblastos e tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos, similar ao encontrado no dente humano. Outros estudos utilizando DPSCs foram realizados *in vivo*, comprovando a possibilidade de formação de tecido pulpar a partir desta população celular (Piva et al., 2017; Itoh et al., 2018), incluindo a formação de estrutura dentinária (Piva et al., 2017). A capacidade de auto-renovação das células progenitoras pulpares, bem como seu potencial de diferenciação em condroblastos, osteoblastos, neurônios, adipócitos ou células semelhantes a odontoblastos já foi comprovada através de estudos *ex vivo* (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Zhang et al., 2008).

Diversas populações de células-tronco adultas já foram identificadas no elemento dental, como as provenientes de dentes decíduos exfoliados, denominadas *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (SHEDs) (Miura et al., 2003; Egusa et al., 2012), ligamento periodontal (*periodontal ligament cells*, *PDLCs*) (Seo et al., 2004), células do folículo dental (*dental follicle stem cells*, *DFCSc*) (Egusa et al., 2012) e da papila apical (*stem cells of apical papila*, *SCAPs*) (Sonoyama et al., 2006). Todas essas células apresentam capacidade de auto-renovação e de diferenciação em linhagens variadas.

2.4 CÉLULAS-TRONCO DA PAPILA APICAL (SCAPs)

O primeiro relato de isolamento de uma população de células-tronco da papila apical, denominada SCAPs, foi realizado por Sonoyama et al. (2006), confirmando que esta estrutura representa uma fonte de células-tronco mesenquimais. Os autores isolaram as células a partir de terceiros molares humanos extraídos e observaram que a sua capacidade de formação de colônias, um dos critérios

utilizados para avaliação de células-tronco, foi equivalente ao de outras populações de células-tronco mesenquimais.

Através de imunomarcção e citometria de fluxo, os mesmos autores demonstraram a positividade de SCAPs para os marcadores precoces de células-tronco mesenquimais Estromatina (*Stromatin-1*, STRO-1) e CD146, previamente identificados em células-tronco de medula óssea e da polpa dental (Gronthos et al., 2000; Shi; Gronthos, 2003), e novamente identificados mais tarde em SCAPs (Bakopoulou et al., 2011). Sonoyama et al. (2006) identificaram também um marcador específico para SCAPs, denominado CD24, não detectado em outras células mesenquimais, como de medula óssea ou polpa dental. Neste mesmo estudo, relataram a positividade de SCAPs para os marcadores de células-tronco CD29, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166, e negatividade para CD45 (marcador de células hematopoiéticas) e CD34 (marcador de células endoteliais). SCAPs apresentaram também positividade aos marcadores de pluripotencialidade Oct (*Octamer-binding transcription factor*) 3/4 (Bakopoulou et al., 2013). Entretanto, é importante ressaltar que essas populações celulares apresentam heterogenicidade, e seu perfil molecular apresenta-se dinâmico devido à sua habilidade de expressar diferentes marcadores, dependendo de sua ativação, diferenciação ou passagem (Ruparel et al., 2013).

SCAPs apresentam potencial para diferenciação em osteoblastos, odontoblastos e em outros tipos celulares, como adipócitos e neurônios, semelhante ao observado em células-tronco pulpares e de medula óssea (Sonoyama et al., 2006; Bakopoulou et al., 2013). Para validar esta capacidade de diferenciação de SCAPs em células dentinárias funcionais, foi realizado um transplante de células-tronco de papila apical em camundongos imunocomprometidos, utilizando partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico como carreadores. Observou-se que houve a regeneração de uma típica estrutura dentinária, ocorrendo a formação de uma camada de dentina na superfície da hidroxiapatita e fosfato tricálcico, associada ao tecido conjuntivo. Com isto, os autores concluíram que SCAPs representam uma população celular multipotente, comprovada pela sua capacidade de diferenciação em odontoblastos e adipócitos *in vitro*. Esta população expressa elevados níveis de duas importantes moléculas mediadoras dos processos celulares proliferativos: survivina, proteína inibidora de apoptose, e telomerase, enzima responsável por

adicionar sequências definidas de DNA à extremidade 3s dos cromossomos (Sonoyama et al., 2006).

Estes mesmos autores (Sonoyama et al., 2008), em outro estudo após dois anos, caracterizaram a papila apical e suas células-tronco através de análise histológica, imunohistoquímica e de fluorescência. Os autores descreveram o aspecto da papila apical associada ao ápice de dentes com rizogênese incompleta como um tecido conjuntivo de superfície lisa, facilmente destacável da região apical, deixando exposto o tecido pulpar após sua remoção. Observaram também que as células da papila apical apresentaram um potencial de proliferação celular de 2 a 3 vezes maior que o de células pulpares do mesmo elemento dental. Histologicamente, os autores observaram que a papila apical é separada da polpa por uma área rica em células, possuindo menor quantidade de vasos sanguíneos e componentes celulares. Este achado histológico foi posteriormente confirmado por diferentes autores, após análise de papila apical em modelo animal (Huang et al., 2008; Tobias Duarte et al., 2014), e papila apical humana (Chrepa et al., 2017).

Diogenes e Hargreaves (2017) afirmam que o menor número de vasos sanguíneos e componentes celulares é uma importante característica que permite que a papila apical e suas células sobrevivam à infecção mesmo diante de uma periodontite apical avançada. A baixa vascularidade deste tecido permite que a papila permaneça em um estágio de demanda metabólica baixa, com células no estado de quiescência, adquirindo nutrientes e realizando trocas gasosas principalmente por difusão com os tecidos vizinhos. Isto permite não somente a sobrevivência destas células diante de uma contaminação do canal radicular, mas também uma resposta a estímulos agressores de maneira favorável ao reparo ou regeneração.

Para verificar o papel funcional da papila apical na formação radicular, Sonoyama et al. (2008) removeram cirurgicamente esta estrutura de algumas raízes de molares em estágio inicial de formação, observando a interrupção da formação das respectivas raízes, apesar do tecido pulpar estar intacto. A partir deste estudo, que foi realizado em mini-porcos, os autores concluíram que a papila apical, e não o tecido pulpar, é a fonte de odontoblastos primários para a produção da dentina radicular.

A identificação dessa população de células-tronco da papila apical pode explicar um fenômeno clínico no qual se observa a conclusão da formação radicular

mesmo em dentes imaturos infectados, com periodontite apical ou abscesso, após a realização de tratamento regenerativo apropriado (Iwaya et al., 2001; Banchs; Trope, 2004; Chueh; Huang, 2006). Após a desinfecção endodôntica, e sob influência da bainha epitelial de Hertwig, a papila apical daria origem a odontoblastos primários, permitindo a continuação da formação radicular (Sonoyama et al., 2008).

Em relato de caso clínico, Chrepa et al. (2017) removeram e processaram a papila apical de um dente com necrose pulpar e rizogênese incompleta para cultura celular, análise imunohistoquímica e microscopia confocal. Os autores observaram que, mesmo sob condições inflamatórias, SCAPs mantiveram a sua viabilidade celular e expressaram os mesmos marcadores de células de papila apical previamente caracterizadas e provenientes de elementos dentais hígidos. Os autores observaram, inclusive, um aumento nos potenciais de diferenciação osteo/odontogênica e angiogênica nestas células, quando comparadas a SCAPs previamente isoladas. Em outro estudo utilizando modelo animal, também observou-se maior deposição de cálcio e aumento na atividade da fosfatase alcalina (*alkalin phosphatase* – ALP) em SCAPs derivadas de dentes com rizogênese incompleta e periodontite apical induzida (Yoo et al., 2016). Portanto, sugere-se que a papila apical é capaz de manter sua viabilidade mesmo após a necrose pulpar, apesar do moderado infiltrado inflamatório (Thibodeau; Trope, 2007; Tobias Duarte et al., 2014), e que a infecção e inflamação endodôntica podem alterar a sua capacidade de diferenciação (Chrepa et al., 2017).

No mesmo modelo de estudo animal previamente citado, Yoo et al. (2016) utilizaram dentes imaturos com patologia pulpar e periodontite apical induzida, observando que após 2 semanas não houve alteração na capacidade proliferativa de SCAPs, porém, após 4 semanas ocorreu um aumento desta capacidade. Em relação à manutenção do estado de indiferenciação, dois fatores de transcrição reguladores de auto-renovação e pluripotencialidade foram avaliados: Oct4 e Sox2. Observou-se semelhante expressão dos dois fatores em SCAPs em microambiente inflamatório, sugerindo que estas células mantêm suas características originais de indiferenciação mesmo nestes ambientes. Contudo, diante de processos inflamatórios severos – com intenso infiltrado neutrofílico e macrófágico – as células expressaram níveis inferiores de Oct4 e Sox2, levando à conclusão de que a inflamação severa resulta em menor proporção de células em estado indiferenciado (Yoo et al., 2016). Em síntese, pode-se afirmar que mediadores inflamatórios

presentes em tecidos injuriados tem potencial para interferir nos sinais necessários ao desenvolvimento radicular.

Estudos *in vivo* realizados em modelo animal utilizando dentes com rizogênese incompleta, indução de necrose pulpar e lesão periapical confirmaram a relação entre comprometimento pulpar e interrupção da rizogênese (Böttcher et al., 2013; Tobias Duarte et al., 2014). Ao contrário dos espécimes do grupo controle, com polpa hígida, a imunomarcação para STRO-1 e proteína óssea morfogenética-4 (*Bone Morphogenetic Protein 4 - BMP-4*) deixam de ser expressos na papila dentária dos grupos com necrose pulpar (Böttcher et al., 2013), sugerindo que esses marcadores são sensíveis a alterações induzidas pela infecção e inflamação (Aberg et al., 1997). STRO-1 é um marcador para células-tronco de tecidos dentários e BMP-4 é uma proteína relacionada ao desenvolvimento dental, expressa em regiões de desenvolvimento de tecidos mineralizados. Os autores observaram que em períodos curtos de infecção ainda existe expressão de STRO-1, ressaltando a importância dos efeitos contínuos da modulação inflamatória sob a capacidade de resposta das células-tronco à injúria e sua capacidade de reparo. Logo, a capacidade de resposta satisfatória ao tratamento regenerativo de um dente imaturo que apresente uma infecção endodôntica recente será diferente da sua capacidade de resposta diante de uma infecção de longa duração. Portanto, a duração do estímulo nocivo parece apresentar uma maior influência no prognóstico do que a intensidade da inflamação (Böttcher et al., 2013).

Tobias Duarte et al. (2014) avaliaram histologicamente a condição do tecido pulpar e da papila apical após 30, 60 e 90 dias de infecção endodôntica induzida em molares de ratos com rizogênese incompleta. Observaram que após 90 dias, apesar de não existir tecido pulpar viável nos três terços do canal radicular, a papila apical encontrava-se vital, porém moderada ou severamente inflamada em 2/3 dos casos. No contexto de terapias regenerativas, as células-tronco da papila apical despertam especial interesse devido à sua localização anatômica, correspondente à região apical de dentes com rizogênese incompleta (Sonoyama et al., 2008). Além disso, uma vez ativadas ou quando removidas de seu nicho, estas células sofrem diversas modificações, adotando um perfil molecular ditado pelas condições do ambiente onde estão inseridas (Ruparel et al., 2013). Porém, a habilidade destas células em regenerar o tecido pulpar de dentes com necrose pulpar, aptas a restabelecer as

funções dentinárias perdidas, ainda não foi adequadamente avaliada (Tziafas; Kodona, 2010).

Em relação ao tipo de tecido formado após os procedimentos regenerativos, estudos em modelos humanos (Shimizu et al., 2013) e animais (Wang et al., 2010) relatam que existe a formação de um tecido estruturalmente diferente do tecido dentinário, podendo ocorrer ainda a deposição de um tecido semelhante ao cimento (tecido cementóide) sobre a dentina já existente. Estes resultados provavelmente ocorrem devido ao recrutamento de outras células progenitoras como células do ligamento periodontal, osteoblastos ou cementoblastos para o interior do canal radicular (Huang; Garcia-Godoy, 2014). Outra possibilidade é a de que a infecção possa alterar o padrão de diferenciação de SCAPs (Vishwanat et al., 2017).

Estes estudos ressaltam a importância dos processos inflamatórios e infecciosos nas alterações funcionais e fenotípicas de células-tronco mesenquimais que participam da rizogênese. Neste contexto, diferentes processos moleculares serão instalados, com a produção e liberação de diferentes mediadores químicos, fatores de crescimento e citocinas. É importante que estes mecanismos sejam investigados, bem como a sua influência na sobrevivência e funcionamento das células que compõem a papila apical e que participam ativamente durante os processos de rizogênese.

2.4.1 SCAPs e Lipopolissacarídeo (LPS)

A progressão das infecções endodônticas em dentes com rizogênese incompleta ocorre de maneira mais lenta do que em dentes com rizogênese completa, devido à maior irrigação colateral observada em dentes imaturos. Nestes casos, a evolução do processo infeccioso pode ocorrer de forma mais lenta em algumas regiões da polpa e de forma mais rápida em outras. Pode ocorrer a instalação simultânea de áreas de inflamação e áreas de necrose pulpar, justificando a manutenção de algumas áreas da polpa que apresentem sangramento e sensibilidade, mesmo nos casos em que há imagem de radiolucidez periapical e o teste de sensibilidade térmica tenha sido negativo (Fouad, 2017).

Estas infecções endodônticas comumente evoluem para a periodontite apical, e são caracterizadas pela presença de diversas espécies microbianas, sendo consideradas infecções polimicrobianas, com a mesma variabilidade de

microrganismos das infecções que acometem dentes com rizogênese completa (Nagata et al., 2014). Dentre estas espécies estão as bactérias Gram positivas e Gram negativas, capazes de ativar uma resposta imunológica no hospedeiro através de componentes presentes na sua parede celular. Nas bactérias Gram positivas, destaca-se o ácido lipoteicóido (*lipoteichoic acid* - LTA) e nas Gram negativas, uma endotoxina denominada lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide* - LPS) (Siqueira et al., 2002; Staquet et al., 2011). O LPS é um complexo glicolipídico composto por um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lípide A, responsável pelos efeitos biológicos desta endotoxina (Strachan et al., 2019). As bactérias Gram negativas são comumente encontradas em polpas necróticas, sendo os principais microrganismos envolvidos em infecções endodônticas (Fabricius et al., 1982; Morrison; Ryan, 1987). Seus componentes moleculares são capazes de induzir a liberação de citocinas inflamatórias por vários tipos celulares, incluindo SCAPs (Zhang et al., 2013). Além disto, o LPS pode promover alterações no padrão de diferenciação e proliferação de células-tronco da polpa dental (Yamagishi et al., 2011), do ligamento periodontal (Albiero et al., 2015) e da papila apical (Lertchirakarn; Aguilar, 2017). Como SCAPs estão localizadas na porção mais apical do elemento dental, estarão diretamente em contato com o LPS proveniente de canais radiculares infectados (Lertchirakarn; Aguilar, 2017).

A concentração de LPS que alcança a região periapical não é conhecida, porém, a concentração aproximada foi estimada em estudos utilizando o ensaio colorimétrico *limulus ameobocyte lysate assay* a partir de amostras diretamente coletadas de canais radiculares, obtendo a concentração de 0,001 a 0,1 µg/mL. No entanto, os autores ressaltam que este ensaio permite a coleta de apenas uma parte das moléculas de LPS presentes no canal radicular, e que esta concentração poderia ser bem mais elevada do que a estimada nos estudos (Martinho et al., 2011; Marinho et al., 2012). Em outro estudo, os autores (Jacinto et al., 2005) obtiveram a concentração de 0,48 a 4,42 µg/mL de LPS após a coleta de amostras de 50 canais radiculares, utilizando o mesmo método anteriormente citado. Diante destes valores, diferentes estudos empregando células-tronco e LPS foram realizados, com o objetivo de avaliar as possíveis alterações nas funções celulares, após exposição a diferentes concentrações de endotoxina.

Kadono et al. (1999) avaliando a influência do LPS de *P. gingivalis* (1, 10 e 100ng/mL) na proliferação e diferenciação osteoblástica de células de calvárias de

ratos observaram que não houve alteração na viabilidade e proliferação celular após 21 dias. Já em relação à formação de nódulos de mineralização por estas mesmas células, observou-se uma redução dose-dependente após exposição ao LPS. Os autores concluíram que o LPS inibe a diferenciação osteoblástica nestas células sem afetar sua viabilidade e capacidade de proliferação.

Mo et al. (2008) também não observaram alteração na proliferação de células-tronco mesenquimais (MSCs) após exposição ao LPS de *E. coli* (0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL) após 3 e 7 dias. Já em relação à diferenciação celular, os autores observaram um aumento na deposição de cálcio nos grupos estimulados com LPS a 1 e 10 µg/mL, após 14 dias. Os autores concluíram que o LPS não alterou a capacidade de proliferação celular, mas aumentou a diferenciação osteogênica de MSCs, quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento com LPS). Resultados semelhantes foram obtidos (He et al., 2015) ao estimular DPSCs com LPS de *E. coli* (0,01; 0,1; 1 e 10 µg/mL). Os autores observaram redução na viabilidade celular após 14 dias no grupo estimulado com a maior concentração de LPS (10 µg/mL), e aumento na diferenciação osteo/odontogênica em todos os grupos, quando comparados ao controle.

Em estudo para avaliar os efeitos do LPS de *P. gingivalis* na viabilidade e diferenciação osteogênica de SCAPs, Letchirakarn e Aguilar (2017) observaram que concentrações de 0,001 e 5 µg/mL não alteraram nenhuma destas funções. Os autores não observaram alterações na expressão gênica do marcador odontoblástico sialofosfoproteína dentinária (*dentinsialophosphoprotein* - DSPP), ou do marcador cementário osteopontina (*osteopontin* - OPN) após exposição ao LPS. No entanto, na concentração de 5 µg/mL ocorreu um aumento significativo na expressão do marcador ósseo sialoproteína óssea (*bone sialoprotein* - BSP). Os autores concluíram que concentrações elevadas de LPS podem promover alterações na diferenciação osteogênica de SCAPs, caracterizada pelo aumento na expressão de genes relacionados à regeneração óssea. Os autores ressaltam que, sem o tratamento com LPS, SCAPs expressariam DSPP de forma mais pronunciada do que BSP (Lertchirakarn; Aguilar, 2017).

Ao avaliar o efeito do LPS de *E. coli* (0,01-1 µg/mL) na viabilidade, proliferação e expressão de genes relacionados à mineralização de DPSCs, os autores (Widbiller et al., 2018) observaram que o LPS não alterou a viabilidade celular após 48h e 7 dias, porém, observou-se um aumento na taxa de apoptose celular nestes períodos.

A expressão de genes relacionados à diferenciação e mineralização não foi alterada pelo LPS, com exceção do colágeno tipo 1 α 1 (*collagen type 1 α 1* - COL1A1), cuja expressão foi reduzida após 21 dias. Os demais genes avaliados foram DSPP, *dentin matrix acidic phosphoprotein* (DMP-1) e osteocalcina (*osteocalcin*, OCN). Os autores concluíram que o LPS pode exercer influência nos padrões de diferenciação de DPSCs, devido à alteração na expressão de um dos genes avaliados.

Ao analisar os efeitos do biofilme de *E. faecalis* na expressão osteogênica de SCAPs e no seu potencial de diferenciação celular, Vishwanat et al. (2017) observaram uma redução na expressão do gene dentinogênico DSPP e do gene mineralizante ALP nestas células. Em contrapartida, ocorreu um aumento na expressão de genes osteoblásticos como BSP, OCN, RUNX-2 (*runt-related transcription factor 2*) e DLX-5 (*distal-less homeobox 5*) após exposição ao biofilme. Em relação à quantificação de ALP produzida por SCAPs durante o período de diferenciação osteo/odontogênica, observou-se sua completa ausência nas células expostas ao biofilme, levando os autores a concluir que antígenos bacterianos podem limitar a habilidade de diferenciação de SCAPs em tipos celulares relacionados à mineralização.

Nomiyama et al. (2007) avaliaram a influência do LPS de *A. actinomycetemcomitans* Y4 (10 e 20 μ g/mL) nas propriedades odontoblásticas de células de papila apical de ratos. Os autores ressaltaram que estas células apresentaram altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), RUNX-2, DSPP e nódulos de mineralização. Após a estimulação com LPS verificou-se que a atividade de ALP, DSPP e RUNX-2 foram suprimidas de modo concentração-dependente em relação ao LPS. Os autores concluíram que as propriedades odontoblásticas destas células foram reduzidas após tratamento com LPS.

Os resultados desses estudos sugerem que as endotoxinas bacterianas podem exercer diferentes influências nas funções celulares de viabilidade, proliferação, diferenciação e expressão gênica. Observa-se que o LPS pode promover um aumento, redução ou nenhum efeito nas funções celulares, dependendo de fatores como a origem das células-tronco, origem do LPS e sua concentração (Zhang et al., 2013; Albiero et al., 2015; Vishwanat et al., 2017). É importante que haja a compreensão da interrelação entre os processos inflamatórios e infecciosos instalados na cavidade pulpar e as células tronco localizadas na papila apical, importante estrutura envolvida nos processos endodônticos regenerativos.

2.4.2 SCAPs e Fatores de Crescimento

Fatores de crescimento são proteínas extracelulares secretadas por diferentes tipos de células e que se ligam a receptores, modulando atividades celulares (Friedlander et al., 2009).

Durante a morfogênese dental, diversos fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras exercem importante influência nas interações entre os tecidos epiteliais e mesenquimais, promovendo a diferenciação celular e desempenhando papel na regulação do desenvolvimento dental. Dentre estes fatores, pode-se citar: fatores de crescimento transformadores (*Transforming Growth Factors* - TGFs), fatores de crescimento insulínicos (*Insuling Growth Factors* - IGFs), fatores de crescimento para fibroblastos (*Fibroblast Growth Factors* - FGFs) e proteínas ósseas morfogenéticas (*Bone Morphogenetic Proteins* - BMPs). O estudo da influência destes fatores de crescimento na migração, proliferação e diferenciação de células que participam de processos endodônticos regenerativos é de primordial importância não só para o seu entendimento, mas também para a aplicação e desenvolvimento de novas tecnologias e protocolos clínicos.

O fator de crescimento transformador beta 1 (*Transforming Growth Factor* β 1 - TGF- β 1) faz parte de um grande grupo de fatores de crescimento, e está envolvido na síntese de matriz extracelular e em diferentes processos celulares (Massagué, 1990), incluindo a odontogênese e processos reparativos (Smith et al., 1998). Demonstrou-se, pela primeira vez na literatura, que este fator apresenta ação quimiotática para células de papila apical de ratos (MDPC-23) (Kwon et al., 2010). Chang et al. (2015) observaram ainda uma maior atividade mitótica em SCAPs expostas à TGF- β 1. Este mesmo efeito estimulatório na proliferação celular foi observado em outros estudos com DPSCs, após exposição à TGF- β 1 (Shirakawa et al., 1994; Nie et al., 2006). Além desta atividade relacionada à proliferação, observou-se também uma redução na expressão de fosfatase alcalina quando concentrações elevadas de TGF- β 1 (>5ng/mL) foram utilizadas, e aumento em sua expressão quando baixas concentrações deste fator de crescimento foram empregadas (0,1-1ng/mL) tanto em SCAPs (Chang et al., 2015) quanto em DPSCs (Shirakawa et al., 1994). Diferentemente, Nie et al. (2006) observaram apenas um

aumento na expressão de fosfatase alcalina relacionada aos processos de diferenciação osteo/odontogênica, após exposição de DPSCs à TGF- β 1 (5ng/mL).

Hwang et al. (2008) sugeriram que TGF- β 1 teria papel regulador na expressão de genes relacionados à mineralização durante a formação de dentina reparadora. Utilizando um modelo animal, os autores compararam a expressão das proteínas óssea e dentinária, respectivamente BSP e DSPP, em dentina primária e reparadora. Os autores observaram uma expressão tanto de BSP quanto de DSPP em dentina reparadora, porém, em dentina primária foi observada elevada expressão de DSPP e uma expressão muito baixa de BSP. Neste mesmo experimento, os autores compararam a expressão destas proteínas em células pulpares humanas e analisaram sua relação com a expressão de TGF- β 1 durante a formação de dentina reparadora. Observou-se que TGF- β 1 está relacionado ao aumento na expressão de BSP, mas não está relacionado a alterações na expressão de DSPP. Os autores concluem que, possivelmente, durante a formação de dentina reparadora ocorreria um aumento na expressão de TGF- β 1, levando a um aumento na expressão de BSP. Neste caso, a dentina reparadora assumiria um fenótipo mais próximo ao tecido ósseo do que ao dentinário. Diferentemente, em outro estudo (He et al. 2004) observou-se uma relação entre TGF- β 1 e redução na expressão de DSPP em células semelhantes a odontoblastos, em modelo animal. Palosaari et al. (2000) afirmam que TGF- β 1 participa da organização da matriz orgânica de dentina previamente à mineralização, e está relacionado à redução na expressão de metaloproteinases (MMP) em odontoblastos e tecido pulpar humano. Este fator de crescimento tem papel regulador no *turnover* de matriz extracelular de SCAPs durante processos de reparo ou regeneração, observados após tratamento de dentes com rizogênese incompleta (Chang et al., 2015).

Em estudo, Carvalho et al. (2016) avaliaram os efeitos de IGF-1 sobre SCAPs *in vitro* e *in vivo*, observando um aumento na regulação dos marcadores osteoblásticos *runt-related transcription fator 2* (RUNX2), *Osterix* (OSX), *Osteocalcin* (OCN) e ALP, e uma redução nos marcadores odontoblásticos (DSPP, DSP), indicando um aumento na diferenciação osteogênica e redução na diferenciação odontogênica. No resultado dos transplantes *in vivo*, observou-se que SCAPs não tratadas com IGF-1 geraram principalmente tecidos pulpo-dentinários, e SCAPs tratadas geraram principalmente estruturas ósseas, confirmando os resultados *in vitro*. Ao utilizar IGF-1 para estimular a atividade da ALP em SCAPs observou-se a

presença de mais nódulos de mineralização e elevadas concentrações de cálcio no grupo experimental em relação ao grupo não tratado. SCAPs apresentaram alteração morfológica e ultraestrutural, tornando-se planas e com morfologia típica de osteoblastos (cuboidais ou poligonais, com diversos processos citoplasmáticos) após 7 dias de exposição à IGF-1. Ocorreu também um aumento na proliferação de SCAPs, comparando-as com células não expostas ao fator de crescimento. Os autores concluíram que IGF-1 pode aumentar a atividade de ALP e a capacidade de mineralização e expressão de diversos marcadores osteoblásticos (ALP, RUNX2, OSX, OCN) em SCAPs.

Chang et al. (2020) relataram a expressão de pelo menos 2 receptores para FGFs em SCAPs e observaram um aumento na proliferação destas células após estimulação com diferentes concentrações de FGF-2. Este fator de crescimento demonstrou-se eficaz no recrutamento de SCAPs e na sua diferenciação celular, bem como na atividade da fosfatase alcalina (Fayazi et al., 2017).

A proteína morfogenética óssea 4 (*Bone morphogenetic protein 4*, BMP-4) é um fator de crescimento relacionado ao desenvolvimento dental, sendo observada em áreas de desenvolvimento de tecidos mineralizados. Ao acessar o papel de BMP-4 na formação da bainha epitelial de Hertwig, confirmou-se que esta proteína desempenha um importante papel na regulação da formação radicular e manutenção da proliferação celular (Hosoya et al., 2008). Böttcher et al. (2013) relataram a sua expressão em odontoblastos e em áreas próximas à pré-dentina, sugerindo um importante papel desta proteína na formação da matriz dentinária. Os autores sugerem que a expressão de BMP-4 é influenciada por alterações induzidas por processos inflamatórios/infecciosos, estando ausente em polpa necrótica, fato que indica que a inflamação no periodonto apical paralisa eventos associados à formação dentinária. Desta forma, estabelece-se uma relação direta entre processos de formação dentinária e expressão de BMP-4.

2.4.3 SCAPs, Citocinas e Mediadores Inflamatórios

As bactérias presentes em infecções endodônticas tem o potencial para ativar a resposta imunológica do hospedeiro, devido a componentes presentes em sua membrana celular, como o LPS e LTA. Esta resposta imunológica não é antígeno-específica, e sim, iniciada através de receptores de reconhecimento padrão (*pattern*

recognition receptors - PRRs), localizados na membrana de células do hospedeiro (Staquet et al., 2011). A partir da ativação de PRRs, capazes de identificar moléculas bacterianas, como ácidos nucleicos e padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecules patterns* - PAMPs) (Staquet et al., 2011), ocorrerá o início da transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outros eventos como fagocitose, autofagia e morte celular (Brubaker et al., 2015). Existem receptores presentes nas células do sistema imunológico chamados receptores tipo *toll* (*toll-like receptors*, TLR), que fazem parte da família dos PRRs, e que farão o reconhecimento de diferentes PAMPs, como os componentes de bactérias e vírus, por exemplo. O LPS, sendo um PAMPs, promove efeitos pró-inflamatórios através da ligação com os receptores *toll-like-4* (TLR-4) (Ulevitch et al., 1993), que juntamente com proteínas acopladas a ele, participarão de vias de sinalização, desencadeando um conjunto de efeitos pró-inflamatórios (McCarthy et al., 2017). Dentre estas proteínas acopladas ao TLR-4 estão: *cluster of differentiation* (CD)-14, proteína ligante de lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide binding protein* - LBP), e proteína de diferenciação mielóide 2 (Myeloid Differentiation Protein 2 - MD-2) (Widbiller et al., 2018).

Num contexto inflamatório relacionado às infecções endodônticas, diversas citocinas e mediadores inflamatórios são sintetizados e secretados após o reconhecimento do patógeno, podendo exercer efeitos moduladores na homeostase (Okada; Muhakami, 1998), proliferação e diferenciação (Shirakawa et al., 1994), migração e apoptose em diferentes tipos celulares (He et al., 2005; Kwon et al., 2010). O aumento na produção de determinadas citocinas em resposta a um antígeno microbiano no interior do canal radicular, especialmente o LPS, pode resultar em posterior degradação tecidual e evolução para a periodontite apical (Brandau et al., 2010).

As lesões periapicais são conhecidamente resultantes de uma resposta inflamatória local mediada pela infiltração de células e produção de mediadores inflamatórios. As citocinas estão diretamente envolvidas nos processos de migração e ativação celular nestes casos (Silva et al., 2005). É importante o estudo e conhecimento dos padrões de produção de citocinas e modulação de células mesenquimais envolvidas em processos regenerativos, diante destas situações clínicas.

Dentre os mediadores químicos diretamente envolvidos em processos ósseos de deposição e reabsorção, estão o ligante ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL), o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), receptor para a ativação do fator de transcrição NF-kB (RANK) e Osteoprotegerina (OPG) (Sun et al., 2015). A ligação do RANKL, expresso em osteoblastos, ao RANK, expresso em células precursoras de osteoclasto e osteoclasto maduro, ativa uma cascata de sinais que modula o processo de osteoclastogênese. A OPG, proteína presente em osteoblastos, representa um outro receptor para RANKL, podendo inibir a sua ligação com RANK, e a consequente diferenciação do osteoclasto. Desta forma, OPG atua como um modulador da síntese e deposição óssea, e RANK atua no processo de reabsorção óssea (Teitelbaum, 2000; Boyle et al., 2003). O papel destes mediadores no desenvolvimento de lesões periapicais foi demonstrado por Kawashima et al. (2007), ao analisarem a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de RANKL, RANK, OPG e diferentes citocinas através de PCR quantitativo, utilizando modelo animal de indução de lesões periapicais a partir de exposição pulpar à cavidade oral. Os autores observaram um aumento na expressão de RANKL e de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL1- α e IL1- β já no início do desenvolvimento da lesão, sugerindo um sinergismo entre estes mediadores. Observou-se uma maior expressão de RNAm de RANKL quando comparada à expressão de OPG, com pico após 2 a 3 semanas. Os autores concluíram que existe uma correlação entre o aumento da expressão de RANKL e das citocinas pró-inflamatórias e a expansão da lesão periapical. Chuang et al. (2012) investigaram a expressão de RANKL e OPG através de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em lesões periapicais induzidas em ratos após exposição pulpar ao LPS de *Escherichia coli* por até 8 semanas. Os autores empregaram também a análise radiográfica e histológica das lesões periapicais, análise imunohistoquímica para RANKL e OPG, e enzimática para atividade da fosfatase ácida resistente a tartarato (*tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP), marcador histoquímico de osteoclastos. Um aumento na expressão de RANKL foi observada após 3 semanas, atingindo seu pico após 8 semanas. Já a expressão de OPG foi inferior tanto à de RANKL quanto à do grupo controle nos períodos avaliados. Os autores concluem que a relação entre RANKL e OPG desempenhou um importante papel para o início de reabsorções ósseas periapicais, após estimulação com LPS. O papel do LPS na diferenciação osteoclástica foi

comprovado após observação de aumento na expressão gênica de RANKL, também denominado fator de diferenciação osteoclástica (*osteoclast differentiation factor*, ODF), presente na membrana de osteoblastos, após exposição ao LPS. Os autores comprovaram que esse aumento na expressão de RANKL/ODF em osteoblastos após tratamento com LPS ocorre via TLR, desempenhando um importante papel na patogênese das alterações ósseas mediadas por essa endotoxina, como em casos de periodontite apical (Kikuchi et al., 2001).

O aumento na expressão de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*) em processos inflamatórios pulpare já foi previamente relatada na literatura (Tokuda et al., 2001). IL-6 e TNF- α são citocinas associadas à reabsorção óssea, pois indiretamente participam da indução de diferenciação de osteoclastos em casos de periodontite apical, resultando em possível reabsorção radicular (Ohsaki et al., 1992). IL-8 atua como uma substância quimioatrativa e ativadora de diversos tipos celulares do sistema imunológico (Okada; Muhakami, 1998) e, juntamente com outras substâncias quimioatrativas, participa ativamente em patologias periapicais (Nair, 1997).

Zhang et al. (2013) relataram um aumento na expressão das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α em SCAPs após exposição a diferentes concentrações de LPS. Observaram que este processo ocorreu via TLR4, já que o pré-tratamento de SCAPs com um inibidor de TLR4 bloqueou a ação destas citocinas.

A exposição de SCAPs às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1- β promove uma inibição na mineralização e expressão de genes osteo/odontogênicos, após 14 dias (Liu et al., 2016). Entretanto, estas citocinas induziram a proliferação e mineralização em SCAPs após tratamento a curto prazo (até 5 dias). Estes achados ajudam a elucidar o impacto da inflamação no desenvolvimento dental (Liu et al., 2016). Outro estudo (Wang et al., 2013) avaliou a expressão das citocinas TNF- α e IL1- β em SCAPs após tratamento com LPS de *P. gingivalis* em diferentes concentrações (0,01, 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e observaram um aumento na produção das citocinas de maneira dose-dependente em relação à concentração de LPS, com resposta máxima em 10 $\mu\text{g/mL}$, após 24h. Estas citocinas desempenham um importante papel nos períodos iniciais de inflamação, estimulando a proliferação e liberação de outras citocinas envolvidas em processos reabsortivos (Coil et al., 2004). Ao quantificar TNF- α e IL1- β em tecido gengival, Rettori et al. (2012)

observaram um aumento significativo destas citocinas em grupos com periodontite, quando comparados ao controle.

MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein - 1*)/CCL-2 é uma quimiocina pertencente à família de citocinas quimioatrativas secretadas em resposta a outras citocinas, possuindo potente atividade quimiotática para o recrutamento de monócitos/macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Deshmane et al., 2009). CCL-2 já foi detectada tanto em quadros de pulpíte quanto em granulomas periapicais, e está associada à modulação do desenvolvimento de lesões periapicais (Caires et al., 2019). É produzida por diferentes tipos celulares de forma constitutiva, após indução de stress oxidativo, e pela ação de outras citocinas ou fatores de crescimento (Deshmane et al., 2009).

A expressão de IL1- β , TNF- α e RANKL foi observada em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, porém, tanto IL1- β quanto RANKL apresentaram uma redução na expressão após a descontaminação dos canais. Já CCL2/MCP-1, apesar da expressão detectada antes e após a descontaminação, não apresentou alterações em seus níveis nos períodos avaliados (de Brito et al., 2012). Bambirra et al. (2015) observaram diferentes resultados, com uma redução na expressão de RNAm de CCL-2, TNF- α e IL-8 após descontaminação de canais radiculares necróticos, quando comparados ao grupo controle, antes da descontaminação.

Meneses et al. (2020) observaram um aumento na produção de CCL-2 por SCAPs após exposição às concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 24h. Já a produção de IL-6 não foi alterada diante das mesmas condições experimentais, porém, a produção das duas citocinas ocorreu de maneira “prostaglandina-dependente”. Ao inibir a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) através do tratamento prévio de SCAPs com indometacina, observou-se uma redução na produção de IL-6 e CCL-2.

O estabelecimento da relação entre citocinas inflamatórias, antígenos bacterianos e células-tronco dentais é extremamente importante quando se busca o entendimento da resposta e modulação destas células diante de agressões teciduais, no microambiente do canal radicular.

Além das citocinas, outros componentes podem ser modulados por mediadores inflamatórios, como os fatores de crescimento. Diferentes fatores de crescimento envolvidos em processos de diferenciação osteogênica e formação óssea podem ser suprimidos em ambientes inflamatórios induzidos por LPS. BMP-4

e BMP-2, importantes fatores de crescimento expressos em áreas de desenvolvimento de tecidos mineralizados, são suprimidos em situações de necrose pulpar e instalação de processos inflamatórios induzidos por LPS (Böttcher et al., 2013; Huang et al., 2014a). A expressão de BMP-9, outro fator de crescimento envolvido na diferenciação osteogênica, também é suprimida em ambientes inflamatórios (Daigang et al., 2016). Huang et al. (2014b) demonstraram em estudo *in vivo* que citocinas como TNF- α e IL-1 β , presentes em ambientes pró-inflamatórios, inibem o fator de crescimento BMP-2, reduzindo a diferenciação osteogênica e ativando a osteoclastogênese.

