

**LETÍCIA MARTINS SANTOS**

**Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células-tronco de papila apical *in vitro***

São Paulo

2022



**LETÍCIA MARTINS SANTOS**

**Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células-tronco de papila apical *in vitro***

**Versão Corrigida**

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Carla Renata Sipert

São Paulo

2022

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

---

Santos, Letícia Martins.

Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células-tronco de papila apical *in vitro* / Letícia Martins Santos; orientadora Carla Renata Sipert. -- São Paulo, 2022.

65 p. : fig.; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Soro Bovino Fetal. 2. Citocinas. 3. Células-tronco de Papila Apical - SCAP. I. Sipert, Carla Renata. II. Título.

Santos LM. Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células-tronco de papila apical *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 30/ 06/ 2022

### **Banca Examinadora**

Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz

Instituição: FOUSP \_\_\_\_\_ Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Marilia Trierveiler Martins

Instituição: FOUSP \_\_\_\_\_ Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Emanuel da Silva Rovai

Instituição: Universidade São Francisco (USF) \_\_\_\_\_ Julgamento: Aprovada



Dedico este trabalho aos que me dedicam suas vidas:

*Meus pais e avós!*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me conduzido durante toda minha trajetória e agradeço à ciência por ter sido o instrumento capaz de me provar Sua existência. O conhecimento, adquirido através dela, me mostrou a beleza na complexidade da vida, que só penso ter sido criada por Ele.

Aos meus avós, **Antônia Martins** e **Pedro Martins**, agradeço pela nossa família, por serem o nosso alicerce. Com vocês aprendo diariamente, com pequenos gestos (mas de grandes significados), sobre amor, respeito, coragem, força. Os momentos com vocês me recarregam de energia e vontade de ser melhor a cada dia. O meu sentimento em totalidade jamais conseguiria ser expresso em apenas algumas linhas, mas espero que esteja conseguindo transmiti-lo nos nossos abraços.

Aos meus pais, **Lucia Martins** e **José Luis Diniz**, agradeço pelo amor e suporte incondicionais. Vocês sempre viabilizaram os meus planos e tornaram o caminho mais seguro e confortável. O amor sempre esteve em forma de preocupação, proteção e cuidado diário. Eu amo-os de maneira imensurável, obrigada por tanto.

À minha irmã, **Amanda Martins**, agradeço pela nossa amizade e parceria, por ser meu ponto de escuta, apoio e incentivo. Minha vida tornou-se mais completa desde a sua chegada. E te agradeço também pelo irmão que ganhei: **Gabriel Rebello**.

Ao **Spider** e ao **Thor** agradeço por trazerem alegria e leveza à minha vida.

À minha **Família Martins**, especialmente aos meus tios **Sandra, Tata, Francisca, Solange, Ide, Lucimara, Silvio** e **Marcelo**, agradeço o carinho, amor e preocupação. Obrigada por serem tão presentes e essenciais e vibrarem com as minhas conquistas. Nossa família é o que eu tenho de maior valor.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Renata Sipert**, agradeço por todo conhecimento, paciência, disponibilidade, dedicação e carinho. Minha admiração por você só cresce a cada dia, obrigada por ter conduzido o meu mestrado de uma

maneira tão saudável e agradável. Quanto privilégio o meu ter minha maior inspiração profissional como orientadora.

Ao **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira** agradeço por sempre agregar com seu conhecimento e ser tão solícito em nos dar o suporte que for necessário.

Aos professores da FOU SP que participaram de uma maneira mais próxima na minha pós-graduação: **Manoel Machado, Maine Skelton, Ericka Pinheiro, Celso Caldeira** e **Emanuela Ferraz** deixo registrada minha grande admiração por vocês.

Aos tantos professores que me inspiraram durante toda a vida agradeço por me mostrarem tantas possibilidades através da educação e por contribuírem com a minha formação.

Aos amigos que o grupo de pesquisa e o laboratório de pesquisa básica me proporcionaram: **Juliana Garuba, Karollyne Spigariol, Marlus Pedrosa, Claudia Meneses, Elisa Diniz, Giovana Porto, Victória Gonçalves, Danielle Shimabuko, Nicole Askinis, João Colmanette, Douglas Amaral, Vicente Murakami, Rafael Albuquerque, Ítallo Emidio, Victor Feliz, Maria Fernanda e Natália Bueno** agradeço pela contribuição especial de cada um, sozinha eu não chegaria a lugar nenhum. A atmosfera respeitosa e colaborativa entre nós me motiva.

À **Patricia Cardoso** e ao **Raphael Gomes**, meus presentes do mestrado, agradeço por toda contribuição, pelo companheirismo, pela solidariedade nos meus momentos de desespero. Contar com a parceria de vocês foi fundamental, obrigada por absolutamente tudo.

Aos meus amigos do LAFACC - VQM, **Aline Gonçalves, Joice Bertaglia** e **Jodonai Barbosa**, agradeço por tanta contribuição e inspiração durante a minha IC. Se optei por seguir na pesquisa, sem dúvidas, foi porque o **Prof. Dr. Edson Liberti** abriu as portas do seu laboratório e vocês me acolheram e influenciaram tão bem.

À **Mariane Pacheco** agradeço pela nossa amizade e pela paciência em ser meu suporte técnico desde 2010. Suas consultorias em tecnologia foram especialmente importantes para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha amiga-prima-gêmea, **Yolanda Cardoso**, agradeço por viver as minhas conquistas há 22 anos. Você faz parte da minha história, e não poderia estar fora desse trecho tão importante dela.

À minha família FOUSP: **Nathalia Vilela, John Brás, Ketuly Cestari, Vinicius Monteiro, Ana Elisa, Henrique Fukushima, Maria Macário, Mayra Baracho e Ananda Schroeter**, agradeço pela nossa amizade tão sólida e pela torcida, seja mais de pertinho ou à distância.

À **Nathalia Vilela** agradeço ainda, além da sua amizade fraterna, por ser a pessoa que embarca nas minhas loucuras com o maior entusiasmo e topa desde os cursos online nos temas mais aleatórios, até assistir palestras sobre memória e doenças crônicas no IPq.

À **Dra. Angélica Rodrigues Santos** (in memoriam), minha dentista, agradeço por ter sido a principal responsável pela escolha da minha profissão.

Aos funcionários da FOUSP, especialmente à **Selma, Aldo, David, Cátia, Fernando, Luís, Carlos, Glauci, Diego, Edmond e Alcimar**, agradeço pelo serviço prestado com tanta qualidade, vocês fazem a diferença.

À **Silvana Copolla**, técnica do nosso laboratório, agradeço pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar nas inúmeras vezes que te importunei e, principalmente, pelas várias conversas, sempre muito agradáveis, que temos.

À **Henrietta Lacks** todo o meu respeito e gratidão pelo avanço revolucionário que suas células causaram na ciência.

À **FOUSP** agradeço por ser o meu segundo lar desde 2013 e pela estrutura para desenvolver essa pesquisa.

Por fim, agradeço o apoio no presente trabalho da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”.

**Marie Curie**



## RESUMO

Santos LM. Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células-tronco de papila apical *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A endodontia e medicina regenerativa têm demonstrado grande interesse no potencial proliferativo e de diferenciação das Células-tronco de Papila Apical (SCAP), sendo que muitos estudos têm sido direcionados a avaliar as citocinas produzidas por tal população celular. No entanto, o suplemento mais comumente utilizado nos meios de cultura, o Soro Bovino Fetal (SBF), apresenta uma composição complexa e não totalmente conhecida, podendo interferir em diferentes fenômenos, sendo um deles a produção *in vitro* de citocinas pelas células. Portanto, este estudo teve como proposição: 1. avaliar a interferência do SBF na viabilidade celular das SCAP ativadas ou não por lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* (LPS) e 2. verificar a interferência de diferentes concentrações de SBF na produção das citocinas Interleucina (IL)-6, Fator de Crescimento Transformador (TGF)- $\beta$ 1, Osteoprotegerina (OPG) e a quimiocina CCL2 no sobrenadante das SCAP ativadas por LPS. As células, previamente caracterizadas, obtidas do Biobanco da FOUSP, foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM a 10% de SBF, plaqueadas e, após 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias de estímulo, foram então submetidas ao ensaio de MTT para a avaliação da viabilidade celular. A quantificação das citocinas foi realizada através do ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), no tempo experimental de 24h. Os grupos foram organizados em triplicata de acordo com a concentração de SBF e presença ou não de LPS (1  $\mu$ g/mL). A análise estatística foi executada aplicando-se a análise de variância a dois critérios (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Em 24h, as SCAP cultivadas em meio suplementado com qualquer concentração de SBF apresentaram maior metabolismo celular comparadas àquelas na ausência de soro. Para os tempos experimentais mais longos, de 7 e 14 dias, as SCAP ativadas por LPS mostraram um aumento significativo na viabilidade celular quanto cultivadas sob 10 e 15% de SBF. As duas concentrações testadas de SBF (1 e 10%) interferiram na produção de todas as citocinas avaliadas no presente estudo. Esse resultado enfatiza a importância de

evitar a suplementação com SBF em estudos de detecção de citocinas envolvendo SCAP.

Palavras-chave: Soro Bovino Fetal. Citocinas. Células-tronco de Papila Apical - SCAP.

