

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
RESTAURADORA

VÍTOR LUÍS RIBEIRO

**Utilização de esferoides de células tronco da polpa
dentária na diferenciação osteoblástica e na recomposição
de cavidade de lesão periapical simulada por impressão
em 3D**

RIBEIRÃO PRETO

2020

VÍTOR LUÍS RIBEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Qualificação para obtenção do grau de Mestre em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora – Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: *Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.*

Ribeirão Preto

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.

Assinatura do autor: _____ Data: ____/____/2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Vítor Luís

Utilização de esferoides de células tronco da polpa dentária na diferenciação osteoblástica e na recomposição de cavidade de lesão periapical simulada por impressão em 3D, 2020.

109p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora- área Endodontia. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr

1. Esferoides. 2. Células tronco da polpa dentária 3. Diferenciação osteoblástica. 4. Lesão Periapical. 5. Impressão em 3D

RIBEIRO, V. L. **Utilização de esferoides de células tronco da polpa dentária na diferenciação osteoblástica e na recomposição de cavidade de lesão periapical simulada por impressão em 3D.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____



Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais **Paulo Ribeiro** e **Adriana Ribeiro** e ao meu irmão **Felipe Ribeiro**.

Agradecimientos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.**, ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, a **Prof^a. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado** e aos funcionários **Aline Aparecida Ferrarese Tiballi, Carlos Feitosa dos Santos, Dimitrius Leonardo Pitol, Reginaldo Santana** e **Roger Rodrigo Fernandes**.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética em geral e em especial a **Prof^a. Dra. Janaína de Andrea Dernowsek** e a **Ana Carolina Monteleone Cassiano**.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Endodontia em especial ao **Prof. Dr. Jardel Francisco Mazzi Chaves**.

Às instituições **CAPES, CNPQ** e **FAPESP** pela bolsa concedida e pelos financiamentos dos projetos dos respectivos laboratórios.

Resumo

RIBEIRO, V.L. Utilização de esferoides de células tronco da polpa dentária na diferenciação osteoblástica e na recomposição de cavidade de lesão periapical simulada por impressão em 3D. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As células tronco são células com capacidade de auto-renovação e diferenciação, ou seja, elas têm a capacidade de gerar células filhas semelhantes e também células diferenciadas. Os estudos com células tronco da polpa dental vem ganhando extrema importância na área da odontologia regenerativa, principalmente quando se trata da regeneração óssea nas áreas de implantodontia, periodontia e, mais recentemente na endodontia, visando o tratamento de lesões periapicais. O objetivo deste projeto foi estabelecer um sistema modeloexperimental de recomposição biológica da cavidade de lesão periapical por meio do uso de células tronco. Uma linhagem de células tronco de polpa dentária de dente humano decíduo esfoliado (*shed cells*) foram cultivadas in vitro em monocamada (2D) e depois foram levadas à formação de esferoides por meio de cultura em 3D. Paralelamente, utilizamos uma imagem típica de lesão periapical, obtida por tomografia computadorizada de dente incisivo lateral superior, para imprimir em acrílico um molde negativo da lesão. Esse molde negativo serviu para prepararmos um molde positivo, agora em gel de agarose, que reproduz a lesão periapical. De posse a esses três elementos (cultura das *shed cells* em 2D, dos esferoides 3D e do molde da lesão periapical) pudemos testar o sistema modeloproposto. As *shed cells* (culturas em 2D ou esferoides em 3D) foram induzidas a diferenciação osteoblástica e então semeadas no molde da lesão e temporalmente acompanhadas levando em conta parâmetros celulares e bioquímicos de diferenciação osteoblástica tais como formação de matriz óssea mineralizada, imunofluorescência, expressão gênica transcricional e atividade de fosfatase alcalina. Os resultados desse projeto contribuirão com a área da odontologia restauradora (endodontia) abrindo perspectivas para o uso de células tronco na restauração da lesão periapical.

Palavras-chave: Células tronco, Culturas 3D, Esferoides, Diferenciação Osteoblástica, Regeneração Óssea, Lesão Periapical, Odontologia Regenerativa.

Abstract

RIBEIRO, V.L. Utilization of dental pulp stem cell spheroids in osteoblastic differentiation and in the reconstruction of the 3D simulated periapical lesion cavity. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Stem cells are cells capable of self-renewal and differentiation, i.e. they have the ability to generate similar daughter cells and differentiated cells. Studies with dental pulp stem cells are becoming extremely important in regenerative dentistry, especially for bone regeneration in implant dentistry, periodontics and, more recently in endodontics, aiming the treatment of periapical lesions. The objective of this project is to establish an experimental model system for biological repair of the cavity of a periapical lesion through the use of stem cells. An exfoliated deciduous human tooth dental pulp stem cell line (shed cells) were cultured in vitro in monolayer (2D) and then led to spheroid formation through 3D culture. In parallel, we used a typical image of a periapical lesion, obtained by computed tomography of the upper lateral incisor tooth, to print in acrylic a negative mold of the lesion. This negative template served to prepare a positive template, now in agarose gel, which reproduces the periapical lesion. With these three elements (2D culture of shed cells, 3D spheroids and periapical lesion mold) we can test the proposed model system. Shed cells (2D cultures or 3D spheroids) were induced to osteoblast differentiation and then seeded into the lesion mold and temporally followed taking into account cellular and biochemical parameters of osteoblast differentiation such as mineralized bone matrix formation, immunofluorescence, transcriptional gene expression. and alkaline phosphatase activity. The results of this project will contribute to the area of restorative dentistry (endodontics) opening perspectives for the use of stem cells in the restoration of periapical lesion.

Keywords: Stem Cells, 3D Cultures, Spheroids, Osteoblastic Differentiation, Bone Regeneration, Periapical Lesion, Regenerative Dentistry.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Gerais.....	39
2.2 Específicos.....	39
3. FLUXOGRAMA.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Células tronco isoladas da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (shed cells).....	47
4.2 Cultura em monocamada 2D.....	48
4.3 Esferoides multicelulares em cultura 3D.....	48
4.3.1 Preparo do gel de agarose.....	49
4.3.2 Esterelização dos moldes em acrílico.....	49
4.3.3 “Maturação” do molde de agarose.....	49
4.4 Cavidade de lesão periapical simulada por impressão em 3D.....	50
4.5 Curva de crescimento.....	51
4.6 Histologia.....	52
4.7 Live/Dead.....	53
4.8 Diferenciação osteoblástica das células tronco da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (shed cells).....	53
4.9 MTT.....	54
4.10 Atividade da ALP (fosfatase alcalina).....	55
4.11 Análise qualitativa de mineralização.....	55
4.12 Imunofluorescência.....	56
4.13 PCR Tempo Real (RT qPCR).....	56
4.14 Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS	61
5.1 Análise da viabilidade celular em diferentes métodos de cultura 3D.....	63
5.2 Análise morfológica dos esferóides.....	65
5.3 Análise da viabilidade celular dos esferoides de shed cells com <i>Live/Dead Kit</i>	68

5.4	Viabilidade celular durante o processo de diferenciação osteoblástica.....	70
5.5	Atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	70
5.6	Análise qualitativa dos nódulos de mineralização.....	72
5.7	Imunofluorescência.....	74
5.8	Expressão dos marcadores relacionados à osteogênese: RUNX 2, ALPL, BGLAP, SP7 e BSP.....	76
5.9	Expressão dos marcadores de células tronco mesenquimais: CD13, CD29, CD44, CD73 e CD90.....	81
6.	DISCUSSÃO.....	87
7.	CONCLUSÕES.....	95
8.	REFERÊNCIAS.....	99

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A infecção polimicrobiana anaeróbica da polpa dentária e do sistema de canais radiculares causa a lesão periapical, inflamação e condição de resposta imune. Essa inflamação prejudica e danifica os tecidos resultando em reabsorção do osso ao redor do ápice radicular (MAZZI-CHAVES, et al 2018).

Visando o reparo da lesão periapical, se faz necessária a intervenção para que haja a eliminação ou redução do contingente bacteriano presente no sistema de canais radiculares e esses objetivos são alcançados por meio do tratamento endodôntico, que consiste no preparo biomecânico do sistema de canais radiculares, uso de soluções irrigantes para dissolução dos tecidos orgânicos necróticos, medicações intracanal tornando o meio alcalino e impróprio para o crescimento bacteriano, obturação dos canais, seguido do processo restaurador, os quais permitem o restabelecimento da função do elemento dental (SILVA et al., 2012; ALVES et al., 2016) e posterior selamento para que não ocorra microinfiltrações e nova contaminação bacteriana do sistema de canais radiculares.

O tratamento endodôntico, portanto, objetiva prevenir e tratar a lesão periapical, para que o elemento dental possa estar na cavidade bucal em condições fisiológicas saudáveis. A ocorrência de sinais e sintomas da doença em associação com dentes já tratados endodonticamente, significam que a lesão periapical ainda está presente e é chamada de lesão periapical pós-tratamento, que pode ser classificada como: emergente (se desenvolvida após o tratamento), persistente (se persistir apesar do tratamento) ou recorrente (se desenvolvida após a cicatrização) (SIQUEIRA JR et al., 2014).

Radiolucências periapicais presentes antes ou após do tratamento ou retratamento endodôntico frequentemente sugerem, respectivamente, infecção e falha na erradicação da infecção bacteriana intra-radicular. Lesões periapicais primárias são consideradas uma resposta inicial do organismo à necrose da polpa dentária, enquanto as lesões periapicais persistentes permanecem após o fracasso do tratamento ou retratamento endodôntico do sistema de canais radiculares (ESTRELA et al., 2017).

O tempo de preservação pós-tratamento endodôntico para determinação do sucesso ou insucesso e neoformação óssea das lesões periapicais é variável e ainda discutido entre autores. Estudos revelam um período mínimo de 4 anos pós-tratamento endodôntico, enquanto outros dizem 2 anos, 1 ano e outros dizem após 6 meses (STRINDBERG, 1956; BENDER et al., 1966; BERGENHOLTZ et al., 1979; REIT, 1987; FRIEDMAN et al., 1995; SJÖGREN et al., 1997).

Sendo a lesão periapical uma doença multifatorial, outros fatores além dos relacionados ao tratamento endodôntico e restaurador estão envolvidos e precisam ser levados em consideração, como a microbiologia bacteriana relacionada às características intrínsecas do hospedeiro, seja por sua capacidade de defesa em resposta ao agente contaminante, seja por sua capacidade de reparo após a remoção do mesmo. Desse modo, a relação entre resistência do hospedeiro *versus* virulência dos microrganismos tem impacto direto no desenvolvimento e no reparo das doenças, ou seja, nem todos os indivíduos apresentam a mesma resposta fenotípica, bem como expressões gênicas frente a determinado estímulo e tratamento (PETEAN et al., 2019).