Conclui-se que a liberação de diferentes substâncias em ambientes inflamatórios tem potencial para modular diferentes funções celulares (Widbiller et al., 2018).

Estas situações podem se instalar durante processos fisiológicos importantes, como a odontogênese e rizogênese, bem como ter relação direta com a interrupção da formação radicular. O estudo deste processo é de grande valia para o entendimento dos padrões fisiológicos de produção destas substâncias em situações de homeostasia, bem como em situações relacionadas a processos infecciosos/inflamatórios.

2.5 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE (ECS)

Durante a instalação e desenvolvimento de processos inflamatórios no organismo, diversos mediadores químicos são produzidos, conforme exposto previamente, incluindo derivados do ácido araquidônico, como eicosanóides e endocanabinóides (ECBs) (Rettori et al., 2012). Estes últimos representam uma classe de mensageiros neurais que são produzidos endogenamente pelo sistema nervoso e outros tecidos do corpo, após estímulos fisiológicos ou patológicos, e se ligam canonicamente a receptores acoplados à proteína G, denominados receptores canabinóides (CB) 1 e 2 (CB1 e CB2), nomeados de acordo com sua ordem de descoberta, que ocorreu em 1990 e 1993, respectivamente. Os endocanabinóides são classificados como neuromoduladores e neurotransmissores, ativando

principalmente CB1 e CB2, ou seja, são considerados agonistas para os receptores CB (Saito et al., 2010; Bari et al., 2011).

Estas substâncias foram identificadas após estudos iniciados na metade do século passado por Mechoulam (1970) envolvendo canabinóides, que representam um grupo de substâncias presentes na planta *Cannabis sativa*, a exemplo do Δ^9 -tetrahydrocannabinol, canabidiol, canabigerol e seus análogos sintéticos. Estudos sobre o perfil farmacológico dessas substâncias levaram à identificação de sítios específicos para sua ligação no cérebro, denominados receptores canabinóides, seguido pelo isolamento e identificação de substâncias sintetizadas endogenamente e que também ativavam esses mesmos sítios. Estes ligantes endógenos para os receptores canabinóides foram denominados canabinóides endógenos ou endocannabinóides (Devane et al., 1992; Saito et al., 2010).

As duas moléculas clássicas e mais estudadas de ECbs são a etanolamida araquidonoil, denominada Anandamida (AEA), do sânscrito *ananda* (felicidade) (Devane et al., 1992), e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) que atuam principalmente por meio de CB1 e CB2 (Mechoulam et al., 1995). 2-AG atua como agonista (ligante) para ambos, enquanto AEA apresenta atividade agonista parcial para CB1 e agonista fraco para CB2 (Kendall; Nicolaou, 2013). Existem outros endocannabinóides identificados, como dopamina N-araquidonoil (NADA), éter glicerol 2-araquidonoil (noladina) e etanolamina O-araquidonoil (virodamina) (De Petrocellis; Di Marzo, 2009). AEA e 2-AG atuam na modulação de diversas atividades celulares (Bari et al., 2011; Paria; Dey, 2000) e, juntamente com os receptores CB1, CB2 e todo o complexo enzimático relacionado à síntese e hidrólise dessas substâncias, constituem o chamado Sistema Endocanabinóide (*Endocannabinoid system*, ECS) (Bari et al., 2011).

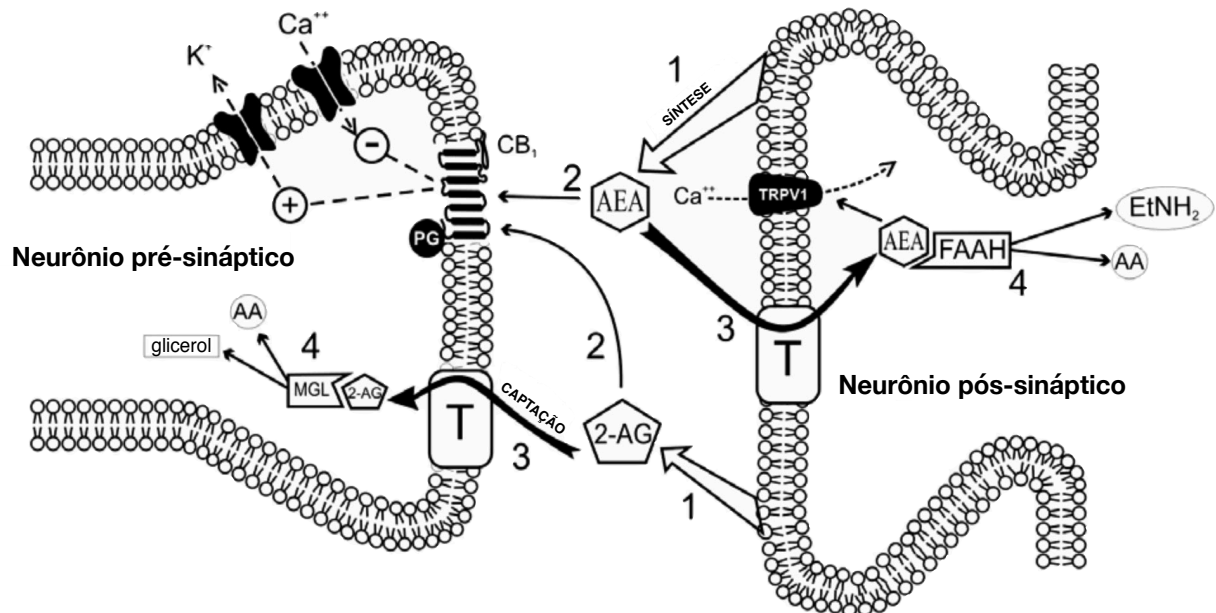
Dentre as características comuns aos ECbs estão: capacidade de ativar receptores canabinóides; ser produzido por neurônios de forma atividade-dependente e ser rapidamente eliminado após sua ação (Dinh et al. 2002).

Os neurotransmissores clássicos como acetilcolina, glutamato, dopamina ou serotonina apresentam sua síntese e liberação tipicamente da seguinte forma: são sintetizados em neurônios pré-sinápticos a partir de precursores específicos e armazenados em vesículas sinápticas; após influxo de cálcio, são liberados na fenda sináptica; exercem suas funções celulares e são então captados para o interior celular e degradados enzimaticamente (Burnstock, 2009).

Os endocanabinóides representam uma classe de mensageiros neurais que são sintetizados sob demanda, não são armazenados em vesículas sinápticas e são liberados inicialmente a partir de neurônios pós-sinápticos para terminais pré-sinápticos, ou seja, atuam de forma retrógrada (Figura 2.2). Após o influxo de cálcio no terminal pós sináptico ocorre a ativação de enzimas denominadas fosfolipases que realizam a síntese de ECbs a partir de fosfolipídeos. Fosfolipase D-específica N-acilfosfatidil etanolamina (NAPE-PDL) é a enzima que realiza a síntese de AEA, e diacilglicerol lipase (DAGL) é a enzima responsável pela síntese de 2-AG. Após sua produção e liberação, os efeitos dos ECbs serão limitados por um processo de 2 etapas, como nos neurotransmissores clássicos: internalização e catabolismo. A internalização representa o processo de “entrada” da substância na célula, a partir da fenda sináptica. Este processo ocorre passivamente por difusão ou por transportadores específicos de membrana (Beltramo et al., 1997). Após a internalização, os ECbs sofrem o processo de catabolismo através de hidrólise enzimática, originando ácido araquidônico (AA) e etanolamida (EtNH₂), a partir de AEA, e AA e glicerol, a partir de 2-AG. As enzimas envolvidas neste processo são a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL), respectivamente para AEA e 2-AG (Cravatt et al. 1996; Dinh et al., 2002). A sinalização retrógrada dos ECbs modula uma diversidade de funções cerebrais incluindo ansiedade, fome e humor (Piomelli, 2003), e funções celulares como proliferação, diferenciação e viabilidade, dependendo do microambiente celular em questão (Galve-Roperh et al., 2013).

No cérebro, 2-AG está presente em quantidades até 50 vezes maiores que AEA (Iversen, 2003). Logo, 2-AG atua como o principal endocanabinóide para CB1 no Sistema Nervoso Central (SNC) e desempenha um importante papel fisiológico em sítios específicos deste receptor (Que et al., 2017).

Figura 2.2 – Representação esquemática da produção, liberação e hidrólise dos ECbs



Fonte: Figura modificada de Saito et al. (2010).

CB1 é o receptor acoplado à proteína G mais abundante no SNC, sendo encontrado principalmente no cérebro e em tecidos nervosos, localizado em neurônios pré-sinápticos. Este receptor tem um importante papel durante a diferenciação osteogênica de MSCs, e posteriormente, na sobrevivência das células diferenciadas (Gowran et al., 2013). Já CB2 está localizado no Sistema nervoso periférico (SNP) e está predominantemente expresso em células do sistema imunológico como macrófagos, células B, natural killers, monócitos, neutrófilos e células T, e é raramente observado em tecido nervoso. Células imunes também expressam CB1, porém, em menor quantidade. Nestas células, ambos receptores exercem papel importante na modulação de citocinas (Howlett et al., 2002).

Por estar presente no sistema imunológico, CB2 tem seu papel criticamente relacionado à resposta do hospedeiro à infecção. Estudo avaliando a resposta à sepse em ratos knock-out (KO) para CB2, ou seja, ratos que não apresentam este receptor, observou-se uma taxa de sobrevivência menor e maior invasão bacteriana nestes animais, quando comparados a ratos do grupo controle. Os autores observaram maiores níveis de IL-6 após o procedimento cirúrgico em ratos KO e redução da função dos neutrófilos nestes animais (Tschöp et al., 2009).

Alguns ECbs, como AEA, podem ativar outros receptores além de CB1 e CB2, chamados receptores não-canabinóides, direta ou indiretamente, como o receptor de potencial transitório vanilóide (TRPV-1), considerado um canal iônico (Scutt; Williamson, 2007; Ruparel et al., 2011; Fernandes et al., 2012). Este receptor está presente tanto no SNC quanto no SNP, sendo ativado por calor ($>43^{\circ}\text{C}$), baixo pH, pela capsaicina, que é uma substância presente na pimenta malagueta, e por ECbs, em se tratando de SNP. Já no SNC, este receptor está expresso nos terminais nervosos pós-sinápticos e é ativado por ECbs, principalmente AEA, substância considerada, por este motivo, um endocanabinóide e endovanilóide (Ross, 2003).

TRPV-1 está expresso predominantemente em neurônios sensoriais de axônios amielínicos (fibras C) e axônios mielínicos finos (fibras $A\delta$), e também em células epiteliais, endoteliais, musculares, osteoclastos, fibroblastos, dentre outras (Pertwee et al., 2010). TRPV-1 está envolvido em diversas funções celulares, como formação e reabsorção óssea e transdução sensorial (Tsumura et al., 2012). Foi demonstrado em experimentos *in vitro* que TRPV-1 apresenta um papel fundamental na recaptção de AEA em células endoteliais, contribuindo para os efeitos deste endocanabinóide neste tipo celular. Os autores relatam que esta função de TRPV-1 ocorre de maneira cálcio independente (Hofmann et al., 2014). Há mecanismos de co-expressão e vias de intercomunicação entre CB1 e TRPV-1 que desempenham importante papel também na sensação dolorosa e analgesia (Evans et al., 2007). Ao tentar esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-hiperalgésicos do canabidiol (CBD) e seus receptores em modelo animal, Costa et al. (2004) utilizaram antagonistas de CB1, CB2 e TRPV-1 e avaliaram sua influência neste processo. Observou-se que antagonistas dos receptores canabinóides não promoveram reversão dos efeitos de CBD. Já o antagonista de TRPV-1, capsazepina (CPZ), promoveu reversão parcial quando utilizado em dose mínima (2mg/kg), e reversão total quando usado em dose máxima (10mg/kg). Os autores concluem que o efeito anti-hiperalgésico de CBD é mediado por TRPV-1, não envolvendo os receptores CB1 e CB2.

Segundo Di Marzo et al. (2001), a ativação de CB1 ou TRPV-1 por ECbs normalmente apresenta efeitos opostos em relação aos seus sinais intracelulares. Por exemplo, a ativação de CB1 promove a inibição dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, enquanto a estimulação de TRPV-1 leva ao influxo de Ca^{2+} nos

neurônios. Os autores enfatizam que o papel de AEA como endocanabinóide ou endovanilóide depende da atividade do transportador de membrana para esses ECbs, do local de produção dessas substâncias e do estado de fosforilação de cada receptor. AEA de origem extracelular ativaria primeiramente receptores CB1, e então seria transportada para o interior da célula, onde ativaria os receptores TRPV-1 (Di Marzo et al., 2001). Há ainda outros receptores potencialmente ativados por ECbs, como os receptores acoplados à proteína G (GPR55, GPR119), TRPV-4, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α e PPAR γ), e diferentes canais iônicos (Pertwee et al., 2010).

O ECS já foi caracterizado em células-tronco embrionárias (ESCs) de ratos, comprovando-se não somente a expressão gênica dos receptores e enzimas de síntese e hidrólise dos ECbs através de PCR quantitativo, mas também a quantificação protéica através de Western blot. Neste estudo, os autores não observaram influência do ECS na expressão de genes relacionados à diferenciação celular (Bari et al., 2011). Diferentemente, alguns autores (Jiang et al., 2007) demonstraram que a ativação de receptores canabinóides em ESCs mostrou-se importante tanto para a sobrevivência celular quanto para a diferenciação celular. Ao investigar o papel de ECbs nas atividades de MSCs e BMSCs *in vitro*, Scutt e Williamson (2007) não observaram expressão significativa de CB1 e CB2 em MSCs, somente em BMSCs. O tratamento de MSCs com 2-AG não promoveu alterações no número celular e produção de colágeno, já em BMSCs ocorreu um aumento nestes dois parâmetros. Os autores sugerem, a partir destes dados, que MSCs não representam células-alvo para ECbs, mas que podem ser influenciadas indiretamente por esse sistema.

Diferentes estudos demonstram que ECbs liberados a partir da ativação celular por mecanismos de imunidade inata tem potencial para modular o fenótipo e função de algumas células indiferenciadas através da expressão de seus receptores e sinalização celular (Di Marzo et al., 2001; Gowran et al., 2013; Mechoulam et al., 2014; Köse et al., 2018). Células-tronco embrionárias expressam componentes do ECS, como os receptores CB1 e CB2 e enzimas responsáveis pelo metabolismo dos ECbs (Bari et al., 2011). Células-tronco mesenquimais apresentam aumento de expressão de CB1 ao longo da diferenciação celular osteogênica, desempenhando papel na sobrevivência celular em condição de deprivação nutricional (Gowran et al., 2013). Estes achados sugerem que o ECS possa modular eventos moleculares em

células-tronco mesenquimais, e essa atividade biológica está diretamente relacionada ao tipo celular e seu microambiente (Bari et al., 2011).

ECbs e seus receptores também parecem estar envolvidos em processos de osteoclastogênese, sendo que CB1 e CB2 desempenham papéis distintos na regulação e *turn over* de massa óssea. A inativação de CB1 determina alterações na diferenciação de osteoclastos, relacionada à redução na sensibilidade dos precursores ao RANKL ou à redução de sua expressão em osteoblastos (Galve-Roperh et al., 2013). Esta capacidade de modulação da expressão gênica de RANKL via receptor CB1 em osteoblastos em modelo animal (*in vitro*) foi também comprovada por Idris et al. (2008). O papel de CB2 na regulação do metabolismo ósseo permanece em discussão, existindo evidências de que este receptor participe da regulação da formação osteoclástica e reabsorção *in vitro*. Observou-se um aumento na atividade de M-CSF e na diferenciação osteoclástica mediada por RANKL após ativação de CB2, assim como uma inibição na formação osteoclástica após utilização de antagonista de CB2 (Idris et al., 2009).

Takita et al. (2007) demonstraram o papel da capsaicina, agonista para TRPV-1, na regulação da osteoclastogênese. Os autores observaram supressão na expressão de RANKL e redução de IL-1 após tratamento de co-culturas de osteoblastos e de células de medula óssea com capsaicina, sugerindo o potencial uso clínico desta substância em doenças ósseas envolvendo processos reabsortivos induzidos por citocinas. IL-1 é uma citocina produzida em processos inflamatórios, e está diretamente relacionada à reabsorção óssea.

Os ECbs podem também apresentar um papel modulador nas células do sistema imunológico, segundo estudos (De Petrocellis; Di Marzo 2009). O seu papel neuroprotetor estaria associado à ativação de CB1 (Eljaschewitsch et al., 2006), enquanto a neurotoxicidade estaria associada à ativação de TRPV-1 (Kim et al., 2005).

Maccarrone et al. (2000) relataram a influência de AEA na indução de apoptose em células humanas de neuroblastoma e de linfoma, avaliada pela formação de corpos apoptóticos e fragmentação de DNA. Os autores observaram que este efeito apoptótico ocorre via receptor vanilóide, e não via receptor canabinóide, uma vez que a utilização de um antagonista para o receptor vanilóide bloqueou este efeito induzido por AEA. O mesmo efeito apoptótico não foi observado quando as células foram tratadas com 2-AG. Os autores concluem que os receptores canabinóides apresentam um papel protetor contra a apoptose, mas esta

apoptose pode ser induzida por AEA via receptor vanilóide. Kim et al. (2005) observaram resultados diversos nesta questão, atestando não somente uma atividade neurotóxica de TRPV-1, mas também de CB1, em cultura de neurônios dopaminérgicos. Os autores observaram que os receptores CB1 podem contribuir, pelo menos em parte, para a morte celular neuronal, ao contrário de outros estudos. Isto ocorre principalmente pela co-expressão de ambos receptores na cultura celular utilizada, levando a uma interação funcional dos mesmos após ativação de cada um separadamente.

Neste contexto em que a maioria dos estudos analisam o papel neuroprotetor dos ECbs separadamente, há poucos estudos avaliando seus efeitos sinérgicos e de cooperação. Um dos poucos estudos avaliando esta interrelação foi realizado em modelo animal de isquemia cerebral focal, e observou que o pré-tratamento da área com eletro-acupuntura promoveu um aumento na produção de AEA e 2-AG e que estas substâncias exerceram efeitos protetores contra a isquemia cerebral transitória, via CB1 (Wang et al., 2009).

Como já foi exposto anteriormente, os ECbs exercem efeitos complexos na atividade de diferentes tipos celulares, influenciando, inclusive, a sua resposta inflamatória diante de diferentes agressões (Berdyshev et al., 1997). Em relação à influência de ECbs na produção de citocinas inflamatórias, observou-se que 2-AG inibe a produção de TNF- α por macrófagos de ratos, camundongos e humanos, *in vitro*, após exposição ao LPS (Zheng et al., 1992; Gallily et al., 2000; Facchinetti et al., 2003). AEA promoveu redução na produção de TNF- α , IL-6 e IL-8 em células sanguíneas mononucleares estimuladas com LPS por 24h, quando comparadas ao grupo controle (sem AEA). Os autores relatam que a concentração de AEA necessária para a redução da produção de TNF- α foi de 3 μ M, porém, concentrações mais baixas (0,003 μ M e 0,03 μ M) foram suficientes para reduzir os níveis de IL-6 e IL-8 (Berdyshev et al., 1997).

Os ECbs desempenham um importante papel em diferentes funções celulares, dentre elas, a migração. As terapias regenerativas em tecidos de origem mesenquimal dependem, entre outros fatores, do potencial migratório de suas células-tronco. Estes efeitos são pronunciados quando inibidores de FAAH, enzima que catalisa a degradação de ECbs, são utilizados (Wollank et al., 2015). Coletivamente, o efeito dos receptores de ECbs variam significativamente entre os diferentes tipos de células mesenquimais (de Brito et al., 2012), e a modulação deste

sistema pode representar um potencial terapêutico em diversas doenças humanas (Pacher; Kunos, 2013).

2.5.1 Caracterização do ECS em Células Dentais

Diversos estudos vem sendo desenvolvidos para analisar a presença e função de componentes do ECS em células dentais, em diferentes cenários. Que et al. (2017) relataram a expressão de CB1 em odontoblastos humanos. Os autores utilizaram imunohistoquímica e imunofluorescência para avaliar a localização destes receptores na estrutura pulpar. PCR quantitativo e Western blot foram realizados para confirmar a expressão gênica e proteica de CB1. Os autores demonstraram que o aumento na intensidade da fluorescência induzida por 2-AG foi sensível ao antagonista específico para CB1, ao invés do antagonista para CB2, indicando que odontoblastos expressaram receptores CB1 ao invés de CB2.

A expressão e função de TRPV-1 em células de ligamento periodontal humano foi relatada em estudo utilizando capsaicina e capsazepina, agonista e antagonista de TRPV-1, respectivamente. Após constatação de expressão de TRPV-1 através de Western blot, as células foram tratadas com capsaicina, para ativação do receptor. Esta ativação de TRPV-1 induziu a expressão de OPG de maneira dose-dependente, sem afetar a expressão de RANKL, observadas através de qPCR, ELISA e Western blot. A utilização de CPZ aboliu os efeitos da capsaicina na expressão de OPG, demonstrando que estes efeitos foram dependentes de TRPV-1, e que a capsaicina apresenta um efeito protetor da arquitetura óssea (Sooampon et al., 2013a). Posteriormente, os mesmos autores investigaram a relação de TRPV-1 ativado pelo calor em células de ligamento peridontal humano quanto à expressão de marcadores inflamatórios e de osteoclastogênese, já que este receptor é conhecidamente termo-sensitivo. As células foram submetidas a temperaturas de 45°C e a expressão e produção de OPG, RANKL, TNF- α e IL-1 β foram determinadas através de ELISA, Western blot e qPCR. Os autores observaram que, em contraste com o estudo anterior, neste estudo não houve alteração na expressão de OPG ou RANKL. Ocorreu aumento apenas na expressão de TNF- α mediada por TRPV-1, previamente ativado pelo calor. Os autores concluem que TRPV-1 desempenha múltiplos papéis em células de ligamento peridontal, dependendo do estímulo (Sooampon et al., 2013b). Tsumura et al. (2012) demonstraram a

expressão e ativação de CB1 e TRPV-1 em odontoblastos de polpa dental de ratos, porém não observaram a presença de CB2. Os autores demonstraram um mecanismo de *cross-talk* entre CB1 e TRPV-1 com importante papel na regulação da proteção e sensibilidade pulpar diante de estímulos externos. Além dessas funções como moduladores de nocicepção e inflamação, há evidências crescentes dos efeitos de CB1 e TRPV-1 na regeneração tecidual (Miyashita et al., 2012). Estes mesmos pesquisadores demonstraram a presença de CB1 e TRPV-1 em células de polpa dental e ainda o papel destes receptores na síntese de metaloproteinase-2 (MMP-2) induzida por AEA (Miyashita et al., 2012). Neste estudo observou-se que os níveis de MMP-2 induzidos por AEA (10 µM/L) começaram a aumentar após 24h de exposição das células, e após 72h alcançaram níveis semelhantes ao controle positivo. Utilizando antagonistas para CB1, CB2 e TRPV-1, os autores puderam determinar que este efeito ocorria via CB1 e TRPV-1 e não via CB2, já que a utilização de antagonista para este último receptor não alterou a produção de MMP-2. Metaloproteinases são substâncias capazes de degradar os componentes da matriz extracelular e desempenham importante papel em diversas doenças inflamatórias. Somsak et al. (2012) também relataram a expressão de CB1 em polpa de ratos, descrevendo-a através de imunohistoquímica, tanto na polpa coronária quanto radicular. Os autores observaram a presença destes receptores no plexo subodontoblástico e na zona rica em células, concluindo que, possivelmente, desempenhariam um papel importante na modulação da dor envolvendo o tecido pulpar.

Nikolaeva et al. (2015) demonstraram o efeito protetor do receptor CB2 em modelo de periodontite apical experimentalmente induzida em camundongos. Os autores observaram maior densidade óssea em animais KO para CB2 quando comparados a camundongos controle, associada ao menor tamanho das lesões periapicais observadas após exposição pulpar. Em outro estudo, a ativação de CB2 em células de ligamento periodontal resultou em aumento na expressão de fatores relacionados à diferenciação osteogênica e de mineralização *in vitro*, desempenhando um importante papel no metabolismo do osso alveolar. Os autores concluem que a ativação de CB2 em células do ligamento periodontal poderia inibir a atividade osteoclástica, potencialmente criando um ambiente favorável à osteogênese (Qian et al., 2010).

TRPV-1 tem sido relacionado à modulação de reabsorção óssea em modelos de periodontite, via peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), inibindo a osteoclastogênese *in vitro*. Um estudo observou que camundongos KO para TRPV-1 apresentaram severa perda óssea, em modelo experimental de periodontite. Sugere-se, a partir deste estudo, que a sinalização neuronal de TRPV-1 em tecido periodontal é crucial para a regulação da osteoclastogênese via neuropeptídeo CGRP (Takahashi et al., 2016). Kobayashi et al. (2012) observaram que a capsaicina (agonista de TRPV-1) apresenta um papel inibidor da atividade reabsortiva de osteoclastos, induzida por LPS. A capsaicina inibiu a produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂) em osteoblastos e BMSCs de ratos estimulados com LPS *in vitro*, inibindo também a formação osteoclástica e, conseqüentemente, a reabsorção óssea *in vivo*. Observou-se que a capsaicina inibe a produção de PGE através da inibição da expressão gênica de cicloxigenase-2 (COX-2) e de Prostaglandina E sintase (mPGES-1). O tratamento com LPS induziu a perda óssea inflamatória neste modelo experimental animal e a capsaicina promoveu a restauração da perda induzida por LPS. Os autores concluem que ligantes de TRPV-1, como a capsaicina, podem ser potencialmente úteis como drogas clínicas que tenham como alvo doenças ósseas associadas à reabsorção inflamatória. Além disso, Takita et al. (2007) observaram que TRPV-1 e capsaicina suprimiram a indução de diferenciação osteoclástica em co-culturas de células-tronco de medula óssea e osteoblastos em modelo animal após tratamento com IL-1. A expressão de RANKL, importante para a formação osteoclástica, foi suprimida por capsaicina. Os autores concluíram que a capsaicina pode modular a diferenciação osteoclástica através da supressão na expressão de RANKL. Diferentemente, em estudo recente, Ossola et al. (2019) demonstraram que o bloqueio de TRPV-1 com capsazepina (CPZ) preveniu a perda óssea alveolar em molares de ratos. Os autores relatam que os mediadores inflamatórios (TNF- α e PGE) cujo aumento foi induzido por LPS em periodontite experimental, apresentaram seus níveis reduzidos em tecido gengival de ratos após tratamento com CPZ. Em contraste, a utilização de antagonistas para CB1 e CB2 promoveu uma exacerbação da perda óssea alveolar e dos mediadores inflamatórios neste mesmo modelo, após tratamento com LPS. O bloqueio de TRPV-1, mas não de CB1 e CB2, atenuou o dano periodontal em ratos com periodontite experimental, devido à redução da inflamação local. Os autores concluem que receptores canabinóides específicos promovem efeitos anti-inflamatórios e

protetores em tecidos periodontais, enquanto TRPV-1 está envolvido em efeitos pró-inflamatórios, causando danos ao tecido periodontal.

ECbs estão associados a múltiplas funções reguladoras em diversos tecidos e já foram detectados em fluido gengival de pacientes com periodontite. CB1 e CB2 estão expressos em fibroblastos gengivais humanos e apresentam sua expressão aumentada em condições patológicas (Nakajima et al., 2006). Em estudo para avaliar o papel de AEA e 2-AG na proliferação de células do ligamento periodontal, bem como na produção das citocinas IL-6, IL-8 e MCP-1, observou-se que não houve alteração na proliferação celular, independentemente da concentração de ECbs, na ausência de LPS. Já na presença da endotoxina, os autores observaram um aumento na proliferação celular quando AEA foi utilizada (10-20 μ M). Em relação à produção de citocinas, na ausência de LPS, observou-se que 2-AG (10 μ M) promoveu aumento na expressão de IL-6, mas o mesmo não foi observado na concentração de 1 μ M. Para IL-8 e MCP-1 não houve alterações, independentemente da concentração de 2-AG. O tratamento com AEA (1 e 10 μ M) não promoveu alteração na produção de nenhuma das citocinas; já na presença de LPS, observou-se significativa redução de IL-6, IL-8 e MCP-1 quando AEA (10 μ M) foi utilizada. 2-AG (10 μ M), por outro lado, induziu significativo aumento na expressão das mesmas citocinas, na presença de LPS. Estes achados demonstram que os ECbs não são capazes de induzir uma resposta pró-inflamatória de maneira independente, mas podem regular algumas vias de sinalização pró-inflamatória em células de ligamento periodontal e modular a sua resposta. Os autores concluem que AEA possui efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores na presença de LPS, enquanto 2-AG parece contribuir para o processo inflamatório (Özdemir et al., 2014).

Outro estudo apresentou resultados semelhantes em relação à redução na produção de IL-6, IL-8 e MCP-1 por fibroblastos gengivais humanos após tratamento com LPS e AEA. Os autores observaram que estes efeitos foram atenuados quando antagonistas de CB1 e CB2 foram utilizados (Nakajima et al., 2006). Os achados de Abidi et al. (2018) corroboram os dados anteriores ao analisarem o papel de AEA na produção de citocinas pró-inflamatórias por células de ligamento periodontal humano após estimulação com LPS, TNF- α ou IL-1 β . Os autores observaram que AEA pode exibir um perfil anti-inflamatório neste ambiente, enquanto em células de ligamento periodontal sem estimulação, pode exibir um perfil pró-inflamatório. A inibição eficaz de IL-8 e MCP-1 por ligantes de CB2 demonstra que o ECS pode ser alvo para o

desenvolvimento de novas drogas destinadas ao tratamento de inflamação crônica em doenças periodontais.

Este papel protetor de ECbs na progressão da periodontite apical foi confirmado por Ossola et al. (2012), utilizando a Metanandamida (Meth-AEA, 500ng/mL), um análogo sintético de AEA, aplicada diariamente no tecido gengival de ratos com periodontite apical induzida. Observaram que este tratamento reduziu a produção de mediadores biológicos associados à doença periodontal e que encontram-se aumentados pelo LPS, como TNF- α e óxido nítrico. Os autores concluem que o tratamento com Meth-AEA demonstrou resultados positivos no tecido gengival de ratos com periodontite. Outro estudo, avaliando o papel desta mesma substância em células de ligamento periodontal humano, observou que Meth-AEA (10 μ M) reduziu significativamente a produção de IL-6, IL-8 e MCP-1 induzidas por LPS, sem afetar a proliferação/viabilidade celular. Os autores concluem que a resposta inflamatória das células do ligamento periodontal pode ser influenciada pela ativação do ECS, que estaria potencialmente envolvido na progressão da doença periodontal (Zhang et al., 2020). Outro estudo, utilizando AEA em modelo animal de ratos, observou resultados semelhantes aos obtidos com a Meth-AEA em relação à inibição de mediadores inflamatórios (Rettori et al., 2012).

Conforme exposto, o ECS já foi previamente caracterizado em diferentes tipos celulares, bem como o seu papel modulador de diferentes funções celulares em condições fisiológicas e patológicas. Todavia, não existem dados na literatura que relacionem a produção destas moléculas moduladoras do ECS com células de papila apical, perante estímulos pró-inflamatórios ou em situações fisiológicas.

3 PROPOSIÇÃO

A literatura traz evidências acerca do potencial de mediadores inflamatórios, como lipídeos bioativos, em modular funções de células indiferenciadas de sítios distintos, de forma que possam resultar em importantes alterações em seu fenótipo e função. Este efeito, porém, parece variar de forma significativa entre células mesenquimais de diferentes tecidos (Bari et al., 2011; Ossola et al., 2012; Raicevic et al., 2012; Ossola et al., 2019). O conhecimento das características celulares de SCAPs, bem como suas respostas a diferentes antígenos, como o LPS, e mediadores químicos é essencial do ponto de vista científico para o estabelecimento de terapias endodônticas regenerativas, envolvendo dentes com rizogênese incompleta. Todavia, a relação entre os eventos moleculares relacionados à necrose pulpar e a interrupção da rizogênese ainda não foi explorada, nem tampouco os mecanismos envolvidos nas funções celulares após procedimentos regenerativos. O conhecimento destes processos é essencial para o progresso clínico-científico das terapias regenerativas empregadas pela Endodontia atual. A presença de componentes do ECS, sintetizados durante processos inflamatórios, ainda não foi demonstrada em SCAPs, tampouco o seu eventual papel na modulação fenotípica e funcional destas células.

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença do ECS e sua influência na modulação de funções de SCAPs *in vitro*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o papel do LPS na viabilidade, diferenciação e produção de proteínas e citocinas inflamatórias em SCAPs *in vitro*;

Analisar a expressão gênica de componentes do ECS em SCAPs *in vitro*;

Avaliar o papel de endocanabinóides na viabilidade e diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs *in vitro*;

Avaliar o papel de endocanabinóides na produção de citocinas após ativação de SCAPs com LPS *in vitro*;

Avaliar o papel de endocanabinóides na expressão gênica de fatores osteogênicos, dentinogênicos e cementogênicos em SCAPs *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A execução dos experimentos *in vitro* foi dividida em quatro fases. Na fase 1 as SCAPs foram obtidas, isoladas e caracterizadas. Na fase 2 foi estudado o papel do LPS sobre as seguintes funções destas células: viabilidade, diferenciação e produção de citocinas. Na fase 3 foi realizada a detecção da expressão gênica dos componentes do Sistema Endocanabinóide e de TRPV1 nas células de papila apical. Na fase 4 foram realizados ensaios funcionais para avaliar o papel do ECS nas funções celulares de SCAPs através da utilização de ECbs exógenos e bloqueio farmacológico de TRPV1. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica.

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Parecer nº 2.523.020, CAAE:70904617.6.0000.0075) (Anexo A).

4.1 FASE 1

4.1.1 Obtenção das Células da Papila Apical (SCAPs)

Papilas apicais foram obtidas a partir de terceiros molares hígidos com rizogênese incompleta, extraídos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), por motivos alheios à pesquisa. Os elementos dentais foram doados por 3 pacientes saudáveis, ou seja, sem alterações sistêmicas, após a assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido.

Após a exodontia, os dentes foram imediatamente acondicionados em tubos de centrífuga contendo *α-Modified Eagle Medium* (α -MEM) (Gibco/Life Technologies, NY, EUA) 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), denominado meio de proliferação (MP), e mantidos em isopor contendo gelo até a chegada ao laboratório de cultura celular. Na sequência, os dentes foram colocados em placas de Petri e delicadamente lavados com o próprio meio de cultura para remoção do excesso de sangue. O

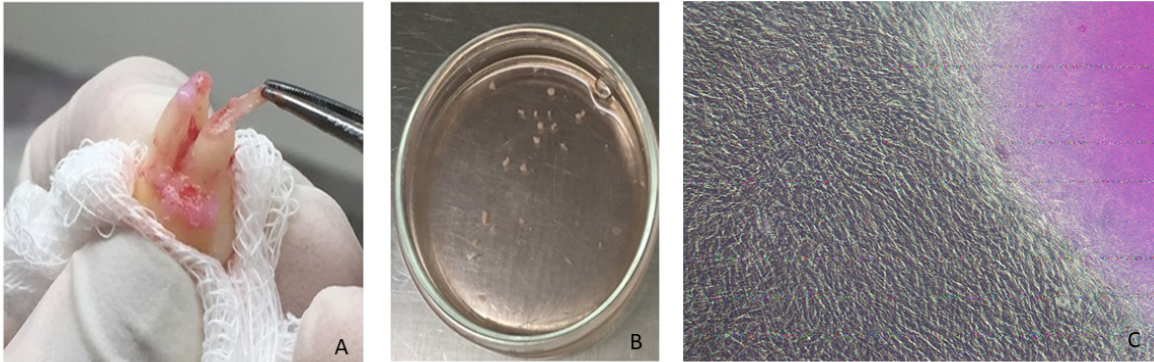
ligamento periodontal foi gentilmente removido da superfície radicular com o auxílio de uma cureta periodontal. A papila apical foi delicadamente destacada da porção radicular apical com o auxílio de uma cureta de dentina (Figura 4.1). O tecido foi fragmentado com o auxílio de uma lâmina de bisturi n^o. 15 em porções menores que 1mm e dispostas em placas do tipo Petri (Corning Inc., NY, EUA), às quais foram adicionados os seguintes antibióticos: Gentamicina (100 µM); Anfotericina B (100 µM) e Penicilina (300 µM). As placas foram levadas à incubadora por 30-40 minutos (37^o, 5% CO₂), e, posteriormente, o conteúdo de cada placa foi inserido em tubos plásticos (15mL) e levados à centrifuga por 5 minutos a 800 x g (1180 rpm), à temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi descartado, e ao conteúdo celular restante foram adicionados 800 µL de MP. O conteúdo foi então acondicionado em garrafas para cultura celular de 25 cm² devidamente identificadas com as iniciais do paciente, data e passagem celular, denominada “primária” neste caso, pois tratava-se do tecido original utilizado para a obtenção das células. As garrafas foram mantidas em incubadora a 37^oC em atmosfera com 5% de CO₂, para que as células começassem a emigrar dos explantes para o fundo das garrafas (Figura 4.1). O meio de cultura foi renovado diariamente durante 7 dias (800 µL), e após esse período a quantidade adicionada a cada troca foi de 1000 µL a cada 2 dias, até que se observasse o início do desprendimento celular do tecido, seguido de proliferação celular no fundo das garrafas. Quando era observada a presença de células cobrindo cerca de 80% da superfície do fundo da garrafa, situação denominada confluência, as células eram transferidas para novas garrafas no processo denominado repicagem ou subcultivo.