## ABSTRACT

Santos LM. Fetal bovine serum as an interference factor in cytokines production by stem cells from apical papilla *in vitro* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Regenerative endodontics and medicine have shown great interest in the proliferative and differentiation potential of Stem Cells from the Apical Papilla (SCAP), and many studies have been performed to evaluate the cytokines produced by this cell population. However, the most common supplement used in culture media, Fetal Bovine Serum (FBS), has a complex composition that is not fully known and may interfere with different phenomena; one of these is the *in vitro* production of cytokines by cells. Therefore, this study aimed to: 1. evaluate the interference of FBS on the cell viability of SCAP activated or not by *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) and 2. verify the interference of different FBS concentrations in the production of the cytokines Interleukin (IL)-6, Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1, Osteoprotegerin (OPG) and the chemokine CCL2 in LPS-activated SCAP supernatant. Previously characterized cells were cultured at  $\alpha$ -MEM medium until plated. Cells were then subjected to MTT assay after 24h, 48h, 72h, 7, and 14 days of stimulation with LPS (1  $\mu$ g/mL) at increasing concentrations of FBS for assessment of cell viability. The quantification of cytokines was performed by using the enzyme immunosorbent assay (ELISA) in the experimental time-point of 24h. The groups were grouped in triplicate according to FBS concentration and the presence or absence of LPS (1  $\mu$ g/mL). Statistical analysis was performed by using two-way analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Tukey's post-test with a significance level of 5%. At 24h, SCAP grown in medium supplemented with any FBS concentration showed higher cellular metabolism than those in the absence of serum. For the longer experimental times of 7 and 14 days, LPS-activated SCAP showed a significant increase in cell viability when grown under 10 and 15% FBS. The two concentrations of FBS tested (1 and 10%) interfered in producing all cytokines evaluated in the present study. This result emphasizes the importance of avoiding FBS supplementation in cytokine detection studies involving SCAP.

Keywords: Fetal Bovine Serum. Cytokines. Stem Cells from the Apical Papilla - SCAP.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) - Absorbância (570nm) obtida a partir do ensaio MTT em tempos experimentais de 24h (A), 48h (B), 72h (C), 7 dias (D) e 14 dias (E) em SCAP expostas à diferentes concentrações de Soro Bovino Fetal (0; 0,5; 1; 10 e 15%) ativadas ou não com LPS (1 µg/mL). Os resultados mostram média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas dos grupos com mesma concentração de SBF. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas dos grupos de diferentes concentrações de SBF (Two-Way ANOVA com teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) .....40
- Figura 5.2 - ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) - Concentração de IL-6 (A), TGF- $\beta$  (B), OPG (C) e CCL2 (D) de acordo com o ensaio ELISA após 24h de exposição à diferentes concentrações de Soro Bovino Fetal (0, 1 e 10%) em SCAP ativadas ou não com LPS (1 µg/mL). Os resultados mostram média e desvio padrão dos experimentos realizados em quadruplicata. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos com mesma concentração de SBF. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos de diferentes concentrações de SBF (Two-Way ANOVA com teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).....42



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2/MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos
MSC	Mesenchymal Stem Cells
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RANK	Receptor Ativador Nuclear kappa-B
RANK-L	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa-B
SBF	Soro Bovino Fetal
SCAP	Stem Cells from the Apical Papilla
STRO – 1	Anticorpo Monoclonal
TGF- $\beta$ 1	Fator de Crescimento Transformador Beta1
TLR	Toll Like Receptor
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alpha
$\alpha$ -MEM	<i><math>\alpha</math>-Modified Eagle Medium</i>



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1	CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DE PAPILA APICAL HUMANA .....	35
4.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT .....	36
4.3	ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA POR ELISA .....	36
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	VIABILIDADE CELULAR.....	39
5.2	PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR SCAP .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>63</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As células-tronco da papila apical (SCAP) são consideradas uma população de células-tronco distinta das células da polpa dentária e têm despertado o interesse da odontologia e de outras áreas médicas devido ao seu potencial de proliferação e diferenciação. Essas células têm sido estudadas com particular interesse pela endodontia regenerativa, (1,2) e as citocinas, por elas produzidas, tem sido um foco de pesquisa relevante. (3,4)

Para a maioria das culturas de células, o Soro Bovino Fetal (SBF) é o suplemento de meio mais utilizado, principalmente devido aos seus altos níveis de fatores estimuladores de crescimento e baixos níveis de fatores inibidores de crescimento. (5) No entanto, tal suplemento pode interferir em fenômenos como proliferação e diferenciação celular, modulação de moléculas e mecanismos celulares, viabilidade celular e produção de citocinas. (6–12)

Foi demonstrado que a suplementação com Soro Bovino Fetal (SBF) interfere significativamente na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais *in vitro*. A simples presença de SBF, mesmo sem estimulação, foi capaz de induzir constitutivamente as citocinas esperadas apenas quando ativadas imunologicamente, como as Interleucinas (IL)-6 e IL-8. (11) Do ponto de vista metodológico, esses achados podem revelar vieses significativos na metodologia científica que emprega essa população celular. No entanto, esse comportamento pode variar significativamente dependendo da população de células em estudo.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar a interferência do SBF usado como suplemento para cultura de células, na padronização de experimentos de detecção de citocinas *in vitro* empregando SCAP.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

[...] Henrietta morreu em 1951, de um caso grave de câncer cervical, ele nos contou. Mas, antes de ela morrer, um cirurgião extraiu amostras de seu tumor e colocou-as numa placa de Petri. Os cientistas vinham tentando manter células humanas vivas em culturas havia décadas, mas elas sempre acabavam morrendo. As células de Henrietta foram diferentes: elas reproduziam uma geração inteira a cada 24 horas, e nunca pararam. Tornaram-se as primeiras células humanas a se reproduzir em laboratório. [...]. (13)

As células HeLa significaram um avanço revolucionário para a medicina. Essas células foram obtidas, sem autorização e consentimento, de um tumor que levou à morte Henrietta Lacks, uma mulher negra e de origem humilde. Elas marcaram o início da cultura de células humanas em laboratório e foram utilizadas em larga escala, pouco tempo depois da morte de Henrietta, para testar a segurança e eficácia da vacina da poliomielite, que havia sido desenvolvida em 1952, durante a epidemia da doença. Até então, os testes de neutralização eram realizados em células de macaco, o que era um problema não somente pela morte dos animais, com pouca importância na época, mas também pelo elevado custo, impossibilitando testes em larga escala. (13).

Desde então, os avanços não pararam, a tecnologia de cultura celular desenvolvida a partir das células HeLa possibilitaram estudos no campo da virologia, fertilizações in vitro, clonagem, genética, além do isolamento de células-tronco. (13–16). Os estudos com células-tronco são especialmente importantes para a engenharia tecidual e medicina regenerativa, devido ao potencial de proliferação e diferenciação dessas células. Para serem assim nomeadas, as células precisam atender a alguns requisitos como: capacidade de auto renovação, de diferenciação em mais de um tipo celular e de manter-se dividindo ao longo da vida. (17)

As células-tronco podem ser divididas entre pluripotentes, com capacidade de diferenciação em qualquer tipo celular, e multipotentes, com capacidade de diferenciação em apenas alguns tipos celulares. As Células-Tronco Mesenquimais (MSC) são células-tronco multipotentes e podem diferenciar-se em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, fibroblastos, mioblastos e neuroblastos. (17) As MSC

consideradas padrão-ouro, no que diz respeito a capacidade de diferenciação, são as células-tronco da medula óssea, mas elas podem ser encontradas em diversos outros tecidos, incluindo a polpa dental, o ligamento periodontal e a papila apical. (18)

As células-tronco da papila apical (SCAP - Stem Cells from the Apical Papilla) foram isoladas pela primeira vez por Sonoyama e colaboradores em 2006 e foram verificados, através de citometria de fluxo, os marcadores de superfície para células-tronco mesenquimais STRO-1, CD146, CD24, CD166, CD73, CD90, CD105, CD106, CD29 e ALP, enquanto que ao mesmo tempo as células apresentaram-se negativas para as moléculas de superfície CD34 (marcador de célula endotelial), CD45 (marcador de linfócitos), CD14, CD18 e CD150. (19)

O mesmo grupo, em 2008, caracterizou a papila apical e as células-tronco dela provenientes. Trata-se de um tecido mole e de superfície lisa encontrado no ápice radicular de dentes imaturos e, histologicamente, apresenta-se menos vascularizado e com menor densidade celular comparativamente às células da polpa dental. Sua função está relacionada ao crescimento e desenvolvimento radicular, sendo as SCAP a principal fonte celular para os odontoblastos primários, que produzirão a dentina radicular. (1)

Tal trabalho contribuiu ainda para o entendimento de um fenômeno clínico, descrito pela primeira vez por Banchs e Trope em 2004, que consistia na apexogênese de um dente com ápice aberto e periodontite apical. Os autores propuseram um protocolo para revascularização baseado na descontaminação do canal radicular com hipoclorito de sódio (5,25%) e medicação intracanal com uma pasta tripla antibiótica a base de Metronidazol, Ciprofloxacino e Minociclina por 28 dias. Após esse período, através do debridamento apical, seria induzido o sangramento objetivando a formação de um coágulo no interior do canal, com posterior selamento do dente. O resultado obtido foi a resolução da radiolucidez apical, espessamento das paredes radiculares, fechamento do ápice e teste térmico frio positivo. (20) A possível explicação seria a sobrevivência das SCAP frente a infecção, devido a sua proximidade aos tecidos periapicais e após a desinfecção, sua diferenciação em odontoblastos, que continuariam o desenvolvimento radicular. (1)