Terapias baseadas na utilização de células tronco na endodontia regenerativa são estratégias terapêuticas promissoras, consistindo no uso de células tronco, scaffolds e fatores de crescimento e diferenciação que estão envolvidos na regeneração da polpa (GONZÁLEZ et al., 2018), assim como na regeneração de lesões periapicais persistentes ou de tamanho crítico, que não possuem a capacidade de auto-regeneração do organismo do hospedeiro, resultando na cura desta doença e na longevidade dos elementos dentários.

As células tronco (Figura 1) são definidas como células com capacidade de auto-renovação: gerar novas células semelhante a ela; e diferenciação: gerar novas células diferenciadas, progenitoras (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006).

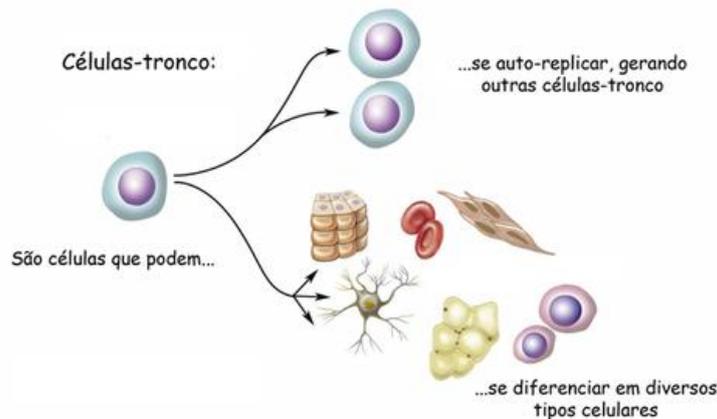


Figura 1. Conceito simplificado de células tronco e seu potencial de diferenciação. (Adaptada de NATIONAL ACADEMIES).

Fonte: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

Existem dois tipos principais de células tronco: as embrionárias (CTE), que por sua vez são subdivididas em células tronco germinativas (células tronco neuronais e outras pluripotentes), estas células possuem a capacidade de produzir um organismo inteiro; o outro tipo são as células tronco adultas (CTAs) natais e pós-natais que apresentam graus diferentes dessa capacidade, são mais amplamente conhecidas e denominadas como células multipotentes (células tronco do tecido adiposo, da medula óssea, da polpa dentária e outro grupo que são as células precursoras que tem a capacidade de diferenciação mais restrita, como os linfócitos T e B e outras células tronco hematopoiéticas; o último tipo de célula tronco, são as progenitoras ou unipotentes, sendo aquelas que apresentam menor capacidade de diferenciação celular. (DERNOWSEK et al., 2018). Toda essa capacidade de diferenciação garante o processo de auto-renovação do organismo durante a vida e a sua sobrevivência em casos de doenças, lesões, traumas ou injúrias (CAPLAN, 2008).

Vários estudos científicos têm sido realizados para buscar entender melhor todo o processo de diferenciação celular de forma mais exata. Zipori (2005) relatou em seu estudo que as células tronco mesenquimais (CTMs) podem se diferenciar em vários tipos de células especializadas, sem ocorrer processos que as comprometam. No organismo adulto elas são rapidamente mobilizadas mediante a existência de lesões teciduais, Zipori (2005) ainda diz que essas células se encontram em modo *standby*, de forma que genes expressados nas células já

diferenciadas são expressos em baixos níveis, mas tornando essas células aptas a mudarem rapidamente para uma determinada direção mediante um estímulo externo.

As células tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (shed cells) são células tronco mesenquimais obtidas a partir de explantes de polpa dentária e estão sendo muito utilizadas em estudos por possuírem uma alta taxa de proliferação e expressam marcadores genéticos como: Oct4, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 e CD166. Essas células tronco são importantes na regeneração e reparação de lesões craniofaciais, perda de dentes e ossos devido à sua alta capacidade de proliferação e diferenciação frente a essas injúrias. De fato, tem sido relatado que essas células são apropriadas para terapia endodôntica regenerativa (GONZÁLEZ et al., 2018) sendo de relevância para futuros tratamentos envolvendo regeneração de lesões ósseas de tamanho crítico e lesões periapicais persistentes.

Estudos envolvendo este tipo de população de células tronco mesenquimais (CTMs) não têm restrições éticas ou polêmicas como às células embrionárias. Porém, estas células podem apresentar menor potencial de diferenciação, assim como dificuldades no isolamento celular in vitro, por estarem presente em menor quantidade nos tecidos. Todavia, oferecem vantagens por não apresentarem restrições de histocompatibilidade e como um sistema-modelo, elas oferecem controle dos processos de proliferação e diferenciação durante o cultivo celular (DERNOWSEK et al., 2018). Nos estudos de biologia celular é necessário o estabelecimento das culturas celulares in vitro para que investigações dos mecanismos e processos biológicos celulares sejam realizadas sob condições experimentais específicas. O método de cultura em monocamada (2D) tem sido referência, porém por conta de sua morfologia simples, alterações das propriedades celulares podem ocorrer, conseqüentemente havendo diferenças das condições reais do microambiente do organismo in vivo (ZHANG & COMER, 2018).

Estudos têm mostrado que as células, de modo geral, possuem alta capacidade responsiva em seus arredores, ou seja, dependendo do estímulo fornecido, elas podem apresentar modificações e evoluções de seus mecanismos para sobrevivência em diversas condições. E esta qualidade celular é que se faz promissora na cultura 3D e por isso, estudos nos últimos anos vêm sendo realizados

para desenvolver metodologias de culturas 3D que reduzam as incertezas decorrentes de cultivos em monocamada 2D (RODRIGUEZ-HERNANDES et al., 2014; LIN & CHANG, 2008). Um desses modelos é o esferoide multicelular (EMC), demonstrado pela primeira vez por Holtfreter (1944) usando uma automontagem com processo de células suspensas.

A formação do esferoide multicelular acontece em um processo de 3 fases (FIGURA 2), na primeira fase, fibras de cadeia longa com múltiplos RGD (sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico) para integrinas de superfície celular, fazem com que haja rápida agregação de células dispersas; na segunda fase, ocorre uma fase de atraso, na qual há expressão e acúmulo de caderina e na terceira e última fase, há a formação de esferoides multicelulares compactos através de interações homofílicas de caderina-caderina de uma célula com a outra (LIN & CHANG, 2008).

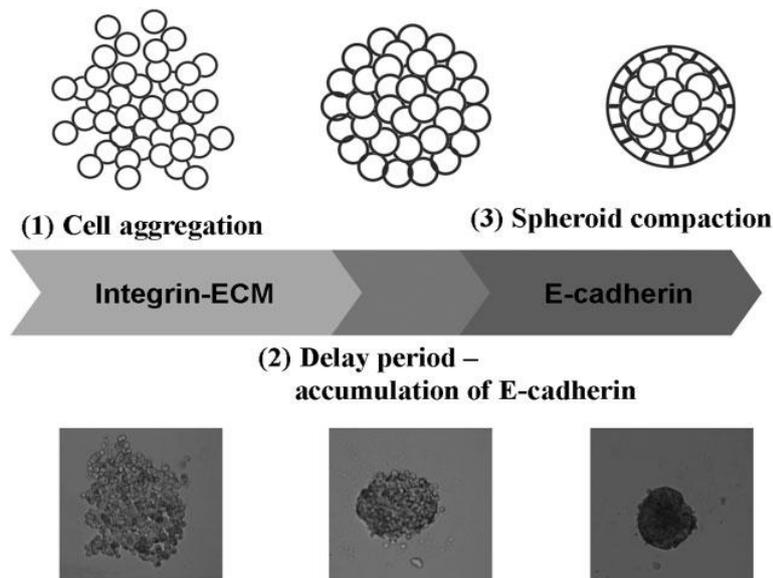


Figura 2. Modelo do processo de formação de esferoides do estudo de LIN & CHANG, 2008. A formação de esferoides pode ser dividida em três etapas: (1) formação de agregados celulares soltos via ligação integrina-ECM; (2) um período de atraso para a expressão e acumulação de caderina; (3) formação de esferoides compactos através de interações homofílicas de caderina-caderina

Com o passar dos anos, estudos têm comprovado que a maioria das exhibições de culturas 3D apresenta maiores similaridades com tecidos reais in vivo em muitos aspectos do que culturas 2D. Portanto, estudos têm mostrado que culturas de esferoides 3D in vitro apresentaram expressões gênicas e respostas

fenotípicas a estímulos externos mais similares com o tecido in vivo e que as células tronco mesenquimais (CTMs) têm sido amplamente utilizadas para estudos de regeneração de tecidos pulpar e ósseo. Assim, podendo ser uma alternativa coerente para uma maior exploração e utilização clínica destes esferoides de células tronco indiferenciadas da polpa dental (CTIPDs), após diferenciação osteoblástica, para o tratamento de lesões periapicais, concomitante ao tratamento endodôntico e restaurador.

Nesse trabalho procuramos estabelecer um sistema modelo utilizando células tronco isoladas da polpa dentária na tentativa de possibilitarmos a formação de esferoides e seu potencial de diferenciação osteoblástica. Uma vez estabelecido esse sistema modelo, ele poderá contribuir com o tratamento biológico de lesões periapicais.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