Repicagem/subcultivo

Este processo visa aumentar a área para o cultivo celular e, conseqüentemente, o número de células. Dessa forma, é realizada a transferência do conteúdo celular de 1 garrafa de cultura para várias garrafas, aguardando-se a nova confluência para que se possa aumentar sucessivamente o número de células de determinada cultura. A cada processo de repicagem as células tornam-se menos jovens, devendo ser adicionado um número à sua passagem celular. Como exemplo, as células denominadas “primárias” que se destacaram do tecido original (papila apical), após a primeira repicagem passam a ser denominadas “passagem 1” (P1), e assim

sucessivamente. Para este processo, inicialmente remove-se todo o meio de cultura das garrafas e adicionam-se às mesmas 1000 µL de Solução Tampão de fosfato (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) 1x estéril (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para remoção de todo o meio de cultura, o qual deve ser aspirado em seguida. Adiciona-se então 1000µL de Trypsin-EDTA 0,25% 1X (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) a cada garrafa para promover a dissociação das adesões celulares e o desprendimento das mesmas do fundo das garrafas. Após 5 minutos deve-se adicionar MP equivalente ao dobro da quantidade de tripsina utilizada. Transfere-se a quantidade de cada garrafa para um tubo de centrifuga (50mL) devidamente identificado com as iniciais do paciente e passagem celular (P1) e centrifuga-se por 5 minutos, 800 x g (1180 rpm), TA. O sobrenadante é descartado e deve-se adicionar 1000µL de MP ao conteúdo do tubo realizando movimentos para homogeneização de todo o conteúdo com a pipeta. O conteúdo do tubo é transferido para 2 garrafas de 25 cm², contendo aproximadamente 2-3 mL de meio em cada garrafa neste primeiro dia, e nas próximas trocas de meio é adicionada a quantidade padronizada de 6mL para cada garrafa. Quando as 2 garrafas atingiram a confluência de 80%, as células foram repicadas novamente e passadas para 3 garrafas de 75 cm² contendo de 6-8 mL de meio de cultura no primeiro dia, e nas trocas seguintes era adicionado o volume padronizado de 12mL de MP por garrafa, até que se observasse nova confluência. Todos os procedimentos de cultura celular desta fase da pesquisa foram realizados no Laboratório de Pesquisas Básicas “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da FOU SP.

Figura 4.1 - Células de papila apical (SCAPs) obtidas a partir de cultura primária com a técnica de explante



Fonte: a autora.

Legenda: A: Papila apical sendo removida da raiz dentária; B: Papila fragmentada na Placa de Petri; C: Células que migraram do explante para o fundo da placa. Imagem capturada em microscópio óptico com contraste de fases em aumento de 100X.

4.1.2 Caracterização Fenotípica de SCAPs

A caracterização do fenótipo celular foi realizada por meio de imunomarcção e detecção por citometria de fluxo. Suspensões celulares foram obtidas por descolamento das células com solução enzimática não mamífera (Accutase, Gibco). Após lavagem com PBS + SBF, as células foram incubadas por 30 min com o tampão de bloqueio PBS e SBF 0,01%. Em seguida, suspensões de 1×10^5 células foram incubadas por uma hora a 4°C com anticorpos conjugados a fluoróforos a uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução de paraformaldeído a 4% por 10 min. A expressão dos antígenos de superfície foi avaliada por Citometria de Fluxo utilizando-se o equipamento FACScalibur (Becton, Dickinson and Co., San Jose, EUA) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP).

Para as marcações, foram utilizados anticorpos anti-CD146 conjugado a ficoeritina (PE) (Cat. FAB932P – R&D Systems), anti-CD24 conjugado a alofococianina (APC) (Cat. FAB5247A – R&D Systems) e anti-STRO-1 (MAB1038-SP) sendo este seguido de anticorpo secundário Goat anti-Mouse-IgM conjugado a PE – F0116 – R&D Systems). Também foi realizada marcação para CD45 (Cat. FAB1430P) e CD34 (Cat. FAB7227P, R&D Systems) sendo que para estes antígenos esperava-se marcação inferior a 2%. Como isotipos controles foram

usados Mouse IgG1-PE (Cat. IC002P – R&D Systems) correspondente a CD146, CD45 e CD34 e Mouse IgG2A-APC (Cat. IC003A – R&D Systems), correspondente a CD24 (8, 58).

4.1.3 Caracterização Funcional de SCAPs - *Diferenciação celular*

A capacidade de diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs foi investigada *in vitro*, conforme estudos prévios da literatura (Sonoyama et al., 2008; Bakopoulou et al, 2013), utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina S a 2% (pH 4,2) (Sigma-Aldrich) para verificação da formação de nódulos mineralizados.

As células foram semeadas em placas de 48-poços (2×10^4 células/poço) com MP e deixadas por 24h para adesão celular. Após 24h o meio foi substituído por meio de Diferenciação (MD) ou MP. MD equivale a MP acrescido de 10 nmol/L de dexametasona (Invitrogen), 10 mmol/L de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e 10 nmol/L de 1,25 dihidroxivitamina D_3 (Sigma-Aldrich) (Bose et al., 2009). O meio de cada poço foi renovado a cada 2 dias durante 14 dias.

Após o período de indução (14 dias), os poços foram lavados com PBS 1X gelado (500 μL por poço), fixados com formaldeído a 10% em água destilada (500 μL por poço), e reidratados em água destilada. A coloração vermelho de alizarina foi preparada utilizando 2g de Vermelho de alizarina diluído em 100mL de água destilada aquecida ($\sim 45^\circ\text{C}$), pH ajustado entre 4.1-4.3. A solução foi filtrada antes de ser adicionada a cada poço, na quantidade de 500 μL /poço, e deixada por 30 minutos à TA. Os poços foram então lavados 3 vezes com água destilada para a remoção do excesso de corante não ligado, e deixadas para secar à TA. Foi realizada a digitalização (fotografia) da imagem dos poços utilizando microscópio invertido. A densitometria semi-analítica de cálcio foi realizada após a adição de 500 μL de hidróxido de amônio a 10% a cada poço, e transferência de 200 μL de cada poço para uma nova placa de 96 poços. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro (Biotek) utilizando o filtro de 405 nm. O cálculo da deposição de cálcio foi realizado através da normalização de todos os grupos com o grupo controle (MP).

4.2 FASE 2

4.2.1 Viabilidade Celular – Estímulo com LPS

A fim de mimetizar um ambiente inflamatório/infeccioso correspondente às situações de necrose pulpar e contaminação, utilizamos o LPS de *Escherichia coli* para avaliação de alterações nas funções básicas de SCAPs diante deste antígeno bacteriano. O efeito desta endotoxina sobre a viabilidade de SCAPs e sua citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaio empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Molecular Probes, Life Technologies), conforme descrito por estudos prévios de nosso grupo (Sipert et al., 2013). Tal método se baseia na capacidade das células viáveis converterem o composto hidrossolúvel MTT (coloração rosa) em um produto insolúvel em água, denominado formazan (coloração roxa). Esta conversão é realizada através da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, obtendo-se como produto final os cristais de formazan. A quantificação de formazan é detectada pela leitura da absorbância.

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 8×10^3 células por poço. O estímulo com LPS (Ultrapure *Escherichia coli* LPS, Cat. LPS-EB, Invivogen, San Diego, EUA) foi realizado nas concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Como controle, foi utilizado o respectivo meio de cultura MP ou MD. As células foram analisadas após 1, 3, 5, 7 e 14 dias, sendo que para os dois últimos períodos foram realizadas trocas de meio a cada 48 h, e para os 2 primeiros períodos não foi realizada troca de meio, após a adição do estímulo.

Após os períodos de incubação, o meio de cultura de cada poço foi aspirado e foi adicionada a quantidade de 10 μL da solução de MTT (5mg/mL em PBS) e 180 μL de MP a cada poço da placa, totalizando 200 μL por poço. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e protegidas da luz por quatro horas. Em seguida, todo o meio foi aspirado e descartado, e imediatamente foram adicionados 100 μL de DMSO a cada poço para dissolver os cristais de formazan resultantes da redução do sal de MTT. Para facilitar a dissolução dos cristais, a placa foi incubada em mesa agitadora por 20 minutos e então a leitura da absorbância foi realizada, utilizando um espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA), no comprimento de onda de 570nm.

4.2.2 Diferenciação Celular – Estímulo com LPS

A capacidade de diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs após estímulo com LPS foi investigada *in vitro*, utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina S, conforme descrição anterior (Fase 1, 4.1.3).

Diferenciação Osteo/odontogênica

Células foram semeadas em placas de 24 poços (10^4 células/cm²) com MP e deixadas por 24h para adesão. Em seguida, o meio foi substituído por MP ou MD, contendo os estímulos (LPS 0.1, 1 e 10 µg/mL), e renovado a cada 48 horas. Após 14 dias, a deposição de cálcio foi detectada através de ensaio vermelho de alizarina S a 2% (pH 4,2) (Sigma-Aldrich).

4.2.3 Detecção de Produção *in vitro* de MCP-1/CCL2 e OPG – Estímulo com LPS

Para este experimento, SCAPs foram estimuladas com diferentes concentrações de LPS (0,1; 1 e 10 µg/mL) diluídos em MP, nos períodos de 1 e 24 horas. Após estes períodos experimentais, o sobrenadante celular foi coletado de cada poço, acondicionado em tubos de microcentrifuga (1mL), centrifugado a 4°C, 1000 x g por 5 minutos, transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. As concentrações de MCP-1/CCL2 e OPG produzidas pelas células foram obtidas por ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Placas de 96 poços (Corning Incorporated, EUA) foram recobertas com anticorpos de captura para MCP-1/CCL-2 (DY279, R&D Systems, Minneapolis, USA) ou OPG (GY805, R&D Systems, Minneapolis, USA) por 15 a 18 horas à TA em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram submetidas ao primeiro ciclo de três lavagens sucessivas com PBS contendo 0,5% de Tween 20 (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram incubadas por 2 horas à TA com 100 µL de solução de bloqueio, composta por PBS contendo e albumina sérica bovina a 1% (BSA). Um novo ciclo de lavagens foi realizado, e imediatamente após, as amostras foram adicionadas a cada poço seguindo um *template* previamente desenhado. As

concentrações conhecidas da proteína padrão (recombinante) de cada alvo foram inseridas na primeira fileira (vertical) de poços em diluição seriada de 1/2 para a confecção da curva padrão de diluição. Amostras e curva padrão foram incubadas por 2 horas à TA. O terceiro ciclo de lavagens foi realizado e as placas foram incubadas com o anticorpo biotinizado diluído em PBS BSA 1% por 2 horas protegidas da luz. Novamente as placas foram lavadas, e incubadas com uma solução de PBS 1% e estreptavidina (R&D Systems, Minnesota, EUA) na proporção de 1:200 ou 1:40, de acordo com orientações do fabricante, por 20 minutos em TA protegidas da luz. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram incubadas com o substrato tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) por até 30 minutos. A reação colorimétrica resultante da adição do substrato foi parada/interrompida pela adição da solução composta por ácido sulfúrico 2N. A leitura das absorbâncias foi realizada imediatamente, utilizando o comprimento de onda de 450nm e 570nm, em espectrofotômetro (Synergy/H1, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). As concentrações da proteínas foram determinadas por interpolação da curva padrão e apresentadas como pg/mL para as amostras em cada uma das condições testadas.

4.3 FASE 3

4.3.1 Detecção da Expressão Gênica dos Componentes do ECS

A expressão gênica dos componentes do ECS em SCAPs foi avaliada por transcrição reversa do RNA mensageiro (RNAm) para obtenção do DNA complementar (cDNA), seguida de ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR). Foram avaliadas a expressão das enzimas responsáveis pela síntese e hidrólise dos ECbs, sendo: NAPE-PLD, FAAH, DAGL e MAGL; a expressão dos receptores canabinóides CB1 e CB2, e do receptor vanilóide TRPV1 em SCAPs, com ou sem exposição ao LPS, utilizando tanto o meio de proliferação quanto o meio de diferenciação osteo/odontogênica.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (2×10^5 células por poço) com meio de proliferação nas primeiras 24h. Após este período, o meio de cultura foi substituído por MD ou MP, com ou sem estímulo de LPS (Invitrogen) nas

concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/mL em períodos de 1h e 24h. Estes experimentos foram utilizados para selecionar apenas 1 concentração de LPS a ser utilizada nos demais períodos experimentais (3 e 7 dias) para avaliação de expressão gênica dos componentes do ECS.

Extração de RNA: Após os períodos experimentais, foi realizada a aspiração do meio de cultura dos poços e as células foram lisadas com Trizol[®] (Invitrogen) (1000µL/poço). A extração foi realizada pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio conforme descrito na literatura (Sipert et al., 2014). Após adição de um volume de 30% de clorofórmio (Merck), os tubos foram agitados e centrifugados a 13000 x g por 15 min a 4°C para a separação em 2 fases. A fase aquosa (transparente) foi recuperada em alíquotas de 300 µL e colocada em tubos de microcentrífuga e em seguida, foi adicionado 600 µL de isopropanol (Merck). Após agitação, o RNA foi precipitado por centrifugação a 13.000 x g por 10 min a 4°C e, posteriormente, o tubo foi invertido para descarte das soluções. Em seguida, o precipitado foi lavado com 1000µL de etanol 75% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%], agitando-se vigorosamente em vórtex. Nova centrifugação foi realizada a 7000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 500µL de álcool 75% em DEPC 0.1%. Nova centrifugação foi realizada a 7000 x g por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados para secar por aproximadamente 10 minutos. Após secagem, o RNA total foi reconstituído em 10 µL de água tratada com DEPC 0,1% e armazenados a -80°C.

Quantificação do RNA: A quantificação do RNA total foi realizada pela leitura de 2 µL de cada amostra. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 230, 260 e 280 nm e a concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/µL. Após a quantificação do RNA, a quantidade a ser transcrita foi definida para todas as amostras.

Tratamento com DNase: Para eliminar a contaminação do RNA total por DNA genômico, procedeu-se ao tratamento de todas as amostras com DNase (Sigma-Aldrich). Após padronização das amostras com base na massa de RNA total, água DEPC foi adicionada individualmente de forma a se obter o volume final de 8 µL. A este volume foi adicionado 1 µL de DNase e 1 µL de solução tampão de reação. As amostras foram incubadas à TA por 15 min. Em seguida, 1 µL de solução

de parada foi adicionada a cada amostra, totalizando o volume de 11 μL por tubo, seguida de nova incubação a 70°C por 10 min.

Transcrição reversa: Após tratamento com DNase, o RNA obtido foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), que foi realizada por meio do kit High Capacity cDNA reverse transcription kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Para tal, foram adicionados a novos tubos devidamente identificados: 10 μL da solução tampão do kit, 1 μL do mix concentrado de enzimas (20X) e 9 μL de cada amostra de RNA, totalizando 20 μL por reação. As amostras foram incubadas a 37 °C por 60 minutos, em seguida a 95 °C por 5 minutos, e mantidas posteriormente a 4 °C.

qPCR: A análise quantitativa da expressão dos genes foi realizada empregando o sistema TaqMan® (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Primers e sondas inventoriados para CB1, CB2, NAPE-PLD, FAAH, DAGLA, MAGL e TRPV1 (Tabela 4.1) foram utilizados juntamente com TaqMan® Mastermix II. A expressão dos genes alvo foi normalizada com base na expressão de GAPDH, utilizado como controle endógeno. Foi utilizado 1 μL de cada amostra, previamente diluída da seguinte forma: cDNA (1 parte) + água ultrapura (3 partes), correspondendo à diluição de 1/4, juntamente com reagentes Taqman Gene Expression Mastermix® (Thermo Scientific), primers e sondas, com um volume final de reação de 10 μL . Esta diluição foi definida a partir de uma curva piloto realizada inicialmente, utilizando diferentes diluições de cada amostra. A termociclagem compreendeu 2 min a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os resultados foram analisados com base no valor de C_T (cycle threshold – ou ciclo limiar), determinado com base em controle negativo (sem amostra). As médias dos valores de C_T de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização ao controle endógeno (GAPDH), e então comparados com o controle alvo-interno (grupo de células-controle não estimuladas) para o cálculo da quantificação relativa, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Estes ensaios de RT-qPCR foram realizados no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP de São Paulo (FOUSP).

Tabela 4.1 – Sequência de primers utilizados para amplificação do cDNA no experimento qPCR

Genes	Nome	Abreviação	Ensaio TaqMan
ECS	<i>Cannabinoid receptor 1</i>	CNR1	Hs01038522_s1
	<i>Cannabinoid receptor 2</i>	CNR2	Hs00361490_m1
	<i>N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D</i>	NAPE-PLD	Hs00419593_m1
	<i>Diacylglycerol lipase</i>	DAGL	Hs00391374_m1
	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>	FAAH	Hs01038660_m1
MGLL	<i>Monoglyceride lipase</i>	MGLL	Hs00200752_m1
TRP	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>	TRPV1/VR1	Hs00218912_m1
Controle Endógeno	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	Hs02786624_g1

Fonte: a autora.

4.3.2 Papel de TRPV1 na Viabilidade, Diferenciação e Produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs – Bloqueio Farmacológico de TRPV1 com Capsazepina

As ações dos ECbs são mediadas preferencialmente por receptores canabinoídes (CB1 e CB2), porém, podem também ocorrer via receptores não canabinoídes (TRPV1). Pelo fato de não observamos a expressão gênica de CB1 e CB2 em nossas amostras, e tendo sido detectada a expressão de TRPV1, realizaram-se ensaios funcionais empregando um antagonista de TRPV1 (capsazepina [CPZ]), com o intuito de realizar o seu bloqueio farmacológico. A capsazepina (Millipore Sigma) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) segundo orientações do fabricante para obtenção de uma solução na concentração de 5 mM, para posterior diluição. O papel de TRPV1 na viabilidade, diferenciação e produção de citocinas e mediadores inflamatórios, com ou sem exposição ao LPS, foi avaliado a partir do seu bloqueio farmacológico. Nestes ensaios, as células foram tratadas com o antagonista de TRPV1 30 minutos antes da colocação dos estímulos. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas, sempre com pré-tratamento utilizando o antagonista.

4.3.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular de SCAPs após bloqueio farmacológico de TRPV1 com CPZ foi realizada através de ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) (Molecular Probes, Life Technologies) conforme descrito previamente, nos períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas, utilizando 3 concentrações de CPZ: 1, 3 e 5 μM , diluída em DMSO. Para cada concentração de CPZ foi utilizado um controle com a mesma quantidade do diluente. O objetivo deste ensaio foi definir a concentração mais elevada de CPZ que não comprometesse mais que 50% da viabilidade celular, para ser utilizada nos próximos experimentos.

4.3.2.2 Diferenciação osteo/odontogênica

A influência de TRPV1 na diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs foi avaliada através do ensaio de Vermelho de Alizarina após período experimental de 14 dias, com ou sem tratamento com LPS e utilizando o antagonista CPZ, na concentração de 5 μM .

As células foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) com MP e deixadas por 24h para adesão celular. Após 24h o meio foi substituído por meio de Diferenciação (MD) ou MP, com ou sem LPS. Nos grupos em que foi realizado o bloqueio farmacológico de TRPV1, a CPZ era adicionada sempre 30 minutos antes dos estímulos. O meio de cada poço foi renovado a cada 2 dias durante 14 dias, quando o processo descrito no item 4.1.3 foi repetido para a quantificação da deposição de cálcio.

4.3.2.3 Detecção de produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs

As células foram cultivadas na presença de LPS, com ou sem bloqueio farmacológico de TRPV1, por 24 horas para a análise da produção de MCP-1/CCL-2, utilizando o método ELISA.

SCAPs foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^5 células por poço) com meio de proliferação, e deixadas para adesão por 24h em incubadora. Após

este período, o meio de cultura foi substituído por MD ou MP (controle), na presença ou ausência de LPS (0,1, 1 e 10 µg/mL), com ou sem bloqueio farmacológico de TRPV1 com CPZ (5 µM). O sobrenadante foi coletado após 24h e o ensaio ELISA foi realizado exatamente como descrito na fase 2, item 4.2.2.

4.4 FASE 4

4.4.1 Papel dos ECbs em SCAPs *in vitro*

Após os experimentos avaliando o papel de TRPV1 nas funções celulares de SCAPs, foram iniciados os experimentos para avaliar o papel dos ECbs Anandamida (AEA) e 2-AG na viabilidade, diferenciação, produção de citocinas inflamatórias e expressão de genes relacionados à mineralização, por SCAPs. Todos os experimentos foram realizados com e sem o bloqueio farmacológico de TRPV1, e os experimentos para avaliação da produção de citocinas também foram realizados na presença e ausência de LPS. Anandamida (10mg) (Cayman chemicals, Ann Arbor, MI, USA) foi diluída em etanol seguindo as orientações do fabricante, de forma a obter uma solução de estoque na concentração de 10mM, para ser posteriormente diluída de forma seriada, obtendo-se diferentes concentrações. 2-AG foi diluído em solução de acetonitrila (Sigma Aldrich), seguindo as orientações do fabricante para obtenção de uma solução de estoque na concentração de 10mM. A Capsazepina (Millipore Sigma) foi diluída em DMSO, para obtenção de uma solução na concentração de 100mM, seguindo orientações do fabricante.

Os experimentos desta fase foram integralmente realizados nos laboratórios do departamento de Endodontia da University of Health Science Center at San Antonio, Texas (UTHSCSA), USA, com apoio de Bolsa FAPESP BEPE Processo 2018/21869-9 e do National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR) Auxílio (RO1 DE0227929).

4.4.1.1 Viabilidade celular

Com o objetivo de analisar o efeito dos ECbs exógenos na viabilidade de SCAPs foi realizado inicialmente um estudo piloto utilizando somente AEA em 6 concentrações, para a seleção de 2 concentrações para a realização dos demais experimentos. Realizou-se o ensaio colorimétrico OZBlue Cell viability

(OZBiosciences), baseado na mensuração da atividade da enzima desidrogenase NADPH em células metabolicamente ativas, aferido por fluorescência. As células ativas realizam a redução da resazurina (azul e não fluorescente) para resofurina (rosa e fluorescente) e o sinal produzido é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura da fluorescência foi realizada nos comprimentos de onda de 560-590nm em espectrofotômetro FlexStation 3 Benchtop Multi-Mode (Molecular Devices, San Jose, CA).

Para tal, as células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^3 células por poço e deixadas por 24h para adesão. Após 24h as células foram estimuladas com MP ou MP + AEA nas seguintes concentrações: 100 μ M, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . O meio de cultura com a mesma concentração do veículo usado para diluição da droga foi utilizado como controle. Os períodos experimentais foram de 24h, 4, 7 e 14 dias. Após a definição das 2 concentrações mais elevadas que mantiveram pelo menos 50% da viabilidade celular de SCAPs, foi utilizado o endocanabinóide 2-AG nas 2 concentrações eleitas para a análise da viabilidade celular em SCAPs.

O ensaio Cell Titer Glo 2.0 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) foi empregado utilizando AEA e 2-AG nas concentrações 100 e 10 μ M nos períodos de 24h, 4 e 7 dias. Este ensaio permite a determinação do número de células viáveis através da quantificação do ATP presente, indicativo de células metabolicamente ativas. Neste ensaio, a luciferina é mono-oxidada pela luciferase resultando em oxiluciferina e luz. A ação da enzima é dependente do ATP oriundo das células viáveis em cultura. A leitura de luminescência foi realizada para a determinação do número de células metabolicamente ativas na amostra, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 500nm.

4.4.1.2 Diferenciação celular

A diferenciação celular foi avaliada por meio da quantificação da deposição de cálcio, através da coloração de Vermelho de Alizarina S (descrito anteriormente), com o período de indução de 14 dias.

Células foram cultivadas em placas de 24 poços (6×10^4 célula/poço) com MP e deixadas 24h para adesão. Os estímulos foram adicionados após 24 horas divididos

nos seguintes grupos: meio de proliferação (controle), meio de diferenciação osteo/odontogênica (MD), MD + AEA (100 μ M e 10 μ M) com e sem CPZ (1 μ M), MD + 2AG (100 μ M e 10 μ M) com e sem CPZ (1 μ M), MD+CPZ (1 μ M). O meio de cultura com os estímulos foram renovados a cada 48h. Para o preparo de MD, foi utilizado o kit StemPro Osteogenic Differentiation (Gibco, Carlsbad, CA). No 14^o dia foi realizado o ensaio de viabilidade celular OZBlue previamente à coloração Vermelho de Alizarina S para verificação do número de células viáveis em cada um dos grupos. Desta forma, os dados de deposição de cálcio foram normalizados com base nos dados de viabilidade celular, evitando o viés de interpretação dos dados de deposição de cálcio a partir da variação de viabilidade/número de células.

4.4.1.3 Detecção da produção de citocinas inflamatórias

Considerando a ocorrência de reabsorção óssea na região apical de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar (Tobias Duarte et al., 2014), o papel dos ECbs na modulação da produção dos mediadores envolvidos na renovação óssea foram analisados.

SCAPs foram cultivadas em placas de 6 poços (3×10^5 célula/poço) com MP e deixadas 24h para adesão. Após 24h as células foram estimuladas com os ECbs AEA (10 μ M), 2AG (10 μ M), com ou sem CPZ, na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL). Nesta fase, ao meio de cultura foi adicionado 1% de SBF ao invés de 10%, para que não houvesse interferência dessa substância na quantificação das proteínas.

Após 24h, os sobrenadantes foram coletados para posterior quantificação das citocinas e TNF- α , TGF- β 1, IL-6, M-CSF, CCL2, OPG, and RANKL. Para tal, foi utilizado o ensaio Luminex/Multiplex Assay (Eve Technologies Corporation, Calgary, Canada) que permite a análise de múltiplos alvos em uma mesma amostra.

4.4.1.4 Detecção da expressão gênica de marcadores de mineralização

A expressão gênica de marcadores de mineralização odontoblástica e osteoblástica por SCAPs foram analisados através de transcrição reversa seguida de qPCR. Foi avaliada a expressão de marcadores osteoblásticos (DMP-1, OCN - BGLAP, ALP, RUNX-2), odontoblástico (DSPP) e cementoblástico (CEMP-1), e o

controle endógeno utilizado foi o gene 18S. A expressão gênica de TGF- β também foi avaliada nos mesmos períodos. SCAPs foram tratadas com ECbs (100 μ M) com ou sem bloqueio farmacológico de TRPV1, por 1 e 7 dias.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (2×10^5 células por poço) com meio de proliferação nas primeiras 24h. Após este período o meio de cultura foi substituído por MP (controle) ou MD, com adição dos ECbs e/ou CPZ.

Para a extração de RNA foi utilizado o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e para a transcrição reversa foi utilizado High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. Os primers e sondas utilizados estão descritos na tabela 4.2.

Os resultados deste ensaio foram analisados de acordo com o descrito no item 4.3.1 da fase 3 de materiais e métodos deste trabalho.

Tabela 4.2 - Sequência de primers utilizados para amplificação do cDNA no experimento qPCR

Genes	Nome	Abreviação	EnsaioTaqMan
Mineralização	<i>Alkaline phosphatase, placental</i>	ALPP	Hs03046558_s1
	<i>Bone gamma-carboxyglutamate protein</i>	BGLAP	Hs01587814_g1
	<i>Cementum protein-1</i>	CEMP-1	Hs04185363_s1
	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>	DMP-1	Hs01009391_g1
	<i>Dentin sialophosphoprotein</i>	DSPP	Hs00171962_m1
	<i>Runt related transcription factor 2</i>	RUNX-2	Hs01047973_m1
Controle Endógeno	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>	18S	Hs99999901_s1

Fonte: a autora.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Shapiro Wilk. O teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* Tukey foi utilizado para dados paramétricos. O teste Kruskal Wallis seguido de *post hoc* Dunn foi utilizado para dados não paramétricos. O teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni foi utilizado para identificar diferenças nas amostras de diferentes períodos experimentais num mesmo ensaio. Os níveis de significância foram determinados com $p < 0.05$. Foi utilizado o software Graphpad Prism 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA) para as análises estatísticas. Todos os dados estão expressos em média e desvio padrão.

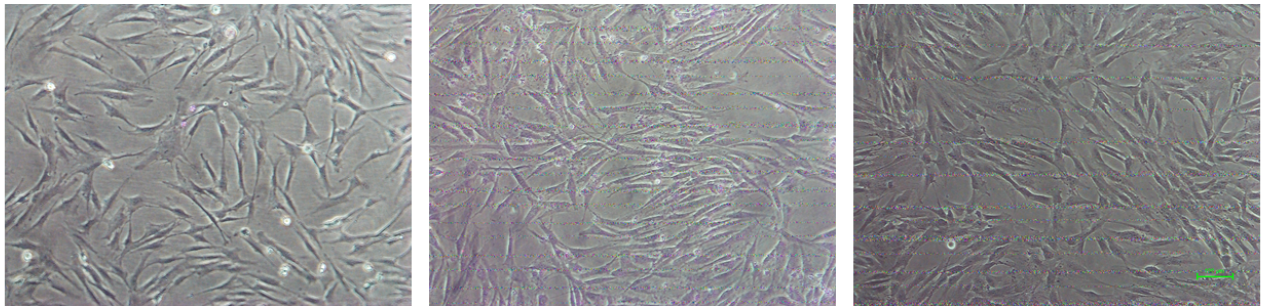
5 RESULTADOS

5.1 FASE 1

5.1.1 Obtenção das Células da Papila Apical

A técnica para a realização de cultura primária de células da papila apical a partir de explantes se mostrou passível de reprodução durante a execução do trabalho. A figura 5.1 ilustra culturas de células da papila apical realizadas durante o estudo.

Figura 5.1 - Células de papila apical (SCAPs) obtidas a partir de cultura primária. Imagens capturadas em microscópio óptico com contraste de fases. Aumento de 100x

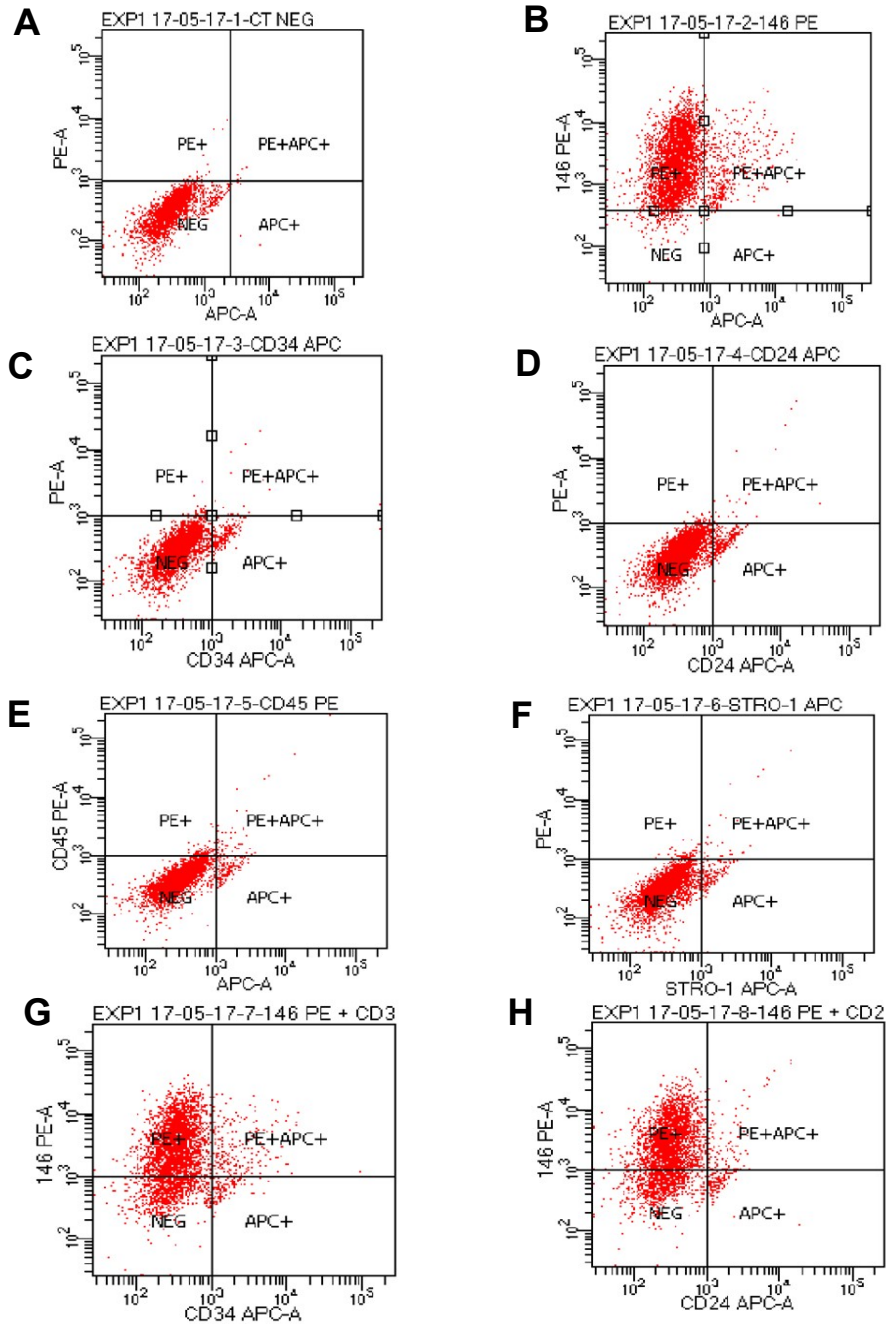


Fonte: a autora.

5.1.2 Caracterização Fenotípica das Células da Papila Apical

As células isoladas da papila apical expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram positividade para marcadores de superfície de células-tronco, tais como CD146, CD44 e STRO-1. As células também apresentaram mínima expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD45) ou endoteliais (CD34). A representação em *dot-plot* da imunomarcagem está demonstrada na figura 5.2 e a porcentagem de expressão dos marcadores está demonstrada na tabela 5.1.

Figura 5.2 - Representação em *dot plot* da imunomarcção para CD146, CD24, CD34, CD45 e STRO-1 por citometria de fluxo



Fonte: a autora.

Legenda: A: Controle negativo; B: CD146; C: CD34; D: CD24; E: CD45; F: STRO-1; G: Combinação de CD146/PE + CD34/APC; H: Combinação de CD146/PE+ CD24/APC.

Tabela 5.1 - Porcentagem dos marcadores celulares em SCAPs

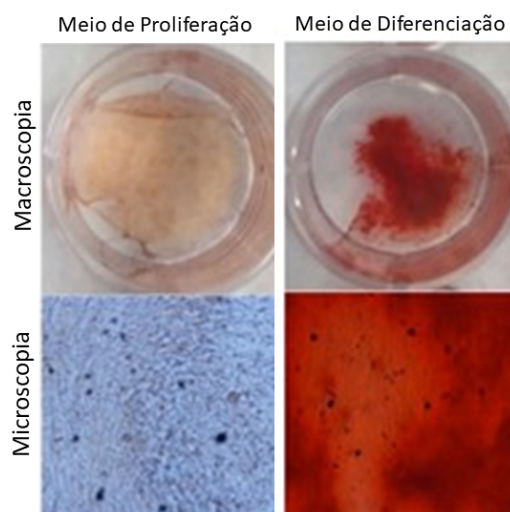
MARCADORES	PORCENTAGEM
Controle negativo	0,2%
CD 146	85,5%
CD 34	5,6%
CD 24	5,5%
CD 45	1,8%
STRO-1	5%
CD 146 + CD 34	CD 146= 66,9% CD 34= 2,9%
CD 146 + CD 24	CD 146= 67,8% CD 24= 3,3%

Fonte: a autora.

5.1.3 Caracterização Funcional: diferenciação Celular

A formação de nódulos mineralizados foi detectada utilizando o ensaio de Vermelho de Alizarina S. Após 14 dias de cultura, SCAPs apresentaram capacidade de diferenciação osteo/odontogênica, observada através da deposição de cálcio por SCAPs estimuladas com MD, tendo MP como controle, demonstrada na figura 5.3.

Figura 5.3 - Indução de diferenciação osteo/odontogênica em células de papila apical



Fonte: a autora.

SCAPs foram mantidas em Meio de Proliferação (MP) ou meio de diferenciação (MD). Deposição de cálcio detectada por meio de ensaio de Alizarina S após 14 dias de cultivo, imagens macro (painel superior) e microscópicas (painel inferior).