As SCAP passaram a representar, então, um importante foco para a endodontia regenerativa, mas também despertou o interesse da medicina regenerativa, uma vez que apresentam alto potencial proliferativo e de diferenciação osteo/odontogênica, mostrando-se superior ao das células-tronco da medula óssea. (1,2,21,22) Elas têm sido usadas experimentalmente para regeneração da polpa dental, musculo esquelético, tecido ósseo e vasos sanguíneos em modelos animais, apresentando resultados favoráveis. (21) Sua aplicação também tem sido realizada conjuntamente à scaffolds, um dos focos mais promissores da engenharia tecidual. (23) Esses arcabouços permitem o desenvolvimento de culturas celulares em 3D, simulando um ambiente mais próximo da realidade, e possibilitando a redução de experimentação animal; além de viabilizar a formação de novos tecidos para regeneração tecidual em testes pré-clínicos e clínicos. (24,25)

O avanço nos testes clínicos traz como uma das maiores preocupações a transmissão de agentes infecciosos e imunoproteínas xenogênicas aos humanos. Os soros de origem animal, utilizados como suplemento nutricional ao meio de cultura, carregam proteínas xenogênicas, endotoxinas, vírus, bactérias e príons que podem levar a respostas imunológicas em humanos. (26) Por tal razão, células cultivadas com Soro Bovino Fetal (SBF) são inutilizáveis na terapia celular. (27) O progresso clínico no transplante de células poderá ser otimizado quando a pesquisa básica estiver mais bem consolidada e nesse sentido, estratégias têm sido estudadas para substituição do SBF, como a suplementação por soro humano autólogo ou heterólogo, assim como a suplementação por derivados do sangue, por exemplo o lisado de plaquetas humanas. (28) Esse último tem sido considerado a melhor alternativa para a medicina regenerativa em substituição aos soros de origem animal. Entretanto, o lisado de plaquetas humanas não é considerado prático para a utilização laboratorial. (18)

Devido ao fornecimento das condições para o crescimento, proliferação, fixação e metabolismo celular, o SBF ainda é o suplemento de meio de cultura mais utilizado para a prática diária em laboratórios. Ele é constituído por uma mistura extremamente complexa de constituintes de alto e baixo peso molecular, que atuam em diferentes funções celulares. O SBF fornece às células, principalmente: fatores de crescimento, hormônios e citocinas; proteínas de ligação e transporte; fatores de

fixação e disseminação; aminoácidos e vitaminas; ácidos graxos e lipídeos; e inibidores de proteases. (29) No entanto, sua composição não totalmente conhecida e a variabilidade entre diferentes lotes são pontos críticos para a padronização, confiabilidade e reprodutibilidade dos experimentos *in vitro*. (30)

Um estudo publicado em 2016 mostrou que 70% dos pesquisadores falharam em reproduzir estudos publicados, e isso foi atribuído à grande variabilidade nos lotes de SBF. (31) Tal variabilidade relaciona-se à maneira como o SBF é adquirido. Ele é coletado de fetos bovinos em qualquer estágio de desenvolvimento dos últimos dois terços de gestação, geralmente descobertos acidentalmente no abate de vacas grávidas. (32) Além de seus constituintes, a concentração de SBF no meio de cultura também pode variar em diferentes estudos, sendo a concentração de 10% a mais comumente empregada. (33)

Apesar de ser ainda o suplemento mais utilizado, diversos estudos demonstraram que o SBF pode interferir em diferentes fenômenos como proliferação e diferenciação celular, modulação de moléculas e mecanismos celulares, viabilidade celular e produção de citocinas. (6,7,10–12)

Bian e colaboradores (2015) mostraram que a concentração de 8% de SBF é a melhor para promover proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em meio de cultura com peptídeo de crescimento osteogênico. Análise desse mesmo estudo indicou ainda que as células não podiam sustentar a proliferação quando a concentração de SBF era inferior a 5%. (7) No ano seguinte (2016), outro grupo observou que a proliferação de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo durante a reprogramação foi significativamente aumentada pelo SBF em concentração de 20% e 30%. Demonstraram inclusive que altas concentrações de SBF podem modular moléculas e mecanismos celulares subjacentes ao processo de reprogramação dessas mesmas células. (6) No entanto, Queiroz e colaboradores (2021) demonstraram que embora na ausência de SBF as SCAP não sejam capazes de expressar algumas de suas propriedades celulares, como a de formação de colônias e diferenciação condrogênica, essas células ainda são capazes de manterem suas características desejáveis, mesmo que de maneira reduzida, como a capacidade de diferenciação osteogênica e a atividade

proliferativa, essa última confirmada pela imunopositividade do marcador de mitoses PHH3 nas células cultivadas em meio livre de soro. (12)

Na avaliação da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea, o estudo *in vitro* de Potier e colaboradores (2007), constatou que a privação de nutrientes (provenientes do SBF) é o fator mais forte quando comparado hipóxia e privação sérica. As MSC expostas à 48h de hipóxia em associação à privação de soro resultaram em morte para a totalidade das células, enquanto quando a hipóxia foi associada ao meio com SBF a 10%, essa taxa diminuiu pela metade. (10)

Em estudo que empregou células endoteliais, foi demonstrado que a suplementação com SBF interfere de forma relevante na produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*. (11) Ainda a respeito das citocinas, MSC derivadas do cordão umbilical cultivadas no meio de cultura sem SBF suprimiram a expressão de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interleucinas (IL-21, IL-22 e IL-26), enquanto a produção de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2), assim como de citocinas imunomoduladoras (IL-6, por exemplo) foi aumentada nesse mesmo meio. (6)

A constatação da interferência do SBF em todos esses fenômenos em diferentes tipos celulares reforça a possibilidade de sua interferência ocorrer também na produção de citocinas pelas SCAP. Tomar conhecimento a respeito desse evento é especialmente importante pelo fato de estudos com esse tipo celular muitas vezes direcionarem a atenção a essas moléculas. (3,4) A razão para tal direcionamento está no fato de as citocinas constituírem um grupo de proteínas secretadas com diversas estruturas e funções, afetando quase todos os processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, crescimento e diferenciação de todas as células imunes, ativação das funções efetoras dos linfócitos e fagócitos frente à infecção, progressão de processos degenerativos, além de ainda estarem relacionadas a eficácia de vacinas, rejeição de enxertos e diferenciação de células-tronco. (34)

O termo citocina pode englobar os interferons, as interleucinas, os fatores de crescimento mesenquimais, a família dos fatores de necrose tumoral, as adipocinas e a família das quimiocinas, essas últimas relacionadas à migração e ao movimento celular. Uma das principais características dessas moléculas é a de possuírem

múltiplas propriedades biológicas. Elas podem ser divididas de acordo com suas funções, algumas desempenham funções pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, ou podem participar da quimiotaxia de linfócitos, por exemplo. (34–36)

As citocinas Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  são importantes citocinas pró-inflamatórias. IL-6 é um homodímero pertencente à família do tipo I de citocinas, que pode ser produzida por diversos tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, monócitos e células T, por exemplo. (36,37) Em condições de homeostasia, a IL-6 geralmente não é produzida constitutivamente pelas células, mas sua expressão é induzida por infecções virais, (38) traumas (39) ou pelo lipopolissacarídeo (LPS). (40) Ela tem importante função na produção de anticorpos, por induzir os linfócitos B em plasmócitos; e também atua na indução de proteínas das respostas inflamatórias agudas; (37) e na reabsorção óssea, estimulando a diferenciação das células precursoras de osteoclastos e a produção da quimiocina CCL2. (39) Assim como IL-6, TNF- $\alpha$  também atua na resposta inflamatória aguda frente a patógenos (41) e é produzido por diversos tipos celulares, tais como macrófagos e células dendríticas. Ela é capaz de induzir outras citocinas inflamatórias, como a própria IL-6, e, quando se liga a receptores específicos (TNF-RI), recruta uma proteína que leva as células à morte celular por apoptose. (36,42)

A Interleucina (IL)-10 e o Fator de Crescimento Transformador (TGF)- $\beta$ 1 são as mais importantes citocinas com propriedades anti-inflamatórias, além da IL-35. IL-10 é produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células T, e a maioria das células teciduais não tem a capacidade de produzi-las; portanto, as suas funções principais estão mais relacionadas às células imunes. Dentre seus papéis, o de maior relevância está em prevenir e limitar as respostas imunes específicas e inespecíficas e, conseqüentemente, evitar danos teciduais. (43,44) Algumas das moléculas que induz a sua expressão são IL-6 e TGF- $\beta$ . (43,45) Mas TGF- $\beta$ , além dessa ação, é responsável por diversas outras; ele é um mediador fundamental da regulação celular, e é alvo de estudo em praticamente todas as áreas da biologia celular e até mesmo da clínica médica. (46) A família TGF- $\beta$  contém, na verdade, três isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, sendo TGF- $\beta$ 1 o mais produzido por macrófagos e vários outros tipos celulares. Dentre as tantas ações de TGF- $\beta$ 1 estão a estimulação da proliferação e diferenciação condrogênica de MSCs, a

diferenciação dos precursores de osteoblastos em osteoblastos, e a diminuição da expressão de ligante ativador do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B (RANK-L) por osteoblastos. (36,47)

RANK-L participa do eixo RANK-L – RANK – OPG. A osteoprotegerina (OPG) funciona como um receptor isca, impedindo o fator osteoclástico RANK-L de se ligar ao seu receptor RANK [ativador do receptor de (NF)- $\kappa$ B]; este, por sua vez, expresso na superfície celular dos monócitos, precursores dos osteoclastos. (47–50) A quimiotaxia dos monócitos acontece principalmente através da ação da Proteína Quimiotática de Monócitos (CCL2/MCP-1). Essa quimiocina, produzida por células teciduais em resposta à infecção, se liga ao seu receptor CCR2, expresso na superfície dos monócitos. CCL2 também estimula outros eventos celulares associados a quimiotaxia e induz levemente a expressão de citocinas em monócitos. (36,51)