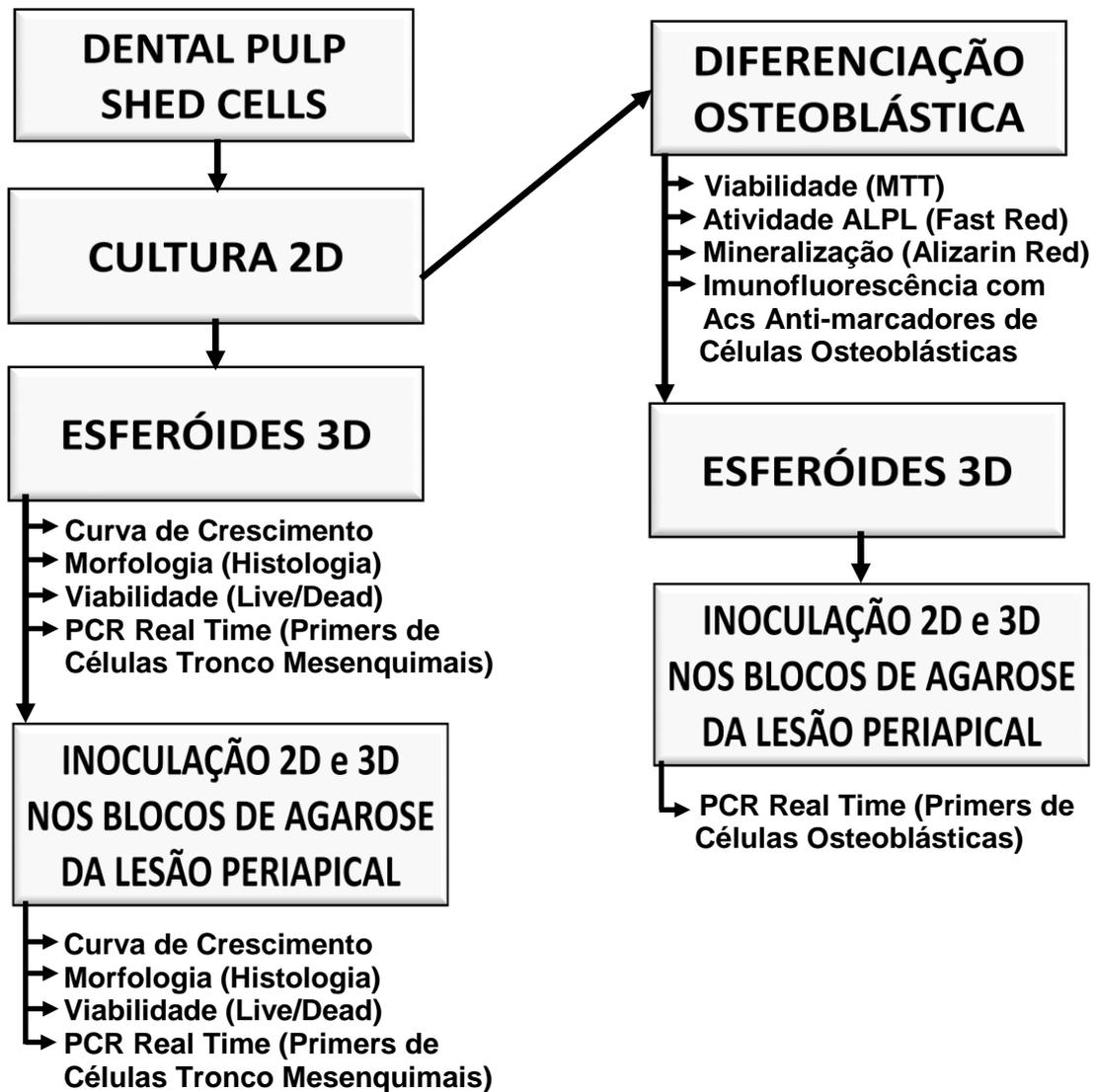
O objetivo deste projeto é estabelecer um sistema modelo experimental e in vitro de recomposição biológica da cavidade de lesão periapical por meio do uso de células tronco isoladas da polpa dentária.

2.2 Específicos

Comparar, através de ensaios de viabilidade celular, histológico, de biologia molecular e bioquímicos, culturas celulares convencionais (2D) e de esferoides multicelulares (3D) de células tronco da polpa dentária, antes e após a diferenciação osteoblástica, em sistema modelo mimetizando a lesão periapical de um incisivo lateral superior in vitro por impressão 3D.

Fluxograma

3. Fluxograma



Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células tronco isoladas da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (Shed Cells)

A linhagem de células tronco da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (shed cells) foi cedida pela Prof^a. Dra. Maria Rita Passos dos Santos e Passos Bueno do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. O isolamento e a caracterização desta linhagem foi realizada a partir da polpa dentária obtida de dentes decíduos humanos normais de crianças com 5 a 7 anos de idade, os quais foram extraídos sob anestesia local na Clínica Odontológica CERA, com consentimento dos responsáveis. A polpa dentária foi extraída com instrumento odontológico adequado, lavado duas vezes com PBS (0,01 M, pH 7,4) suplementado com antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina), e transferida para placas de Petri de 35 mm (Corning, USA) com DMEM (Meio de Eagles modificado por Dulbecco) contendo meio Ham F12 e suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂ (KERKIS *et al.*, 2007).

O crescimento *in vitro* em cultura das shed cells foi mantido nessas condições por duas semanas. Após este período as células foram lavadas duas vezes com PBS e dissociadas em solução de tripsina 0,25% (Invitrogen); e semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² com uma densidade de 10⁴ células/garrafa.

A cultura foi mantida em semi-confluência de 70% para evitar a diferenciação celular e fazendo a troca de meio a cada 3-4 dias.

Para o congelamento (criopreservação), as células foram ressuspendidas em meio contendo 40% de SBF, 50% de DMEM e 10% de DMSO (Sigma, USA) em uma densidade de 5x10⁵ células/ml e colocadas em tubos plásticos apropriados (criotubos). A temperatura dos tubos foi diminuída a -20 °C até a temperatura final de -80 °C. Após esta etapa, as células foram mergulhadas em nitrogênio (N₂) líquido acondicionados em bujões de criopreserações.

Para descongelamento e a posterior utilização das células, os criotubos foram removidos dos bujões de N₂ líquido e adicionado 1 ml de meio de cultura aquecido a 37 °C no criotubo e pipetado em garrafa de cultura com meio de cultura, após 24

horas as células foram lavadas duas vezes em PBS estéril, a troca do meio de cultura foi realizada.

4.2 Cultura em monocamada 2D

Os sistemas de cultivo convencionais ou bidimensionais (2D) utilizam placas ou garrafas (DIRAMI et al, 1999; NAGANO et al, 2003). As shed cells foram semeadas em garrafas, em suspensão ao meio de cultura (suplementado com soro fetal bovino e antibiótico), o qual forneceu nutrição para sobrevivência celular.

Existem diversos meios comerciais básicos que podem ser suplementados para o cultivo celular. O meio de cultivo que foi utilizado para as culturas celulares tanto convencionais 2D, quanto dos esferoides 3D, foi o Dulbecco modified Eagle Medium suplementado com Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco®) e com 20% de soro fetal bovino.

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm³ e mantidas em incubadoras de CO₂ (Thermo Electron Corporation) a 37°C com 5% de atmosfera até alcançar confluência celular de 70% para repique.

4.3 Esferoides multicelulares em cultura 3D

O sistema de cultivo tridimensional (3D) foi estabelecido e primeiramente utilizado, para estudos dos mecanismos de proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas (PARENT-MASSIN et al., 2001). Desde então, este novo modelo de cultivo celular é considerado uma autêntica representação do ambiente celular in vitro e in vivo, recebendo muita atenção no campo da biologia celular (ZHANG & COMER, 2018)

Diferentemente da cultura celular em monocamada 2D, as células semeadas em suspensão com meio de cultura não podem se aderir ao poliestireno das placas de cultura, pois desta forma não haverá a formação de esferoides. Portanto, placas de Petri para culturas bacterianas e certas placas de 6, 12, 24 e 96 poços são feitas de plásticos não-adesivos e são adequados para a cultura de esferoides multicelulares.

No presente estudo, foram utilizados moldes positivos de gel de agarose confeccionados a partir da impressão 3D de moldes negativos de acrílico (Figura 5) compostos por pinos de 600 μm , os quais foram utilizados para a confecção dos esferoides multicelulares.



Figura 5. Moldes de acrílico com pinos de 600 μm confeccionados por Impressão 3D.

4.3.1 Preparo do gel de agarose:

Para 25 ml de PBS, foi pesado 50 mg de agarose. A solução foi homogeneizada e colocada na autoclave para esterilização. A solução foi adicionada nos moldes de acrílico esterilizados e aguardou-se a solidificação, para posterior retirada do molde positivo do gel de agarose.

4.3.2 Esterilização dos moldes em acrílico:

Foi mantido em etanol 70% por 30 minutos, o álcool foi retirado e foram mantidos em radiação UV por 20 a 30 minutos.

4.3.3 “Maturação” do molde de agarose

Foram realizadas cinco lavagens de 15 minutos cada, com meio de cultura F12, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico, para a utilização dos moldes de agarose. Posteriormente, foi adicionada a suspensão celular com a quantidade de células desejada após a contagem. Foi feita a observação da formação dos esferoides com microscopia eletrônica invertida.

4.4 Cavidade de lesão periapical simulada por impressão em 3D

Um sistema modelado para mimetizar a lesão periapical *in vitro* foi utilizado neste estudo. Sua confecção se deu a partir do escaneamento da área de uma lesão periapical de um dente que necessitava tratamento endodôntico. A obtenção desta área se deu através de um exame radiográfico, utilizando tomografia computadorizada (ConeBeam), de um paciente do acervo de exames tomográficos da Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. O arquivo foi segmentado no programa CTAn v.1.18.4.0+ (SkyScan, Kontich, Bélgica) e utilizando um histograma de contrastes, foram obtidos através das diferenças de densidade de tons de cinza, o segmento e a separação da estrutura que compõe a lesão periapical das estruturas adjacentes (dente e osso alveolar).

Os moldes foram projetados utilizando o software Rhinoceros, o qual gerou um arquivo estereolitográfico (STL) da lesão periapical escaneada. Posteriormente, os moldes foram confeccionados utilizando a impressão 3D. O arquivo STL foi executado na impressora 3D (Polyjet Objet Connex 350 da Stratasys), a qual jorrou instantaneamente minúsculas gotículas de foto polímero líquido comercialmente denominado VeroClear (DERNOWSEK et al. 2018), assim foram confeccionados os moldes negativos com formatos e medidas exatas ao da lesão periapical anteriormente escaneada. Os moldes foram projetados para serem utilizados em placas de cultura Multiwell de 12 poços, contendo respectivamente, 3 lesões) periapicais de formatos e medidas idênticas por molde confeccionado (Figura 6).

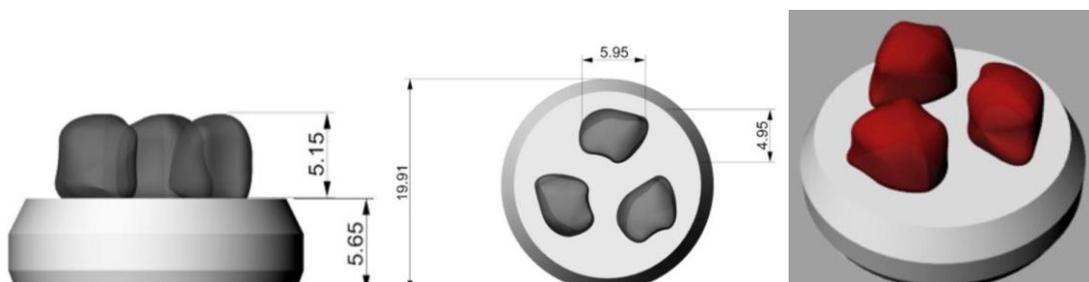


Figura 6. Projeções métricas do molde mimetizando lesão periapical confeccionados por Impressão 3D.

Os moldes em acrílico compostos por pinos de 600 μm e os mimetizando lesões periapicais foram confeccionados no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, Campinas, São Paulo, Brasil através de impressão 3D pela Dra. Janaína de Andrea Dernowsek. Ambos foram referidos no decorrer do trabalho por estes respectivos nomes.

A confecção dos moldes positivos em gel de agarose foi realizada a partir do protocolo de preparo, esterilização e maturação do gel de agarose já descrito anteriormente. E assim, foram utilizados os moldes confeccionados por impressão 3D, simulando a real situação de uma lesão periapical, para posterior inoculação de células em três diferentes situações: shed cells provindas diretamente da cultura 2D; esferoides multicelulares de shed cells provindos da cultura 3D utilizando o molde pinos de 600 μm ; shed cells após diferenciação osteoblástica provindas diretamente da cultura 2D e esferoides multicelulares de shed cells após diferenciação osteoblástica provindos da cultura 3D do molde pinos de 600 μm para respectivos testes e avaliações.