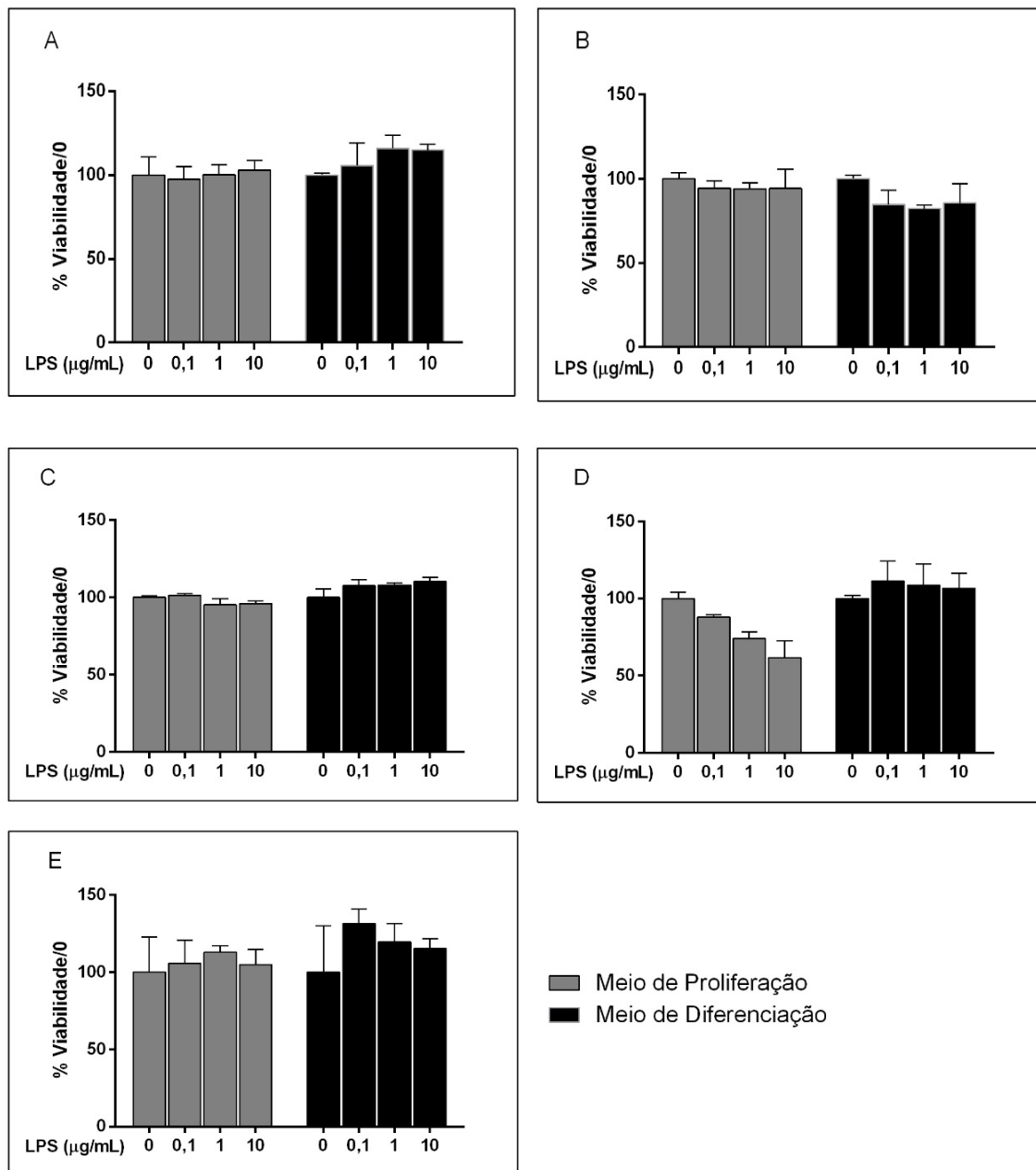
5.2 FASE 2

5.2.1 Viabilidade Celular – Estímulo com LPS

Para avaliar o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a viabilidade de SCAPs, a sua citotoxicidade quando diluído em MP ou MD foi avaliada por meio de ensaio empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Molecular Probes, Life Technologies).

O estímulo com LPS em diferentes concentrações e com diferentes meios (MP e MD) não afetou a viabilidade de SCAPs em nenhum dos períodos experimentais avaliados, conforme demonstrado na figura 5.4.

Figura – 5.4 - Viabilidade de SCAPs após estímulo com LPS. Células foram mantidas em meio de proliferação ou diferenciação na presença de LPS nas concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: a autora.

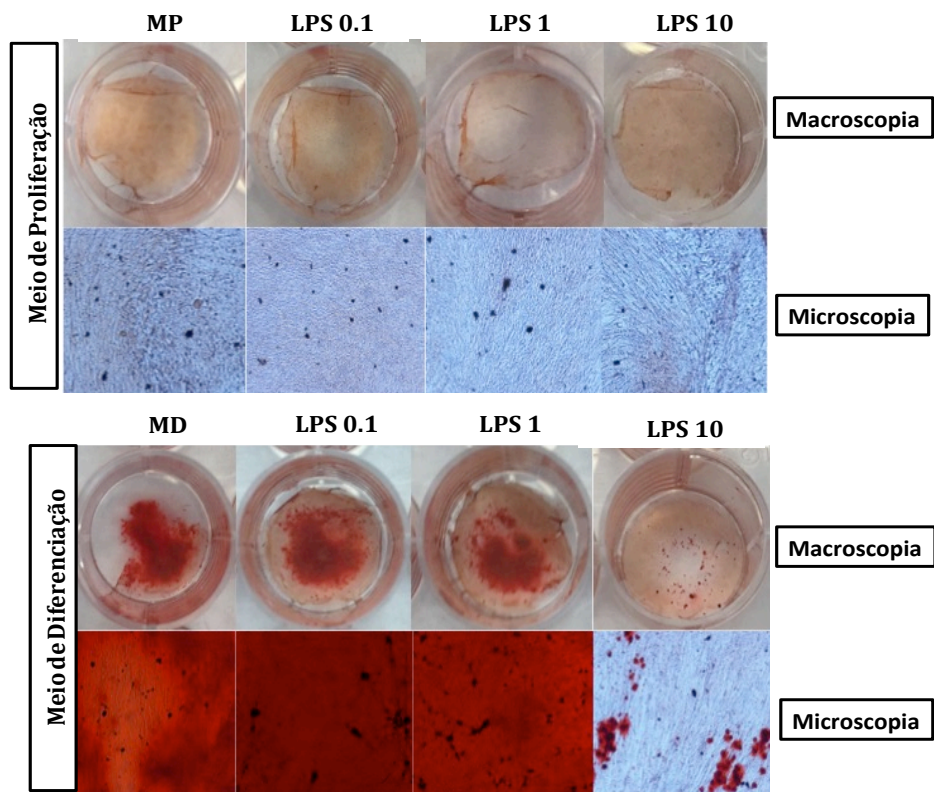
Análise de viabilidade celular nos períodos experimentais de A: 24h; B: 3 dias; C: 5 dias; D: 7 dias; E: 14 dias. A viabilidade e/ou proliferação foi detectada indiretamente por meio do emprego de MTT. Não houve diferença estatística significativa.

5.2.2 Diferenciação Celular – Estímulo com LPS

Para avaliar o efeito do LPS sobre a diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs, foi utilizada a coloração Vermelho de alizarina S. Os grupos foram comparados apenas com os grupos que receberam o mesmo meio de cultura, conforme figura 5.5.

O estímulo com LPS (0,1 µg/mL) aumentou a capacidade de diferenciação de SCAPs, quando comparada ao grupo controle (MD). Já o grupo estimulado com LPS (10 µg/mL) promoveu uma redução na diferenciação celular, quando comparado ao grupo estimulado com LPS 0,1 µg/mL, conforme ilustrado na figura 5.6.

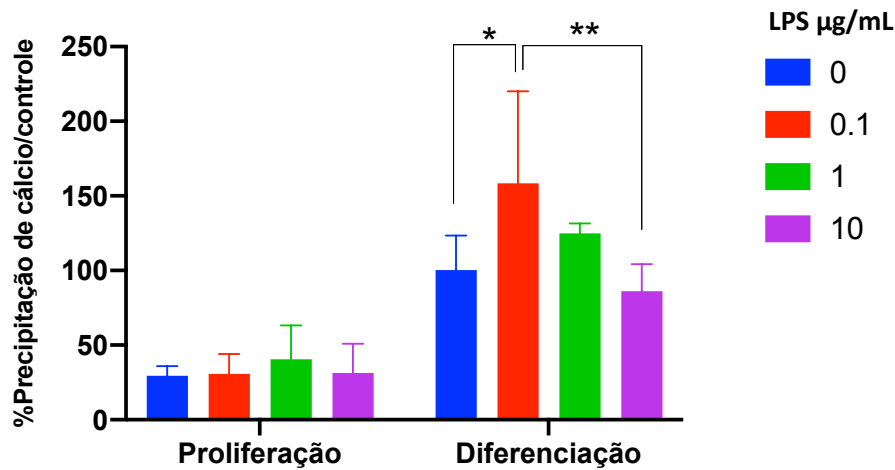
Figura 5.5 - Indução de diferenciação osteo/odontogênica em células de papila apical ativadas com LPS



Fonte: a autora.

SCAPs foram mantidas em meio de proliferação (painel superior) ou meio de diferenciação (painel inferior) com LPS nas concentrações indicadas (µg/mL) ou somente com meio controle (MP/MD). Deposição mineral detectada por ensaio de Alizarina S após 14 dias de cultivo, imagens macro e microscópicas (100X)

Figura 5.6 - Diferenciação Osteo/ Odontogênica – 14 dias. Quantificação de deposição mineral por Vermelho de Alizarina S



Fonte: a autora.

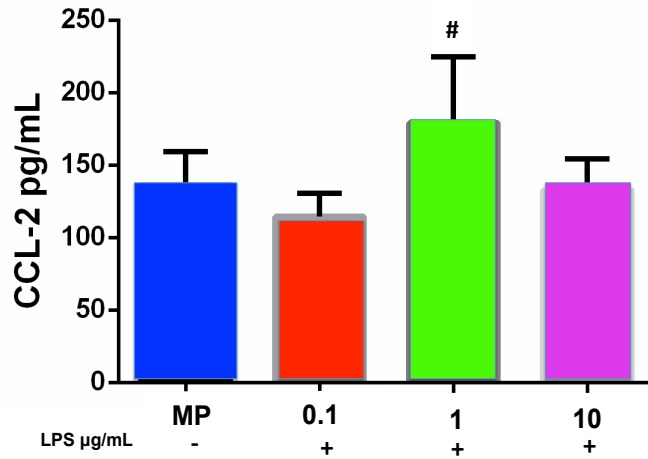
*, **: Diferença significativa quando comparado ao controle MD (0) ou entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

5.2.3 Detecção de Produção *in vitro* de MCP-1/CCL-2 e OPG – Estímulo com LPS

A detecção da produção de MCP-1/CCL2 e OPG foi realizada através do ensaio ELISA, após 1 e 24 horas de estímulo celular com LPS em diferentes concentrações.

A produção de MCP-1/CCL-2 após 1 hora foi significativamente maior no grupo estimulado com LPS 1µg/mL quando comparado a LPS 0,1 µg/mL (Figura 5.7). Em 24 horas, a produção nos grupos estimulados com LPS a 1µg/mL e 10µg/mL foi significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 5.8).

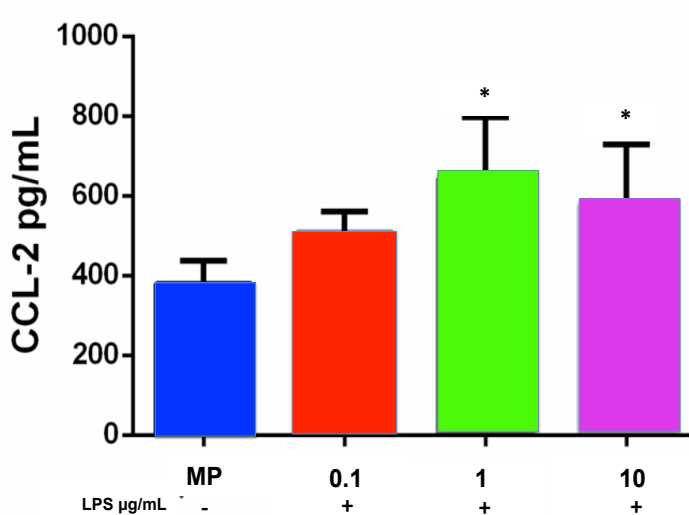
Figura 5.7 - Produção de CCL-2 (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora



Fonte: a autora.

#: Diferença significativa quando comparado ao grupo estimulado com LPS 0,1 µg/mL ($p < 0.05$).

Figura 5.8 - Produção de CCL-2 (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em 24 horas

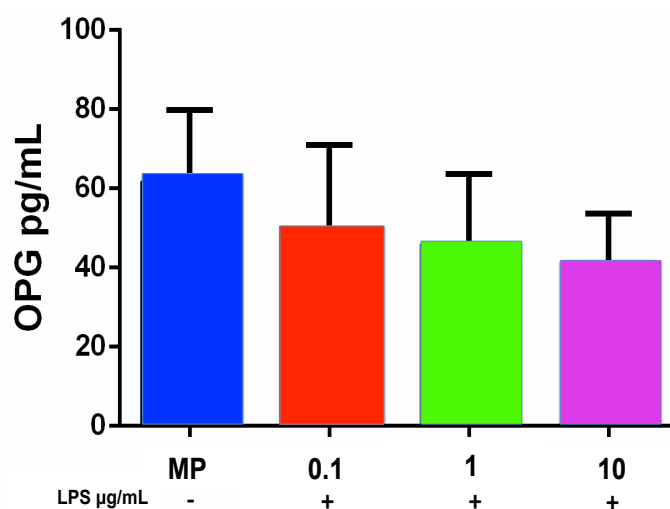


Fonte: a autora.

*: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$).

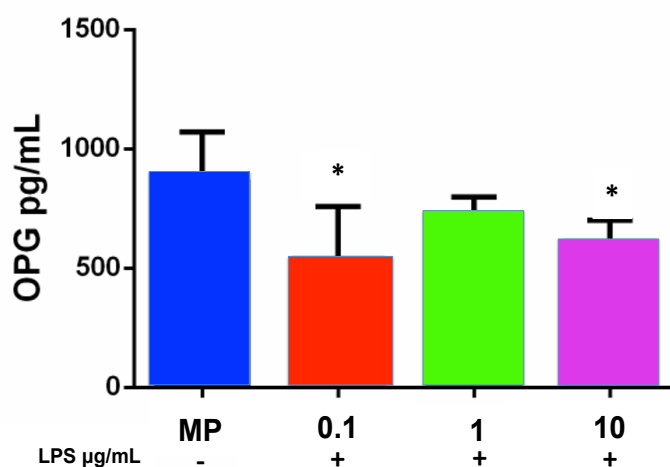
A Osteoprotegerina (OPG) foi produzida por SCAPs no período de 1 hora, porém, sem diferença estatística entre as concentrações de LPS (Figura 5.9). Já em 24 horas houve uma menor expressão de OPG nos grupos estimulados com LPS a 0,1 e 10 µg/mL, quando comparados ao controle (Figura 5.10).

Figura 5.9 - Produção de OPG (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em uma hora



Fonte: a autora.

Figura 5.10 - Produção de OPG (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL) em 24 horas



Fonte: a autora.

*: Diferença significativa quando comparado ao controle (MP) ($p < 0.05$).

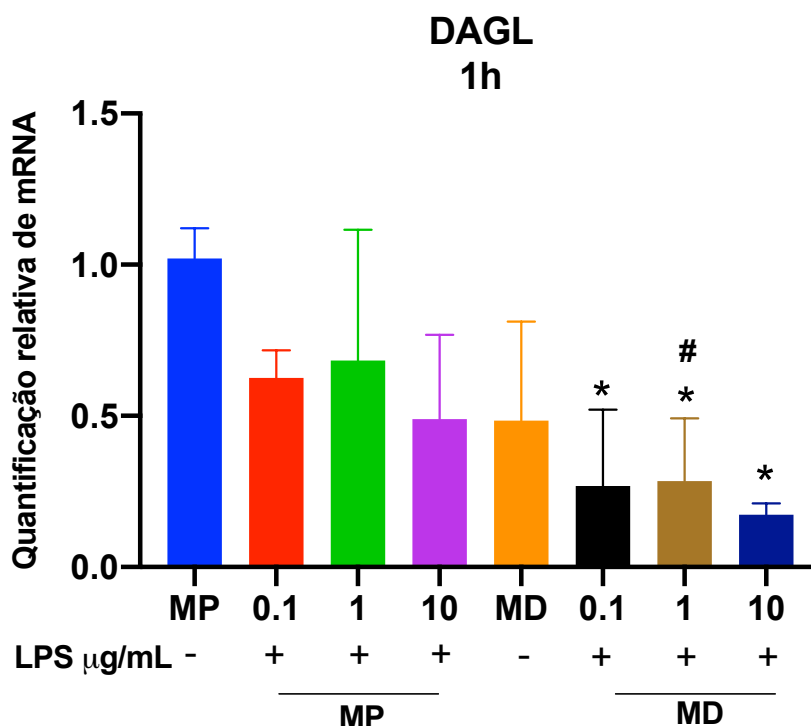
5.3 FASE 3

5.3.1 Detecção da Expressão Gênica dos Componentes do ECS em SCAPs

A expressão dos componentes do ECS foi avaliada inicialmente nos períodos de 1 hora e 24 horas, utilizando 3 concentrações de LPS com 2 meios de cultura diferentes (MP e MD). O objetivo neste experimento foi definir 1 concentração de LPS a ser utilizada nos demais períodos experimentais. Para os períodos de 3 e 7 dias, a concentração eleita de LPS foi de 10 µg/mL.

Após 1 hora, observou-se expressão de todas as enzimas do ECS, exceto FAAH. Em relação aos receptores CB1 e CB2, não foi observada expressão em nenhum dos períodos experimentais avaliados. Observou-se uma redução na expressão de DAGL quando os grupos tratados com MD+LPS (nas 3 concentrações) foram comparados ao grupo controle. Essa redução também foi observada ao comparar-se o grupo MD+LPS 1 µg/mL ao grupo MP+ LPS 1 µg/mL, conforme observado na figura 5.11.

Figura 5.11 – Expressão gênica de DAGL em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH

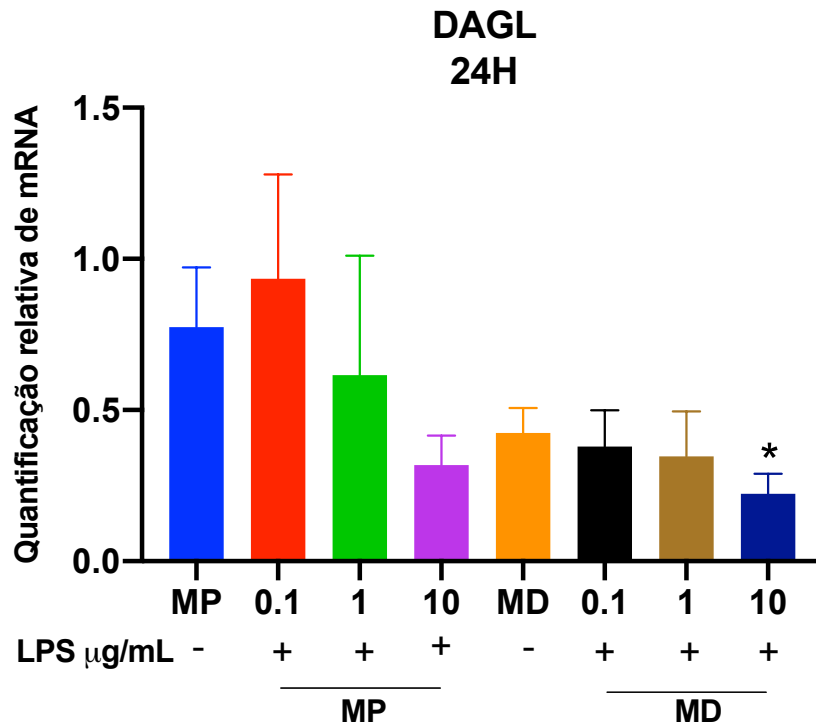


Fonte: a autora.

*: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$). #: Diferença significativa quando comparado ao grupo MP1 ($p < 0.05$).

Observou-se redução significativa na expressão de DAGL após 24 horas no grupo estimulado com MD+LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao grupo controle (Figura 5.12).

Figura 5.12 – Expressão gênica de DAGLA em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



Fonte: a autora.

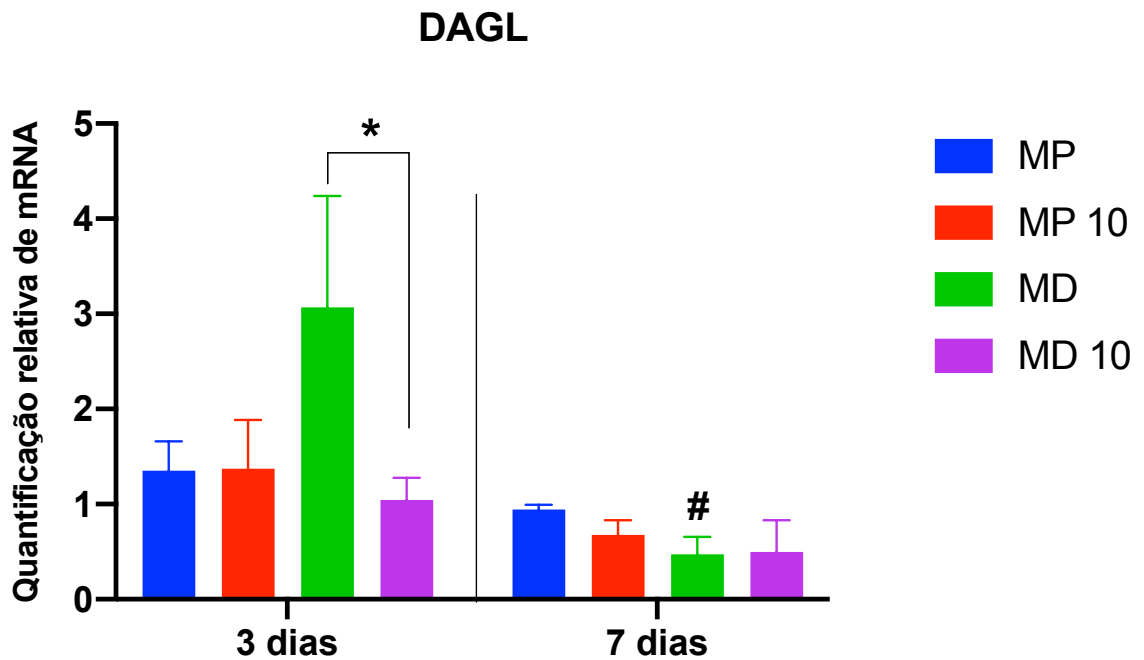
*: Diferença significativa em relação ao controle (MP) ($p < 0.05$).

Para a expressão gênica das demais enzimas nos períodos experimentais de 3 e 7 dias foi eleita apenas 1 concentração de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), com MP ou MD.

Não houve diferença estatística na expressão de DAGL após 3 e 7 dias quando os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle, conforme figura 5.13. Porém, observou-se redução na expressão no grupo estimulado com MD+LPS, quando comparado ao grupo MD, em 3 dias. O grupo estimulado com MD

apresentou redução na expressão de DAGL após 7 dias, quando comparado ao mesmo grupo experimental no período de 3 dias.

Figura 5.13 – Expressão gênica de DAGL em SCAPs após 3 e 7 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



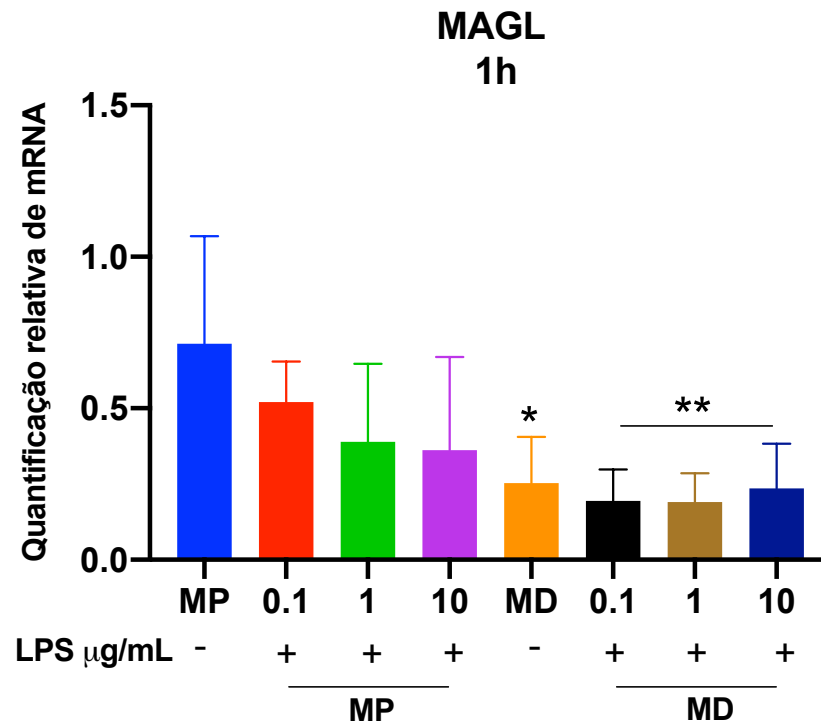
Fonte: a autora.

*: Diferença significativa entre os grupos destacados (MD e MD 10) no período experimental de 3 dias ($p < 0.05$).

#: Diferença significativa entre o grupo MD quando comparado ao grupo MD no período experimental de 3 dias ($p < 0.05$).

Já em relação à expressão de MAGL após 1h, observou-se redução em sua expressão em todos os grupos tratados com MD, quando comparados ao controle (MP), conforme figura 5.14.

Figura 5.14 – Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH

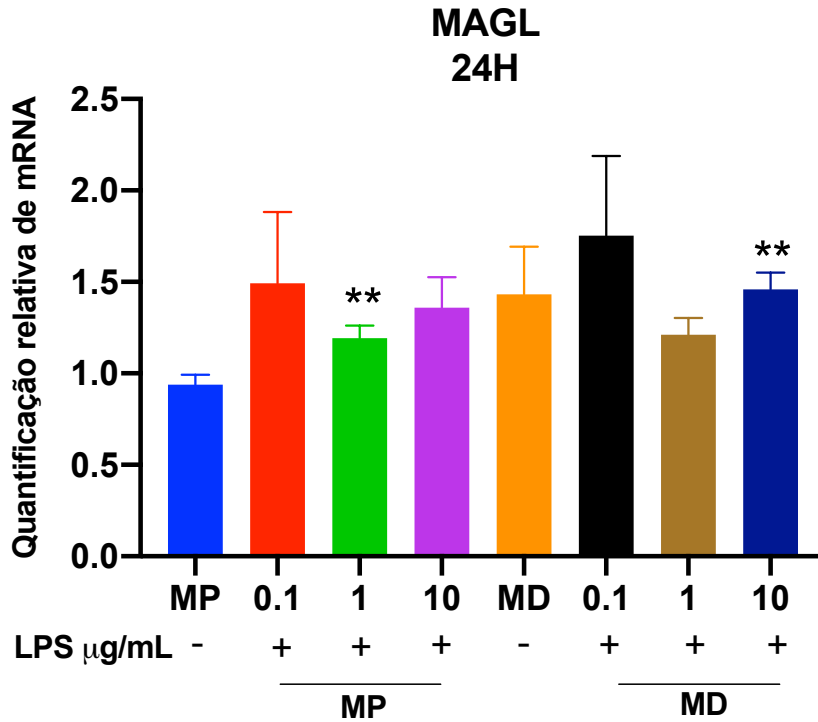


Fonte: a autora.

*, **: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$).

Observou-se aumento na expressão da enzima MAGL após 24 horas, nos grupos estimulados com MP+LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e MD+LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle (Figura 5.15).

Figura 5.15 – Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH

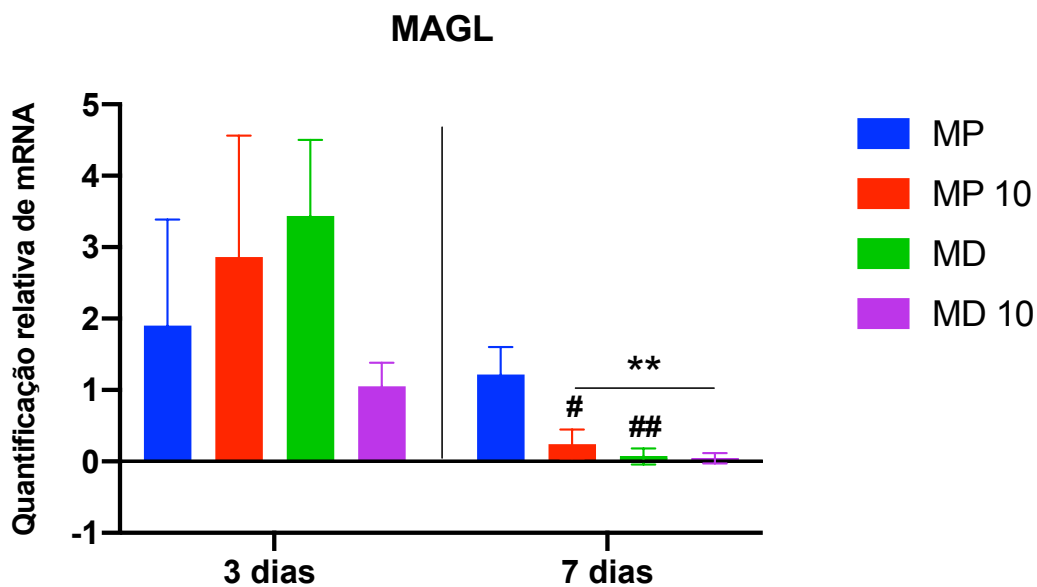


Fonte: a autora.

** : Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$).

Após 3 dias não observou-se alteração na expressão da enzima MAGL. Já após 7 dias observou-se redução na expressão em todos os grupos experimentais, quando comparados ao controle (MP). Observou-se também redução na expressão de MAGL quando os grupos MP10 e MD foram comparados aos mesmos grupos no período de 3 dias (Figura 5.16).

Figura 5.16 – Expressão gênica de MAGL em SCAPs após 3 e 7 dias de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



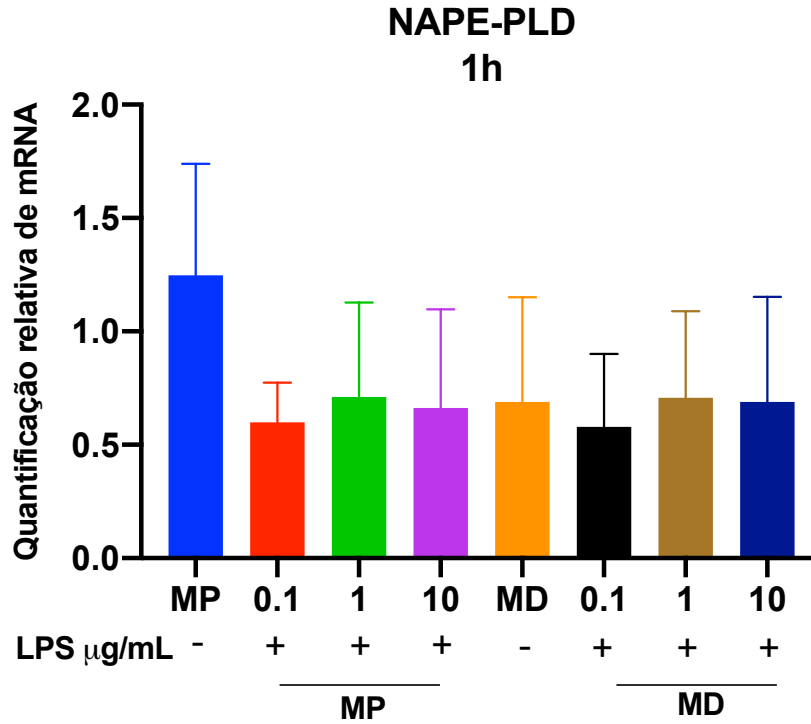
Fonte: a autora.

** : Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$).

#, ## : Diferença significativa quando comparado ao mesmo grupo no período de 3 dias ($p < 0.05$).

A expressão de NAPE-PLD foi observada em todos os grupos nos diferentes períodos experimentais, conforme figura 5.17. No período de 1h não foi observada diferença estatística entre os grupos.

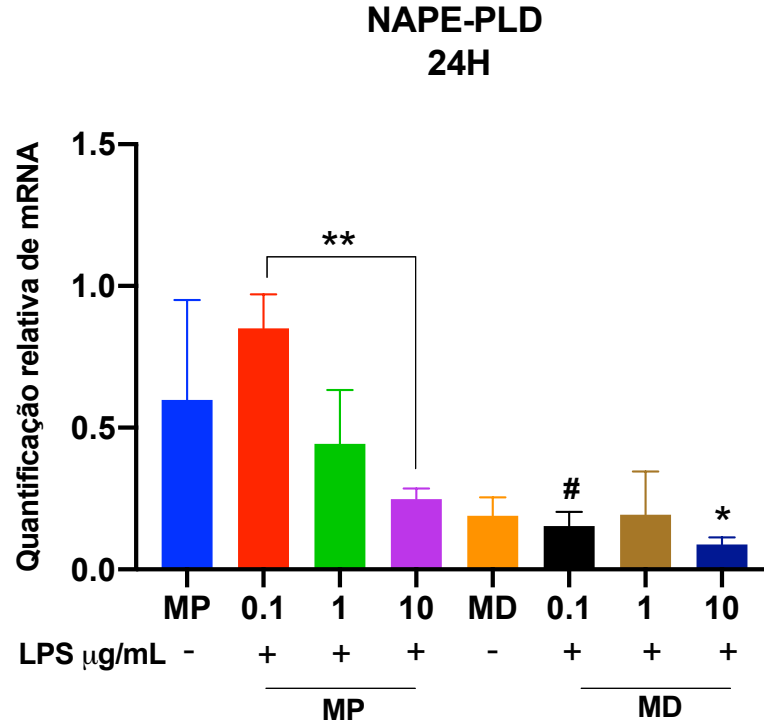
Figura 5.17 – Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



Fonte: a autora.

Ocorreu redução na expressão gênica da enzima NAPE-PLD após 24 horas no grupo estimulado com MD+LPS 10, quando comparado ao controle (MP). Observou-se também uma redução na expressão no grupo MP+LPS 10 em relação ao grupo MP+LPS 0,1. Ao comparar-se o grupo ativado com MP+LPS 0,1 e o grupo MD+LPS 0,1 observou-se uma redução na expressão gênica da enzima NAPE-PLD neste último grupo, conforme demonstrado na figura 5.18.

Figura 5.18 – Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



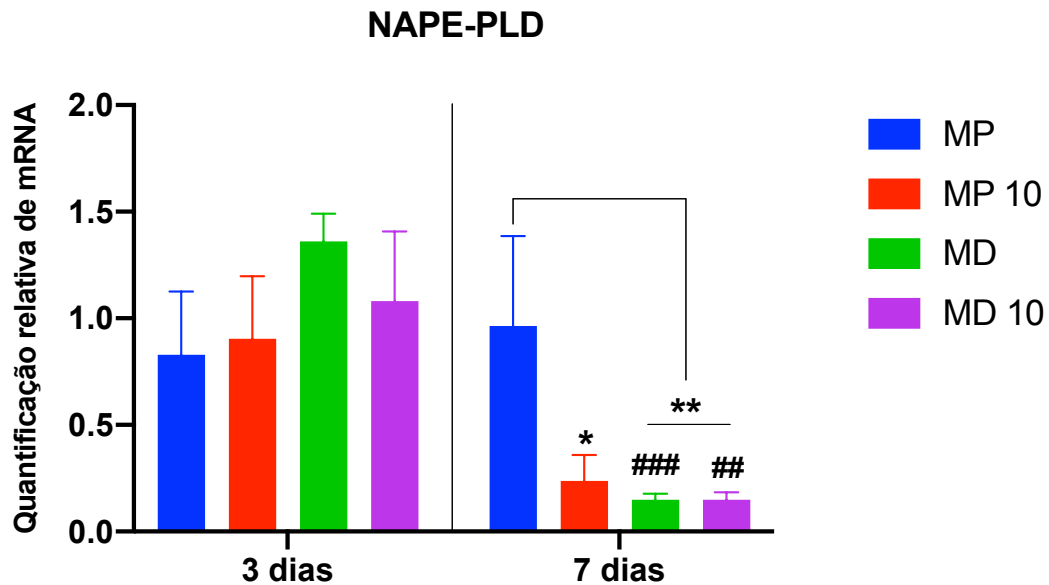
Fonte: a autora.

*, **: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ou diferença entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

Diferença significativa quando comparado ao grupo MP 0.1 ($p < 0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de NAPE-PLD entre os grupos experimentais no período de 3 dias. Já após 7 dias, todos os grupos experimentais apresentaram uma redução na expressão gênica desta enzima quando comparados ao controle, conforme figura 5.19. Além disso, os 2 grupos estimulados com MD (com e sem LPS) apresentaram redução na expressão gênica de NAPE-PLD após 7 dias, se comparados à expressão dos mesmos grupos no período de 3 dias.

Figura 5.19 – Expressão gênica de NAPE-PLD em SCAPs após 3 e 7 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



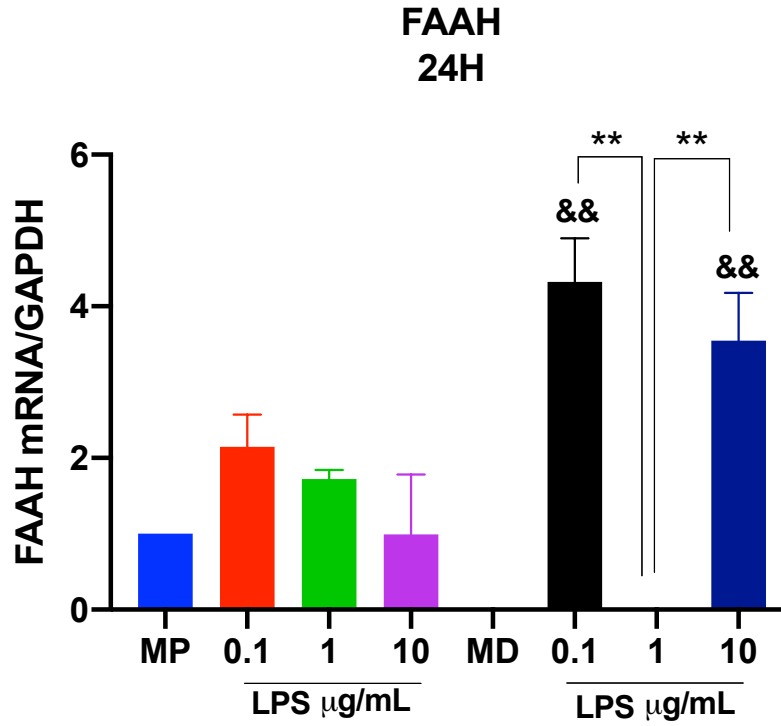
Fonte: a autora.