A maioria das citocinas são secretadas na dependência da ativação de suas células produtoras, essa ativação geralmente se dá por agentes infecciosos. (34) No contexto da endodontia, os microrganismos têm um papel bem estabelecido na etiopatogenia das alterações pulpares e periapicais. As bactérias presentes no interior do canal radicular são as responsáveis pela progressão e perpetuação da periodontite apical. (52–54) Os colonizadores da infecção endodôntica se alteram de acordo com a progressão da doença; inicialmente as bactérias anaeróbias facultativas são predominantes e, conforme a infecção progride em sentido apical, as bactérias anaeróbias estritas e gram-negativas passam a prevalecer. (53,55)

As bactérias gram-negativas possuem em sua parede celular o lipopolissacarídeo (LPS), um fator de virulência que atua como endotoxina, participando de diversas etapas de um processo infeccioso. O LPS é um potente indutor da resposta inflamatória e o padrão molecular associado a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) mais estudado. (56,57) Os responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e seus componentes são os receptores Toll Like Receptors (TLRs), sendo o TLR4 o receptor específico encarregado pela identificação do LPS e indução da resposta inflamatória. (58) *Escherichia coli* tem o LPS como o seu mais abundante componente e a maioria dos estudos *in vitro* utilizam LPS originário dessa bactéria. (57)

Estudos *in vitro* envolvendo cultura de células geralmente incluem ensaios de viabilidade celular como uma importante etapa para certificação de que as células estão viáveis nas condições experimentais em questão. (59) O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina) foi o primeiro ensaio de viabilidade celular desenvolvido para uma triagem de alto rendimento e permanece popular em laboratórios acadêmicos. Ele consiste na conversão, pelas células viáveis e com metabolismo ativo, do MTT em um produto formazan de cor púrpura. O exato mecanismo celular de conversão não é totalmente compreendido, mas especula-se que esteja relacionado à atividade de enzimas mitocondriais e, portanto o ensaio avaliaria a atividade mitocondrial das células. (60)

Para quantificação de proteínas (como as citocinas) em determinadas amostras, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um ensaio amplamente realizado por apresentar alta especificidade e sensibilidade. Um dos métodos bastante utilizado é o ELISA sanduíche, esse consiste na ligação do anticorpo de captura na placa de cultura, seguida da colocação da amostra em que se pretende verificar a presença da proteína específica. Tais proteínas se ligam ao anticorpo de captura, e então, após a lavagem para remover os não ligantes, são adicionados os anticorpos de detecção conjugados à enzima peroxidase, que irão reconhecer a proteína. Por fim, é adicionado o substrato que reagirá com a enzima e produzirá uma coloração como resultado. (61,62)

Em suma, para todos os resultados de experimentação científica deve-se ter a certificação de que nenhum viés interferiu no estudo. Os estudos *in vitro* costumam ser uma etapa preliminar às pesquisas clínicas e os parâmetros metodológicos estabelecidos precisam levar em conta todos os possíveis vieses a fim de não elaborar conclusões inadequadas. (63,64) Sendo assim, este estudo foi delineado de forma a esclarecer as potenciais interferências que o uso do SBF pode exercer sobre ensaios de viabilidade e de detecção de proteínas solúveis em cultura de células-tronco da papila apical humanas.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a interferência da suplementação com Soro Bovino Fetal na produção de citocinas por células de papila apical *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a viabilidade celular de SCAP estimuladas com diferentes concentrações de SBF, ativadas ou não com LPS.

Avaliar a quantificação das citocinas IL-6, TGF- $\beta$ , OPG e CCL2 no sobrenadante de SCAP estimuladas por diferentes concentrações de SBF e ativadas ou não com LPS.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Parecer: 4.251.087, CAAE: 29421220.3.0000.0075) (Anexo A).

### 4.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE PAPILA APICAL HUMANA

A cultura foi iniciada a partir de células-tronco de papila apical (SCAP) obtidas no Biobanco da FOUSP. As SCAP utilizadas foram previamente caracterizadas fenotipicamente e funcionalmente, de tal forma que expressaram, em níveis típicos, os marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais CD146, CD24 e STRO-1, e de forma mínima os marcadores de células hematopoiéticas (CD45) ou endoteliais (CD34). A caracterização foi realizada quando as células se encontravam na segunda passagem. A formação de nódulos mineralizados foi detectada utilizando a técnica de Vermelho de Alizarina. (65)

Células na sexta passagem foram descongeladas, e cultivadas em garrafas médias para cultura contendo  $\alpha$ -*Modified Eagle Medium* ( $\alpha$ -MEM) (Gibco) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), 100  $\mu$ M de L-ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100U/mL de penicilina (Invitrogen), 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina (Invitrogen) (meio de proliferação - MP) a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após passadas 24h, trocas de meio de cultura ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 10% de SBF foram realizadas a cada dois dias até atingirem 80% de confluência. (1) A partir dessa etapa, as células foram então submetidas ao protocolo de tripsinização, utilizando solução de tripsina a 0,25%, e plaqueadas para os experimentos de viabilidade celular e ELISA, respectivamente, de acordo com a fase da pesquisa.

## 4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular das SCAP estimuladas nas diferentes concentrações de SBF foi analisada através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina). As células foram plaqueadas em placas de 48 poços numa densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Após 24h o meio foi substituído por  $\alpha$ -MEM sem SBF para permitir a adaptação celular. Essa condição foi mantida por mais 24h e então efetuado o estímulo com  $1\mu\text{g/mL}$  de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (66) nas concentrações crescentes de SBF (0, 0,5, 1, 10 e 15%) em  $\alpha$ -MEM. Após 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias de estímulo, o sobrenadante celular foi substituído por 40uL de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 mg/mL) em PBS; e 360uL de  $\alpha$ -MEM 10% SBF. As células foram então incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 4 horas, sob proteção de luz. A solução de MTT foi descartada e substituída por 200 $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, Brasil). A placa foi mantida sob agitação contínua em mesa agitadora por 20 minutos em temperatura ambiente. A densidade óptica foi determinada usando um leitor de placas (Synergy HT, Biotek, Instruments, Inc. Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

## 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Para quantificação de citocinas, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços numa densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. Como descrito anteriormente, após 24h o meio foi substituído por  $\alpha$ -MEM sem SBF e esse mantido por mais 24h, quando foi então colocado o estímulo de  $1\mu\text{g/mL}$  de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (66) nas concentrações de 0, 1 e 10% SBF em  $\alpha$ -MEM. Atingidas 24h de estímulo, o sobrenadante foi coletado em tubos de 1,6mL, mantidos em gelo, e centrifugados a 1000g por 5min e  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante do tubo de 1,6mL foi transferido para o tubo de 0,6mL e as amostras armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ . A Interleucina IL-6, Fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ 1), osteoprotegerina (OPG), e Proteína Quimiotática de Monócitos (CCL2/MCP-1)

foram quantificadas nas amostras por meio de imunoenensaio enzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante dos insumos (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A dosagem das citocinas em meios correspondentes a cada concentração de SBF foi também realizada na ausência de células para fins de controle. O experimento foi conduzido em quadruplicata.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados de viabilidade celular e de quantificação de citocinas foi realizada através do software GraphPad Prism 9.0. A verificação do padrão de distribuição das amostras foi determinada através do teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Aqueles que apresentaram distribuição normal foram então submetidos à análise de variância a dois critérios (two-way ANOVA) seguida de teste de Tukey. O nível de significância de 5% foi adotado para considerar as possíveis diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.