4.5 Curva de crescimento

Foram feitas curvas de crescimento celular dos diferentes grupos de esferoides e tipos de moldes, a fim de caracterizar e padronizar o melhor momento da utilização do esferoide 3D molde pino 600 μm no molde mimetizando lesão periapical, além de analisar a viabilidade celular pela curva de crescimento dos esferoides formados a partir das culturas 2D e 3D inoculadas no molde mimetizando lesão periapical para a recomposição dessa cavidade.

A curva de crescimento dos esferoides do molde pinos de 600 μm foi realizada nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas e dos esferoides formados após a inoculação da cultura 2D e 3D no molde mimetizando lesão periapical in vitro nos tempos 8, 16, 24, 32 e 40 horas.

O cálculo foi realizado a partir dos valores das quantidades celulares das triplicatas nos respectivos tempos. Um teste piloto foi realizado com 300 mil shed cells para os esferoides do molde pinos de 600 μm , porém observou-se que a quantidade celular inicial era alta para os parâmetros métricos do molde e, portanto

preconizou-se 125 mil células. Para os esferoides formados a partir da inoculação de shed cells no molde mimetizando lesão periapical provindas da cultura 2D foram semeadas 300 mil células e provindas da cultura 3D preconizou a utilização dos esferoides na fase exponencial da curva de crescimento do molde pinos de 600 μm , sendo a proporção: esferoides de um poço da placa Multiwell 12 poços para uma cavidade do molde da lesão periapical.

As concentrações celulares foram ressuspensas em meio F12 (suplementado a 20% de soro fetal bovino e antibiótico) após a contagem celular com azul de tripan e contador de células (Nexcelom Auto T4 Cellometer). A cultura 2D foi pipetada diretamente nos poços, e a cultura 3D nos moldes de gel de agarose presentes em cada poço de uma placa Multiwell de 12 poços, com as respectivas quantidades celulares. Atingidos os respectivos tempos da curva de crescimento, foi utilizado 1 ml de tripsina, e aguardados 5 minutos, para que houvesse a dissociação celular. As células foram removidas e centrifugadas a 1000 giros em um tubo falcon 15 ml, durante 5 minutos. Após formação do pelet, foi realizada a nova contagem da quantidade celular utilizando azul de tripan e contador de células (Nexcelom Auto T4 Cellometer). Nos grupos dos esferoides, células semeadas que caíram embaixo do gel de agarose, e que se aderiram ao polietileno, foram descartadas.

Uma média dos valores de cada triplicata foi gerada, e assim, formando a curva de crescimento dos esferoides composta por cinco fases: fase de latência, fase exponencial, fase de desaceleração, fase estacionária e fase de morte.

4.6 Histologia

A análise histológica dos esferoides de shed cells provindos do molde de micro pinos de 600 μm e do molde da lesão periapical, provindos da inoculação das culturas 2D e 3D, foram realizadas colhendo esferoides na fase exponencial da curva de crescimento dos respectivos grupos, os quais foram fixados utilizando formol 10%, desidratados com uma série de concentração graduada de etanol 70, 80, 90 e 100%, posteriormente, foram embebidos em resina para inclusão. Foram realizados cortes para obtenção de secções de 5 μm de espessura e foram aderidas

a lâminas de vidro para microscopia. Posteriormente, foi realizada a reidratação e secagem. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e finalmente foram colocadas as lamínula para avaliação das morfologias dos esferoides utilizando microscopia digital.

4.7 Live/Dead

O kit LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) foi utilizado para avaliar qualitativamente a viabilidade celular dos esferoides do molde de micropinos de 600 µm e dos esferoides provindos da inoculação da cultura 2D e 3D no molde da lesão periapical na fase exponencial de suas respectivas curvas de crescimento. Portanto, foram colhidos os esferoides e após a lavagem com PBS, 10 µL de etidiodiomodímero-1 (2 µM) e 5 µL de calceína (2 µM) em 200 µL de PBS foram adicionados às células por 45 minutos a 37 °C, posteriormente foi colocado em uma lâmina histológica com lamínula. O microscópio de fluorescência (Ti 5 Nikon) foi utilizado para observar os esferoides, os quais apresentavam fluorescência verde para células vivas ou vermelha para células mortas.

4.8 Diferenciação osteoblástica das células tronco da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (shed cells)

A indução química das shed cells em osteoblastos foi deflagrada pela adição de dexametasona (Sigma) 10⁻⁷ M, 5µg/mL de ácido ascórbico (Gibco) e 2,16 g/mL de β-glicerolfosfato (Sigma) ao meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 15% de SBF, estas condições de cultura induzem a diferenciação osteoblástica (ROSA, BELOTI, 2003). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada três dias. Foram coletadas amostras de três períodos diferentes da cultura em monocamada 2D durante a indução de diferenciação: 7, 14 e 21 dias, para a realização de testes de viabilidade celular e diferenciação

osteoblástica, tais como: MTT, Fast Red, Mineralização e Imunofluorescência com anticorpos marcadores de células osteoblásticas.

Nos períodos de diferenciação: 7 e 14 dias as células foram colhidas para pipetagem e formação dos esferoides multicelulares de shed cells diferenciadas e, neste mesmo período, as células diferenciadas da cultura em monocamada 2D, os esferoides multicelulares diferenciados do molde de micro pinos de 600 μm e os esferoides diferenciados formados pela inoculação das culturas 2D e 3D no molde da lesão periapical foram submetidas a PCR em Tempo Real (qPCR) para a análise quantitativa da expressão de genes marcadores ósseos.

4.9 MTT

O ensaio foi utilizado para avaliar quantitativamente a viabilidade celular das shed cells ao meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 15% de SBF e meio indutores (dexametasona Sigma 10^{-7} M, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico Gibco e 2,16 g/mL de β -glicerolfosfato Sigma) e se baseou na metabolização do *Metiltetrazolium diphenyltetrazoliumbromide* (MTT) pela mitocôndria de células viáveis, que libera a enzima succinato desidrogenase, que converte o sal do tetrazolium, que possui cor amarelada e é hidrossolúvel, em cristais de Formazan, de cor azul. Portanto a atividade mitocondrial foi avaliada através da incubação das células em meio indutor osteoblástico nos tempos: 3,7 e 10 dias. Foi preparada a alíquota de MTT (5 mg/mL) em PBS filtrado e dentro do fluxo, foi preparada a solução 10% de MTT + 90% de MTS 10% filtrado, em um tubo falcon de acordo com o número de poços da placa Multiwell a serem avaliados. Foi acrescentado 1 ml de solução MTT/MTS por poço e a placa foi deixada na incubadora por 4 horas, posteriormente retirada e lavado uma vez com PBS não filtrado. Foi acrescentado 1 ml de isopropanol ácido por poço, levado para o agitador de placa por 5 minutos, homogeneizado e acrescentado 150 μL na placa de 96 poços (ELISA) com um poço em branco (150 μL de isopropanol ácido). A absorbância de cada poço foi mensurada a 570 nm no leitor de ELISA. A densidade óptica é que dá o resultado, portanto, quanto mais escura for a coloração, maior é a metabolização do MTT pelas células viáveis, ou seja, conseqüentemente maior a proliferação celular.

4.10 Atividade da ALP (Fosfatase Alcalina)

A análise da enzima fosfatase alcalina foi realizada por meio de Fast Red. Para a avaliação, 1×10^4 células de shed cells da cultura 2D foram plaqueadas em 5 poços (n=5) da placa de cultura Multiwell de 24 poços e cultivadas durante 7, 10, 14 e 21 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37 °C, posteriormente, 320 mg do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20 mL de água deionizada e, adicionado, 7 mg do reagente Fast Red (Sigma). Foram desprezados 2 mL desta solução e acrescidos 8 mg de Naphtol (Sigma) diluídos em 2 mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. 1 mL dessa solução foi adicionado em cada poço e a placa foi levada para incubadora à 37 °C com 5% de CO₂ durante 30 minutos. Aguardado o tempo, foi removida a solução de cada poço e as placas ficaram em descanso, para secagem, durante 48 horas. Foi realizada a documentação fotográfica e as imagens foram submetidas ao programa Image J para cálculo da porcentagem de área do Fast Red de cada poço nos respectivos tempos.

4.11 Análise qualitativa de mineralização

Foi utilizado o teste de mineralização (Midura) para visualização e evidenciação das áreas de deposição de cálcio pela coloração vermelha (Alizarin Red). Para a avaliação, 1×10^4 células de shed cells da cultura 2D foram plaqueadas em 5 poços (n=5) da placa de cultura Multiwell de 24 poços e cultivadas durante 7, 14, 17 e 21 dias. Após esses períodos, o meio foi removido, os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37 °C e desidratados com álcool 70% durante 1 hora na geladeira. Após remoção do álcool, os poços foram lavados duas vezes com PBS e corados, com 2 ml por poço, de vermelho de alizarina (Sigma) durante 45 minutos, posteriormente o vermelho de alizarina foi removido e os poços foram lavados uma vez com água deionizada e PBS, após sua remoção, as placas ficaram em descanso, para secagem, durante 48 horas. Foi realizada a documentação

fotográfica para observação das áreas evidenciadas de mineralização de cada poço nos respectivos tempos.

4.12 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, as shed cells cultivadas nos períodos de 7, 14 e 21 dias cultivadas sobre lamínulas de vidro foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado 5% em PB por 30 minutos. Os anticorpos primários monoclonais e/ou policlonais para RUNX2, ALP e BSP (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídos em concentrações de trabalho e incubados por 1 hora, seguidos de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas à lamínula, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). Entre cada incubação as amostras eram lavadas 3 vezes com PBS, 10 minutos cada. Após montagem da lamínula de vidro sobre os disos, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Alemanha). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop para ajustes em dimensões, brilho e contraste, sobreposições de fluorescência azul, verde e vermelha e montagem das pranchas.

4.13 PCR Tempo Real (RT qPCR)

Foi utilizado o *kit – mirvanami RNA Isolation* para a extração de RNA. O meio das garrafas (cultura 2D) e dos poços (cultura 3D) foram descartados e as foram lavados três vezes com BPS filtrado. Foi adicionado 6 ml de tripsina nas garrafas para as células se soltarem e após aguardados 5 minutos na estufa a 37 °C, a tripsina foi inativada com o mesmo volume de meio DMEM/F12 e o volume total foi

passado para um tubo falcon de 15 ml, na cultura 3D os esferoides foram extraídos do molde de gel de agarose de todos os poços da placa Multiwell 12 poços com pipeta de 1000 uL e passados para tubos falcon de 15 ml e foram centrifugados durante 5 minutos a 1000 giros. Posteriormente o sobrenadante foi dispensado e ressuspensos em 5 ml de PBS e uma nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram vertidos para secagem.