*, **: Diferença significativa entre os grupos do período experimental de 7 dias quando comparados ao controle no mesmo período ($p < 0.05$).

##, ###: Diferença significativa entre o grupo MD e MD + LPS quando comparados aos mesmos grupos no período experimental de 3 dias ($p < 0.05$).

A expressão de FAAH ocorreu apenas no período experimental de 24h e não houve diferença entre os grupos e o controle. Não foi observada expressão nos grupos MD e MD+LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Observou-se aumento na expressão gênica nos grupos estimulados com MD + LPS (0,1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao grupo MD e MD+LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5.20).

Figura 5.20 – Expressão gênica de FAAH em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



Fonte: a autora.

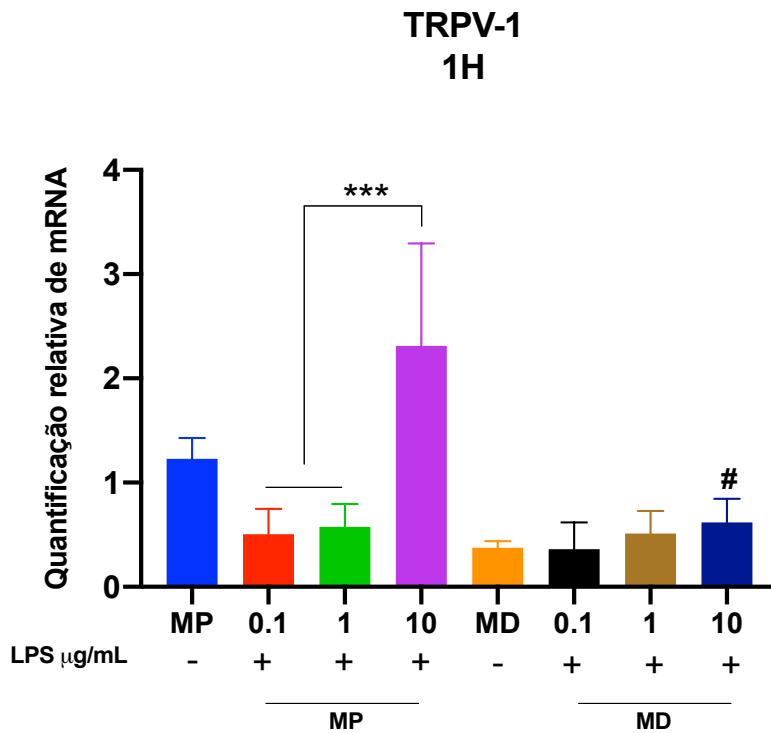
** : Diferença significativa entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

&& : Diferença significativa quando comparado ao grupo MD ($p < 0.05$).

Não houve diferença significativa na expressão de TRPV-1 após 1 e 24h, quando os grupos foram comparados ao controle (MP). Porém, observou-se um aumento na sua expressão gênica no grupo estimulado com MP+LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado aos grupos estimulados com MP+LPS nas demais concentrações, após 1h (Figura 5.21). Ao comparar-se apenas os grupos estimulados com LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ (MP e MD) no período de 1 h, observou-se redução na expressão de TRPV-1 no grupo estimulado com MD. No período de 24h observou-se diferença apenas nos dois grupos estimulados com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, sendo que ocorreu aumento na expressão de TRPV-1 no grupo tratado com MD

(Figura 5.22). Já no período de 3 dias, observou-se redução na expressão de TRPV-1 no grupo estimulado com LPS 10 µg/mL em relação ao controle (Figura 5.23).

Figura 5.21 – Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 1h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH

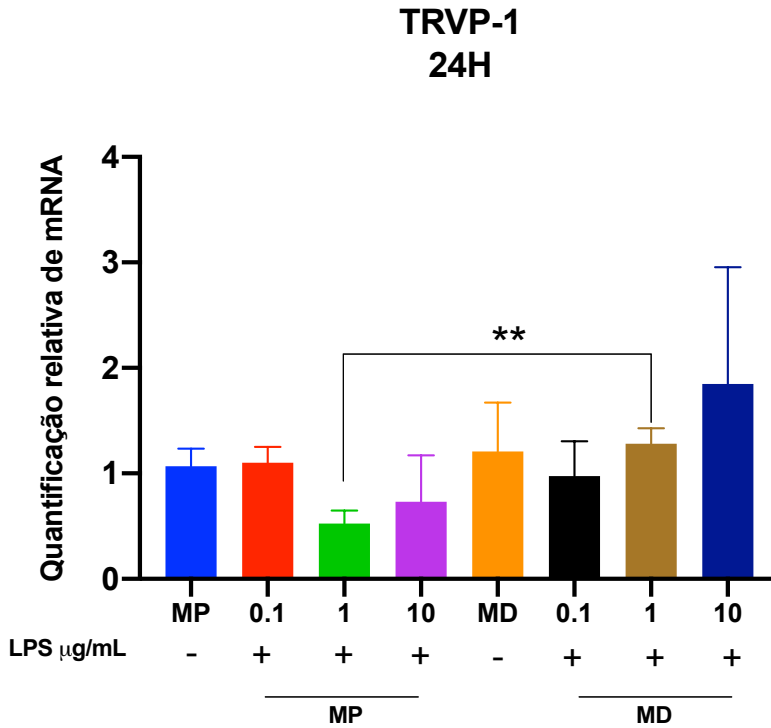


Fonte: a autora.

***: Diferença significativa entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

#: Diferença significativa quando comparado ao grupo MP 10 ($p < 0.05$).

Figura 5.22 – Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 24h de estímulo. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH

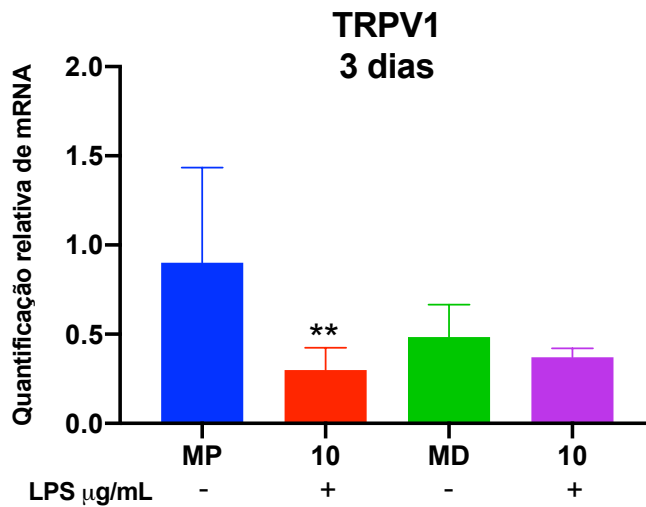


Fonte: a autora.

** : Diferença significativa entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

O receptor TRPV-1 foi avaliado apenas em 3 períodos experimentais: 1h, 24 h e 3 dias. Para o período de 3 dias foi eleita apenas a concentração de 10 µg/mL de LPS para a estimulação das células. Observou-se redução na expressão de TRPV-1 apenas no grupo estimulado com MP+LPS, quando comparado ao grupo controle, conforme observado na figura 5.23.

Figura 5.23 – Expressão gênica de TRPV-1 em SCAPs após 3 dias de estimulação. A expressão de RNAm foi quantificada em relação ao gene de referência GAPDH



Fonte: a autora.

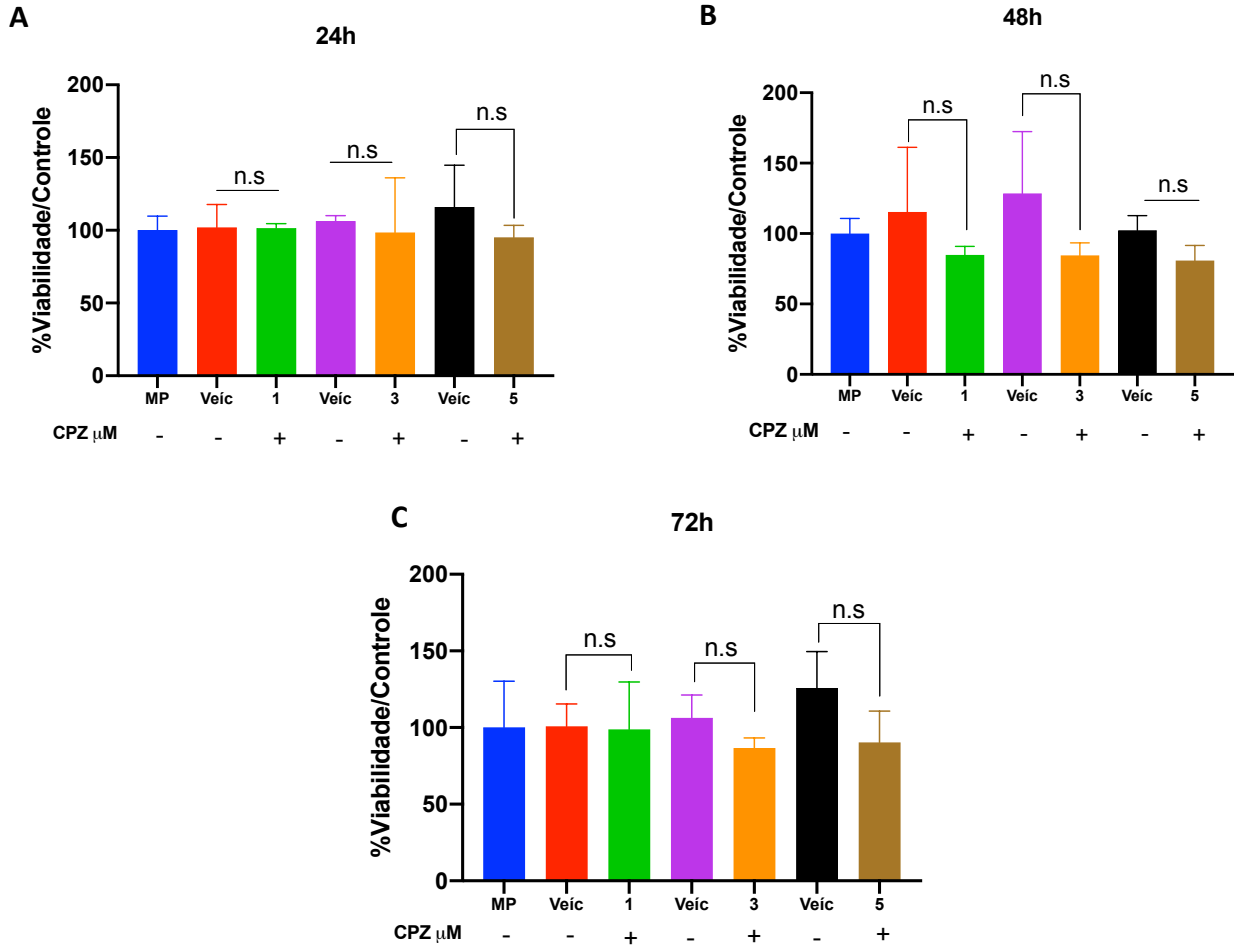
** : Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ($p < 0.05$).

5.3.2 Papel de TRPV1 na Viabilidade, Diferenciação e Produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs – Bloqueio Farmacológico de TRPV1 com Capsazepina

5.3.2.1 Viabilidade celular

A fim de analisar o efeito da CPZ sobre a viabilidade de SCAPs foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, primeiramente sem a presença de LPS (Figura 5.24). Não houve diferença na viabilidade celular quando os grupos foram comparados ao controle nos diferentes períodos experimentais. Também não observou-se diferença ao comparar os grupos experimentais entre si, em cada período. Para cada concentração de CPZ foi adicionado um grupo com a mesma quantidade do diluente (DMSO) para avaliar uma possível citotoxicidade desta substância.

Figura 5.24 – Viabilidade celular de SCAPs após tratamento com diferentes concentrações de capsazepina (CPZ)



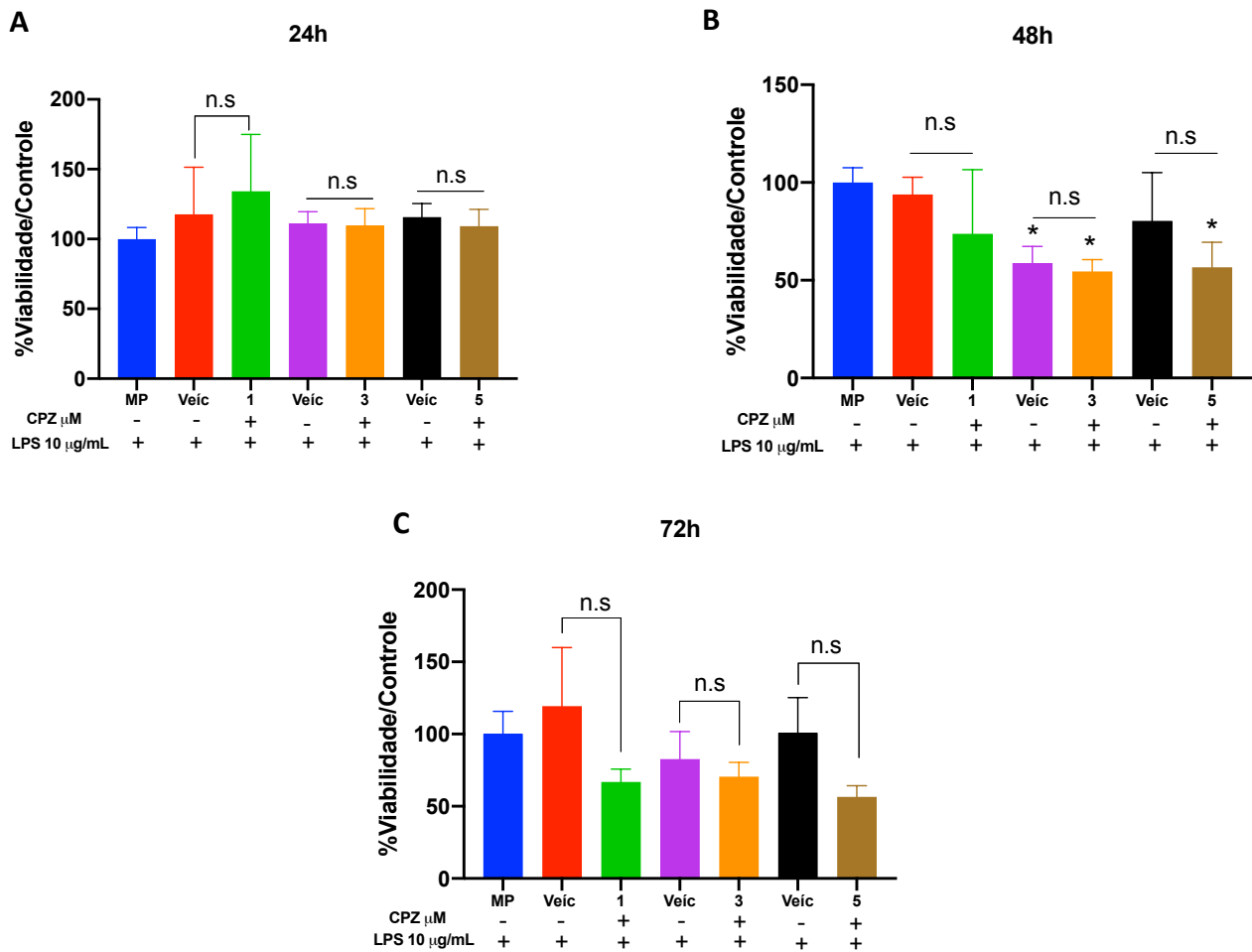
Fonte: a autora.

Legenda: A: Viabilidade de SCAPs tratadas com diferentes concentrações de CPZ após 24h; B: após 48h; C: após 72h.

Num segundo experimento, a viabilidade celular foi avaliada adicionando, além da CPZ, LPS (10 μg/mL). Nos grupos estimulados apenas com CPZ não foi observada diferença estatística na viabilidade celular ao compará-los ao controle (MP). Entretanto, quando SCAPs foram expostas ao LPS, após tratamento com CPZ (3 e 5 μM), observou-se redução na viabilidade celular no período de 48h, quando comparados ao grupo controle. Redução semelhante foi observada no

grupo tratado com quantidade de veículo equivalente ao utilizado na CPZ 3 μ M (Figura 5.25).

Figura 5.25 – Viabilidade celular de SCAPs após tratamento com diferentes concentrações de CPZ e ativação com LPS (10 μ g/mL)



Fonte: a autora.

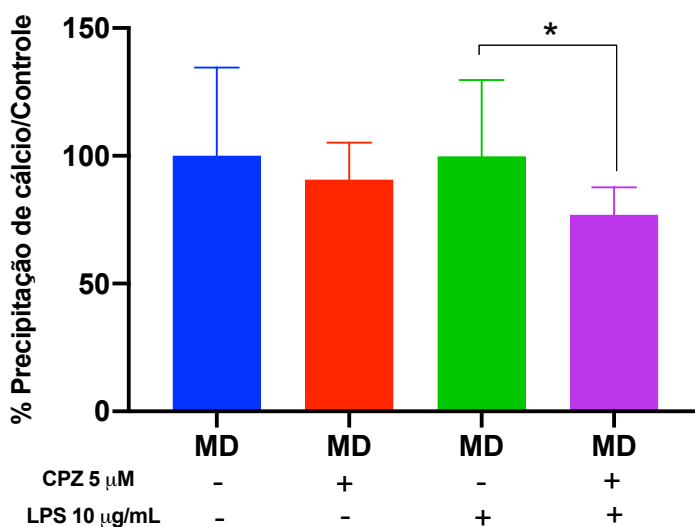
Legenda: A: Viabilidade de SCAPs tratadas com diferentes concentrações de CPZ e LPS após 24h; B: após 48h; C: após 72h.

*: Diferença significativa quando comparado ao grupo Controle ($p < 0.05$).

5.3.2.2 Diferenciação osteo/odontogênica

A formação de depósitos de cálcio foi detectada utilizando o ensaio Vermelho de Alizarina S. SCAPs foram tratadas com CPZ (5 μ M) na presença ou ausência de LPS. Não observou-se diferença quando os grupos foram comparados ao controle (sem tratamento). Ao comparar-se os grupos tratados com LPS (com e sem CPZ), observou-se uma redução significativa na deposição de cálcio no grupo tratado com CPZ, apesar de não haver diferença em relação ao controle (Figura 5.26).

Figura 5.26 – Diferenciação osteo/odontoblástica em SCAPs tratadas com CPZ (5 μ M).



Fonte: a autora.

SCAPs foram mantidas em meio de diferenciação (MD) e tratadas com CPZ na concentração de 5 μ M. Análise da quantificação de cálcio detectada por meio de ensaio de Alizarina S.

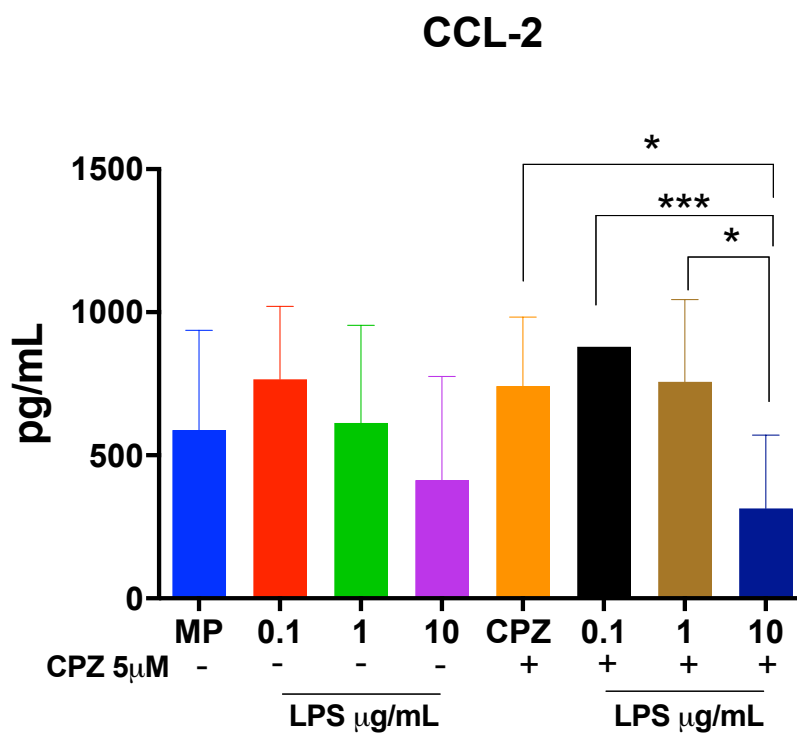
*: Diferença significativa entre os grupos identificados ($p < 0.05$).

5.3.2.3 Produção de MCP-1/CCL-2 e OPG por SCAPs

A detecção da produção de MCP-1/CCL2 e OPG foi realizada através do ensaio ELISA, após 24 horas de estímulo celular com CPZ e/ou LPS em diferentes concentrações.

Não foram observadas diferenças significantes na produção de MCP-1/CCL-2 após 24h ao comparar-se os grupos experimentais com o controle (MP). Observou-se diferença estatística apenas entre os grupos estimulados com CPZ, conforme ilustra a figura 5.27.

Figura 5.27 - Produção de CCL-2 (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com CPZ e/ou LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 µg/mL), após 24h

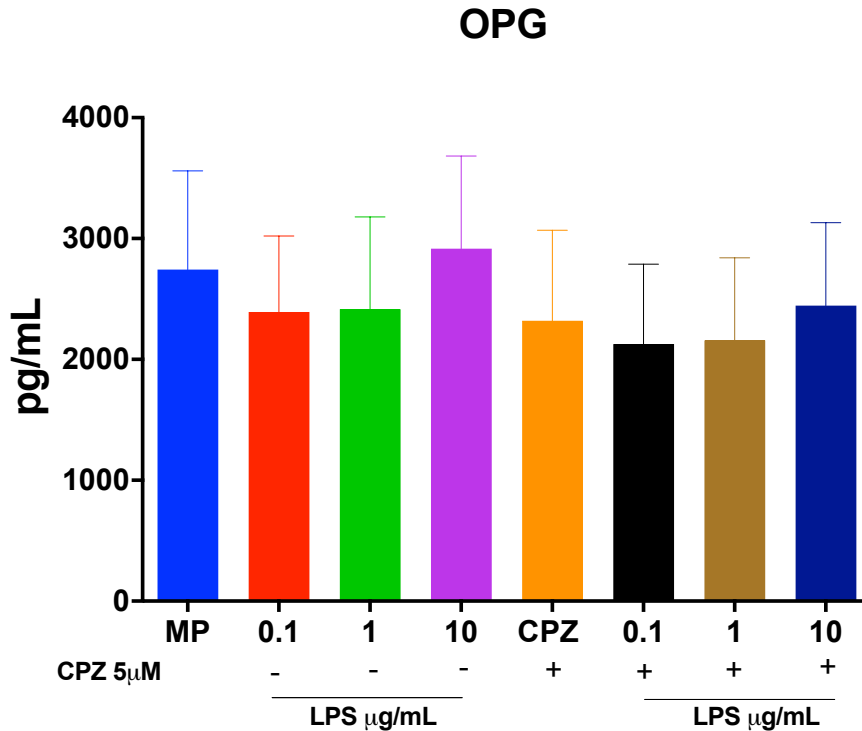


Fonte: a autora.

*, **, ***: Diferença significativa entre os grupos identificados ($p < 0.05$).

Em relação à produção de OPG, não foram observadas diferenças significantes ao comparar-se os grupos experimentais com o controle (MP) ou os grupos entre si (Figura 5.28).

Figura 5.28 - Produção de OPG (pg/mL) pelas células da papila apical em Meio de Proliferação (MP) estimuladas com CPZ e/ou LPS em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$), após 24h



5.4 FASE 4

5.4.1 Papel dos ECbs em SCAPs *in vitro*

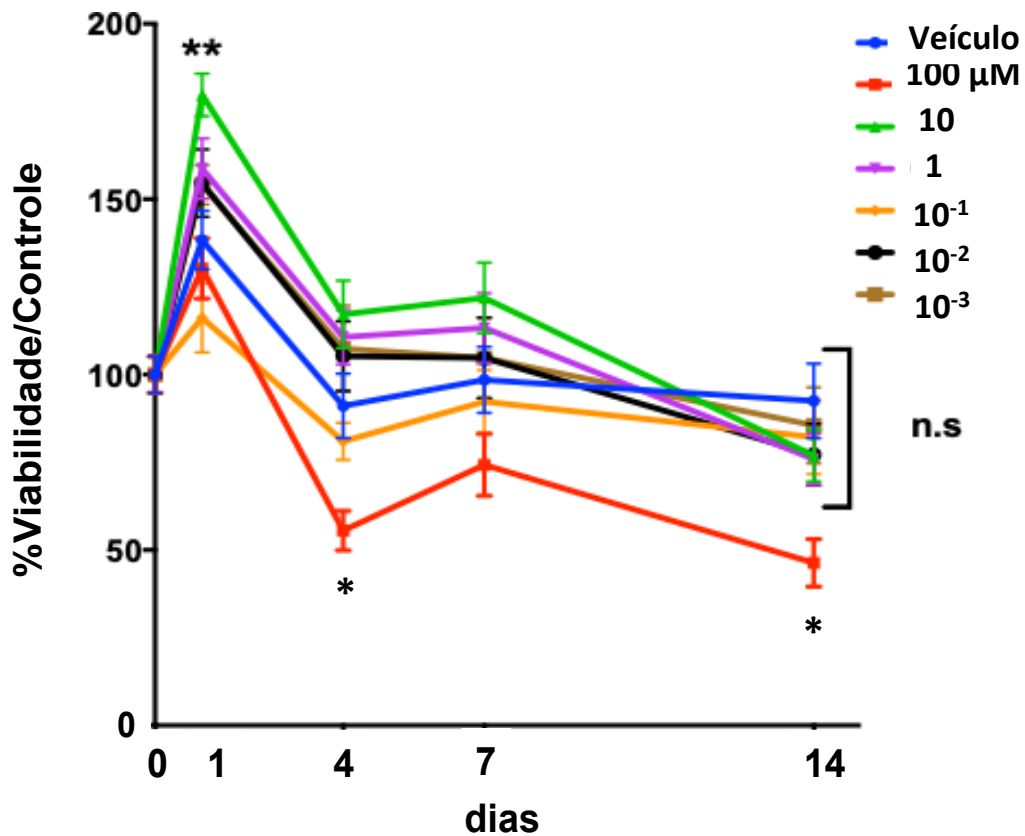
5.4.1.1 Viabilidade celular

O primeiro experimento realizado nesta pesquisa com ECbs exógenos e SCAPs foi o ensaio piloto de viabilidade celular, utilizando AEA em 6 diferentes concentrações. O objetivo foi definir as 2 maiores concentrações que permitissem no mínimo 50% de viabilidade celular após os períodos experimentais de 1, 4, 7 e 14 dias, realizado com OZBlue.

Observou-se um aumento na viabilidade celular após 24h no grupo tratado com AEA 1 μM quando comparado ao grupo controle, composto por MP + veículo utilizado na diluição de AEA (etanol). No grupo estimulado com AEA 100 μM

observou-se redução significativa na viabilidade celular após 4 e 14 dias quando comparado ao grupo controle. As demais concentrações não apresentaram diferença estatística em nenhum dos períodos, quando comparadas ao controle (Figura 5.29). A partir deste ensaio, definiram-se as concentrações de 100 e 10 μ M de AEA para serem empregadas nos próximos experimentos. Estas 2 concentrações selecionadas foram testadas também para 2AG.

Figura 5.29 – Ensaio piloto para avaliar a viabilidade celular de SCAPs tratadas com AEA em 6 concentrações



Fonte: a autora.

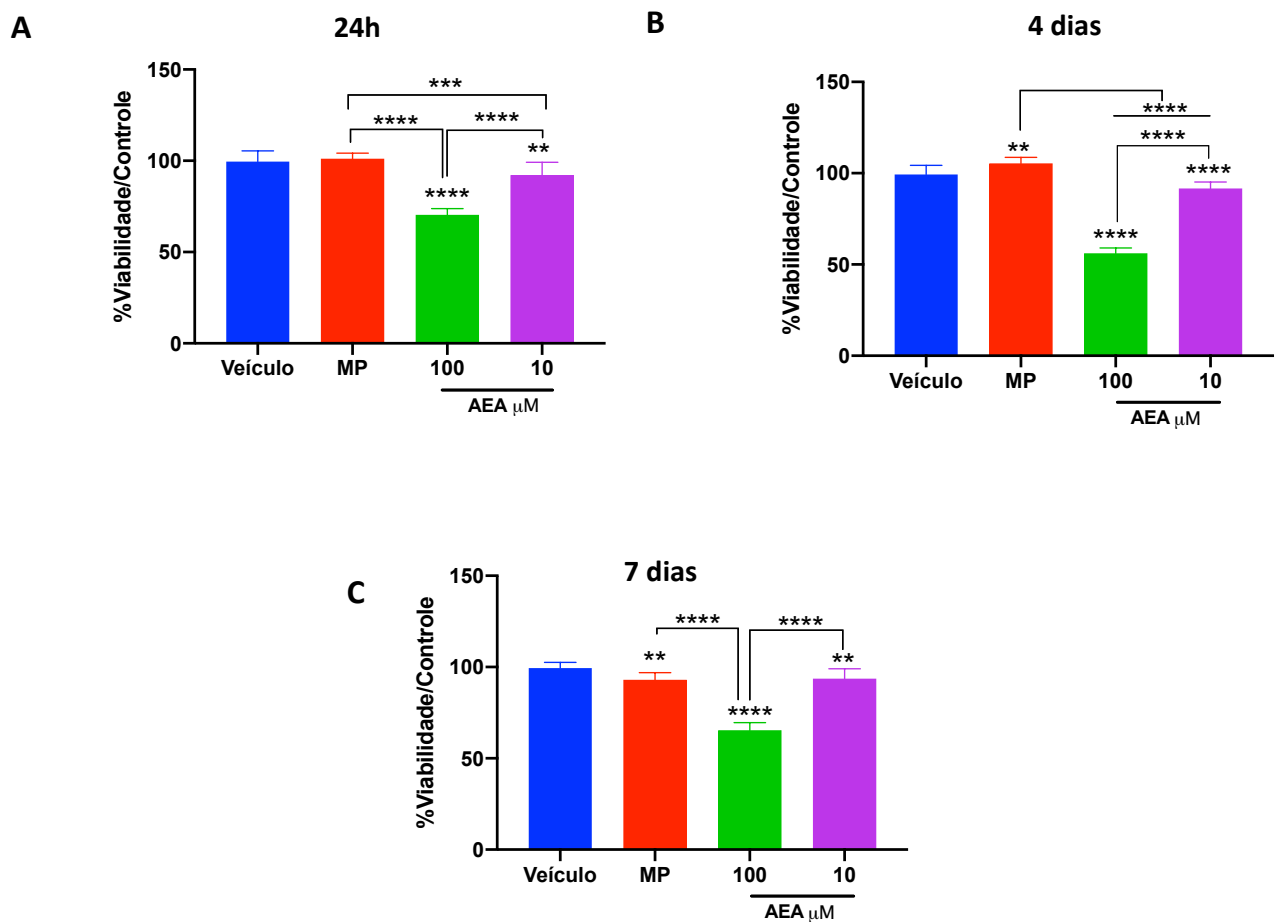
Viabilidade SCAPs após tratamento com 6 concentrações de AEA durante 1, 4 7 e 14 dias.

*, **: Diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo controle (veículo). (p < 0.05).

No segundo ensaio de viabilidade utilizou-se o Cell Titer Glo nos períodos de 1, 4 e 7 dias tanto para AEA quanto 2-AG (100 e 10 μ M). Observou-se redução na

viabilidade celular em ambas as concentrações de AEA nos 3 períodos experimentais, quando comparadas ao controle. Além disso, observou-se diferença entre as 2 concentrações de AEA em todos os períodos, sendo que 100 μ M promoveu maior redução na viabilidade de SCAPs, quando comparada a 10 μ M (Figura 5.30).

Figura 5.30 – Ensaio de viabilidade celular de SCAPs após tratamento com AEA



Fonte: a autora.

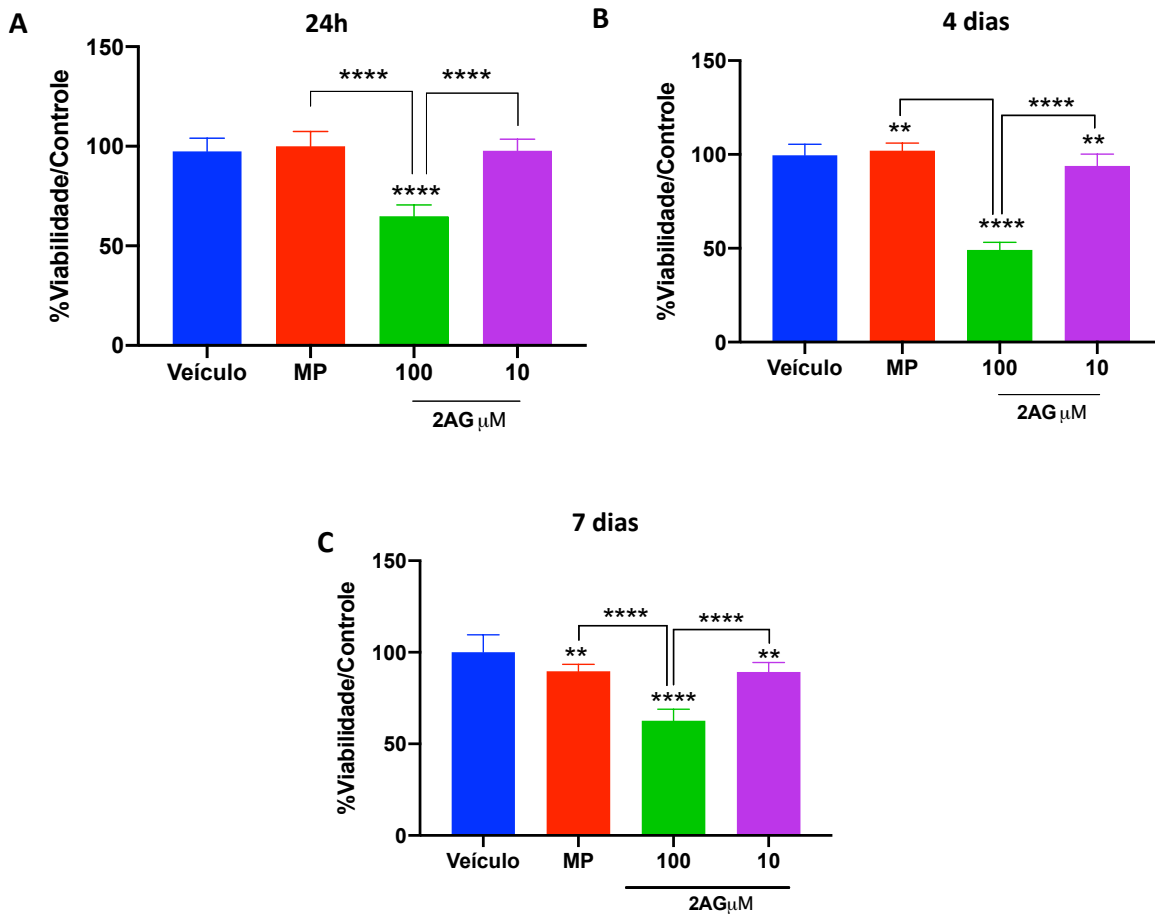
Viabilidade de SCAPs após tratamento com 2 concentrações de AEA nos períodos de A: 24h; B: 4 dias; C: 7 dias. O veículo utilizado para diluir a AEA foi utilizado como controle.

** , ****: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP+veículo), ou diferença entre os grupos identificados ($p < 0.05$).

No caso de 2-AG, observou-se uma redução na viabilidade celular dos grupos tratados com as 2 concentrações do endocanabinóide em todos os períodos

experimentais, exceto para o grupo 2-AG 10 μ M após 24h, que não apresentou diferença em relação ao controle, mas apresentou aumento na viabilidade quando comparado à concentração de 100 μ M (Figura 5.31). Nos demais períodos observou-se diferença estatística entre as 2 concentrações de 2-AG utilizadas, sempre com a menor concentração apresentando uma maior viabilidade celular quando comparada à maior concentração.

Figura 5.31 – Ensaio de viabilidade celular de SCAPs após tratamento com 2-AG



Fonte: a autora.

Viabilidade de SCAPs após tratamento com 2 concentrações de 2-AG nos períodos de A: 24h; B: 4 dias; C: 7 dias. O veículo utilizado para diluir a AEA foi utilizado como controle.