## 5 RESULTADOS

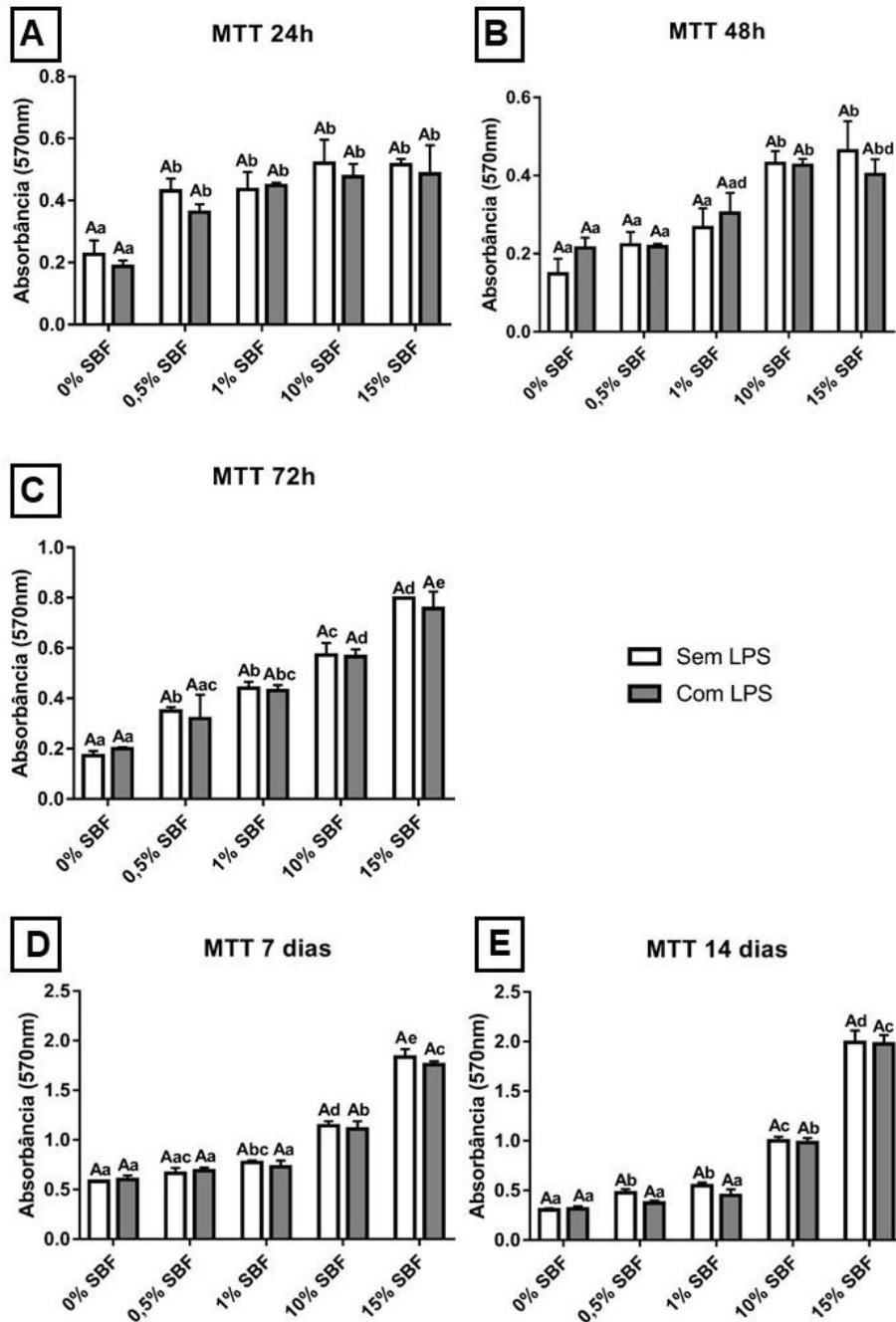
Os resultados obtidos são apresentados nos seguintes tópicos: viabilidade celular e produção de citocinas por SCAP.

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT, nos tempos experimentais de 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias, foi realizado para analisar a atividade metabólica celular das SCAP ativadas com LPS sob diferentes concentrações de SBF (0, 0,5, 1, 10 e 15%). A presença de LPS não resultou em alterações metabólicas em SCAP ativadas em comparação com cada respectivo controle, independentemente da concentração de SBF, mostrando não existir interação entre as duas variáveis do estudo (Figura 5.1).

Em 24h, SCAP cultivadas com qualquer concentração testada de SBF apresentaram um aumento significativo na atividade metabólica em comparação com o meio sem SBF (Figura 5.1A). Em 48h, um aumento significativo é observado em meios suplementados com 10% e 15% de SBF (Figura 5.1B). Considerando os períodos experimentais a partir de 72h, um aumento gradual da atividade metabólica é observado de maneira concentração-dependente para amostras sem LPS (Figuras 5.1C, 5.1D e 5.1E). Por outro lado, o mesmo não é observado para células ativadas por LPS que, por sua vez, apresentaram um ligeiro aumento para amostras de 0,5 e 1% de SBF e depois um aumento maior para amostras de 10 e 15% de SBF (Figuras 5.1C, 5.1D e 5.1E).

Figura 5.1 - ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) - Absorbância (570nm) obtida a partir do ensaio MTT em tempos experimentais de 24h (A), 48h (B), 72h (C), 7 dias (D) e 14 dias (E) em SCAP expostas à diferentes concentrações de Soro Bovino Fetal (0; 0,5; 1; 10 e 15%) ativadas ou não com LPS (1µg/ml). Os resultados mostram média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas dos grupos com mesma concentração de SBF. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas dos grupos de diferentes concentrações de SBF (Two-Way ANOVA com teste de Tukey,  $p < 0,05$ )



Fonte: A autora.

## 5.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR SCAP

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi realizado para analisar quantitativamente a produção de IL-6, TGF- $\beta$ , CCL2 e OPG por SCAP expostas ao LPS sob três concentrações de SBF (0, 1, e 10%) no tempo experimental de 24h.

Nenhuma das citocinas analisadas foram detectadas nos respectivos controles contendo os meios suplementados na ausência de células. A análise estatística dos dados demonstrou a ocorrência de interação entre as variáveis (presença de LPS e a concentração de SBF) para todas as respectivas citocinas.

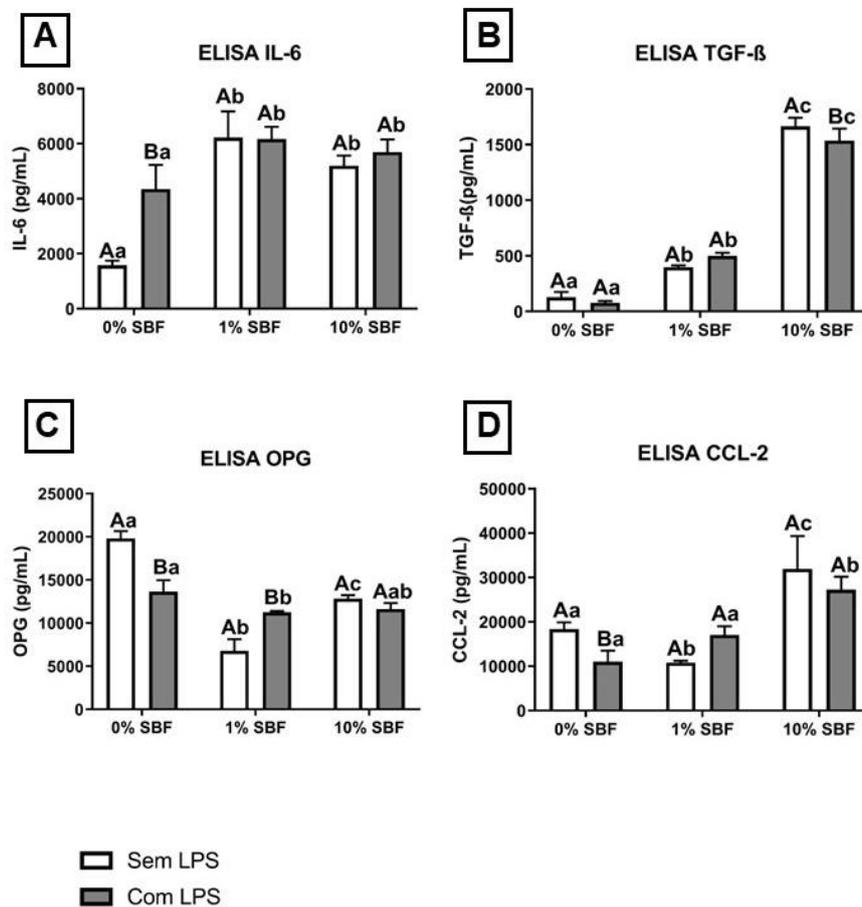
A suplementação do meio com SBF resultou em um aumento na produção de IL-6 e TGF- $\beta$ 1 por SCAP em geral. No entanto, para IL-6, não foi mostrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações de SBF testadas (Figura 5.2A). Por outro lado, em TGF- $\beta$ 1 foi observado um aumento progressivo concentração-dependente (Figura 5.2B). Ainda em IL-6, as SCAP cultivadas em meio livre de SBF apresentaram uma produção aumentada da citocina quando ativadas por LPS (Figura 5.2A). A produção de TGF- $\beta$ 1 foi significativamente reduzida apenas na presença de SBF a 10% (Figura 5.2B).

Os dados resultantes da produção de CCL2 por SCAP mostram que na ausência de SBF, as células ativadas com LPS produziram uma menor quantidade da quimiocina. Ao mesmo tempo, na presença de SBF, independentemente da concentração testada, não houve diferença estatisticamente significativa entre SCAP com e sem ativação por LPS. Foi observado ainda que SCAP cultivadas em meio SBF 10%, ativadas ou não com LPS, apresentaram maior produção de CCL2 em comparação com as células cultivadas em meio sem SBF ou em baixa concentração (1%) (Figura 5.2D).

Nos resultados da quantificação de OPG, foi verificado que a presença de SBF causou uma diminuição na produção dessa citocina por SCAP não ativadas por LPS. Uma vez ativadas, a presença do SBF manteve a produção de OPG por SCAP menor ou igual aos não suplementados com o soro. Sob a mesma concentração

sérica, observou-se redução na produção de OPG por células ativadas por LPS em relação às células não ativadas apenas na cultura livre de soro (Figura 2C).

Figura 5.2 - ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) - Concentração de IL-6 (A), TGF- $\beta$  (B), OPG (C) e CCL2 (D) de acordo com o ensaio ELISA após 24h de exposição à diferentes concentrações de Soro Bovino Fetal (0, 1 e 10%) em SCAP ativadas ou não com LPS (1 $\mu$ g/ml). Os resultados mostram média e desvio padrão dos experimentos realizados em quadruplicata. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos com mesma concentração de SBF. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos de diferentes concentrações de SBF (Two-Way ANOVA com teste de Tukey,  $p < 0,05$ )



Fonte: A autora.