Foi adicionado 1 ml do tampão lise por tubo falcon e homogeneizado no vórtex por 1 minuto, o miRNAhomogenate additive (10% do volume anterior), novamente homogeneizado no vórtex por 20 segundos e colocado no gelo por 10 minutos. Foi adicionado 1 ml de fenolclorofórmio, o qual apresenta duas fases no frasco e foi utilizada a segunda fase (de baixo) e homogeneizado no vórtex por 1 minuto, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 giros a 4 °C para a separação das duas fases no tubo e a primeira fase foi separada em novos tubos falcon de 15 ml. O dobro do volume retirado da primeira fase foi adicionado em Etanol 100% e todo volume final foi passado pelas colunas em tubos eppendorf (700 uL por vez) centrifugando por 15 segundos a 10.000 giros, descartando o líquido filtrado. Após todo volume ser filtrado, foi realizada a lavagem das colunas com wash 1 (700uL) e duas lavagens com wash 2 (500 uL) ambos centrifugados por 10 segundos a 10.000 giros e uma última centrifugação de 1 minuto a 10.000 giros foi realizada apenas com as colunas para eliminação de qualquer líquido residual. As colunas foram passadas para um novo tubo eppendorf e foi feita a eluição da água DEPC (100 uL) a 95 °C no termociclador centrifugando por 30 segundos a 16.000 giros. As colunas foram descartadas e o RNA mantido no tubo foi armazenado no -80 °C.

A quantificação de RNA foi realizada no aparelho Qubit 4 Fluorometer - Qubit Assays utilizando 190 uL de solução de trabalho através da diluição do reagente com o buffer conforme indicado pelo fabricante mais 10 uL da amostra de RNA. A solução foi homogeneizada no vórtex por 3 segundos. Foi feita a incubação dos tubos de amostras de RNA por 2 minutos em temperatura ambiente e colocados no aparelho para serem lidas para obtenção de concentração das amostras aceitáveis (5 – 500 ng/μL), posteriormente foi preparado o Mix para cada amostra, contendo 2 μL de 10x RT Buffer, 0,8 μL de 25x DNTp, 2 μL de Rondon Primers, 1 μL de Enzima,

1 µL de RNase Inibitor, 3,2 µL de H₂O DEPC e 1 µL de RNA de cada amostra, foi montada a estação, e o gel, Ladders e Mix foram pipetados e levados ao bioanalisador *2100 Expert* para análise da integridade do RNA extraído.

A fita de cDNA foi confeccionada utilizando 10 µL de RNA total de cada amostra, por meio da reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o *kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen – Life Technologies)* e o termociclador *GeneAmpTM PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific)*. Foi realizada PCRBio utilizando o *kit PCRBio HS Taq DNA Polymerase* e foi utilizado o primer do gene constitutivo GAPDH para a reação. Após feita a PCRBio, realizou-se a corrida no gel de eletroforese por 40 minutos utilizando 17 µL de amostra de cDNA da PCRBio, 3 µL de Loading Buffer e 1 µL de Brometo para verificação do cDNA.

Para as reações de PCR em tempo real (RT qPCR), foram utilizados o reagente *SYBR Green (Bio-Rad, Philadelphia, EUA)* e o aparelho *StepOne (Real Time PCR System)*. As reações foram realizadas em triplicata com 19 µL de Mix composto por 10 µL SB, 7,4 µL H₂O DEPC, 0,8 Primer F, 0,8 Primer R e acrescido de 1 µL de cada amostra de cDNA totalizando o volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi composta por 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor do CT (Cicle Treshold), que corresponde ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atingiu um limiar, o qual é determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão dos genes relacionados à osteogênese: RUNX 2, ALPL, BGLAP, SP7, BSP e dos genes de células tronco mesenquimais: CD13, CD29, CD44, CD73 e CD90. Como controle endógeno foi avaliada a expressão gênica do GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), pois como gene constituinte, é usado para normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. Duas amostras negativas (com H₂O DEPC) foram submetidas à reação com cada par da sequência dos primers utilizados. O método comparativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para comparar a expressão gênica das shed cells em seus diferentes grupos (cultura 2D e 3D) sem indução e com indução esteoblástica de 7 e 14 dias. A tabela 1 mostra a sequências de primers utilizados.

Símbolo do mRNA	Primer	Sequência 5' → 3'	Amplicon (Pb)	T _m
GAPDH	Forward	ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC	116	60 °C
	Reverse	CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC		
RUNX 2	Forward	AGT AAG AAG AGC CAG GCA GG	120	60 °C
	Reverse	GCT GGA TAG TGC ATT CGT GG		
ALPL	Forward	CCA CGT CTT CAC ATT TGG TG	115	60 °C
	Reverse	AGA CTG CGC CTG GTA GTT GT		
BGLAP	Forward	GGC AGC GAG GTA GTG AAG AG	110	60 °C
	Reverse	CTG GAG AGG AGC AGA ACT GG		
SP7	Forward	TGC TTG AGG AGG AAG TTC AC	125	60 °C
	Reverse	AGG TCA CTG CCC ACA GAG TA		
BSP	Forward	ACA ACA CTG GGC TAT GGA GA	127	60 °C
	Reverse	CCT TGT TCG TTT TCA TCC AC		
CD13	Forward	GCC GTG TGC ACA ATC ATC GC	130	60 °C
	Reverse	CAC CAG GGA GCC CTT GAG GT		
CD29	Forward	ACC AAG GTA GAA AGT CGG GA	135	60 °C
	Reverse	TGA CCA CAG TTG TTA CGG CA		
CD44	Forward	ACT GCA ATG CAA ACT GCA AG	118	60 °C
	Reverse	AAG GTG GAG CAA ACA CAA CC		
CD73	Forward	GTT CTC CCA GGT AAT TGT GC	123	60 °C
	Reverse	ACC TGA GAC ACA CGG ATG AA		
CD90	Forward	GCC CTC ACA CTT GAC CAG TT	122	60 °C
	Reverse	GCC TTC ACT AGC AAG GAC GA		

Tabela 1 – Primers utilizados nas reações de RT-qPCR e suas respectivas sequências.

4.14 Análise estatística

A análise estatística comparando os resultados das expressões dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica RUNX 2 (Runt-related transcription factor

2), ALPL (Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney), BGLAP (Bone gamma-carboxyglutamate – gla protein), SP7 (Osterix) e BSP (Bone sialoprotein) nos tempos 7 e 14 dias de diferenciação osteoblástica dos grupos cultura 2D, esferoides 3D pino 600 µm, cultura 2D e 3D inoculadas no molde lesão periapical foi realizada utilizando o teste estatístico T não pareado, bicaudal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A análise estatística comparando os resultados das expressões dos genes marcadores de células tronco mesenquimais indiferenciadas CD13 (H-CAM), CD29 (β 1-integrin), CD44 (H-CAM), CD73 (ecto-5' nucleotidase, SH3, SH4) e CD90 (Thy-1) das shed cells, sem e com indução osteoblástica nos tempo 7 e 14 dias dos grupos cultura 2D, esferoides 3D pino 600 µm, cultura 2D e 3D inoculadas no molde lesão periapical foi realizada utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA com correção de Tukey's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise da viabilidade celular em diferentes métodos de cultura 3D

Para a análise e padronização do melhor momento da utilização do esferoide 3D molde pino 600 μm no molde mimetizando lesão periapical, além de analisar a viabilidade pela curva de crescimento, das culturas 2D e 3D de shed cells inoculadas no molde mimetizando lesão periapical para a recomposição desta cavidade foram realizadas curvas de crescimento destes 3 grupos. Na Figura 7 podemos observar a viabilidade do esferoide no molde pino 600 μm e que o período exponencial se dá no período entre 24 e 48 horas, sendo o melhor período para a inoculação destes esferoides no molde mimetizando lesão periapical, uma vez que as células ainda estão viáveis e em crescimento exponencial para a recomposição da cavidade. No período entre 48 e 72 horas observamos o período de desaceleração e posterior início da queda da viabilidade celular no período entre 72 e 96 horas.

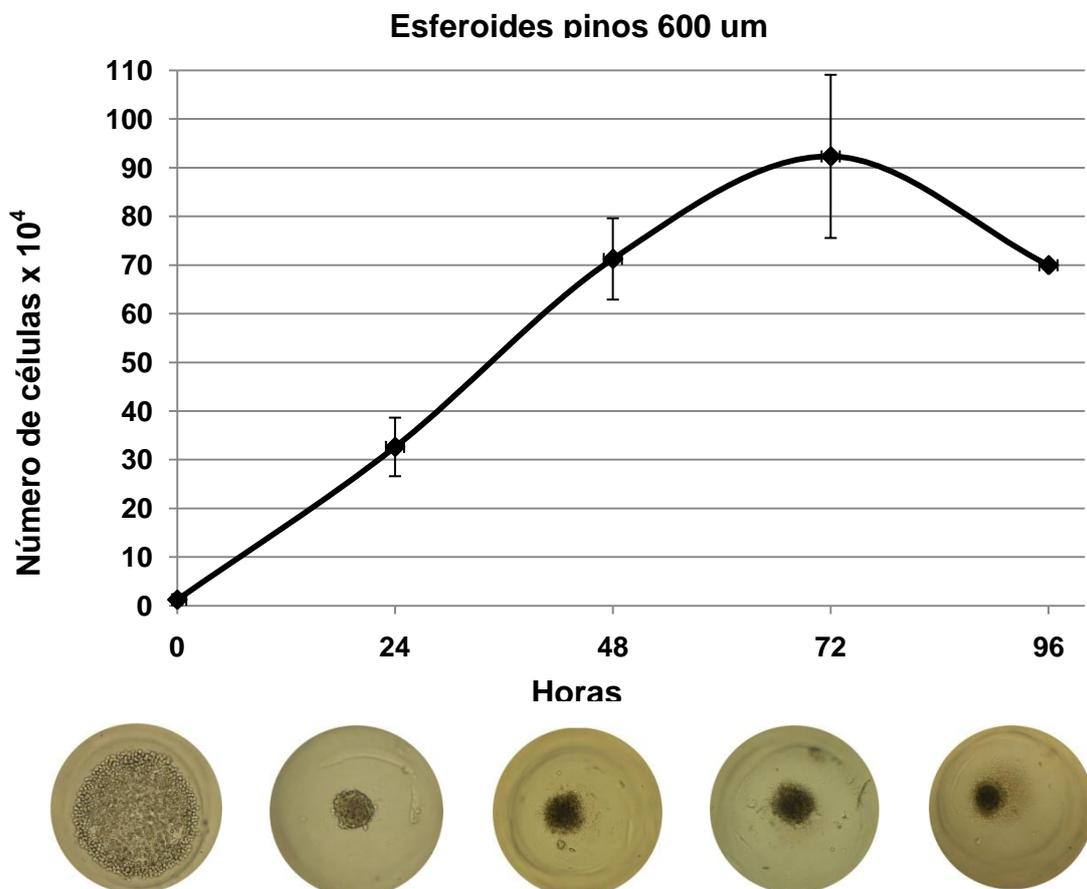


Figura 7. Curva de crescimento (média \pm desvio padrão em shed cells cultivadas em cultura 3D no molde pinos de 600 μm) nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

A Figura 8 mostra a viabilidade celular do esferoide formado a partir da inoculação de shed cells da cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical. No período entre 8 e 16 horas observamos a fase exponencial do crescimento celular, entre 16 e 24 horas a fase estacionária, com 24 horas a fase de decaimento da viabilidade e morte celular no período entre 32 e 40 horas.