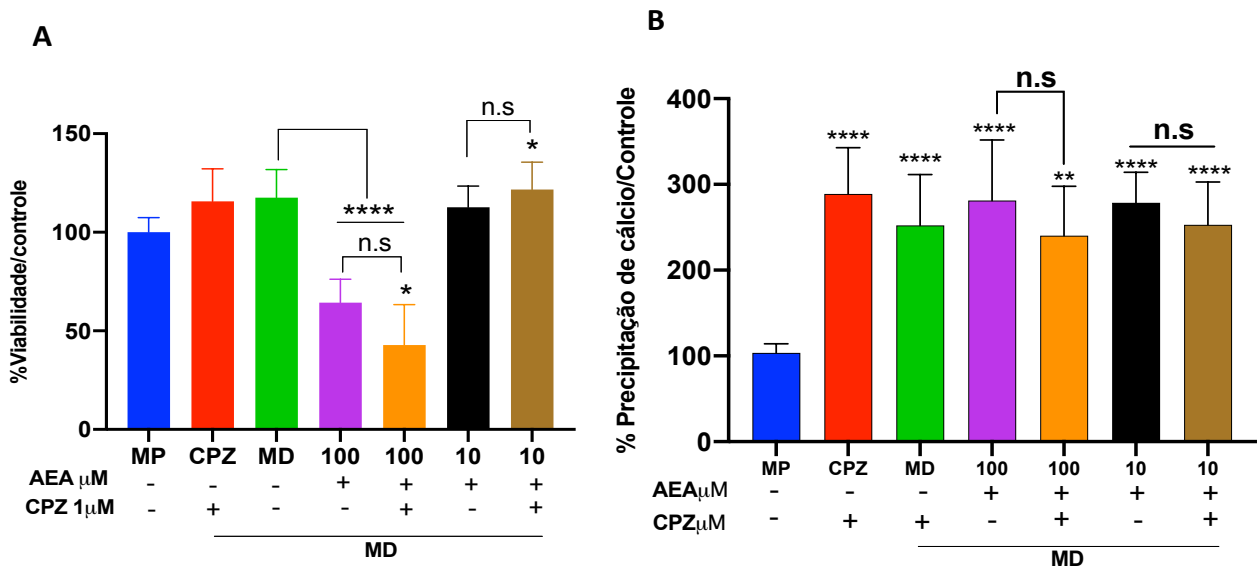
, **: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP+veículo) ou diferença entre os grupos identificados ($p < 0.05$).

5.4.1.2 Diferenciação celular

A deposição de cálcio foi avaliada através do ensaio vermelho de Alizarina S após 14 dias, com o objetivo de determinar o papel de ECbs exógenos no processo de diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs, bem como a influência do receptor TRPV-1 neste processo. Previamente à realização da coloração de alizarina foi realizado o ensaio OZBlue, após 14 dias, para avaliação da viabilidade celular entre os grupos. A partir dos resultados deste experimento, a quantificação da deposição de cálcio foi normalizada de acordo com o número celular.

Após 14 dias, no experimento em que se utilizou AEA, todos os grupos experimentais apresentaram maior deposição de cálcio quando comparados ao grupo controle (MP), independentemente do tratamento com CPZ (Figura 5.32). Estes resultados sugerem que não houve envolvimento do receptor TRPV-1 neste processo, já que a utilização da CPZ não promoveu alterações nos resultados deste ensaio.

Figura 5.32 – Ensaio de viabilidade e diferenciação celular SCAPs estimuladas com AEA após 14 dias.



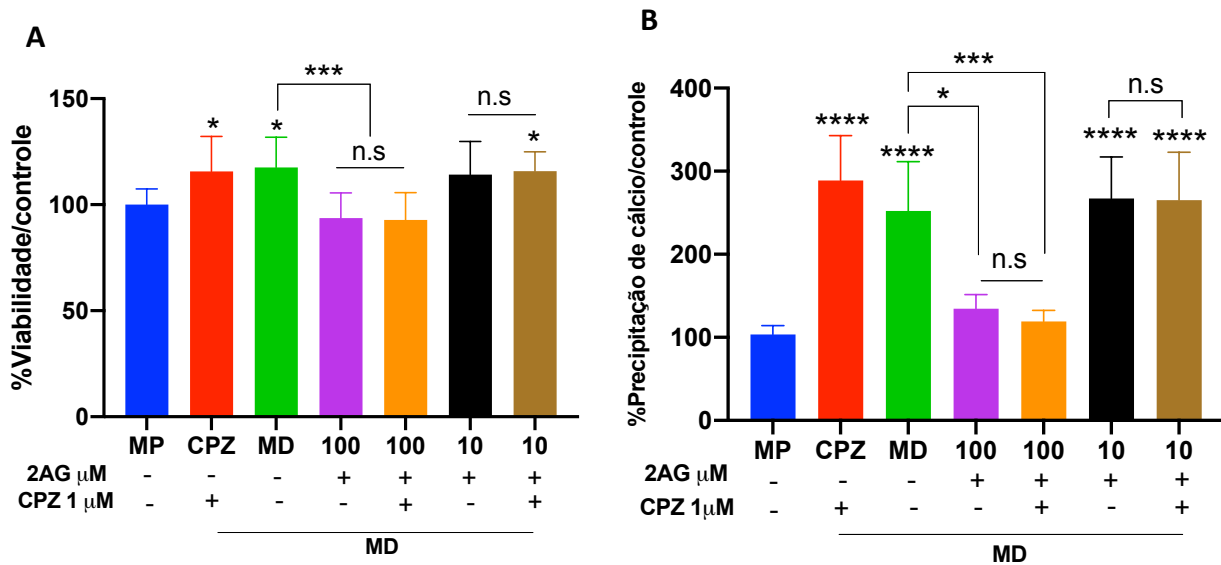
Fonte: a autora.

A: Viabilidade celular (OZBlue) após tratamento com AEA e/ou CPZ; B: Quantificação da deposição de cálcio (Alizarina S) após normalização de acordo com o número de células.

*, **, ***, ****: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ou entre grupos ($p < 0.05$).

Já em relação ao experimento com 2-AG, observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram maior deposição de cálcio quando comparados ao grupo controle (MP), exceto os grupos estimulados com a maior concentração de 2-AG (100 μ M), que não apresentaram diferença em relação ao controle (MP), independentemente de CPZ. Estes dois grupos apresentaram diferença estatística em relação ao grupo MD, com uma redução significativa na deposição de cálcio (Figura 5.33). Como não foram observadas diferenças em relação à deposição de cálcio entre os grupos com e sem utilização de CPZ, sugere-se que a diferenciação ou inibição induzida por 2-AG não tenha envolvimento de TRPV-1.

Figura 5.33 – Ensaio de viabilidade e diferenciação celular SCAPs estimuladas com 2-AG após 14 dias



Fonte: a autora.

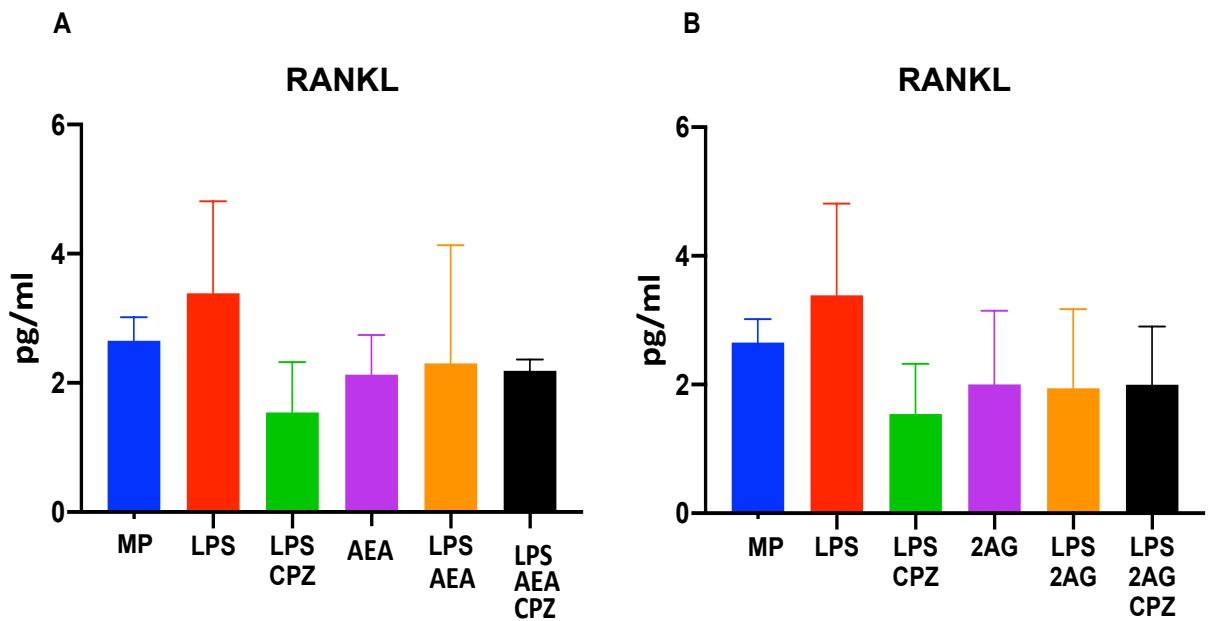
A: Viabilidade celular (OZBlue) após tratamento com 2-AG e/ou CPZ; B: Quantificação da deposição de cálcio (Alizarina S) após normalização de acordo com o número de células.

*, ***, ****: Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (MP) ou entre grupos ($p < 0.05$).

5.4.1.3 Detecção da produção de citocinas inflamatórias

A quantificação da produção de citocinas foi realizada através do ensaio Luminex/Multiplex. Não foram observadas diferenças significativas na produção de RANKL e TNF- α por SCAPs entre os grupos experimentais após tratamento com os ECbs, com ou sem bloqueio farmacológico de TRPV-1, utilizando CPZ (Figura 5.34 e Figura 5.35).

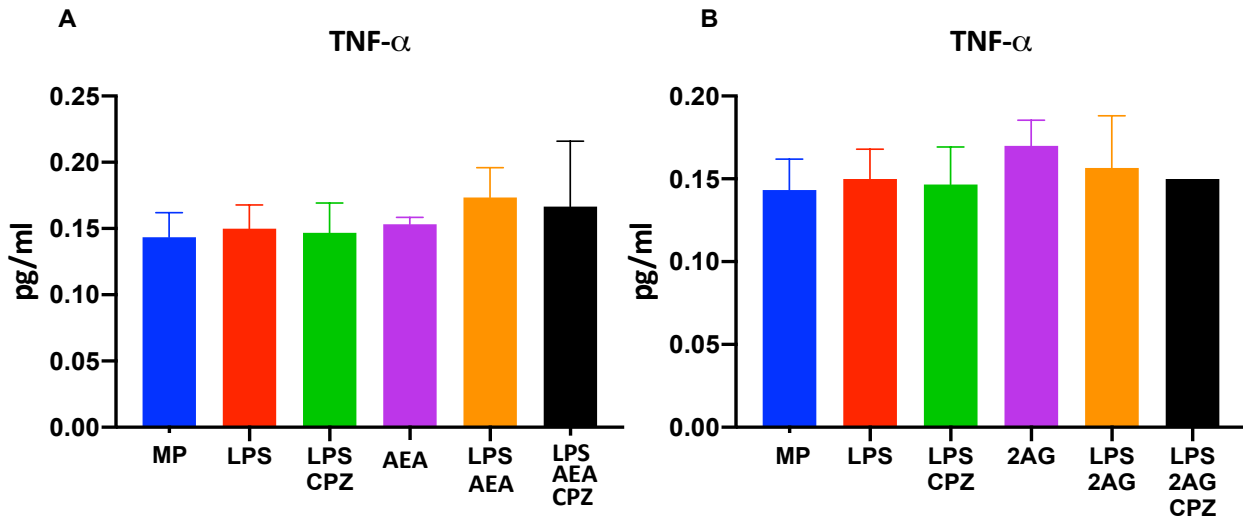
Figura 5.34 – Quantificação da produção de RANKL por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h



Fonte: a autora.

Produção de RANKL após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

Figura 5.35 – Quantificação da produção de TNF- α por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h.

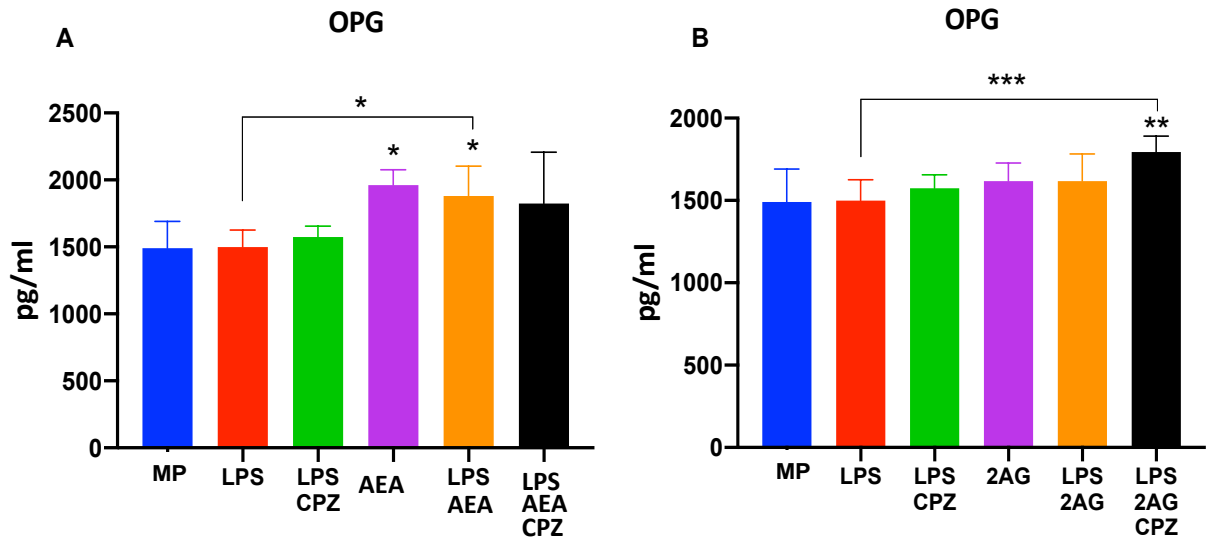


Fonte: a autora.

Produção de TNF- α após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

Quando a produção de OPG foi avaliada, observou-se um aumento na sua produção nos grupos estimulados com AEA com e sem LPS, quando comparados ao grupo controle (Figura 5.36). Ao compararem-se os grupos experimentais entre si, observou-se aumento na produção de OPG no grupo estimulado com AEA + LPS, em relação ao grupo estimulado somente com LPS. No experimento utilizando 2-AG, o único grupo que apresentou diferença estatística em relação ao controle foi o grupo estimulado com 2-AG+LPS+CPZ, apresentando um aumento na produção de OPG. Este grupo também apresentou um aumento significativo na produção de OPG ao ser comparado com o grupo tratado apenas com LPS.

Figura 5.36 – Quantificação da produção de OPG por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h



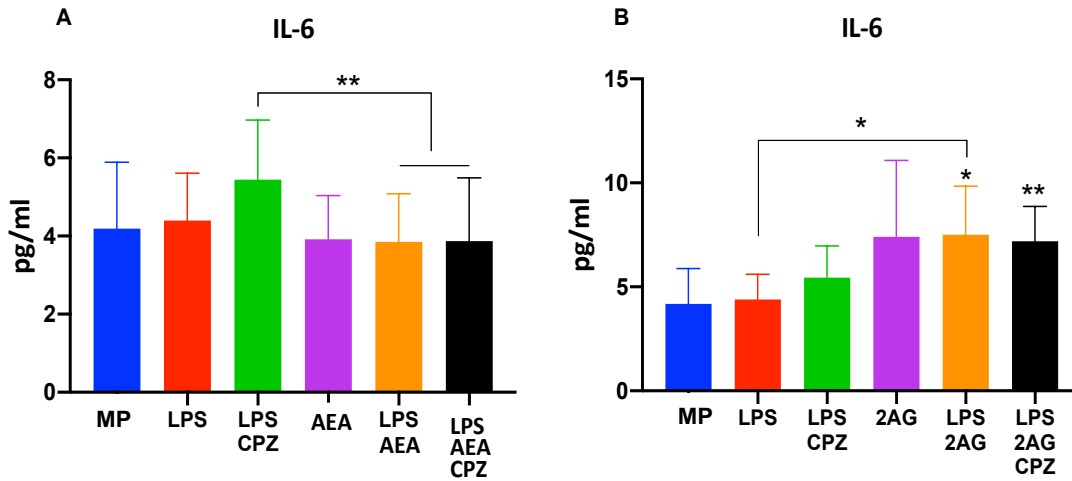
Fonte: a autora.

Produção de OPG após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

*, **, ***: Diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo controle ou entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

SCAPs apresentaram uma redução significativa na produção de IL-6 nos grupos estimulados com AEA+LPS na presença ou ausência de CPZ, quando comparados ao grupo estimulado com CPZ+LPS. Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa ao ser comparado com o grupo controle. No experimento com 2AG observou-se redução significativa na produção de IL-6 nos grupos tratados com 2AG + LPS, com ou sem CPZ, em comparação ao grupo controle. Ocorreu aumento na produção de IL-6 no grupo tratado com 2AG + LPS, quando comparado ao grupo tratado somente com LPS (Figura 5.37).

Figura 5.37 – Quantificação da produção de IL-6 por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h



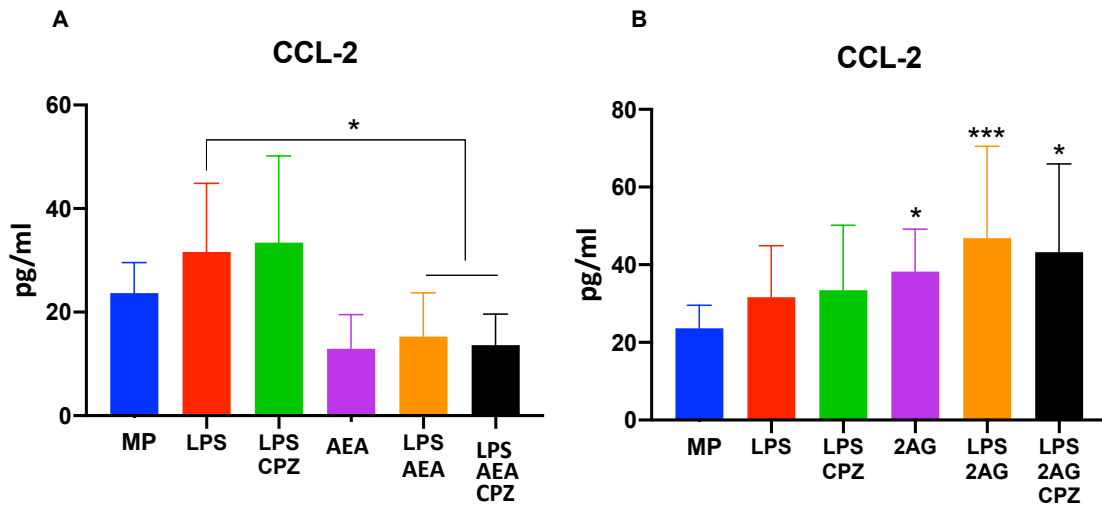
Fonte: a autora.

Produção de IL-6 após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

*, **: Diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo controle ou entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

A produção de CCL-2 no experimento utilizando AEA não apresentou diferença significativa quando os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle. Observou-se redução na produção desta citocina nos grupos tratados com AEA+LPS com ou sem CPZ, em relação ao grupo tratado somente com LPS. Já no experimento utilizando 2AG observou-se aumento significativo na produção de CCL-2 nos grupos 2AG, 2AG+LPS com ou sem CPZ, quando comparados ao grupo controle (Figura 5.38).

Figura 5.38 – Quantificação da produção de CCL-2 por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h



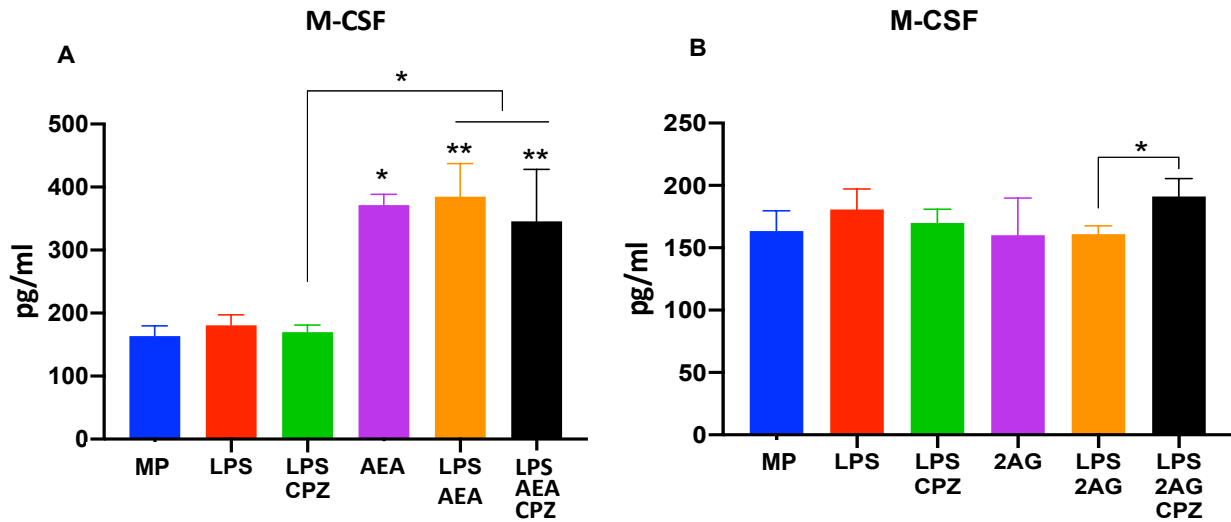
Fonte: a autora.

Produção de CCL-2 após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

*, ***: Diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo controle ou entre os grupos destacados ($p < 0.05$)

Houve um aumento significativo na produção de M-CSF em todos os grupos tratados com AEA, comparados ao controle. Os grupos AEA+LPS com ou sem CPZ também apresentaram maior produção quando comparados ao grupo LPS+CPZ. Ao adicionar-se CPZ ao grupo tratado com 2AG+LPS observou-se um aumento significativo na produção de M-CSF (Figura 5.39).

Figura 5.39 – Quantificação da produção de MCS-F por SCAPs após tratamento com AEA, 2-AG, LPS e CPZ, por 24h



Fonte: a autora.

Produção de MCS-F após tratamento de SCAPs com A: AEA (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h; B: 2-AG (10 μ M), LPS (1 μ g/mL) e CPZ (1 μ M), por 24h.

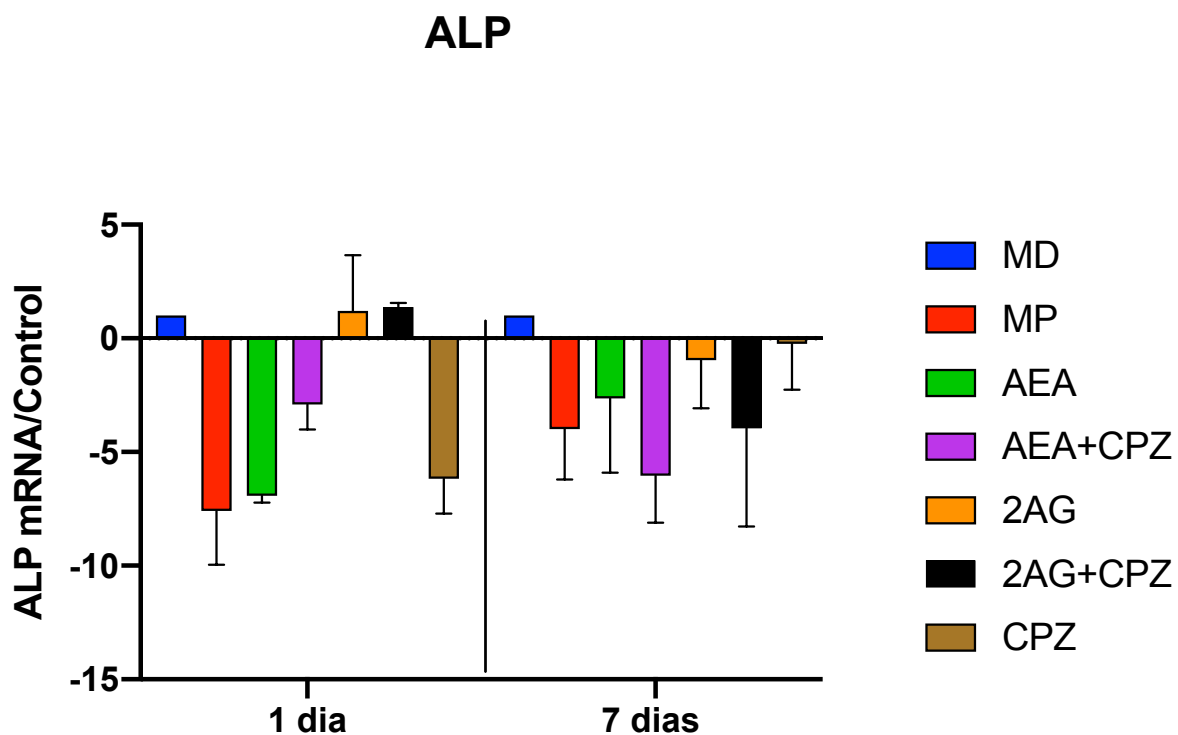
*, **: Diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo controle ou entre os grupos destacados ($p < 0.05$).

5.4.1.4 Detecção da expressão gênica de marcadores de mineralização

Neste ensaio, a expressão gênica dos marcadores de mineralização osteo/odontogênica e cementoblástica, além de TGF- β , foram avaliados após tratamento de SCAPs com ECbs exógenos (100 μ M) com ou sem o bloqueio farmacológico de TRPV-1, nos períodos experimentais de 24h e 7 dias. O grupo controle é representado por SCAPs tratadas apenas com MD.

Em relação à expressão gênica de ALP não foi observada alteração na expressão em nenhum dos grupos experimentais nos períodos de 1 e 7 dias (Figura 5.40).

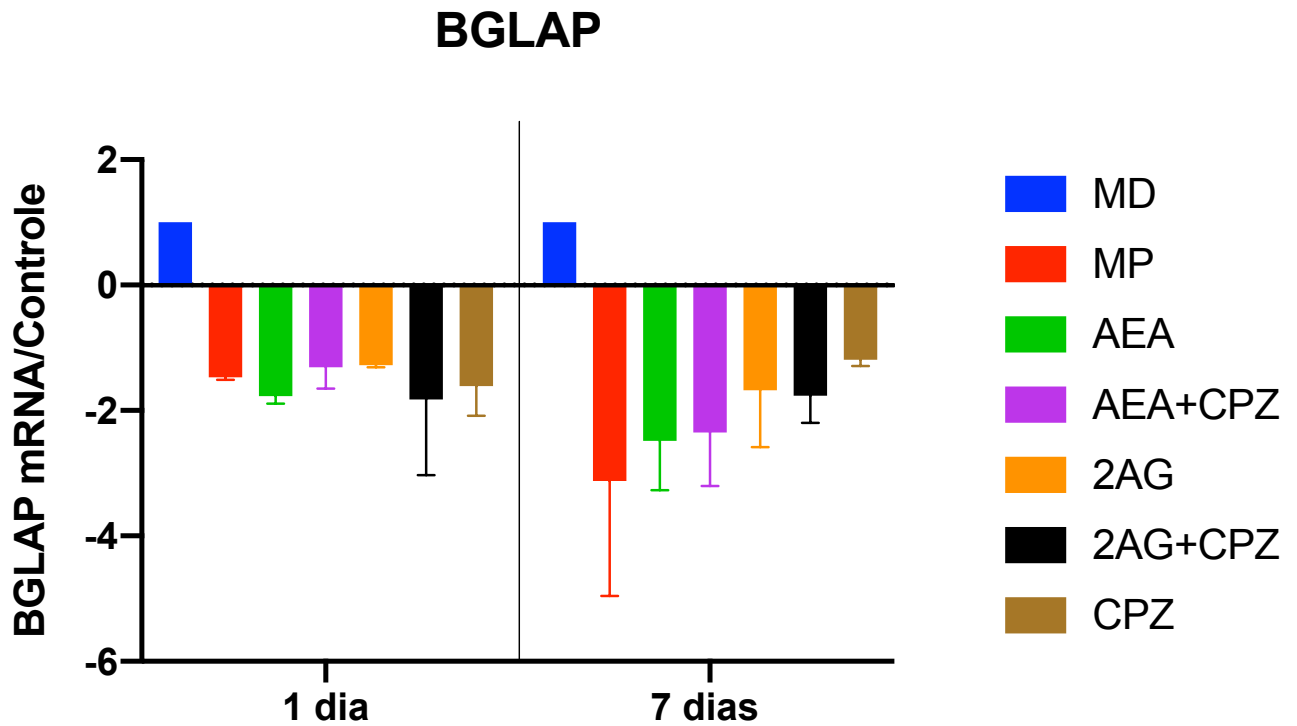
Figura 5.40 – Expressão gênica de ALP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



Fonte: a autora.

Não ocorreu alteração na expressão gênica de BGLAP em nenhum dos grupos experimentais quando comparados ao controle, após 1 e 7 dias. Não houve diferença na expressão gênica de um mesmo grupo nos diferentes períodos (Figura 5.41).

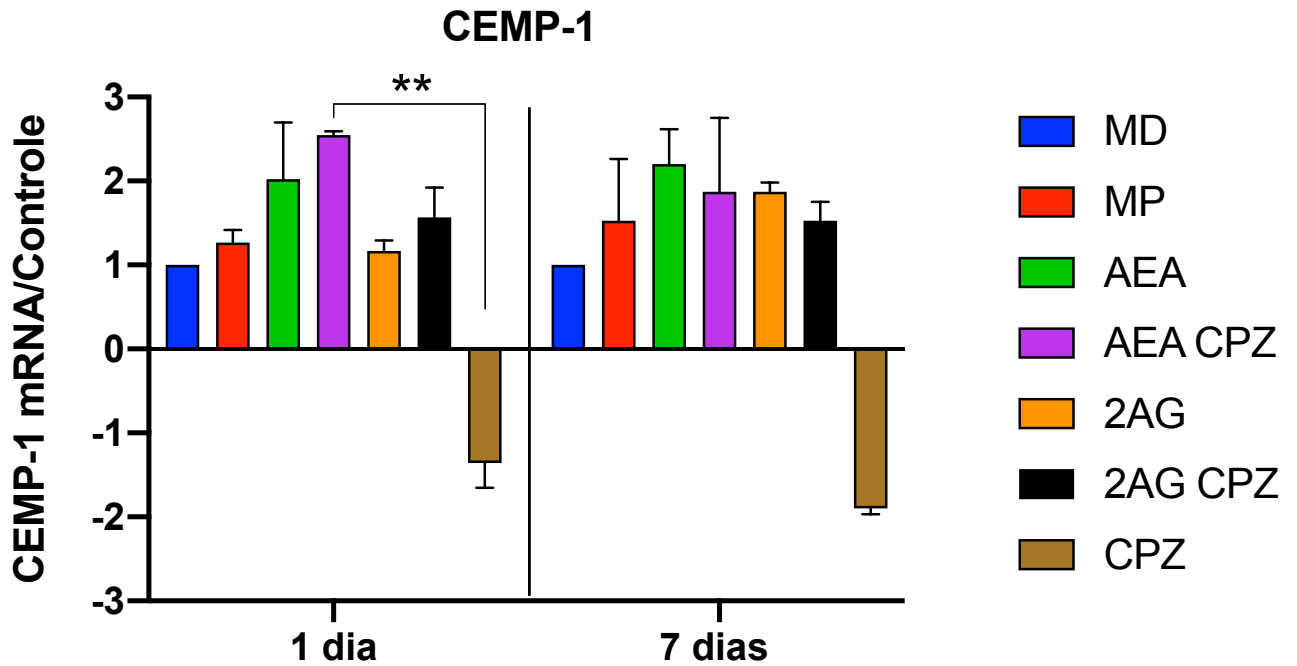
Figura 5.41 – Expressão gênica de BGLAP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



Fonte: a autora.

Em relação à expressão gênica de CEMP-1 não foram observadas diferenças significantes quando os grupos experimentais foram comparados ao controle. Porém, observou-se uma redução significativa na expressão de CEMP-1 no grupo tratado com CPZ, quando comparado ao grupo estimulado com AEA+CPZ no período de 1 dia (Figura 5.42).

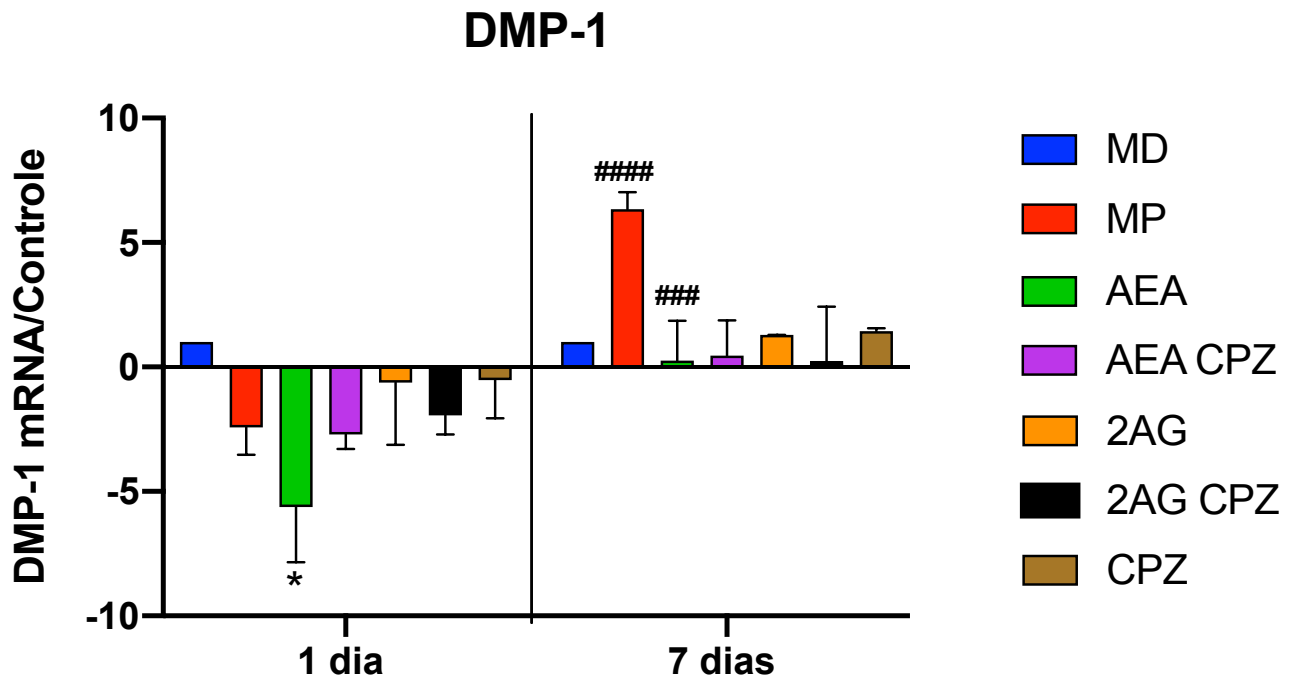
Figura 5.42 – Expressão gênica de CEMP-1 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



** : Diferença significativa entre os grupos destacados ($p < 0.05$)

Observou-se redução na expressão de DMP-1 no grupo estimulado com AEA quando comparado ao controle, no período de 1 dia. Além disso, ao analisar-se a expressão de DMP-1 no grupo MP nos 2 períodos experimentais, observou-se um aumento significativo na sua expressão após 7 dias. O mesmo padrão foi observado ao comparar o grupo AEA nos 2 períodos experimentais (Figura 5.43).

Figura 5.43 – Expressão gênica de DMP-1 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



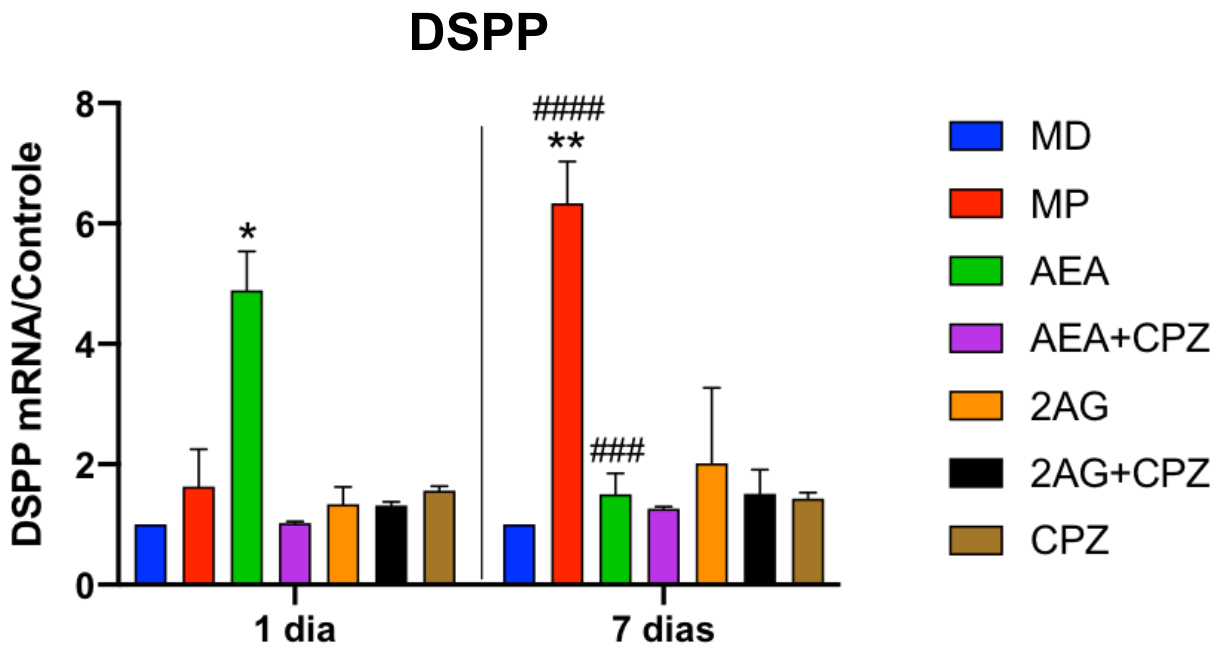
Fonte: a autora.