## 6 DISCUSSÃO

As células-tronco da papila apical (SCAP) são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento radicular e uma importante fonte de odontoblastos, esses responsáveis pela formação de dentina radicular. (1,19) Elas têm sido utilizadas em estudos de regeneração endodôntica e da área médica devido ao seu potencial de proliferação e diferenciação. (1,2,23) Essas células, responsáveis pela rizogênese, possibilitaram a revascularização pulpar em dente permanente imaturo e com infecção, em protocolo descrito pela primeira vez em 2004. (20) Um melhor conhecimento a respeito do comportamento de tal população celular, incluindo os mecanismos moleculares a ela relacionados, frente a diferentes condições, fisiológicas ou patológicas, é primordial para que se consiga maiores avanços num contexto clínico. Para tanto, estudos *in vitro* utilizando culturas celulares são um meio que viabiliza o requerido entendimento sobre seu funcionamento. Porém, em geral, o cultivo celular requer uma suplementação do meio de cultura com soro de origem animal para fornecer às células melhores condições de proliferação, diferenciação e adesão a superfícies plásticas. (27) O SBF é um suplemento amplamente utilizado, no entanto, o mesmo pode interferir de diferentes maneiras nos experimentos *in vitro*, afetando a qualidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos estudos. (30)

Essa potencial interferência é conhecida; entretanto, ao mesmo tempo, a importância da suplementação tem sido descrita. Foi demonstrado que a privação de nutrientes é mais crítica do que a hipóxia para células-tronco mesenquimais (MSC). MSC expostas à 48h de hipóxia associada à privação de soro resultou em 100% de morte, porém quando a hipóxia foi associada ao meio com SBF a 10%, essa taxa diminuiu pela metade. (10) O presente estudo mostra que no tempo experimental de 24h, SCAP cultivadas sem SBF apresentaram menor atividade metabólica em comparação com qualquer outra concentração de SBF. A partir de 72h, observou-se um aumento considerável na atividade metabólica para meios com 10 e 15% de SBF, o que pode significar que a privação de nutrientes é mais crítica para longos períodos de cultura, embora a diferença estatística entre meio sem SBF e SBF-presente tenha sido observada desde o tempo de 24h.

Um estudo recente utilizando duas linhagens de SCAP, demonstrou que as células cultivadas em meio DMEM-F12 ou  $\alpha$ -MEM suplementados com 10% de SBF proliferaram mais comparativamente àquelas nos meios livres de soro. O mesmo estudo comparou também a capacidade condrogênica e de formação de colônias, e verificou que tais eventos são dependentes da presença de soro. No entanto, a diferenciação osteogênica ocorreu em todos os grupos avaliados, apesar da quantidade de depósitos minerais terem sido menores nos grupos sem SBF e em meio DMEM-F12, enfatizando a superioridade do meio  $\alpha$ -MEM para o cultivo de SCAP. Os resultados, em conjunto, mostraram que apesar de suas propriedades de proliferação e diferenciação serem reduzidas na ausência de SBF, as SCAP ainda são capazes de manterem algumas características desejáveis. (12) Esses achados são importantes quando da necessidade em realizar experimentos sem a suplementação do meio por motivos da potencial interferência do mesmo nos resultados finais.

Uma vez que as SCAP tem sido importante alvo de pesquisas da área endodôntica, e tem-se muito bem estabelecida a relação da microbiologia na periodontite apical, (52,53) uma boa compreensão dos desafios bacterianos para essas células é necessária para desenvolver pesquisas que os envolvam. As bactérias predominantemente envolvidas nas infecções endodônticas são anaeróbias e gram-negativas, (53) essas possuem como um dos principais componentes de sua membrana o lipopolissacarídeo (LPS), um fator de virulência que atua como endotoxina e participa de várias etapas de um processo infeccioso, promovendo diferentes respostas imunológicas em células como odontoblastos, células-tronco da polpa dentária e SCAP. (66,67) Os *Toll Like Receptors* (TLRs) participam no reconhecimento inicial de patógenos e seus componentes, sendo o TLR4 o receptor específico responsável por modular a transdução de sinal celular induzida por LPS. (58) Esses receptores são expressos nas SCAP e tem um papel central na regulação das respostas imunes inatas, induzindo a expressão de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . (66)

A compreensão das respostas celulares de SCAP frente a remanescentes microbianos é fundamental, uma vez que os protocolos de regeneração endodôntica não recomendam a instrumentação das paredes do canal radicular. (20) A sanificação do canal radicular ocorre pelo uso de substâncias químicas utilizadas na

irrigação da cavidade pulpar e é conhecido o fato de que parte da microbiota não seja totalmente removida no momento da indução do coágulo no interior do canal radicular. (68–70) Embora o LPS atue como um indutor de inflamação, estudos demonstraram que 1µg/mL de LPS protege as Células-Tronco Mesenquimais (MSC) contra a apoptose e aumenta a proliferação. Em contraste, 5 µg/mL de LPS pode aumentar a apoptose de MSC e inibir a diferenciação osteo/odontogênica de SCAP via autofagia *in vitro*. (71–73) Também por essa razão, nosso estudo utilizou a concentração de 1µg/mL de LPS para ativação celular e os resultados não mostraram alterações metabólicas em SCAP ativadas em comparação a cada respectivo controle, independentemente da concentração de SBF, não havendo, portanto, interação entre as duas variáveis analisadas nesse ensaio (Figura 5.1). No entanto, quando verificada a interferência do SBF na produção de citocinas por SCAP, foi demonstrado que esse interfere na produção de todas as citocinas analisadas, sendo ainda observadas diferentes respostas celulares frente a ativação por LPS especialmente na presença e ausência do soro (Figura 5.2).

Uma das citocinas quantificadas, IL-6, é sabidamente uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células em resposta à infecção ou dano tecidual. (36) Como já descrito, a ativação do TLR4 por LPS induz sua expressão. Isso pode explicar a maior produção de IL-6 por SCAP cultivadas em meio livre de SBF e ativadas com LPS em comparação às não ativadas pela endotoxina. No entanto, ao mesmo tempo, a suplementação do meio com SBF resultou em um aumento de IL-6 na presença ou não de LPS, indicando que a composição do SBF é suficiente para ativar a produção dessa citocina e anular o aumento induzido pelo LPS. O SBF tem uma composição pouco conhecida; uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, vitaminas, hormônios e carboidratos estão presentes, bem como endotoxinas, agentes infecciosos e outros fatores adversos, (29,30) que juntamente com proteínas estranhas (por exemplo, antígenos séricos bovinos xenogênicos) podem ser os responsáveis pela reação imune das SCAP.

Ao mesmo tempo em que houve aumento de IL-6, também foi observada maior produção de CCL2 em meio com SBF a 10% em comparação com meio livre de SBF ou com baixa concentração (1%). CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) é a mais potente quimiocina na ativação das vias de transdução de sinal

que levam à transmigração de monócitos, e estimula vários eventos celulares relacionados à quimiotaxia. (51,74) Os monócitos são precursores dos osteoclastos e estes participam da reabsorção óssea, nas condições de homeostasia ou frente à respostas inflamatórias induzidas por agentes infecciosos. (48,75)

A suplementação do meio de cultura com SBF resultou ainda em um declínio na produção de OPG. Trata-se de uma molécula que compete com o receptor RANK [ativador do receptor de (NF)-κB] pelo seu ligante, o fator pró-osteoclástico RANK-L [ligante ativador do fator nuclear (NF)-κB] funcionando como um receptor isca. RANK é expresso na superfície celular dos precursores dos osteoclastos (48–50) e sua ativação por RANK-L induz a maturação do osteoclasto. Na presença de OPG, a ligação RANK/RANK-L não ocorre. A produção de RANK-L por SCAP foi detectada em concentrações muito baixas por estudos prévios do nosso grupo. (76,77) Conseqüentemente, a diminuição de OPG pode resultar em aumento na razão RANK-L: OPG. Essas reações em conjunto, incluindo o aumento de CCL2, estão associadas à osteoclastogênese em resposta à infecção, (75) corroborando a opinião de que *in vitro*, o SBF atua como um ativador imunológico em SCAP.

A presente pesquisa também demonstrou que TGF-β1 aumentou de forma concentração-dependente em relação ao SBF. SCAP passaram a produzir três vezes mais TGF-β1 quando cultivadas em meio 1% SBF e treze vezes mais quando em meio 10% SBF. É possível afirmar que o aumento da detecção dessa citocina é resultado de sua produção pelas SCAP e não são provenientes do SBF, uma vez que TGF-β1, assim como todas as demais citocinas avaliadas, não foi detectado nas amostras dos poços controle livres de células (meio de cultura somente).

Esse foi um achado de especial importância, pois TGF-β1 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares e com papéis conhecidos na regulação de outras citocinas, tais como IL-6, OPG e CCL2, (78–80) todas também quantificadas nesse estudo. O objetivo desse trabalho não foi determinar quais componentes do SBF atuam como os estímulos para a secreção da citocina e estudos futuros devem ser conduzidos para tal. Mas sabe-se que sua produção em células-tronco mesenquimais ocorre quando estímulos, tais como proteínas neurotóxicas, citocinas (IL-1 e TNF), produtos provenientes de vírus e bactérias, glicocorticóides e produtos de reações de enzimas, levam à ativação da via de NF-κB. (81) Literatura recente

mostra ainda que a produção de TGF- $\beta$ 1 por MSC é maior quando essas são cultivadas em meio suplementado com aminoácidos. (82) Sabendo-se que na composição complexa do SBF podem estar presentes aminoácidos e fatores adversos provenientes de agentes infecciosos, esses podem ser sugeridos como alguns dos estímulos responsáveis.

No que se refere a TGF- $\beta$ 1, quando SCAP foram cultivadas com baixa concentração de SBF ou na sua ausência, a ativação com LPS não causou diferenças significativas em sua produção comparativamente às células não ativadas. No entanto, em meio suplementado a 10% de SBF, as células produziram menor quantidade da citocina na presença de LPS. De forma contrária às demais citocinas analisadas, para TGF- $\beta$ 1, a ativação com LPS só se mostrou na presença da concentração mais alta de SBF.