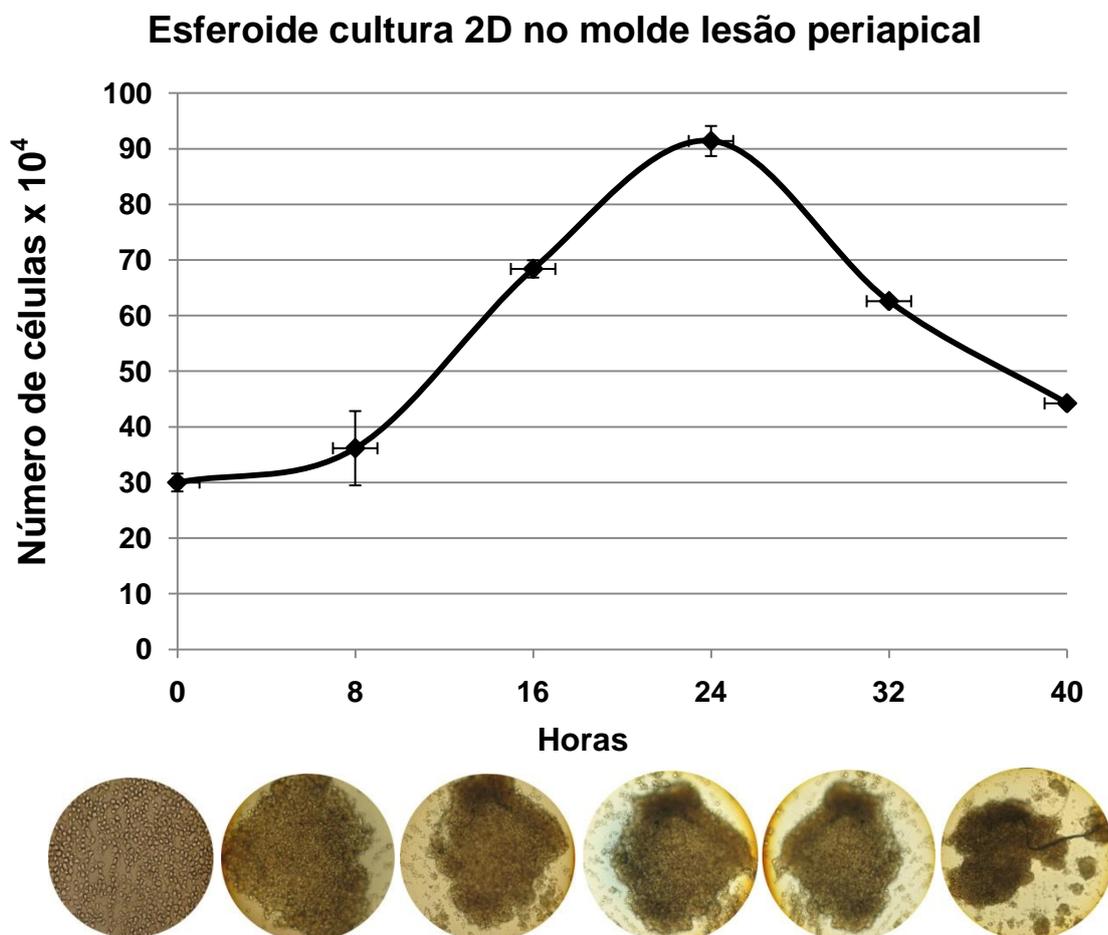


Figura 8. Curva de crescimento (média \pm desvio padrão em shed cells cultivadas em cultura 3D na cavidade de gel de agarose mimetizando lesão periapical) nos tempos 0, 8, 16, 24, 32 e 40 horas.

O comportamento e viabilidade celular dos esferoides 3D de shed cells do molde pinos 600 μ m inoculados no molde mimetizando lesão periapical é mostrado pela Figura 9. Observamos no período de 8 e 16 horas a fase exponencial e entre 16 e 24 horas a fase estacionária e início do declínio da viabilidade e morte celular de 24 a 40 horas. Porém observamos também que esse declínio e morte celular deste grupo são menores que o de shed cells da cultura 2D inoculados na cavidade mimetizada para recomposição.

Esferoide cultura 3D no molde lesão periapical

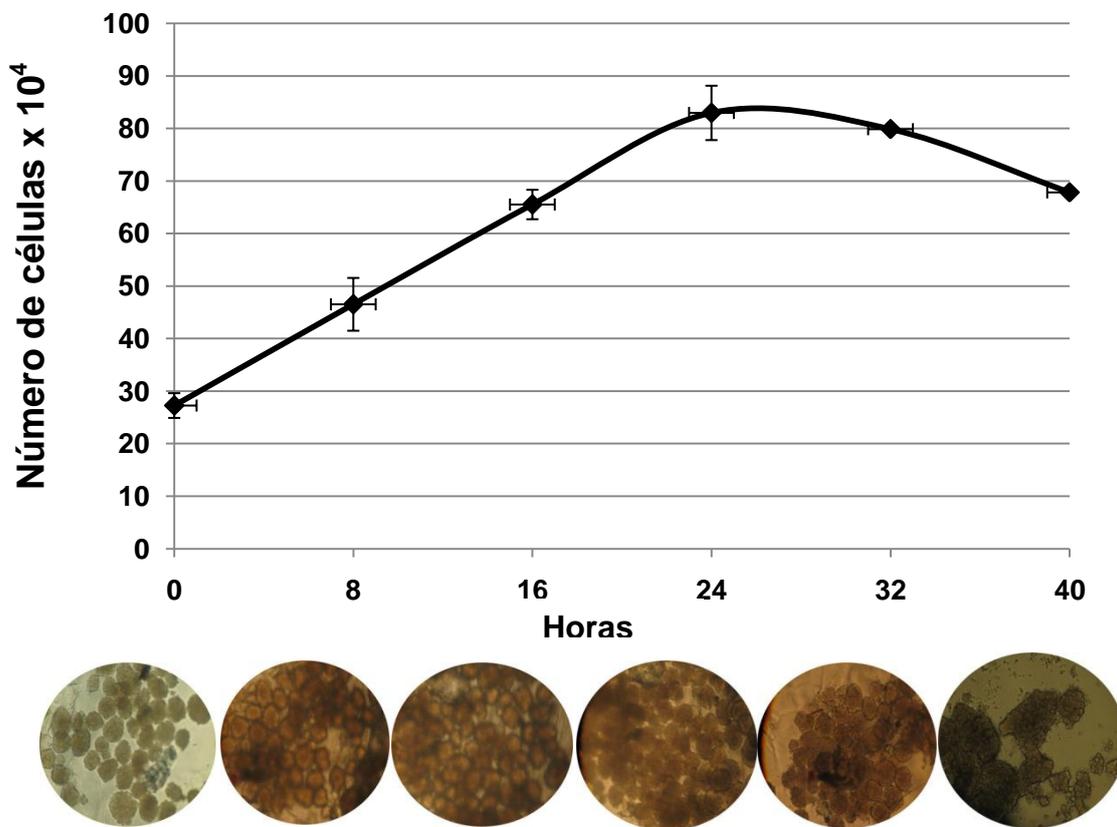


Figura 9. Curva de crescimento (média \pm desvio padrão em esferoides de shed cells cultivados em cultura 3D no molde pinos 600 μm e posteriormente inoculados na cavidade de gel de agarose mimetizando lesão periapical) nos tempos 0, 8, 16, 24, 32 e 40 horas.

5.2 Análise morfológica dos esferoides

Os cortes histológicos foram observados ao microscópio e as análises qualitativas das morfologias dos esferoides foram realizadas. A Figura 10 mostra os cortes histológicos dos grupos **(A)** pino 600 μm no tempo 24 horas; **(B)** pino 600 μm posteriormente inoculado no molde lesão periapical no tempo 24 horas; **(C)** cultura 2D inoculada no molde lesão periapical no tempo 8 horas. Podemos observar que devido a menor quantidade celular pipetada devido aos padrões métricos do molde pino 600 μm , os esferoides do grupo A apresentaram geometria esférica e células bem agrupadas formando um pequeno esferoide celular.

No grupo B observamos morfologias distintas e de geometrias diferenciadas, pois estes esferoides se formaram a partir da agregação celular por meio de

interações bioquímicas de membrana de vários esferoides do grupo A no molde mimetizando lesão periapical.

No grupo C observamos morfologias de geometria esférica igual ao grupo A, porém com maior tamanho, uma vez que a quantidade celular é maior e a inoculação foi diretamente no molde lesão periapical, ou seja, sendo maiores os parâmetros métricos deste molde, as células se dispõem de todo o espaço da lesão para se proliferarem. Neste mesmo grupo observa-se a presença de um centro oco na zona central, com ausência celular.

Morfologia dos esferoides (3D)

Esféroides 3D pinos 600 μm
(24 horas)

Esféroides 3D no molde LP
(24 horas)

Cultura 2D no molde LP
(8 horas)