*: Diferença significativa em relação ao controle (MD) ($p < 0.05$).

###, ####: Diferença significativa entre o mesmo grupo no período de 24h ($p < 0.05$).

A expressão de DSPP aumentou significativamente no grupo AEA no período de 24h em relação ao controle. No período de 7 dias observou-se aumento na expressão de DSPP no grupo estimulado com MP quando comparado ao controle no mesmo período, e ao mesmo grupo no período de 24h. Ao comparar-se a expressão de DSPP no grupo tratado somente com AEA nos 2 períodos, observou-se uma redução na expressão no período de 7 dias em relação ao período de 24h (Figura 5.44).

Figura 5.44 – Expressão gênica de DSPP por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



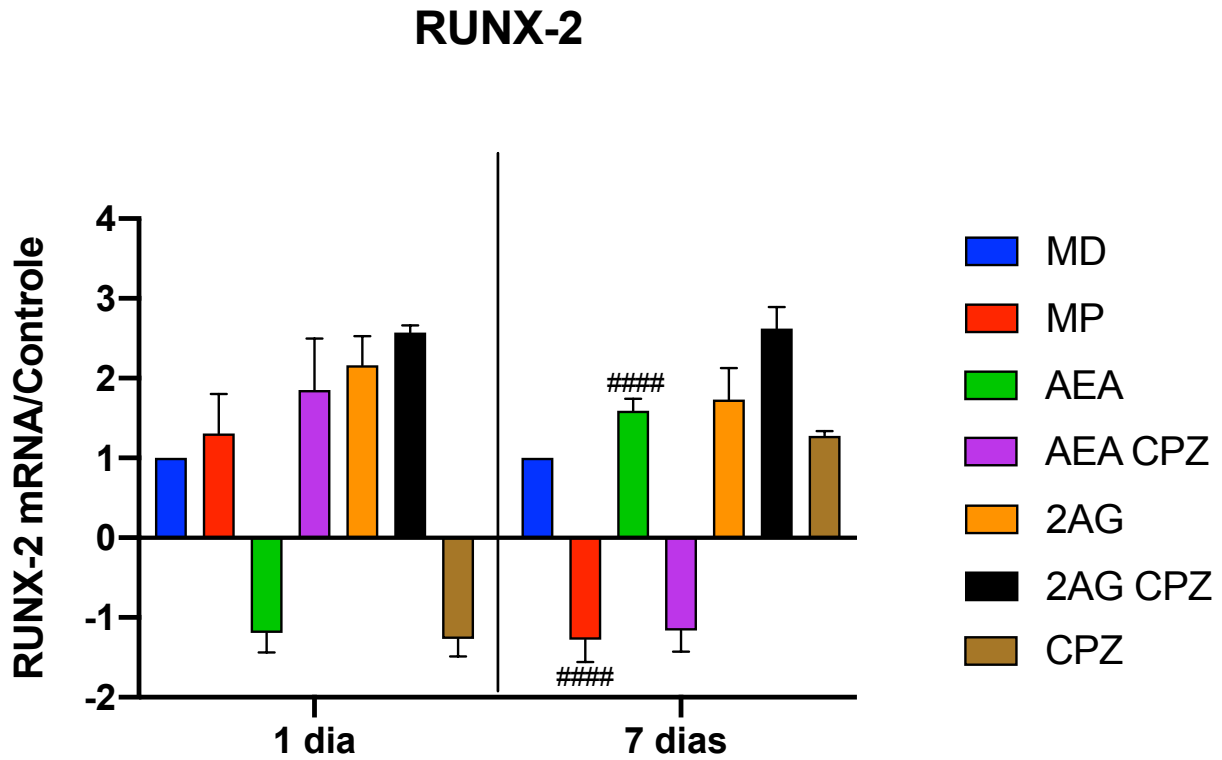
Fonte: a autora.

*, **: Diferença significativa em relação ao controle (MD) ($p < 0.05$).

###, ####: Diferença significativa entre o mesmo grupo no período de 24h ($p < 0.05$).

Não houve diferença na expressão de RUNX-2 em nenhum dos grupos quando comparados ao controle, em ambos períodos experimentais. No período de 7 dias ocorreu uma redução na expressão de RUNX-2 no grupo tratado com MP quando comparado ao mesmo grupo, no período de 24h. Já no grupo tratado com AEA observou-se um aumento na expressão de RUNX-2 no período de 7 dias, se comparado ao mesmo grupo no período de 24h (Figura 5.45).

Figura 5.45 – Expressão gênica de RUNX-2 por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ

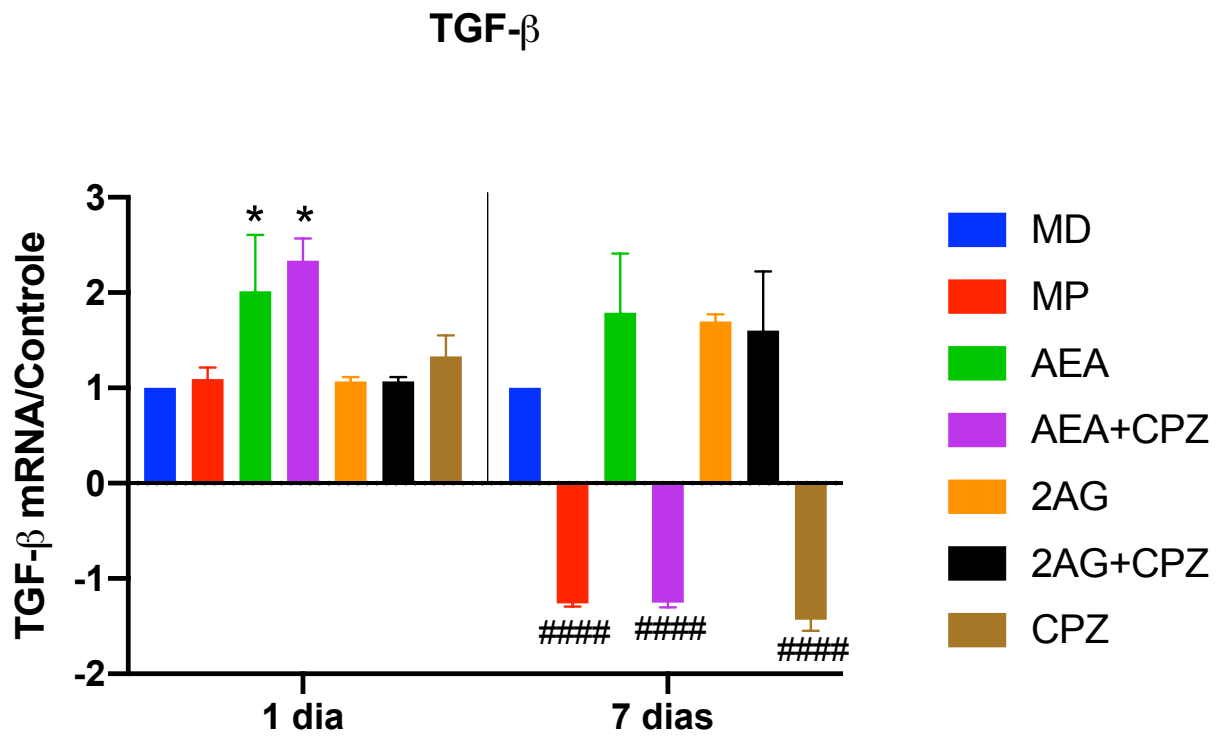


Fonte: a autora.

####: Diferença significativa entre o mesmo grupo no período de 24h ($p < 0.05$).

A expressão de TGF- β aumentou nos grupos tratados com AEA (com e sem CPZ) no período de 1 dia, comparado ao controle. Após 7 dias observou-se uma redução da expressão nos grupos estimulados MP, AEA+CPZ e CPZ quando comparados aos mesmos grupos no período de 24h (Figura 5.46)

Figura 5.46 – Expressão gênica de TGF- β por SCAPs após tratamento com ECbs e CPZ



Fonte: a autora.

*: Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$).

#####: Diferença significativa entre o mesmo grupo no período de 24h ($p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

A papila apical tem sido estudada e descrita na literatura como uma potencial fonte de células-tronco, denominadas SCAPs, importantes durante a rizogênese e terapia endodôntica regenerativa (Sonoyama et al., 2008; Lovelace et al., 2011). Este tratamento é indicado em casos de necrose pulpar e rizogênese incompleta, como uma alternativa ao tratamento denominado apicificação, possibilitando a continuação e conclusão da formação radicular, quando bem sucedido (Iwaya et al., 2001).

A caracterização celular de SCAPs nesta pesquisa foi realizada de duas formas: fenotípica e funcionalmente. A caracterização fenotípica foi realizada através de imunomarcagem e citometria de fluxo para identificação dos marcadores de superfície expressos por estas células, em concordância com outros estudos (Sonoyama et al. 2006; Bakopoulou et al., 2013). A caracterização funcional foi realizada através da demonstração do potencial de diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs, empregando o ensaio vermelho de Alizarina S, como realizado em estudos prévios da literatura (Sonoyama et al., 2006; Huang et al., 2010; Nada; Backly, 2018).

A imunomarcagem citometria de fluxo neste trabalho apresentou resultados semelhantes aos descritos por Schneider et al. (2014) para os marcadores STRO-1 (5 e 6%, respectivamente) e CD24 (5,5 e 5,9%), porém, diferentes dos obtidos por Sonoyama et al. (2006) para o marcador STRO-1 (12%). As primeiras caracterizações de SCAPs relatadas na literatura eram baseadas principalmente na expressão deste marcador (Sonoyama et al. 2008), indicativo da origem mesenquimal destas células (Huang et al. 2008). Entretanto, logo comprovou-se que as células positivas para STRO-1 representavam apenas uma pequena subpopulação de SCAPs (Bakopoulou et al., 2011; Wu et al., 2012), justificando sua baixa porcentagem de expressão para este marcador. CD-24 é considerado um marcador indicativo de pluripotencialidade, diretamente relacionado a SCAPs e exclusivamente expresso por estas células (Liu et al., 2016), mesmo que em baixas concentrações, como observado em nosso trabalho e em concordância com outros estudos (Ding et al., 2010; Zhang et al., 2014; Meneses et al., 2020). Em relação ao CD 146, marcador de células-tronco perivasculares, no presente trabalho observou-

se uma maior expressão (85,5%) quando comparado aos trabalhos de Schneider et al. (2014) (75,6%) e Egusa et al. (2012) (72,3%), e em concordância com os valores obtidos por Bakopoulou et al. (2015). Estas divergências podem estar relacionadas à heterogenicidade das populações de SCAPs selecionadas para a caracterização fenotípica, influenciada pelo seu perfil dinâmico, dependendo da passagem em que se encontram, diferenciação e ativação (Ruparel et al., 2013).

As condições microambientais do elemento dental nas quais SCAPs estão inseridas, bem como a presença de infecção local, tem potencial para interferir em funções celulares como proliferação e diferenciação (Lertchirakarn; Aguilar, 2017), influenciando os resultados de tratamentos regenerativos. Para avaliar o papel de antígenos bacterianos nas funções celulares, é comum a estimulação de SCAPs com diferentes concentrações de LPS em experimentos *in vitro* (Marcal et al., 2010; Kato et al., 2014). Já foi demonstrado que baixas concentrações de LPS não promovem alterações nas taxas de proliferação e diferenciação celular (Lertchirakarn; Aguilar, 2017), corroborando outros trabalhos que demonstram a capacidade de sobrevivência de SCAPs diante de infecções no sistema de canais radiculares (Tobias Duarte et al., 2014; Chrepa et al., 2017). Entretanto, a concentração de LPS presente em um canal infectado é de difícil quantificação e não apresenta consenso na literatura. Já foi estimada entre 0,001 e 0,1µg/mL, podendo apresentar valores bem mais elevados, dependendo do método utilizado para coleta e quantificação (Martinho et al., 2011; Marinho et al., 2012), incluindo valores entre 0,48 e 4,421µg/mL (Jacinto et al., 2005). Para o desenvolvimento deste estudo, foi empregada uma versão comercial de LPS de *Escherichia coli* com fins de padronização e para possibilitar reproduções futuras. Apesar de não ser um microrganismo prevalente em infecções endodônticas, possui sua endotoxina estrutural e biologicamente semelhante à do *Fusobacterium nucleatum*, microrganismo prevalente em infecções endodônticas (Okahashi et al., 1988; Onoue et al., 1996). O estímulo com LPS de *E.coli*, tanto em meio de proliferação como diferenciação, não afetou a viabilidade de SCAPs em nosso estudo. Já o potencial de diferenciação celular aumentou quando o LPS na concentração de 0,1 µg/mL foi utilizado, se comparado ao controle. Este achado confirma a possibilidade de alteração no padrão de diferenciação celular diante de um processo infeccioso, em concordância com outros autores (Lertchirakarn; Aguilar, 2017; Seeley; Ghosh, 2017). Lertchirakarn e Aguilar (2017) não observaram alteração no potencial de

diferenciação de SCAPs empregando diferentes concentrações de LPS de *P. gingivalis*, após 7 dias, utilizando a concentração máxima de 5 µg/mL. Os autores relataram uma maior expressão de BSP no grupo tratado com LPS (5 µg/mL), estimulando um padrão osteogênico de diferenciação celular. Este achado poderia sugerir uma justificativa para o fato de que os tecidos mais comumente observados no interior do canal radicular após procedimentos regenerativos são tecidos cementóides ou osteóides (Nosrat et al., 2015). Sabe-se que os efeitos do LPS na proliferação e diferenciação celular podem ser influenciados por fatores como: tipo celular, fonte bacteriana do LPS e concentração da endotoxina empregada (Lertchirakarn; Aguilar, 2017); portanto, LPS de diferentes fontes podem promover efeitos antagônicos no mesmo tipo celular, assim como diferentes tipos celulares podem responder de maneira diferente ao mesmo LPS (Chatzivasileiou et al., 2013; Kato et al., 2014). Nossos resultados iniciais fortalecem a procura por mediadores inflamatórios potencialmente envolvidos na inibição da diferenciação, neste contexto.

Em uma revisão, Diogenes e Hargreaves (2017) destacaram a importância da compreensão do efeito de antígenos microbianos, como o LPS, remanescentes nas paredes de canais radiculares após a realização dos protocolos de descontaminação em casos de revascularização. Os autores alertam a comunidade científica para a necessidade de investigações dentro deste contexto.

Após a avaliação da influência de diferentes concentrações de LPS nas funções de SCAPs, analisamos a produção de citocinas por estas células através de ensaio ELISA, após exposição ao LPS, para caracterizar a resposta inflamatória a este antígeno. Sabe-se que a exposição de SCAPs às citocinas inflamatórias pode promover alterações em suas funções celulares, dentre elas proliferação e diferenciação, ressaltando a importância do impacto da inflamação no prognóstico dos tratamentos regenerativos (Liu et al., 2016). Uma das citocinas analisadas foi MCP-1/CCL-2, relacionada ao recrutamento de monócitos/macrófagos para sítios inflamatórios, ativando a quimiotaxia de células de defesa para a região, sendo esta uma resposta importante para eliminar os patógenos através da fagocitose (Deshmane et al., 2009). Observamos que as concentrações de 1 e 10 µg/mL de LPS promoveram um aumento na produção de CCL-2 por SCAPs após 24h, quando comparadas ao grupo controle. A presença desta citocina já foi demonstrada em áreas relacionadas à infecção endodôntica, como lesões periapicais (Rahimi et al., 1995; Marcal et al., 2010), e o aumento na sua concentração já foi constatado em

células pulpares, na presença de LPS (Jiang et al., 2003), o que corrobora nossos achados em SCAPs.

O desenvolvimento das lesões periapicais depende da interação estabelecida entre os antígenos microbianos e a resposta imune do hospedeiro, resultando na produção de citocinas inflamatórias e posterior reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína envolvida nos processos de remodelação óssea, e sua menor expressão em áreas de lesões periapicais já foi previamente demonstrada por Kawashima et al. (2007). Em nosso trabalho, observamos que SCAPs produzem OPG na ausência de antígenos microbianos, e que há uma redução nesta produção em grupos estimulados com LPS (0,1 e 10 µg/mL), quando comparados ao controle, após 24h. Este achado indica que o LPS tem potencial para alterar a produção de mediadores importantes para a remodelação óssea, podendo favorecer a diferenciação osteoclástica, devido à redução na produção de OPG, e, conseqüentemente, favorecer a instalação de processos reabsortivos. Kikuchi et al. (2001) observaram que o LPS é capaz de estimular diretamente os osteoblastos a expressarem RANKL, resultando em maior diferenciação osteoclástica.

A instalação e desenvolvimento de processos inflamatórios no organismo (Rettori et al., 2012) pode levar à produção de componentes do ECS, exercendo importante papel na modulação de funções celulares (Berdyshev et al., 1997). O ECS já foi caracterizado em diferentes tipos celulares, porém, ainda não havia sido demonstrado em SCAPs, ressaltando o caráter inédito de nossa pesquisa. A expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese e degradação de ECbs foi observada em SCAPs estimuladas com concentrações de até 10 µg/mL de LPS, com MD ou MP. A expressão da enzima NAPE-PLD, que participa da síntese de AEA foi observada em todos os períodos experimentais desta pesquisa. Por outro lado, a expressão da enzima FAAH, que participa da degradação deste endocanabinóide, foi observada apenas no período experimental de 24 horas.

Apesar da detecção das enzimas, não foi detectada a expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 em nossas amostras, independentemente do período experimental. A expressão gênica de CB1 em odontoblastos humanos já foi caracterizada em experimentos *in vitro* (Que et al., 2017), bem como a expressão e ativação de CB1 e CB2 em DPSCs (Tsumura et al., 2012), podendo estar associados a processos fisiológicos como reparo tecidual (Miyashita et al., 2012).

Segundo Ofek et al. (2006), não houve expressão de CB2 em células mesenquimais de medula óssea até que as mesmas tivessem sido cultivadas em meio osteogênico durante 20 dias, quando passaram a expressar este receptor. Uma hipótese para a ausência de expressão dos receptores em nossas amostras é que, semelhantemente às células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea (Ofek et al., 2006), SCAPs não expressem CB1 e CB2 nas condições específicas reproduzidas neste estudo. Outra hipótese é que os ECbs poderiam ativar receptores em SCAPs além dos receptores canabinóides, como por exemplo, o TRPV-1, que é um receptor vanilóide (Galiegue et al., 1995; Scutt; Williamson, 2007), cuja expressão gênica foi demonstrada na presente pesquisa.

A expressão do receptor TRPV-1 foi detectada em nossas amostras em todos os períodos experimentais analisados. Ocorreu redução significativa na expressão deste receptor no grupo estimulado com MP+LPS (10 µg/mL) no período de 3 dias, quando comparado ao controle. Sabe-se que uma das vias de ativação de TRPV-1 é o receptor toll-like 4 (TLR-4), após estímulo com LPS, cujo mecanismo já foi previamente relatado na literatura utilizando neurônios sensoriais trigeminais (Diogenes et al., 2011). Logo, poderia-se prever um aumento na sua expressão nos grupos tratados com LPS, o que não foi observado. A não coincidência entre o momento de expressão gênica e o período experimental avaliado podem ser possíveis explicações para os resultados.

Há evidências de que AEA ative TRPV-1 direta ou indiretamente via metabólitos da lipoxigenase, sendo que este agiria como um integrador molecular de estímulos térmicos e físicos, exercendo importante papel na hiperalgesia inflamatória (Scutt; Williamson, 2007; Saito et al., 2010). Considerando que houve expressão gênica da enzima responsável pela síntese de AEA (NAPE-PLD) nas amostras em todos os períodos experimentais, e supondo que tenha ocorrido a produção endógena de AEA, esta pode ter exercido influência na expressão gênica de TRPV-1. A afinidade e potência de AEA por TRPV-1 é aumentada pela inibição de FAAH (enzima responsável pela degradação de AEA) em certos tecidos (Ross, 2003). Na presente pesquisa observou-se a expressão de FAAH apenas no período experimental de 24 horas. Este fato pode ter contribuído para o aumento da disponibilidade de AEA, e, conseqüentemente, para o aumento da ativação de TRPV-1 pela mesma, em situações específicas. Devido à sua afinidade tanto por CB1 quanto por TRPV-1, AEA é considerada um endocanabinóide e endovanilóide

(Ross, 2003). Além dos ECbs, outras substâncias podem ativar os receptores TRPV-1, como metabólitos oxidados do ácido linoleico. Estas substâncias são liberadas após dano celular causado por elevadas temperaturas, ativando TRPV-1, que participa da resposta hiperalgésica e proinflamatória (Partwardhan et al. 2010) .

Devido à sua similaridade com ácidos graxos poliinsaturados, AEA pode ser utilizada como substrato por enzimas como lipoxigenases e cicloxigenases, originando metabólitos bioativos potentes (Yu et al., 1997). Neste processo, a enzima COX-2, por exemplo, participaria da oxidação de AEA, obtendo-se como produto final a Prostaglandina E₂ Etanolamida (Yu et al., 1997; Kozak et al., 2004). Este processo demonstra a existência de uma via mediada por COX-2 no metabolismo de AEA, com geração de metabólitos que representam uma nova classe de prostaglandinas. Yu et al. (1997), em estudo, sugerem 3 justificativas principais para este processo: 1: representa um mecanismo fisiológico alternativo para inativação de AEA; 2: via para síntese de novas prostaglandinas e 3: modulação de prostaglandinas locais pela AEA, via COX-2. Em células ativadas por LPS ocorre um aumento na expressão de COX-2, previamente relatada em estudos de nosso grupo (Meneses et al., 2020) e, possivelmente, aumento no metabolismo de AEA por esta via ao invés da convencional, pela enzima FAAH, possivelmente justificando sua expressão em apenas 1 dos períodos experimentais de nosso estudo.

Após a demonstração de expressão gênica do receptor TRPV-1 em SCAPs, realizamos o tratamento das células com o antagonista de TRPV-1 (capsazepina) para quantificação das citocinas produzidas, através de ensaio ELISA. Neste experimento, não se observou diferença na produção de OPG nos diferentes grupos analisados. Takita et al. (2007) demonstraram que o tratamento de osteoblastos e células da medula óssea com capsaicina (agonista de TRPV-1) pode levar a uma significativa redução ou total inibição na formação de osteoclastos, dependendo de sua concentração. Este efeito, segundo os autores, se deve à inibição na expressão de RANKL (mRNA) observada em células tratadas com IL-1, na presença de capsaicina. Os autores concluem neste estudo que a capsaicina poderia contribuir para a inibição na formação de osteoclastos através da supressão na expressão de RANKL. Já Sooampon et al. (2013a) observaram uma maior expressão de OPG, sem afetar a expressão de RANKL, em células de ligamento periodontal humano

tratadas com capsaicina. Baseados nestes estudos, poderia-se supor que o tratamento com capsazepina (antagonista de TRPV-1), promoveria efeitos antagônicos aos promovidos pela ativação deste receptor, ou seja, a redução na produção de OPG. Entretanto, este resultado não foi observado em nossos estudos após tratamento de SCAPs com CPZ, na presença ou ausência de LPS. Diferentes resultados podem estar relacionados ao microambiente no qual as células estão inseridas, bem como o tipo celular utilizado.

Deve-se considerar ainda o efeito da concentração de SBF utilizado nestes estudos, que pode promover alterações no padrão de síntese protéica e expressão gênica em células humanas, justificando diferentes resultados obtidos em estudos (van der Valk et al., 2018).

As 2 concentrações de AEA e 2-AG utilizadas neste trabalho promoveram uma redução na viabilidade de SCAPs quando comparadas ao controle em todos os períodos experimentais (Figura 5.30 e 5.31), exceto no grupo estimulado com 2-AG (10 μ M) no período de 24h, que não apresentou diferença quando comparado ao controle (Figura 5.31). É interessante ressaltar que, em todos os períodos experimentais, a redução na viabilidade promovida pelos ECbs foi concentração-dependente, sendo observadas diferenças entre os grupos, ao comparar ambas concentrações. Maccarrone et al. (2000) relataram um efeito apoptótico de AEA em células humanas de neuroblastoma e linfoma, via TRPV-1. Quando AEA ativa um receptor vanilóide, ocorre inicialmente um aumento na concentração intracelular de cálcio, ativação da cicloxagenase e lipoxagenase, redução do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo C e ativação de caspases, levando à apoptose. Já quando AEA ativa um receptor canabinóide ocorre a ativação de seu transportador de membrana (*Anandamide Membrane Transporter* - AMT), internalização do endocannabinóide e subsequente clivagem do mesmo em ácido araquidônico e etanolamina, via FAAH, contribuindo para a inibição de eventos apoptóticos. A partir dos resultados deste estudo, pode-se sugerir que os ECbs tenham ativado TRPV-1, exercendo efeitos apoptóticos sobre SCAPs. Diferentemente, Hofmann et al. (2014) observaram que o tratamento de células endoteliais com AEA (1 μ M) promoveu aumento na proliferação celular após 48 horas, e demonstraram que esta ativação ocorreu via TRPV-1. No presente estudo, não foi observada alteração na proliferação celular quando AEA foi utilizada na concentração de 1 μ M, em estudo piloto, quando comparado ao controle. Porém,

quando concentrações mais elevadas foram empregadas, os ECbs promoveram uma redução na proliferação celular, se comparados ao controle.

Ainda, considerando que o sítio de ligação para agonistas de TRPV-1 está localizado intracelularmente, a eficácia de AEA exógena na ativação deste receptor está relacionada à sua capacidade de entrada na célula (Ross, 2003). Os ECbs em concentrações mais elevadas provavelmente apresentem maior facilidade de entrada na célula, reduzindo a viabilidade de SCAPs. Diferentemente, as concentrações mais baixas produziram um menor efeito inibitório na viabilidade celular, possivelmente devido à menor eficiência de entrada na célula. Nossos achados estão em concordância com os de Hofmann et al. (2014), que observaram um efeito inibitório na proliferação de células endoteliais quando concentrações de AEA a partir de 10 μ M foram utilizadas. Porém, divergem dos achados de Smith et al. (2015) que não observaram diferença na viabilidade celular de osteoblastos humanos após tratamento com AEA (10 μ M) por 4 dias, se comparados ao controle. É importante ressaltar que os ECbs podem ter ativado receptores canabinóides, cujos sítios de ligação estão extracelularmente localizados, ou ainda outros receptores, previamente citados neste trabalho e não abordados diretamente em nossos ensaios. O fato de não observarmos expressão gênica de CB1 e CB2 em SCAPs neste estudo não indica a ausência deste receptor neste tipo celular, mas sim, a ausência de expressão nos períodos avaliados e condições reproduzidas neste estudo.

Os diferentes achados indicam que existem variações nos efeitos de ECbs sobre a proliferação celular, dependendo do receptor ativado, disponibilidade do AMT, tipo celular e concentração das substâncias utilizadas.

Quando o papel dos ECbs foi avaliado em relação à capacidade de diferenciação de SCAPs, observou-se maior deposição de cálcio em todos os grupos estimulados com AEA, independentemente do tratamento com CPZ, quando comparados ao controle (MP). Neste caso, é possível afirmar que AEA tenha um papel importante na diferenciação osteo/odontogênica de SCAPs, e que este mecanismo ocorre de maneira independente de TRPV-1, já que o tratamento com CPZ na presença de ECbs não promoveu alterações na deposição de cálcio. Quando SCAPs foram estimuladas apenas com CPZ, sem ECbs, também não se observou alteração na diferenciação celular, sugerindo que TRPV-1 não esteja ativado nesta condição ou que não esteja envolvido neste processo. Nossos

achados estão de acordo com os achados de Smith et al. (2015) que não observaram alteração na deposição de cálcio após tratamento de osteoblastos com AEA por 21 dias, comparado ao controle (MD+veículo). Em nossos ensaios prévios realizados apenas com CPZ e LPS, também não se observou redução na deposição de cálcio em relação ao controle (MD).

Em relação à 2-AG, observou-se inibição na diferenciação celular quando a maior concentração foi utilizada (100 μ M), independentemente da presença de CPZ. Já quando a concentração de 10 μ M foi utilizada, ocorreu um aumento na deposição de cálcio quando comparado ao controle (MP). Isto sugere que 2-AG desempenhe um papel importante na diferenciação celular, e que sua ação ocorra de maneira concentração-dependente, independentemente de TRPV-1. Smith et al. (2015) não observaram alteração na deposição de cálcio após 21 dias de estimulação de osteoblastos humanos com 2-AG em diferentes concentrações, quando comparados ao controle (MD+veículo). A concentração mais elevada utilizada no estudo anterior foi de 10 μ M, corroborando nossos achados em relação aos resultados do ensaio de diferenciação. Os autores observaram uma redução na produção de colágeno nos grupos tratados com 2-AG, considerado um marcador tardio da diferenciação de osteoblastos e arcabouço para a deposição de matriz óssea, e ressaltam que isto poderia implicar numa redução na produção de matriz óssea, *in vivo*. Já Scutt e Williamson (2007) observaram um aumento na produção de colágeno em BMSCs de ratos após estimulação com 2-AG em concentrações semelhantes, mas não observaram alterações neste parâmetro para MSCs. Além da diferença nos tipos celulares utilizados nestes estudos, o tempo de cultivo e o momento em que as células foram ativadas pelos ECbs (durante o plaqueamento ou ao atingir confluência) são fatores importantes a se considerar na análise de diferentes resultados (Smith et al., 2015).

No presente estudo, previamente à realização do ensaio Alizarina S realizou-se o ensaio de viabilidade celular, para avaliar a variação do número de células em cada grupo, ao final do experimento. Posteriormente, realizou-se a normalização dos valores correspondentes à deposição de cálcio com o número de células de cada grupo, com uma projeção dos resultados diante deste novo cenário. Este processo foi realizado para reduzir possíveis equívocos nas interpretações dos resultados da quantificação de cálcio, baseados somente no número final de células. Sabe-se que estes cálculos não equivalem à reprodução da realidade, porém,

diminuem o viés interpretativo, já que faz-se uma projeção de resultados com base no mesmo número final de células em todos os grupos. Outro fator a ser considerado é a influência das células não viáveis sobre as células remanescentes, presentes no mesmo ambiente. A liberação de diferentes moléculas após stress e dano celular oxidativo tem potencial para interferir no funcionamento das células remanescentes. Estas moléculas são denominadas padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs), e, ao serem liberadas para o meio extracelular podem ativar o sistema imunológico, desencadeando uma reação inflamatória e alterando o padrão de resposta das células viáveis a diferentes substâncias. Apesar do efeito pró-inflamatório, DAMPs também estão envolvidas no mecanismo de reparo após agressões (Vénéreau et al., 2015).

Em relação ao padrão de expressão gênica após estimulação com ECbs e/ou CPZ em meio osteogênico, não houve diferença significativa na expressão de CEMP-1 e RUNX-2 entre os grupos experimentais quando comparados ao controle (MD). Observou-se aumento na expressão do marcador odontoblástico DSPP no grupo tratado com AEA no período de 1 dia e redução na expressão do marcador osteoblástico DMP-1 neste grupo, no mesmo período, quando comparado ao controle. Esses resultados sugerem uma tendência de SCAPs em assumir um perfil odontoblástico, quando ativadas por AEA. Observou-se ainda um aumento na expressão de TGF- β 1 nos grupos estimulados com AEA (com ou sem CPZ), no período experimental de 1 dia, em relação ao controle. Este fator de crescimento é importante durante o desenvolvimento dental e já foi demonstrada sua capacidade de induzir a diferenciação odontoblástica de SCAPs (Unterbrink et al., 2002).

BGLAP é considerado um marcador tardio e específico para osteoblastos, relacionado à mineralização óssea (Silva et al., 2017). Em nosso estudo não houve diferença na expressão deste marcador nos diferentes grupos experimentais e períodos avaliados. Em relação à expressão gênica de ALP, proteína essencial para a mineralização óssea que promove aumento na concentração local de íons fosfato, auxiliando na formação de cristais de hidroxiapatita na matriz mineralizada, também não se observou diferença entre os grupos. Não foi possível estabelecer uma correlação entre expressão gênica destes marcadores de mineralização e os resultados do ensaio de Alizarina. No entanto, a ausência de correspondência entre expressão gênica e níveis protéicos é um fato já relatado na literatura, e pode ocorrer em cerca de 60% dos casos, por diferentes razões, como regulação pós-

transcricional e diferenças na estabilidade do RNA e da proteína analisada (Vogel et al., 2012).

Ossola et al. (2019) demonstraram que a estimulação de TRPV-1 reduziu a expressão de alguns biomarcadores osteogênicos críticos, demonstrando que o ECS emergiu como regulador essencial do metabolismo ósseo. Bari et al. (2011), diferentemente, não observaram influência do ECS na expressão de genes relacionados à diferenciação.

Sabe-se que o ECS pode exercer influência na produção de citocinas inflamatórias (Pacher; Kunos, 2013). Para quantificar esta produção, SCAPs foram estimuladas com ECbs (10 μ M) e/ou CPZ, na presença ou ausência de LPS. Para estes experimentos utilizou-se meio de proliferação com quantidade reduzida de SBF (1%) para que não houvesse superposição dos efeitos promovidos por este componente com aqueles promovidos pelas substâncias testadas (Widbiller et al., 2018). Diferentemente dos resultados obtidos em outros trabalhos, os nossos achados não apresentaram diferença estatística em relação à produção de TNF- α quando os grupos foram comparados ao controle (Zheng et al., 1992; Berdyshev et al., 1997; Gallily et al., 2000).

Quando avaliamos a produção de OPG no presente estudo, observamos um aumento na sua produção nos grupos estimulados com AEA (com ou sem LPS), quando comparados ao controle. Este mesmo efeito não foi observado quando a CPZ foi adicionada ao grupo tratado com AEA+LPS, sugerindo que o receptor TRPV-1 possa estar envolvido neste processo, e seu bloqueio impediu o aumento na produção de OPG, apesar de não haver diferença em relação ao controle. Ao avaliar os resultados do grupo tratado apenas com LPS, observa-se que, ao adicionar AEA, ocorre um aumento significativo na produção de OPG, sugerindo um efeito protetor de AEA em relação aos processos reabsortivos. Soampon et al. (2013b) também observaram, em estudo, que a ativação de TRPV-1 induziu à expressão de OPG em células de ligamento periodontal, de maneira dose-dependente. Os autores constataram ainda que a utilização de CPZ aboliu os efeitos da ativação de TRPV-1 sobre a expressão de OPG, comprovando que este processo ocorreu via TRPV-1. Estudos prévios demonstraram o papel regulador de TRPV-1 sobre a osteoclastogênese, observando-se uma redução na diferenciação osteoclástica quando o receptor TRPV-1 era ativado (Idris et al., 2008; Kobayashi et al., 2012). Quando a produção de RANKL foi analisada, não observou-se diferença

significativa entre os grupos. Conclui-se que AEA, ao aumentar a proporção de OPG sobre RANKL, possa contribuir para a redução na instalação de processos reabsortivos. Já no caso de 2-AG, observou-se aumento na produção de OPG apenas no grupo tratado com 2-AG+LPS +CPZ em relação ao controle, sugerindo que o bloqueio de TRPV-1 pela CPZ tenha contribuído para o aumento na produção desta proteína, na presença de 2-AG.

Em relação às citocinas IL-6 e CCL-2, observou-se um aumento na sua produção apenas em grupos tratados com 2-AG, e não com AEA, sugerindo que 2-AG possa exercer um papel pro-inflamatório, enquanto AEA atuaria como anti-inflamatório. Estes achados estão em concordância com os de Özdemir et al. (2014) que observaram um aumento na produção destas citocinas em células de ligamento periodontal quando 2-AG foi utilizado, na presença de LPS, mas não observaram os mesmos efeitos para AEA. Abidi et al. (2018) também relatam o papel anti-inflamatório de AEA em células de ligamento periodontal em relação à produção de citocinas inflamatórias, na presença de LPS.

Conclui-se que, diante das condições reproduzidas neste estudo, há expressão de todos os componentes do Sistema Endocanabinóide e de TRPV-1 em SCAPs, com exceção dos receptores canabinóides. O ECS é capaz de modular funções celulares como proliferação, diferenciação, expressão gênica e produção de citocinas inflamatórias. AEA apresenta efeitos inibitórios na proliferação celular de SCAPs, porém, apresenta efeito estimulatório na diferenciação celular, que ocorre independentemente de TRPV-1. A produção de algumas citocinas por SCAPs após estimulação com AEA pode ter envolvimento de TRPV-1. 2-AG apresenta papel inibitório na proliferação celular, porém, na diferenciação celular esses efeitos estão relacionados à sua concentração: altas concentrações inibem a diferenciação e baixas concentrações não interferem neste processo, que ocorre em via independente de TRPV-1. Não foi possível especificar qual foi o receptor ativado pelos ECbs durante os ensaios realizados neste estudo, sugerindo-se que determinadas funções celulares tenham ocorrido por via independente de TRPV-1.

Como próxima fase deste projeto, sugere-se a realização de ensaios *in vivo*, em modelo animal. Um estudo utilizando modelo de rizogênese incompleta poderia ser empregado para avaliação do papel do LPS e ECS no processo de interrupção da rizogênese e modulação de funções de SCAPs, utilizando grupos de animais KO para receptores canabinóides e TRPV-1, e silenciamento gênico destes receptores.