As respostas celulares observadas frente à ativação por LPS foram claramente distintas quando na ausência e presença de SBF. Em IL-6, SCAP ativadas expressaram valor de concentração 1,7 vezes maior do que as células não ativadas, em meio livre de SBF. Na presença do soro em qualquer concentração, o efeito da ativação foi anulado. A interação entre as variáveis do estudo também foi verificada no ensaio de ELISA para CCL2. Quando em meio livre de SBF, as células ativadas produziram quantidades inferiores ao seu controle não ativado. No entanto, quando sob meio suplementado, o efeito da ativação com LPS deixou de ser observado. Para OPG, a ativação com a endotoxina levou à redução de sua produção. No entanto, em meio suplementado por SBF essa resposta celular é alterada, de forma que a ativação por LPS levou as células a produzirem mais OPG com SBF a 1% SBF e anulou diferenças induzidas por LPS na concentração de 10% SBF. Em suma, os valores obtidos da quantificação das citocinas na presença de SBF sugerem fortemente que o TGF- $\beta$ 1 produzido pelas SCAP regularam a produção de IL-6, CCL2 e OPG. Nossos dados estão de acordo com achados da literatura, que apontam TGF- $\beta$ 1 como inibidor de IL-6 (80) e estimulador de OPG (78) e CCL2. (79)

A importância destes achados é fundamental, uma vez que eles em conjunto contribuem para reduzir os vieses em pesquisas envolvendo metodologias *in vitro* utilizando culturas de SCAP. Neste estudo, optamos pelo cultivo de SCAP, mas outros tipos celulares possivelmente estão sujeitos a tais vieses, uma vez que SBF é o suplemento de meio de cultura de origem animal mais comumente utilizado em estudos *in vitro*. (83) Apesar de os estudos com desenhos observacionais serem mais sujeitos a vieses do que aqueles com desenhos experimentais, questões metodológicas, aparentemente sutis, podem levar a interpretações equivocadas de seus resultados. (84) Críticos argumentam que a força da experimentação laboratorial está na vantagem em exercer controle sobre uma extensa gama de condições. (63) No entanto, deve-se ter bem estabelecidas todas as possibilidades de interferências existentes na metodologia aplicada, ainda que vastas. No contexto do presente estudo, resultados de quantificação super/subestimados, ou mesmo interações imunológicas indesejáveis poderiam ser alguns dos desfechos.

Essas adversidades provenientes do uso do soro de origem animal, como a transmissão de agentes infecciosos e imunoproteínas xenogênicas, o tornam inseguro e impossibilitam o seu uso em células cultivadas com finalidade de aplicação em terapias regenerativas em humanos. No entanto, o avanço constante da engenharia tecidual e das terapias baseadas em células-tronco tem direcionado esforços na investigação e desenvolvimento de meios alternativos ao SBF para fornecer às células suas condições ideais de cultura. (29)

Por fim, idealmente, um meio de cultura livre de suplementos de origem animal, como o SBF, seria a escolha mais adequada para experimentos de detecção de citocinas. Mas, como visto, sua ausência provoca uma considerável alteração da atividade metabólica de SCAP, tornando a suplementação necessária, principalmente para tempos experimentais de 72h ou acima. Nestas condições, a ausência de SBF poderá resultar em morte celular ou autofagia. (85) Alternativas tem sido testadas para a substituição do SBF, como o soro humano, que já demonstrou permitir proliferação e diferenciação de MSC, (86,87) mas não se tem dados quanto à sua interferência na produção de citocinas. Mesmo com o empenho em busca de um substituto, ele ainda se mantém como o suplemento mais utilizado e, portanto, na necessidade de ensaios de quantificação de citocinas na sua presença, deve ser ressaltado, mais uma vez, que as limitações metodológicas

devem ser cuidadosamente consideradas e discutidas para a análise correta dos resultados. Portanto, a suplementação com SBF deve ser evitada em ensaios de quantificação de citocinas em culturas de células, porém deve ser mantido em ensaios experimentais de períodos mais longos a fim de preservar o metabolismo fisiológico celular.



## 7 CONCLUSÕES

SCAP apresentaram maior atividade metabólica quando cultivadas em meio suplementado com Soro Bovino Fetal. Esse aumento do metabolismo mostrou-se mais significativo em tempos experimentais maiores.

A interação entre as variáveis presença de LPS e concentração de SBF não foi observada no ensaio de MTT. Entretanto, essa interação foi constatada no que diz respeito à quantificação de citocinas.

O Soro Bovino Fetal interferiu na produção de IL-6, OPG, CCL2 e TGF- $\beta$ 1 pelas SCAP induzida por LPS. A decisão quanto à suplementação do meio deve ser considerada de acordo com o alvo de cada estudo.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. 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.
2. Huang GTJ, 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.
3. Meneses CCB, Pizzatto LN, Andrade FFF, Sipert CR. Prostaglandin E2 Affects Interleukin 6 and Monocyte Chemoattractant Protein 1/CCL2 Production by Cultured Stem Cells of Apical Papilla. *J Endod.* 2020 Mar 1;46(3):413–8. doi: 10.1016/j.joen.2019.12.001.
4. Whiting D, Chung WO, Johnson JD, Paranjpe A. Characterization of the Cellular Responses of Dental Mesenchymal Stem Cells to the Immune System. *J Endod.* 2018 Jul;44(7):1126–31. doi: 10.1016/j.joen.2018.03.018.
5. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol Prog.* 2006;22(5):1294–300. doi: 10.1021/bp060121o.
6. Kwon D, Kim JS, Cha BH, Park KS, Han I, Park KS, et al. The effect of fetal bovine serum (FBS) on efficacy of cellular reprogramming for induced pluripotent stem cell (iPSC) generation. *Cell Transplant.* 2016;25(6):1025–42. doi: 10.3727/096368915X689703.
7. Bian S, Su Q, Xiao Y XZ. Effect of Fetal Bovine Serum on osteogenic growth peptide promoting bone marrow mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. *Chinese J Reparative Reconstr Surgery.* 2015;29(2):221–6.
8. Sato K, Itoh T, Kato T, Kitamura Y, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015 May;51(5):515-29. doi: 10.1007/s11626-014-9860-0.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

9. Wu M, Han ZB, Liu JF, Wang YW, Zhang JZ, Li CT, et al. Serum-free media and the immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells in vivo and in vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(3):569-80. doi: 10.1159/000358635.
10. Potier E, Ferreira E, Meunier A, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng*. 2007 Jun;13(6):1325-31. doi: 10.1089/ten.2006.0325.
11. Antypas H, Libberton B, Melican K. Reducing background cytokine expression in epithelial cells without serum starvation. *MethodsX*. 2014 Oct 16;1:251-3. doi: 10.1016/j.mex.2014.10.003.
12. Queiroz A, Wada MT, Rosin FCP, Pelissari C, Trierveiler M. Effects of serum-free culture media on human apical papilla cells properties. *Arch Oral Biol*. 2021 Jan;121:104962. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104962.
13. Skloot R. *A vida imortal de Henrietta Lacks*. São Paulo: Companhia das Letras; 2010.
14. Hamlin A, Harford CG, Parker E, Van Ravenswaay T. Electron microscopy of HeLa cells infected with adenoviruses. *J Exp Med*. 1956 Sep 1;104(3):443-54. doi: 10.1084/jem.104.3.443.
15. Deinhardt F, Henle G. Determination of Neutralizing Antibodies against Mumps Virus in HeLa Cell Cultures. *J Immunol*. 1956 Jul;77(1):40-6.
16. Puck TT, Marcus PI. A rapid method for viable cell titration and clone production with hela cells in tissue culture: the use of x-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1955 Jul 15;41(7):432-7. doi: 10.1073/pnas.41.7.432.
17. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*. 2005;1(2):169-78. doi: 10.1385/SCR:1:2:169.
18. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb;16(1):3-32. doi: 10.1007/s12015-019-09935-x.

19. 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.
  
20. 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.
  
21. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning*. 2014 Dec 4;7:89-99. doi: 10.2147/SCCAA.S51009.
  
22. Schneider R, Holland GR, Chiego D Jr, Hu JC, Nör 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.
  
23. Germain L, De Berdt P, Vanacker J, Leprince J, Diogenes A, Jacobs D, et al. Fibrin hydrogels to deliver dental stem cells of the apical papilla for regenerative medicine. *Regen Med*. 2015;10(2):153-67. doi: 10.2217/rme.14.81.
  
24. Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Reis RL. Current Concepts and Challenges in Osteochondral Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015 Apr 13;1(4):183-200. doi: 10.1021/ab500038y.
  
25. Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol Biol*. 2011;695:17-39. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0\_2.
  
26. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol*. 2006 Mar;24(3):105-8. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.01.001.
  
27. Trubiani O, Diomede F. Xeno-free culture of human periodontal ligament stem cells. *Methods Mol Biol*. 2015;1283:87-92. doi: 10.1007/7651\_2014\_122.
  
28. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1603-9. doi: 10.1634/stemcells.2007-0127.

29. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. ALTEX. 2010;27(1):53-62. doi: 10.14573/altex.2010.1.53.
  
30. 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.
  
31. Baker M, Penny D. Is there a reproducibility crisis? Nature. 2016 May 26;533(7604):452-4.
  
32. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Altern Lab Anim. 2002 Mar-Apr;30(2):219-27. doi: 10.1177/026119290203000208.
  