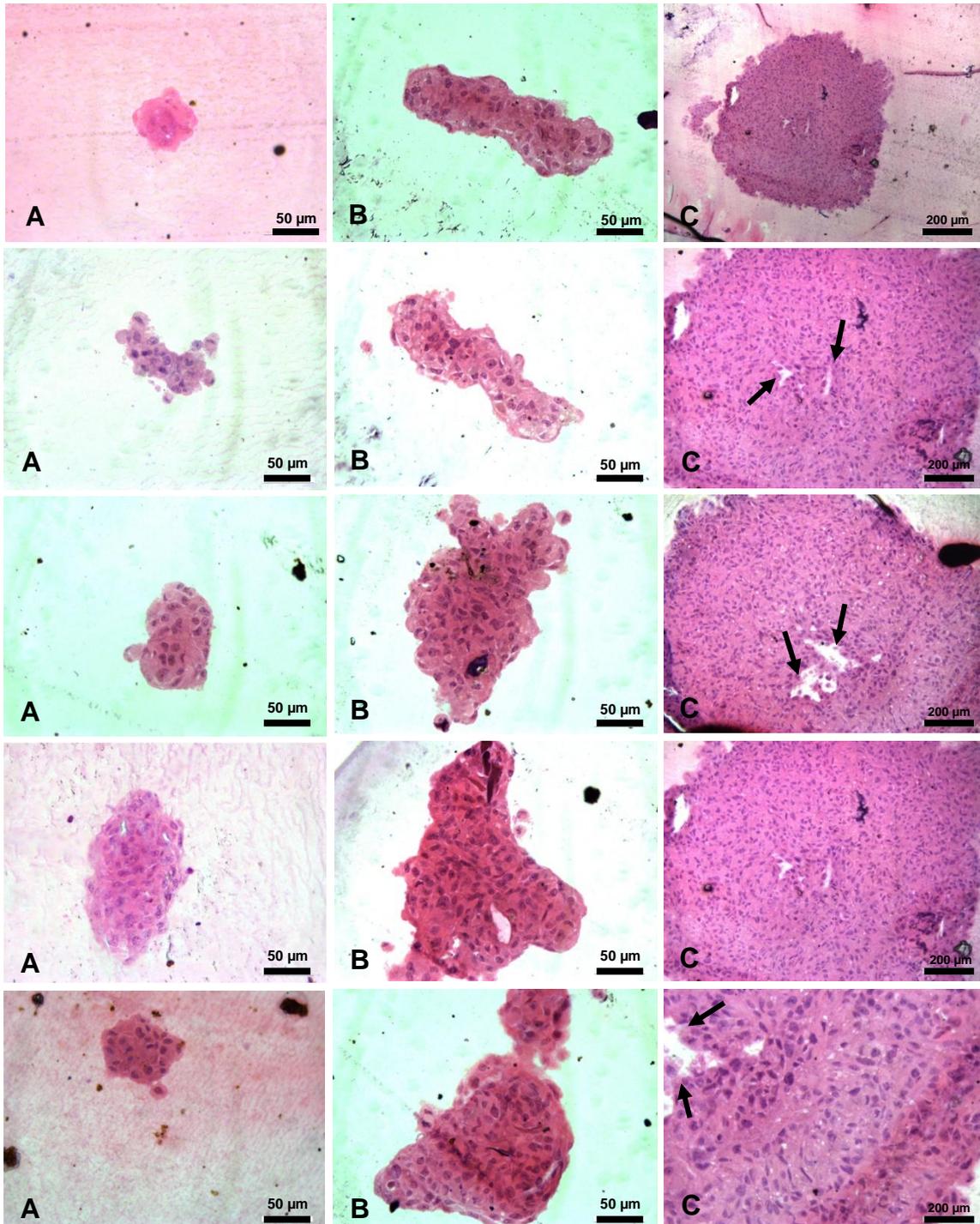


Figura 10. Morfologia demonstrada por cortes histológicos (aumentos de 40x e 100x – Hematoxilina & Eosina, corando núcleo e citoplasma, respectivamente) dos esferoides de shed cells cultivados no molde (A) pino 600 μm no tempo 24 horas apresentando morfologias de geometria esférica e de menor tamanho; (B) pino 600 μm posteriormente inoculado no molde lesão periapical no tempo 24 horas apresentando morfologias de geometria diversa, devido a agregação por interações bioquímicas de membrana dos esferoides entre si; (C) cultura 2D inoculada no molde lesão periapical no tempo 8 horas apresentando morfologias de geometria esférica, porém com maior tamanho, observa-se também a evidência da formação de um centro oco tipo lúmen vascular com ausência de células vivas na região central destes esferoides (setas pretas).

5.3 Análise da viabilidade celular dos esferoides de shed cells com *Live/Dead Kit*

A viabilidade celular *Live/Dead Kit* demonstrada por microscopia confocal dos esferoides de shed cells cultivados no molde **(A)** pino 600 μm no tempo 24 horas; **(B)** pino 600 μm posteriormente inoculado no molde lesão periapical no tempo 24 horas; **(C)** cultura 2D inoculada no molde lesão periapical no tempo 8 horas, na Figura 11.

No grupo A podemos observar que os esferoides apresentaram geometria esferoidal e grande quantidade de células vivas e apenas algumas células apoptóticas dispersas na periferia. No grupo B observamos que os esferoides possuem geometrias de formatos variados e a maior parte de suas células está viável com apenas algumas células apoptóticas dispersas na periferia. Já o grupo C podemos observar que os esferoides se formaram apresentando geometria esferoidal grande e maior quantidade de células vivas na periferia e aglomerado de células apoptóticas na zona central, típica de esferoides multicelulares.

Portanto, os três grupos de esferoides resultaram em boa viabilidade celular, confirmando, que o melhor tempo para a utilização do esferoide de shed cells do molde pino 600 μm para a recomposição da cavidade mimetizando lesão periapical é o tempo de período da fase exponencial deste grupo, assim como, os esferoides da cultura 2D e 3D após a inoculação do molde lesão periapical, apresentaram também, boa viabilidade celular para recomposição da cavidade in vitro sendo utilizados também na fase exponencial de suas respectivas curvas de crescimento.

Viabilidade celular (*Live/Dead Kit*)

Esferoides 3D pinos 600 μm
(24 horas)

Esferoides 3D no molde L.P.
(24 horas)

Cultura 2D no molde L.P.
(8 horas)

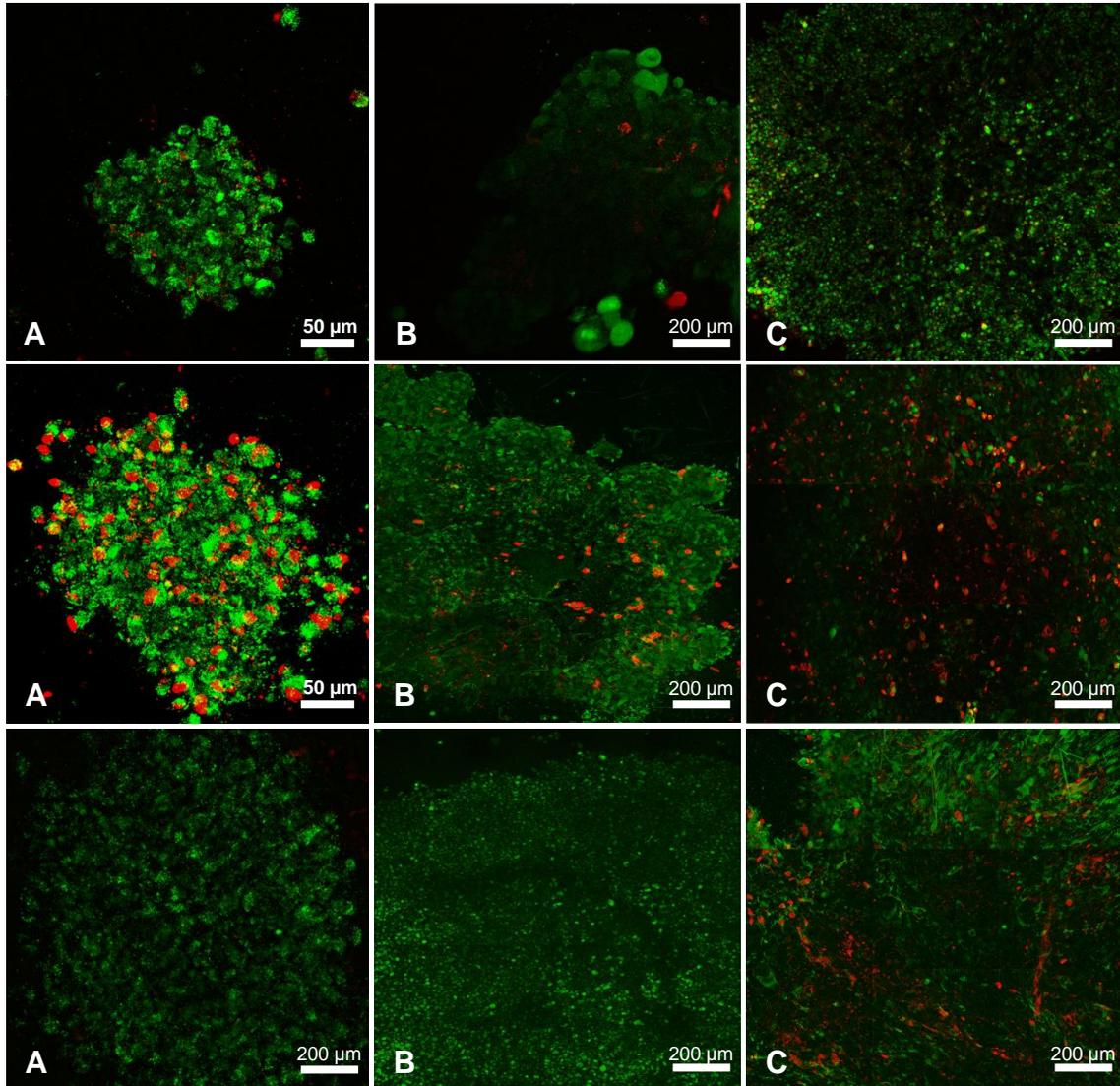


Figura 11. Viabilidade celular *Live/Dead Kit* demonstrada por microscopia confocal (aumento de 40x e 100x) dos esferoides de shed cells cultivados no molde **(A)** pino 600 μm no tempo 24 horas, apresentando geometria esférica e grande quantidade de células vivas e apenas algumas células apoptóticas dispersas na periferia; **(B)** pino 600 μm posteriormente inoculado no molde lesão periapical no tempo 24 horas, apresentando geometria de formatos variados e maior parte de células vivas e apenas algumas células apoptóticas dispersas na periferia; **(C)** cultura 2D inoculada no molde lesão periapical no tempo 8 horas, apresentando geometria esférica grande e maior quantidade de células vivas na periferia e aglomerado de células apoptóticas na zona central.

5.4 Viabilidade celular durante o processo de diferenciação osteoblástica

O teste de MTT foi realizado para verificar a viabilidade celular nas culturas de shed cells com meio de indução osteoblástica durante 3, 7 e 10 dias, certificando de que não ocorreria morte celular das culturas durante este processo. Os resultados mostram que com o passar dos períodos de diferenciação, as culturas de shed cells com o meio DMEM/F12 com adição de dexametasona (Sigma) 10^{-7} M, 5ug/mL de ácido ascórbico (Gibco) e 2,16 g/mL de β -glicerolfosfato (Sigma) tiveram aumentos gradativos da viabilidade celular (Figura 12).