Com o estudo da capacidade de modulação de SCAPs pelo ECS *in vivo*, bem como sua relação com o processo de interrupção da rizogênese e resposta aos tratamentos endodônticos regenerativos, é possível determinar se os componentes deste sistema poderiam representar potenciais alvos durante a elaboração de futuros protocolos para tratamentos regenerativos.

7 CONCLUSÕES

Há expressão de componentes do ECS e TRPV-1 em SCAPs, porém, não foi observada expressão dos receptores canabinóides nas condições reproduzidas neste estudo.

Os ECbs apresentam potencial para modular diferentes funções celulares de SCAPs, dentre elas viabilidade, diferenciação, produção de citocinas e expressão gênica de marcadores de mineralização. O LPS não alterou a viabilidade celular e, dependendo da concentração, promoveu aumento no potencial de diferenciação de SCAPs.

REFERÊNCIAS¹

- Abidi AH, Presley CS, Dabbous M, Tipton DA, Mustafa SM, Moore BM, 2nd. Anti-inflammatory activity of cannabinoid receptor 2 ligands in primary hPDL fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2018 Mar;87:79-85. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.005.
- Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn.* 1997 Dec;210(4):383-96. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199712)210:4<383::AID-AJA3>3.0.CO;2-C.
- Albiero ML, Amorim BR, Martins L, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr., et al. Exposure of periodontal ligament progenitor cells to lipopolysaccharide from *Escherichia coli* changes osteoblast differentiation pattern. *J Appl Oral Sci.* Mar-Apr 2015;23(2):145-52. doi: 10.1590/1678-775720140334..
- Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol.* 2002 Jun;18(3):134-137. doi:10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x
- Bambirra W, Jr., Maciel KF, Thebit MM, de Brito LC, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heat shock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J Endod.* 2015 Jul;41(7):1085-90. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.002.
- 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.
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol.* 2013 Oct;58(10):1556-68. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.06.018. Epub 2013 Jul 18.
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. 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.
- Bakopoulou A, Kritis A, Andreadis D, Papachristou E, Leyhausen G, Koidis P, et al. Angiogenic potential and secretome of human apical papilla mesenchymal stem cells in various stress microenvironments. *Stem Cells Dev.* 2015 Nov 1;24(21):2496-512. doi: 10.1089/scd.2015.0197.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- Bari M, Tedesco M, Battista N, Pasquariello N, Pucci M, Gasperi V, et al. Characterization of the endocannabinoid system in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Jan;20(1):139-47. doi: 10.1089/scd.2009.0515.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 1997 Aug 22;277(5329):1094-7. doi: 10.1126/science.277.5329.1094.
- Berdyshev EV, Boichot E, Germain N, Allain N, Anger JP, Lagente V. Influence of fatty acid ethanolamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells. *Eur J Pharmacol.* 1997 Jul 9;330(2-3):231-40. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01007-8.
- Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1343-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.021.
- Böttcher DE, Scarparo RK, Batista EL, Jr., Fossati AC, Grecca FS. Histologic evaluation and immunohistochemical localization of STRO-1 and BMP-4 in rat immature teeth: a comparison between vital and induced pulp necrosis. *Arch Oral Biol.* 2013 Sep;58(9):1174-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.04.001. 65.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658.
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:257-90. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240.
- Brandau S, Jakob M, Hemedda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol.* 2010 Nov;88(5):1005-15. doi: 10.1189/jlb.0410207.
- Burnstock G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:1-30. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.052808.102215.
- Caires NCM, Espaladori MC, Tavares WLF, Brito LCN, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Influence of genetic regulatory effects modified by environmental immune activation on periapical disease. *Braz Oral Res.* 2019 Dec 2;33:e109. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0109.
- Carvalho CN, Wang Z, Shen Y, Gavini G, Martinelli JR, Manso A, et al. Comparative analyses of ion release, pH and multispecies biofilm formation between conventional and bioactive gutta-percha. *Int Endod J.* 2016 Nov;49(11):1048-1056. doi: 10.1111/iej.12558.

Chang HH, Chang MC, Wu IH, Huang GF, Huang WL, Wang YL, et al. Role of ALK5/Smad2/3 and MEK1/ERK signaling in transforming growth factor beta 1-modulated growth, collagen turnover, and differentiation of stem cells from apical papilla of human tooth. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1272-80. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.022.

Chang MC, Chen CY, Chang YC, Zhong BH, Wang YL, Yeung SY, et al. Effect of bFGF on the growth and matrix turnover of stem cells from human apical papilla: Role of MEK/ERK signaling. *J Formos Med Assoc*. 2020 Jan 10;S0929-6646(19)31156-8. doi: 10.1016/j.jfma.2019.12.013.

Chatzivasileiou K, Lux CA, Steinhoff G, Lang H. Dental follicle progenitor cells responses to *Porphyromonas gingivalis* LPS. *J Cell Mol Med*. 2013 Jun;17(6):766-73. doi: 10.1111/jcmm.12058.

Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):561-567. doi: 10.1016/j.joen.2016.09.024.

Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *J Oral Pathol Med*. 2012 Feb;41(2):186-93. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01065.x.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006 Dec;32(12):1205-13. doi: 10.1016/j.joen.2006.07.010.

Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):88-91. doi: 10.1097/00004770-200402000-00006.

Conde MC, Chisini LA, Demarco FF, Nör JE, Casagrande L, Tarquinio SB. Stem cell-based pulp tissue engineering: variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. *Int Endod J*. 2016 Jun;49(6):543-50. doi: 10.1111/iej.12489.

Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol*. 2004 Sep;143(2):247-50. doi: 10.1038/sj.bjp.0705920.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):83-7. doi: 10.1038/384083a0.

Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*. 1992 Apr;8(2):45-55. doi:10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x

Daigang L, Jining Q, Jinlai L, Pengfei W, Chuan S, Liangku H, et al. LPS-stimulated inflammation inhibits BMP-9-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between BMP/MAPK and Smad signaling. *Exp Cell Res*. 2016 Feb 1;341(1):54-60. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.01.009.

de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):481-5. doi: 10.1016/j.joen.2011.12.010

De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;23(1):1-15. doi: 10.1016/j.beem.2008.10.013.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313-26. doi: 10.1089/jir.2008.0027.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9. doi: 10.1126/science.1470919.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Jul;22(7):346-9. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01712-0.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10819-24. doi: 10.1073/pnas.152334899.

Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*. 2010 May;223(2):415-22. doi: 10.1002/jcp.22050.

Diogenes A, Hargreaves KM. Microbial modulation of stem cells and future directions in regenerative endodontics. *J Endod*. 2017 Sep;43(9S):S95-S101. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.012.

Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. *J Am Dent Assoc*. 2016 May;147(5):372-80. doi: 10.1016/j.adaj.2016.01.009.

Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res*. 2011 Jun;90(6):759-64. doi: 10.1177/0022034511400225.

Duncan HF, Cooper PR, Smith AJ. Dissecting dentine-pulp injury and wound healing responses: consequences for regenerative endodontics. *Int Endod J*. 2019 Mar;52(3):261-266. doi: 10.1111/iej.13064.

Dupin E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM, Le Douarin NM. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol.* 2018 Dec 1;444 Suppl 1:S47-S59. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.03.024.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-- part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul;56(3):151-65. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron.* 2006 Jan 5;49(1):67-79. doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.027.

Evans RM, Scott RH, Ross RA. Chronic exposure of sensory neurones to increased levels of nerve growth factor modulates CB1/TRPV1 receptor crosstalk. *Br J Pharmacol.* 2007 Oct;152(3):404-13. doi: 10.1038/sj.bjp.0707411.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res.* 1982 Jun;90(3):200-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.1982.tb00728.x.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia.* 2003 Jan 15;41(2):161-8. doi: 10.1002/glia.10177.

Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative evaluation of chemotactic factor effect on migration and differentiation of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1288-93. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.012.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):510-21. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.

Fouad AF. Microbial factors and antimicrobial strategies in dental pulp regeneration. *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S46-S50. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.010.

Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J.* 2009 Nov;42(11):955-62. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01622.x.

Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995 Aug 15;232(1):54-61. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x.

Gallily R, Breuer A, Mechoulam R. 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000 Oct 6;406(1):R5-7. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00653-1.

Galve-Roperh I, Chiurchiu V, Diaz-Alonso J, Bari M, Guzman M, Maccarrone M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res.* 2013 Oct;52(4):633-50. doi: 10.1016/j.plipres.2013.05.004.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan 1;15(1):13-27. doi: 10.1177/154411130401500103.

Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002 Aug;81(8):531-5. doi: 10.1177/154405910208100806.

Gowran A, McKayed K, Campbell VA. The cannabinoid receptor type 1 is essential for mesenchymal stem cell survival and differentiation: implications for bone health. *Stem Cells Int.* 2013;2013:796715. doi: 10.1155/2013/796715.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Endod.* 2013 Mar;39(3 Suppl):S30-43. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.025.

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Smith AJ. Smad protein mediated transforming growth factor beta1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line. *Arch Oral Biol.* 2005 Nov;50(11):929-36. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.03.004.

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004 Nov;49(11):911-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.05.005.

He W, Wang Z, Luo Z, Yu Q, Jiang Y, Zhang Y, et al. LPS promote the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells via MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2015 Mar;230(3):554-61. doi: 10.1002/jcp.24732.

Hofmann NA, Barth S, Waldeck-Weiermair M, Klec C, Strunk D, Malli R, et al. TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation. *Biol Open.* 2014 Nov 13;3(12):1164-72. doi: 10.1242/bio.20149571.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996 Mar;29(2):125-30. doi: 10.1111/j.1365-2591.1996.tb01173.x.

Hosoya A, Kim JY, Cho SW, Jung HS. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell Tissue Res.* 2008 Sep;333(3):503-9. doi: 10.1007/s00441-008-0655-z.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):161-202. doi: 10.1124/pr.54.2.161.

Huang GT, Garcia-Godoy F. Missing concepts in de novo pulp regeneration. *J Dent Res.* 2014 Aug;93(8):717-24. doi: 10.1177/0022034514537829.

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.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A.* 2010 Feb;16(2):605-15. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0518.

Huang RL, Yuan Y, Zou GM, Liu G, Tu J, Li Q. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling. *Stem Cells Dev.* 2014a Feb 1;23(3):277-89. doi: 10.1089/scd.2013.034

Huang RL, Yuan Y, Tu J, Zou GM, Li Q. Exaggerated inflammatory environment decreases BMP-2/ACS-induced ectopic bone mass in a rat model: implications for clinical use of BMP-2. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014b Aug;22(8):1186-96. doi: 10.1016/j.joca.2014.06.017.

Huang XF, Chai Y. Molecular regulatory mechanism of tooth root development. *Int J Oral Sci.* 2012 Dec;4(4):177-81. doi: 10.1038/ijos.2012.61.

Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Histol.* 2008 Apr;39(2):153-60. doi: 10.1007/s10735-007-9148-8.

Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, van't Hof RJ, Ralston SH. Regulation of bone mass, osteoclast function, and ovariectomy-induced bone loss by the type 2 cannabinoid receptor. *Endocrinology.* 2008 Nov;149(11):5619-26. doi: 10.1210/en.2008-0150.

Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, et al. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab.* 2009 Aug;10(2):139-47. doi: 10.1016/j.cmet.2009.07.006.

Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. Pulp regeneration by 3-dimensional dental pulp stem cell constructs. *J Dent Res*. 2018 Sep;97(10):1137-1143. doi: 10.1177/0022034518772260.

Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain*. 2003 Jun;126(Pt 6):1252-70. doi: 10.1093/brain/awg143.

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.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005 Aug;54(Pt 8):777-783. doi: 10.1099/jmm.0.45976-0.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):19-29. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00322-6.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Mar;95(3):348-54. doi: 10.1067/moe.2003.18.

Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, et al. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One*. 2007 Jul 25;2(7):e641. doi: 10.1371/journal.pone.0000641.

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.

Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1999 Jun;67(6):2841-6. doi: 10.1128/IAI.67.6.2841-2846.1999.

Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2014 Feb;59(2):167-75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.008.

Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 May;103(5):707-11. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.11.036.

Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res*. 2013 Jan;52(1):141-64. doi: 10.1016/j.plipres.2012.10.003.

- Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol.* 2001 Mar 1;166(5):3574-9. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3574.
- Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, et al. 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.
- Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 2005 Jan 19;25(3):662-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4166-04.2005.
- Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, et al. Capsaicin, a TRPV1 ligand, suppresses bone resorption by inhibiting the prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolysaccharide. *ISRN Pharmacol.* 2012;2012:439860. doi: 10.5402/2012/439860.
- Köse S, Aerts-Kaya F, Köprü Ç Z, Nemutlu E, Kuşkonmaz B, Karaosmanoğlu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Exp Hematol.* 2018 Jan;57:30-41.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2017.09.009.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des.* 2004;10(6):659-67. doi: 10.2174/1381612043453081.
- Kwon SM, Kim SA, Yoon JH, Ahn SG. Transforming growth factor beta1-induced heat shock protein 27 activation promotes migration of mouse dental papilla-derived MDPC-23 cells. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1332-5. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.010.
- Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering. science.* 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529.
- 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):1835-1840. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.024.
- Liu C, Xiong H, Chen K, Huang Y, Yin X. Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *Int Endod J.* 2016 Oct;49(10):950-9. doi: 10.1111/iej.12551.
- Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):133-8. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.009.

Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13;275(41):31938-45. doi: 10.1074/jbc.M005722200.

Marcal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*. 2010 Jun;36(6):995-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.020.

Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci*. Nov-Dec 2012;20(6):661-6. doi: 10.1590/s1678-77572012000600012.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):163-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.020.

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641. doi: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121.

McCarthy GM, Bridges CR, Blednov YA, Harris RA. CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. *F1000Res*. 2017 Jul 19;6:1144. doi: 10.12688/f1000research.12036.1.

Mechoulam R. Marijuana chemistry. *Science*. 1970 Jun 5;168(3936):1159-66. doi: 10.1126/science.168.3936.1159.

Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Nov;15(11):757-64. doi: 10.1038/nrn3811.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d.

Meneses CCB, Pizzatto LN, Andrade FFF, Sipert CR. Prostaglandin E(2) affects interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 production by cultured stem cells of apical papilla. *J Endod*. 2020 Mar;46(3):413-8. doi: 10.1016/j.joen.2019.12.001.

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

Miyashita K, Oyama T, Sakuta T, Tokuda M, Torii M. Anandamide induces matrix metalloproteinase-2 production through cannabinoid-1 receptor and transient receptor potential vanilloid-1 in human dental pulp cells in culture. *Endod*. 2012 Jun;38(6):786-90. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.025.

Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol.* 2008 Sep 18;9:52. doi: 10.1186/1471-2121-9-52.

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

Mullen LM, Richards DW, Quaranta V. Evidence that laminin-5 is a component of the tooth surface internal basal lamina, supporting epithelial cell adhesion. *J Periodontal Res.* 1999 Jan;34(1):16-24.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Endod.* 2007 Apr;33(4):377-90. doi: 10.1016/j.joen.2006.09.013.

Nada OA, El Backly RM. Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018 Jul 24;6:103. doi: 10.3389/fbioe.2018.00103.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):778-83. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.038.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997 Feb;13:121-48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00098.x.

Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, et al. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett.* 2006 Jan 23;580(2):613-9. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.079.

Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int.* 2006 Apr;30(4):295-300. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.12.001.

Nikolaeva EP, Cox TC, Flake NM. Osseous characteristics of mice lacking cannabinoid receptor 2 after pulp exposure. *J Endod.* 2015 Jun;41(6):853-7. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.030.

Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, et al. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod.* 2007 Oct;33(10):1187-91. doi: 10.1016/j.joen.2007.05.015.

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.

Nosrat A, Kolahtouzan A, Hosseini F, Mehrizi EA, Verma P, Torabinejad M. Histologic outcomes of uninfected human immature teeth treated with regenerative endodontics: 2 case reports. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1725-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.05.004.

Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, et al. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):696-701. doi: 10.1073/pnas.0504187103.

Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, et al. Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology*. 1992 Nov;131(5):2229-34. doi: 10.1210/endo.131.5.1425421.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248-66. doi: 10.1177/10454411980090030101.

Okahashi N, Koga T, Nishihara T, Fujiwara T, Hamada S. Immunobiological properties of lipopolysaccharides isolated from *Fusobacterium nucleatum* and *F. necrophorum*. *J Gen Microbiol*. 1988 Jun;134(6):1707-15. doi: 10.1099/00221287-134-6-1707.

Onoue S, Niwa M, Isshiki Y, Kawahara K. Extraction and characterization of the smooth-type lipopolysaccharide from *Fusobacterium nucleatum* JCM 8532 and its biological activities. *Microbiol Immunol*. 1996;40(5):323-31.

Ossola CA, Balcarcel NB, Astrauskas JI, Bozzini C, Elverdin JC, Fernandez-Solari J. A new target to ameliorate the damage of periodontal disease: The role of transient receptor potential vanilloid type-1 in contrast to that of specific cannabinoid receptors in rats. *J Periodontol*. 2019 Nov;90(11):1325-1335. doi: 10.1002/JPER.18-0766.

Ossola CA, Surkin PN, Pugnaroni A, Mohn CE, Elverdin JC, Fernandez-Solari J. Long-term treatment with methanandamide attenuates LPS-induced periodontitis in rats. *Inflamm Res*. 2012 Sep;61(9):941-8. doi: 10.1007/s00011-012-0485-z.

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

Özdemir B, Shi B, Bantleon HP, Moritz A, Rausch-Fan X, Andrukhov O. Endocannabinoids and inflammatory response in periodontal ligament cells. *PLoS One*. 2014 Sep 16;9(9):e107407. doi: 10.1371/journal.pone.0107407.

Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. *FEBS J*. 2013 May;280(9):1918-43. doi: 10.1111/febs.12260.

Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res*. 2000 Jan;79(1):77-84. doi: 10.1177/00220345000790011401.

Paria BC, Dey SK. Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids*. 2000 Nov;108(1-2):211-20. doi: 10.1016/s0009-3084(00)00197-3.

Partwardhan A, Murphy R, Hargreaves K. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. *J Clin Inv*. 2010 Maio;120(5):1617-1626. doi: 10.1172/JCI41678.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*. 2010 Dec;62(4):588-631. doi: 10.1124/pr.110.003004.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873-84. doi: 10.1038/nrn1247.

Piva E, Tarlé SA, Nör JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, et al. Dental pulp tissue regeneration using dental pulp stem cells isolated and expanded in human serum. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):568-574. doi: 10.1016/j.joen.2016.11.018.

Qian H, Zhao Y, Peng Y, Han C, Li S, Huo N, et al. Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2010 Aug;45(4):504-11. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01265.x.

Que K, He D, Jin Y, Wu L, Wang F, Zhao Z, et al. Expression of cannabinoid Type 1 receptors in human odontoblast cells. *J Endod*. 2017 Feb;43(2):283-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.004.

Rahimi P, Wang CY, Stashenko P, Lee SK, Lorenzo JA, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. *Endocrinology*. 1995 Jun;136(6):2752-9. doi: 10.1210/endo.136.6.7750500.

Raicevic G, Najar M, Pieters K, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jul;18(13-14):1410-8. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0434.

Rettori E, De Laurentiis A, Zorrilla Zubilete M, Rettori V, Elverdin JC. Anti-inflammatory effect of the endocannabinoid anandamide in experimental periodontitis and stress in the rat. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(5):293-303. doi: 10.1159/000339113.

Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spångberg LS, Tay FR. Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *Dent*. 2014 Sep;42(9):1156-70. doi: 10.1016/j.jdent.2014.06.012.

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *B Br J Pharmacol*. 2003 Nov;140(5):790-801. doi: 10.1038/sj.bjp.0705467.

Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):357-63. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.027.

Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. Desensitization of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) by the TRP vanilloid 1-selective cannabinoid arachidonoyl-2 chloroethanolamine. *Mol Pharmacol*. 2011 Jul;80(1):117-23. doi: 10.1124/mol.110.068940.

Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. [Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?]. *Braz J Psychiatry*. 2010 May;32 Suppl 1:S7-14.

Schilder H. Filling root canals in three dimensions. 1967. *J Endod*. 2006 Apr;32(4):281-90. doi: 10.1016/j.joen.2006.02.007

Schneider R, Holland GR, Chiego D, Jr., Hu JC, Nor JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod*. 2014 Jul;40(7):931-6. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.021.

Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif Tissue Int*. 2007 Jan;80(1):50-9. doi: 10.1007/s00223-006-0171-7.

Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*. 2017 Jan;101(1):107-119. doi: 10.1189/jlb.3MR0316-118RR.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.

Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. *J Endod*. 2013 Mar;39(3 Suppl):S26-9. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.046.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):919-25; Discussion 1157. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.001.

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.

Shimizu E, Ricucci D, Albert J, Alobaid AS, Gibbs JL, Huang GT, et al. Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with

- chronic apical abscess after revitalization treatment. *J Endod.* 2013 Aug;39(8):1078-83. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.032.
- Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K, et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res.* 1994;73(9):1509-14.
- Silva HF, Abuna RPF, Lopes HB, Francischini MS, de Oliveira PT, Rosa AL, et al. Participation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells grown on titanium surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2017 Oct;125(5):355-60. doi: 10.1111/eos.12369
- Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Oct;20(5):310-6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00232.x.
- Sipert CR, Morandini AC, Modena KC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. *J Appl Oral Sci.* 2013 Mar-Apr;21(2):99-105. doi: 10.1590/1678-7757201300004.
- Sipert CR, Morandini AC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, Campanelli AP, et al. 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
- Siqueira JF, Rôças IN, Uzeda M, Colombo AP, Santos KRN. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol.* 2002 Dec;51(12):1090-1096. doi: 10.1099/0022-1317-51-12-1090.
- Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:179-84. doi: 10.1111/j.1600-0722.1998.tb02173.x.
- Smith M, Wilson R, O'Brien S, Tufarelli C, Anderson SI, O'Sullivan SE. The effects of the endocannabinoids anandamide and 2-Arachidonoylglycerol on human osteoblast proliferation and differentiation. *PLoS One.* 2015 Sep 28;10(9):e0136546. doi: 10.1371/journal.pone.0136546.
- Somsak M, Sopee P, Pornpoj F. Cannabinoid receptor 1 (CB1R) expression in rat dental pulp. *Oral Sci Int.* 2012 May;9(1):17-20. doi: [https://doi.org/10.1016/S1348-8643\(12\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S1348-8643(12)00003-1).
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006 Dec 20;1(1):e79. doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. 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.

Sooampon S, Manokawinchoke J, Pavasant P. Transient receptor potential vanilloid-1 regulates osteoprotegerin/RANKL homeostasis in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res*. 2013a Feb;48(1):22-9. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01493.x.

Sooampon S, Phoolcharoen W, Pavasant P. Thermal stimulation of TRPV1 up-regulates TNF α expression in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2013b Jul;58(7):887-95. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.01.010.

Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3):296-301. doi: 10.1177/0022034511405390 74. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001. p. 675-80.

Strachan A, Harrington Z, McIlwaine C, Jerreat M, Belfield L, Kilar A, et al. Subgingival lipid A profile and endotoxin activity in periodontal health and disease. *Clin Oral Investig*. 2019 Sep;23(9):3527-34. doi: 10.1007/s00784-018-2771-9.

Sun H, Li Q, Zhang Y, Bi Y, Li X, Shu Y, et al. Regulation of OPG and RANKL expressed by human dental follicle cells in osteoclastogenesis. *Cell Tissue Res*. 2015 Nov;362(2):399-405. doi: 10.1007/s00441-015-2214-8.

Taha NA, Abdulkhader SZ. Full Pulpotomy with Biodentine in Symptomatic Young Permanent Teeth with Carious Exposure. *J Endod*. 2018 Jun;44(6):932-937. doi: 10.1016/j.joen.2018.03.003.

Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, de Jong PR, Bertin S, Tabeta K, et al. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29294. doi: 10.1038/srep29294.

Takita M, Inada M, Miyaura C. Capsaicin, a ligand for vanilloid receptor-1, transduces suppressive signal for osteoclast differentiation in bone. *J Health Sci*. 2007;53(2):240-4. doi: <https://doi.org/10.1248/jhs.53.240>.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1504-8. doi: 10.1126/science.289.5484.1504.

Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:14-8. doi: 10.1177/08959374010150010401.

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.

Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol*. 1989;34(1):27-35. doi: 10.1016/0003-9969(89)90043-5.

Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):231-7.

Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marcal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, et al. 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.

Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod*. 2001 Apr;27(4):273-7. doi: 10.1097/00004770-200104000-00008.

Tschöp J, Kasten KR, Nogueiras R, Goetzman HS, Cave CM, England LG, et al. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis. *J Immunol*. 2009 Jul 1;183(1):499-505. doi: 10.4049/jimmunol.0900203.

Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Ichikawa H, Sahara Y, et al. TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium*. 2012 Aug;52(2):124-36. doi: 10.1016/j.ceca.2012.05.002.

Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010 May;36(5):781-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.006.

Ulevitch RJ. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol*. 1993;53:267-89. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60502-7.

Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M. TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):354-8. doi: 10.1080/03008200290000565.

van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal bovine serum (FBS): Past - present - future. *ALTEX*. 2018;35(1):99-118. doi: 10.14573/altex.1705101.

Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol*. 2015 Aug 18;6:422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422.

Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, et al. Effect of bacterial biofilm on the osteogenic differentiation of stem cells of apical papilla. *J Endod*. 2017 Jun;43(6):916-922. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.023.

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):227-32. doi: 10.1038/nrg3185.

- Wang J, Dai J, Liu B, Gu S, Cheng L, Liang J. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activates canonical Wnt/ β -catenin and p38 MAPK signalling in stem cells from the apical papilla. *Inflammation*. 2013 Dec;36(6):1393-402. doi: 10.1007/s10753-013-9679-y.
- Wang Q, Peng Y, Chen S, Gou X, Hu B, Du J, et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. *Stroke*. 2009 Jun;40(6):2157-64. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541490.
- Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):56-63. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.039.
- Weisleder R, Benitez CR. Maturogenesis: is it a new concept? *J Endod*. 2003 Nov;29(11):776-8. doi: 10.1097/00004770-200311000-00022.
- Widbiller M, Eidt A, Wölflick M, Lindner SR, Schweikl H, Hiller KA, et al. Interactive effects of LPS and dentine matrix proteins on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2018 Aug;51(8):877-888. doi: 10.1111/iej.12897.
- Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *J Endod*. 2008 Jul;34(7 Suppl):S25-8. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.030.
- Wollank Y, Ramer R, Ivanov I, Salamon A, Peters K, Hinz B. Inhibition of FAAH confers increased stem cell migration via PPAR α . *J Lipid Res*. 2015 Oct;56(10):1947-60. doi: 10.1194/jlr.M061473
- Wu J, Huang GT, He W, Wang P, Tong Z, Jia Q, et al. Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. *J Endod*. 2012 May;38(5):614-22. doi: 10.1016/j.joen.2012.01.014.
- Yamagishi VT, Torneck CD, Friedman S, Huang GT, Glogauer M. Blockade of TLR2 inhibits Porphyromonas gingivalis suppression of mineralized matrix formation by human dental pulp stem cells. *Endod*. 2011 Jun;37(6):812-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.03.013.
- Yoo YJ, Oh JH, Lee W, Woo KM. Regenerative Characteristics of Apical Papilla-derived Cells from Immature Teeth with Pulpal and Periapical Pathosis. *J Endod*. 2016 Nov;42(11):1626-1632. doi: 10.1016/j.joen.2016.08.004.
- Yu M, Ives D, Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21181-6. doi: 10.1074/jbc.272.34.21181.

Zhang F, Özdemir B, Nguyen PQ, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Methanandamide diminish the Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induced response in human periodontal ligament cells. BMC Oral Health. 2020 Apr 15;20(1):107. doi: 10.1186/s12903-020-01087-6.

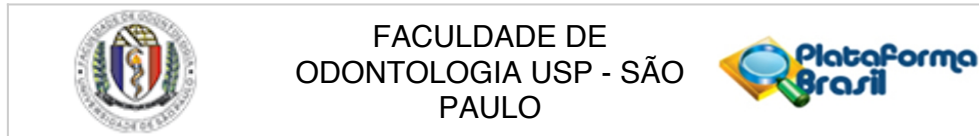
Zhang J, Zhang Y, Lv H, Yu Q, Zhou Z, Zhu Q, et al. Human stem cells from the apical papilla response to bacterial lipopolysaccharide exposure and anti-inflammatory effects of nuclear factor I C. J Endod. 2013 Nov;39(11):1416-22. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.018.

Zhang W, Zhang X, Ling J, Liu W, Ma J, Zheng J. Proliferation and odontogenic differentiation of BMP2 gene-transfected stem cells from human tooth apical papilla: an in vitro study. Int J Mol Med. 2014 Oct;34(4):1004-12. doi: 10.3892/ijmm.2014.1862.

Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. J Tissue Eng Regen Med. Mar-Apr 2008;2(2-3):117-25. doi: 10.1002/term.71.

Zheng ZM, Specter S, Friedman H. Inhibition by delta-9-tetrahydrocannabinol of tumor necrosis factor alpha production by mouse and human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1992 Nov;14(8):1445-52. doi: 10.1016/0192-0561(92)90017-f.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel dos Endocanabinóides na modulação de células de papila apical humana in vitro

Pesquisador: Carla Renata Sipert

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70904617.6.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.201.755

Apresentação do Projeto:

O manejo de processo patológico pulpar quando da rizogênese incompleta continua ser sempre um desafio na clínica odontológica e os mecanismos moleculares envolvidos no processo de interrupção da rizogênese e sua relação com as células da papila apical ainda não foram esclarecidos.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o papel de endocanabinóides nos mecanismos moleculares envolvidos com alterações fenotípicas e funcionais de células de papila apical in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

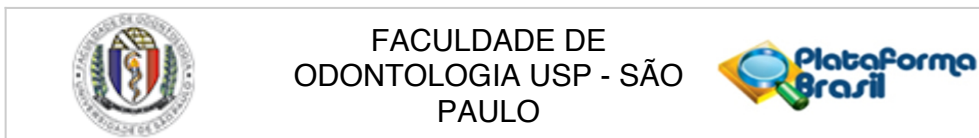
Riscos: Considerando a possibilidade de uso de células já estabelecidas para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, não há riscos para pacientes indiretamente envolvidos.

Benefícios: Os benefícios a curto prazo não são previstos; porém, o trabalho pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos com a etiopatogenia da interrupção da formação radicular em pacientes jovens com dentes imaturos que sofreram necrose pulpar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem estruturada e respeitando normas da CONEP.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.201.755

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados Folha de rosto, autorização do biobanco, projeto de pesquisa.

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.

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_BÁSICAS_DO_PROJETO_946867.pdf	06/07/2017 12:38:09		Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	06/07/2017 12:35:43	CLAUDIA CAROLINE BOSIO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacaobiobanco.pdf	04/07/2017 15:47:03	CLAUDIA CAROLINE BOSIO MENESES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCLAUDIA.pdf	20/06/2017 15:29:50	CLAUDIA CAROLINE BOSIO MENESES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



Continuação do Parecer: 2.201.755

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepto@usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
TERMO DE DOAÇÃO**

A pesquisa de Título: "Papel de Endocanabinóides na modulação de células-tronco de papila apical *in vitro*" será realizada por Claudia Caroline Boslo Meneses, sob orientação da Prof^a Dr^a Carla Renata Sipert, CRO-SP 74.434, será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sendo os procedimentos clínicos realizados na Clínica Odontológica e os procedimentos laboratoriais no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOU SP.

A referida pesquisa tem como objetivo o estudo de substâncias produzidas pelo nosso próprio corpo, durante a inflamação. A participação consiste na doação voluntária do dente com indicação para extração. Sua participação é opcional e dela você pode desistir a qualquer momento, sem explicar os motivos e sem comprometer o seu tratamento na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Deste dente será removido a extremidade, que por sua vez é a porção responsável pela formação da raiz. A partir deste fragmento, serão feitas as análises necessárias para localizar as referidas substâncias, que são o objeto deste estudo. Após a pesquisa, tanto o seu dente como a extremidade que foi utilizada na pesquisa, serão descartados em lixo infectocontagioso.

Os riscos envolvidos serão inerentes a qualquer procedimento cirúrgico, 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. Você não terá nenhum benefício direto, mas a doação do seu dente extraído poderá resultar na aquisição de conhecimento científico acerca de mecanismos envolvidos durante a formação do dente. As informações fornecidas serão confidenciais, de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis e apenas para este estudo. Você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia - Av. Prof. Lineu Prestes 2227, 05508-000 - São Paulo, telefone (11) 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br – Horário de Funcionamento: de segunda a sexta-feira das 8 às 17h exceto em feriados e recesso universitário. 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, concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa, por meio da doação do dente extraído nesta ocasião.

Este documento será laborado em duas vias.

Nome: _____

Endereço: _____

RG: _____ Tel: _____

São Paulo, ____ / ____ / ____

Paciente

Claudia C. B. Meneses
Pesquisadora

Orientadora: D^ª Carla Renata Sipert
Endereço: Av. Professor Lineu Prestes, 2227
São Paulo- SP CEP: 05508-000 Telefone: (11) 3091-7841

ANEXO C – Parecer do Institutional Review Board



December 14, 2017

To: Kenneth M. Hargreaves, D.D.S., Ph.D. (Hargreaves@uthscsa.edu)
UTHSCSA

cc: Erin Locke, B.S.N., R.N. (locke@uthscsa.edu)

From: Institutional Review Board

Subject: Expedited Approval of a Request to Continue Research (Reapproval)

Protocol Number: HSC20080148H
Title: Role of Dentin Growth Factors in the induction of an Odontoblastic Phenotype in Stem Cells found in the Apical Papilla
 Formerly "Growth Factors that Induce Odontoblastic Differentiation in Two Different Populations of Oral Stem Cells"

EXPIRED - Funding Type: Non-Profit; Sponsor: American Association of Endodontics

Dear Principal Investigator,

Your progress report, dated November 15, 2017, was reviewed and approved by the Institutional Review Board on December 13, 2017. Your study has been approved to continue.

The new IRB expiration date: January 11, 2019. Your progress report must be submitted to the IRB Office 34 days before the IRB meeting that will occur before the study's expiration date.

In addition to the progress report, the following documents were reviewed: Signature Assurance Sheet; Form D - HSC Consent, Stamped.

Your progress report included the following minor modifications that were also approved: None.

Affiliated Institutions which are engaged in this research: UTHSCSA University Health System

Sincerely,

Digitally signed by Juanita Ching
 DN: cn=Juanita Ching, o=UT Health San Antonio,
 ou=OCR and IRB, email=ching@uthscsa.edu, c=US
 Reason: I am the author of this document
 Date: 2017.12.14 10:16:50 -0600

Research Compliance Coordinator
 Research Protection Programs

Please retain this document in your IRB correspondence file

Institutional Review Board Office | Mail Code 7830 | 7703 Floyd Curl Drive | San Antonio, Texas 78229-3900
 210.567.8250 | <http://research.uthscsa.edu/irb> | FWA00005928 | IORG0000312

QIRB-40



August 29, 2019

To: Kenneth M. Hargreaves, D.D.S., Ph.D. (Hargreaves@uthscsa.edu)
UT Health San Antonio (UTHSA)

cc: Erin Locke, B.S.N., R.N. (locke@uthscsa.edu)

From: Institutional Review Board

Subject: Expedited Approval of a Request to Continue Research (Reapproval)

<p>Protocol Number: H8C20080246H Title: Tissue Bank and Data Bank for Genetic Polymorphisms of Pain Genes Funding Type: Institution</p>
--

Dear Principal Investigator,

Your progress report, dated July 23, 2019, was reviewed and approved by the Institutional Review Board on August 27, 2019 under category:

Collection of blood specimens from healthy, non-pregnant adults (refer to Form B-1, Category 2 for details) Collection of blood specimens from children, pregnant adults, or other adults not considered healthy (refer to Form B-1, Category 2 for details)

Collection of data by non-invasive means (refer to Form B-1, Category 4 for details).

Collection of existing research or clinical data and/or prospective clinical data (refer to Form B-1, Category 5 for details).

Collection of data using surveys, interviews, focus groups, etc. (refer to Form B-1, Category 7 for details).

Your study has been approved to continue.

The new IRB expiration date: **September 16, 2020**. Your progress report must be submitted to the IRB Office 34 days before the IRB meeting that will occur before the study's expiration date.

In addition to the progress report, the following documents were reviewed: Signature Assurance Sheet; Form E - Repository Consent, Stamped.

Your progress report included the following minor modifications that were also approved: None.

Affiliated institutions which are engaged in this research: UTHSA University Health System

Sincerely,

Juanita Ching

Digitally signed by Juanita Ching
DN: cn=Juanita Ching, ou=UT Health San Antonio,
ou=Research Protection Programs,
email=chingj@uthscsa.edu
Reason I am the author of this document
Date: 2019.08.29 08:41:20 -0500

Research Compliance Coordinator
Research Protection Programs

Please retain this document in your IRB correspondence file

Institutional Review Board Office | Mail Code 7830 | 7703 Floyd Curl Drive | San Antonio, Texas 78229-3900
210.567.8250 | <http://research.uthscsa.edu/irb> | FWA00005928 | IORG0000312

ORR-40

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, concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa, por meio da doação do dente extraído nesta ocasião.

Este documento será laborado em duas vias.

Nome: _____

Endereço: _____

RG: _____ Tel: _____

São Paulo, ____ / ____ / ____

Paciente

Claudia C. B. Meneses
Pesquisadora

Orientadora: D^ª Carla Renata Sipert
Endereço: Av. Professor Lineu Prestes, 2227
São Paulo- SP CEP: 05508-000 Telefone: (11) 3091-7841