33. Mendicino M, Bailey AM, Wonnacott K, Puri RK, Bauer SR. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. Cell Stem Cell. 2014 Feb 6;14(2):141-5. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.013.
  
34. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. Eur J Immunol. 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772.
  
35. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. J Cell Biol. 1991 Jun;113(5):981-6. doi: 10.1083/jcb.113.5.981.
  
36. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
  
37. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annu Rev Immunol. 1990;8:253-78. doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001345.
  
38. May LT, Santhanam U, Tatter SB, Bhardwaj N, Ghrayeb J, Sehgal PB. Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. Biochem Biophys Res Commun. 1988 May 16;152(3):1144-50. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80404-2.
  
39. Siqueira JF, Saboia-Dantas CJ. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.

40. Nordan RP, Potter M. A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science*. 1986 Aug 1;233(4763):566-9. doi: 10.1126/science.3726549.
41. Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Penza E, Magnani O, et al. Infection risk associated with anti-TNF- $\alpha$  agents: a review. *Expert Opin Drug Saf*. 2015 Apr;14(4):571-82. doi: 10.1517/14740338.2015.1009036.
42. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279(4):2559-67. doi: 10.1074/jbc.M308809200.
43. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Oct;21(5):331-44. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
44. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Oct;21(5):315-24. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.11.001.
45. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1390-7. doi: 10.1038/ni1539.
46. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul*. 1990 Nov;1(12):875-82. doi: 10.1091/mbc.1.12.875.
47. Kasagi S, Chen W. TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell Biosci*. 2013 Jan 15;3(1):4. doi: 10.1186/2045-3701-3-4.
48. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x.
49. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999 Jan 28;397(6717):315-23. doi: 10.1038/16852.

50. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999 Sep 15;13(18):2412-24. doi: 10.1101/gad.13.18.2412.
51. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo).* 2015 Jul-Sep;13(3):469-73. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
52. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0.
53. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation on the Internet]. Umeå: University of Umeå; 1976 [citado 7 maio 2022]. Disponível em: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:719968/FULLTEXT02.pdf>.
54. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981 Dec;89(6):475-84. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x.
55. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J.* 1990 Mar;23(2):100-6. doi: 10.1111/j.1365-2591.1990.tb00847.
56. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta.* 2002 Sep;323(1-2):59-72. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00180-8.
57. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 7;21(2):379. doi: 10.3390/ijms21020379.
58. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511. doi: 10.1038/nri1391.
59. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Hoboken, NJ, USA: John Wiley; 2005. doi: 10.1002/9780471747598.
60. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers.* 2020;1:332-49. doi: 10.1002/fft2.44.

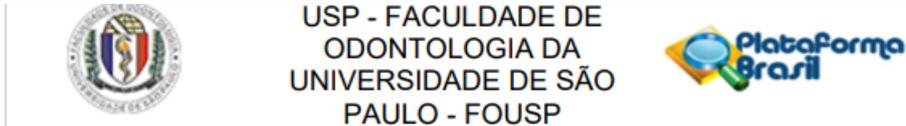
61. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. 2010 Feb;56(2):319-20. doi: 10.1373/clinchem.2009.127803.
62. Franco VLM, Marques LOC, Diniz SGS, Assunção VIS, Nogueira ABL, Bragagnolo JCB et al. A técnica de elisa e a sua importância para o diagnóstico clínico. *Braz J Develop*. 2021 set;7(9):89877-85. doi: 10.34117/bjdv7n9-243.
63. Barnes JH, Seymour DT. Experimental bias: Task, tools, and time. *J Acad Mark Sci*. 1980;8(1-2):1-11. doi: 10.1007/BF02721967.
64. Rhoden IFL. Avaliação de risco de viés de estudos in vitro: protocolo para uma revisão sistemática [tese]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2020.
65. Pizzatto LN, Meneses CCB, Diniz EA, Dionísio TJ, Santos CF, Sipert CR. Angiotensin II Regulates Proliferation and Function of Stem Cells of Apical Papilla. *J Endod*. 2020 Jun;46(6):810-817. doi: 10.1016/j.joen.2020.03.015.
66. 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.
67. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81. doi: 10.1177/154411130401500604.
68. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod*. 2014 Apr;40(4 Suppl):S52-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.015.
69. Lin LM, Shimizu E, Gibbs JL, Loghin S, Ricucci D. Histologic and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: a case report. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):291-5. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.024.
70. Lin LM, Ricucci D, Huang GT. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *Int Endod J*. 2014 Aug;47(8):713-24. doi: 10.1111/iej.12210.

71. Wang ZJ, Zhang FM, Wang LS, Yao YW, Zhao Q, Gao X. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int*. 2009 Jun;33(6):665-74. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.03.006.
72. Lei S, Liu XM, Liu Y, Bi J, Zhu S, Chen X. Lipopolysaccharide Downregulates the Osteo-/Odontogenic Differentiation of Stem Cells From Apical Papilla by Inducing Autophagy. *J Endod*. 2020 Apr;46(4):502-508. doi: 10.1016/j.joen.2020.01.009.
73. Zhang HT, Zha ZG, Cao JH, Liang ZJ, Wu H, He MT, et al. Apigenin accelerates lipopolysaccharide induced apoptosis in mesenchymal stem cells through suppressing vitamin D receptor expression. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Nov;124(21):3537-45.
74. Sozzani S, Zhou D, Locati M, Rieppi M, Proost P, Magazín M, et al. Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J Immunol*. 1994 Apr 1;152(7):3615-22.
75. Chen W, Foo SS, Sims NA, Herrero LJ, Walsh NC, Mahalingam S. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. *Trends Microbiol*. 2015 Jan;23(1):35-43. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.005.
76. Meneses CCB. Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco de Papila Apical in vitro [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020.
77. Gomes RS. Hidróxido de Cálcio na modulação de células da papila apical e ligamento periodontal in vitro [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021.
78. Mohammad KS, Chen CG, Balooch G, Stebbins E, McKenna CR, Davis H, et al. Pharmacologic Inhibition of the TGF- $\beta$  Type I Receptor Kinase Has Anabolic and Anti-Catabolic Effects on Bone. *PLoS One*. 2009;4(4):e5275. doi: 10.1371/journal.pone.0005275.
79. Fan Q, Gu D, Liu H, Yang L, Zhang X, Yoder MC, et al. Defective TGF- $\beta$  signaling in bone marrow-derived cells prevents hedgehog-induced skin tumors. *Cancer Res*. 2014 Jan 15;74(2):471-483. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2134-T.

80. Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, Chung KF. TGF- $\beta$  regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Feb;300(2):L295-304. doi: 10.1152/ajplung.00134.2010.
81. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997 Jun;20(6):252-8. doi: 10.1016/s0166-2236(96)01035-1.
82. Sartori T, Santos ACA, Oliveira da Silva R, Kodja G, Rogero MM, Borelli P, et al. Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing nuclear factor kappa B expression and modulating some inflammatory properties. *Nutrition*. 2020 Oct;78:110935. doi: 10.1016/j.nut.2020.110935.
83. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. 2010 Jun;24(4):1053-63. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
84. Ransohoff DF, Gourlay ML. Sources of bias in specimens for research about molecular markers for cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):698-704. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6065.
85. Mortimore GE, Schworer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*. 1977 Nov 10;270(5633):174-6. doi: 10.1038/270174a0.
86. Aldahmash A, Haack-Sørensen M, Al-Nbaheen M, Harkness L, Abdallah BM, Kassem M. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Nov;7(4):860-8. doi: 10.1007/s12015-011-9274-2.
87. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1603-9. doi: 10.1634/stemcells.2007-0127.



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Soro Bovino Fetal como fator de interferência na produção de citocinas por células de papila apical in vitro

**Pesquisador:** Carla Renata Sipert

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 29421220.3.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.251.087

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de emenda de projeto anteriormente aprovado por este CEP que investiga a concentração ideal de Soro Bovino Fetal em culturas de células de papila apical visando a quantificação de citocinas inflamatórias produzidas por estas células

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo da pesquisa é padronizar a concentração ideal de Soro Bovino Fetal em culturas de células de papila apical para a quantificação de citocinas inflamatórias produzidas por estas células, sob diferentes estímulos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A emenda não traz alterações para os riscos e benefícios anteriormente apreciados. Os riscos foram considerados mínimos tendo em conta que as células de papila apical humana já foram previamente coletadas e armazenadas (não haverá participação de pacientes neste estudo). estas mesmas considerações aplicam-se aos benefícios para os participantes de pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Observa-se que o motivo da emenda é o de informar:

1) Alteração da equipe de pesquisa: remoção do membro Cláudia Meneses em virtude do encerramento de seu vínculo com a Universidade a partir de 3 de setembro de 2020 (defesa de tese) e inserção da mestranda Leticia Martins Santos.

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



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: 4.251.087

2) Alteração do Cronograma em virtude do decreto de quarentena e interrupção das atividades de Pesquisa na Universidade. Reprogramação a partir de setembro de 2020.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto, projeto detalhado e autorização de uso do biobanco, todos em conformidade

**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](http://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:**

sem 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_1620380_E1.pdf	27/08/2020 11:19:14		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco_Assinaturas.pdf	17/04/2020 11:17:30	Carla Renata Sipert	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Elisa_2020.pdf	17/04/2020 09:52:03	Carla Renata Sipert	Aceito
Folha de Rosto	Untitled_02112020_120555.pdf	11/02/2020 11:51:04	CLAUDIA CAROLINE BOSIO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

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



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



Continuação do Parecer: 4.251.087

Não

SAO PAULO, 01 de Setembro de 2020

---

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

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