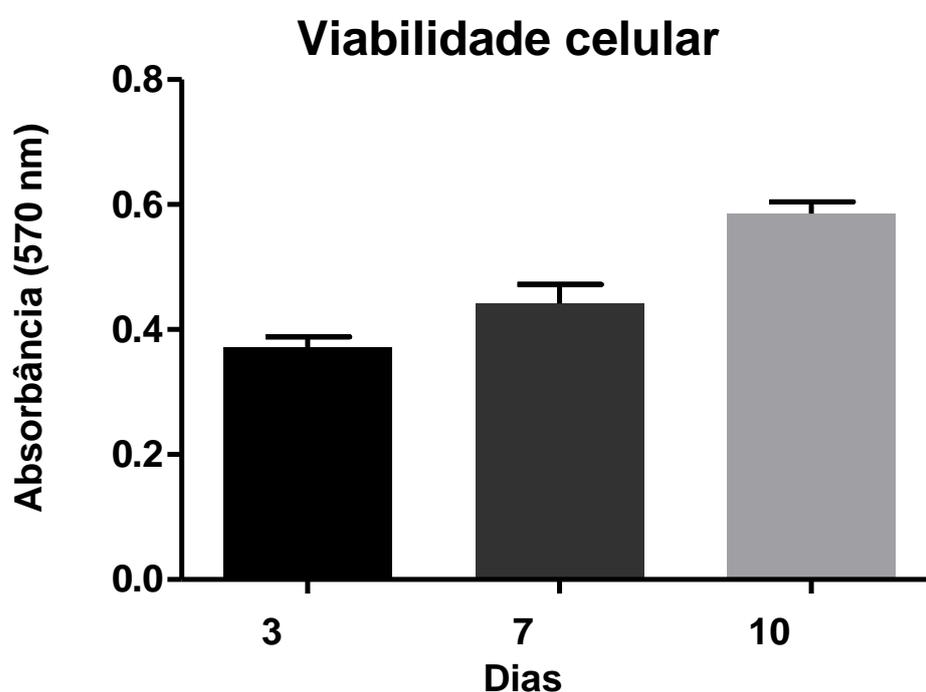


Figura 12. Ensaio de MTT nas culturas de shed cells (n=5) cultivadas em 2D após indução osteoblástica nos tempos 3, 7 e 10 dias.

5.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) está diretamente ligada ao processo de formação ou reabsorção óssea, sendo um mediador bioquímico participante deste processo. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína expressa na superfície dos osteoblastos e mede os produtos decorrentes da ação destas células. Sua principal ação ainda não é bem esclarecida, mas sabe-se que a fosfatase alcalina está vinculada aos processos de deposição da matriz orgânica nas fases iniciais do

processo de mineralização durante a diferenciação osteoblástica (DERNOWSEK, 2018). Portanto, foi realizada a medida da fosfatase alcalina por *Fast Red* e a Figura 13 mostra a média dos níveis de atividade de ALP expresso em cada tempo (n=5) da diferenciação osteoblástica das shed cells.

Os resultados revelam que houve aumento gradativo da atividade da ALP entre 7 e 14 dias e a partir deste período ouve um declínio significativo entre 14 e 21 dias, como esperado no processo de diferenciação osteoblástica.

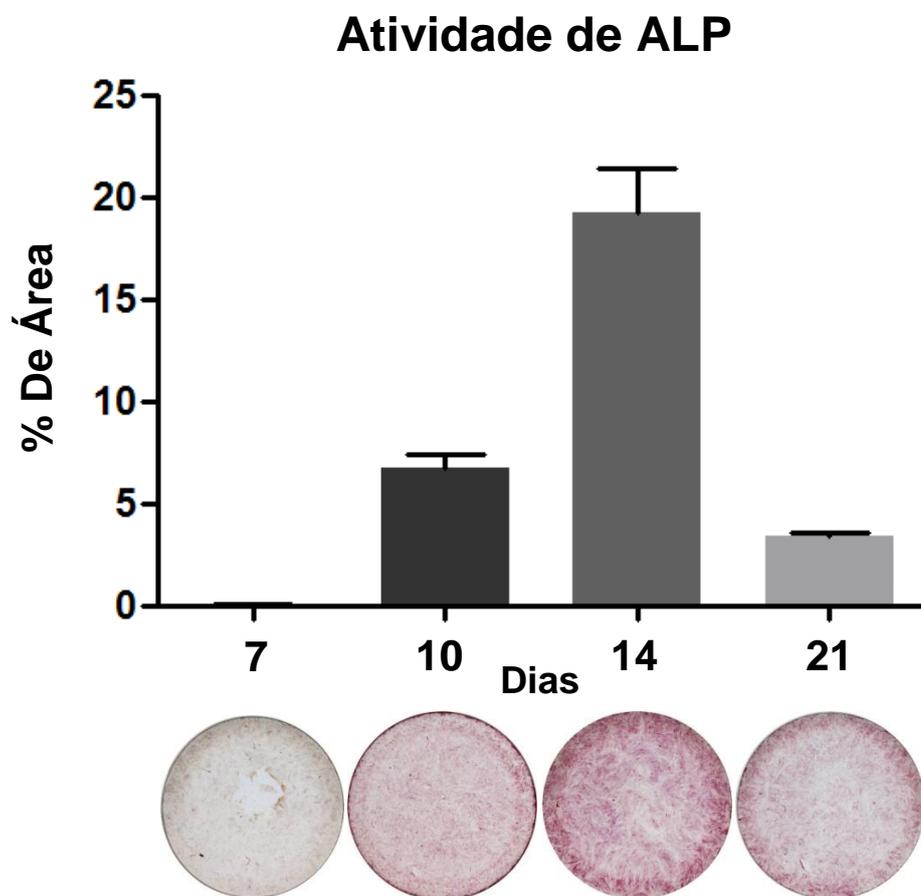


Figura 13. Medida da atividade de fosfatase alcalina por *Fast Red* calculada pela porcentagem de área nas culturas de shed cells cultivadas em 2D após indução osteoblástica nos tempos 7, 10, 14 e 21 dias.

5.6 Análise qualitativa dos nódulos de mineralização

O processo de mineralização foi avaliado pela incorporação do vermelho de alizarina (*Alizarin Red*), obtendo dados qualitativos do depósito de cálcio nas áreas de mineralização. Após a incorporação e remoção do corante, foi realizada a documentação fotográfica das culturas de shed cells (n=5) nos tempos 7, 14, 17 e 21 dias de indução osteoblástica (Figura 14). Os resultados da análise imagiológica mostraram que há presença de nódulos de mineralização nos períodos de 17 e 21 dias, podendo-se observar a presença de áreas escurecidas as quais são tipicamente presentes na cultura celular durante esta fase no processo de diferenciação osteoblástica.

Nódulos de Mineralização

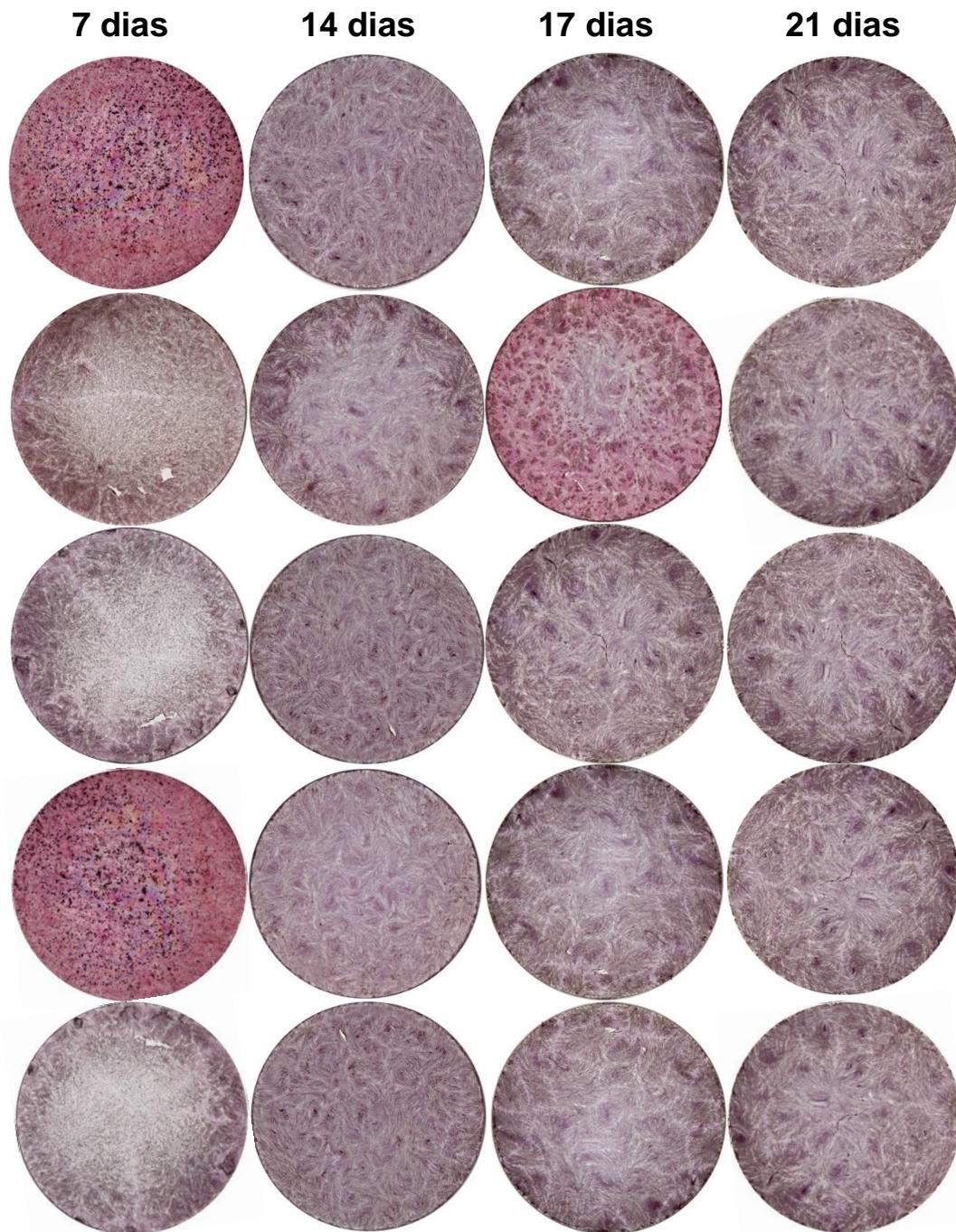


Figura 14. Imagens macroscópicas da formação de matriz mineralizada pelo vermelho de alizarina (*alizarin red*) nas culturas de shed cells cultivadas em 2D (n=5) após indução osteoblástica nos tempos 7, 14, 17 e 21 dias. Observa-se áreas de nódulos de mineralização nos tempos 17 e 21 dias, se apresentam nas áreas de manchas escurecidas, típicas deste processo na diferenciação osteoblástica.

5.7 Imunofluorescência

Os resultados da imunolocalização das proteínas RUNX 2, ALP e BSP na cultura de shed cells após diferenciação osteoblástica nos tempos experimentais 7, 14 e 21 dias (Figura 15), nos mostram que o RUNX 2 (fator de transcrição), importante nesse processo, foi marcado nas regiões dos núcleos celulares em azul (DAPI) e foi marcado nos três períodos, porém em maior quantidade nos períodos 21 dias. A proteína ALP (fosfatase alcalina) glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos (TANIMURA et al., 1983) apresentou maior marcação nos três períodos e assim como o RUNX 2, maior marcação no período de 21 dias. A proteína BSP (sialoproteína óssea), importante no processo de deposição e maturação da matriz extracelular (DERNOWSEK, 2018) foi mais marcada nos três períodos e também maior marcação no período de 21 dias.

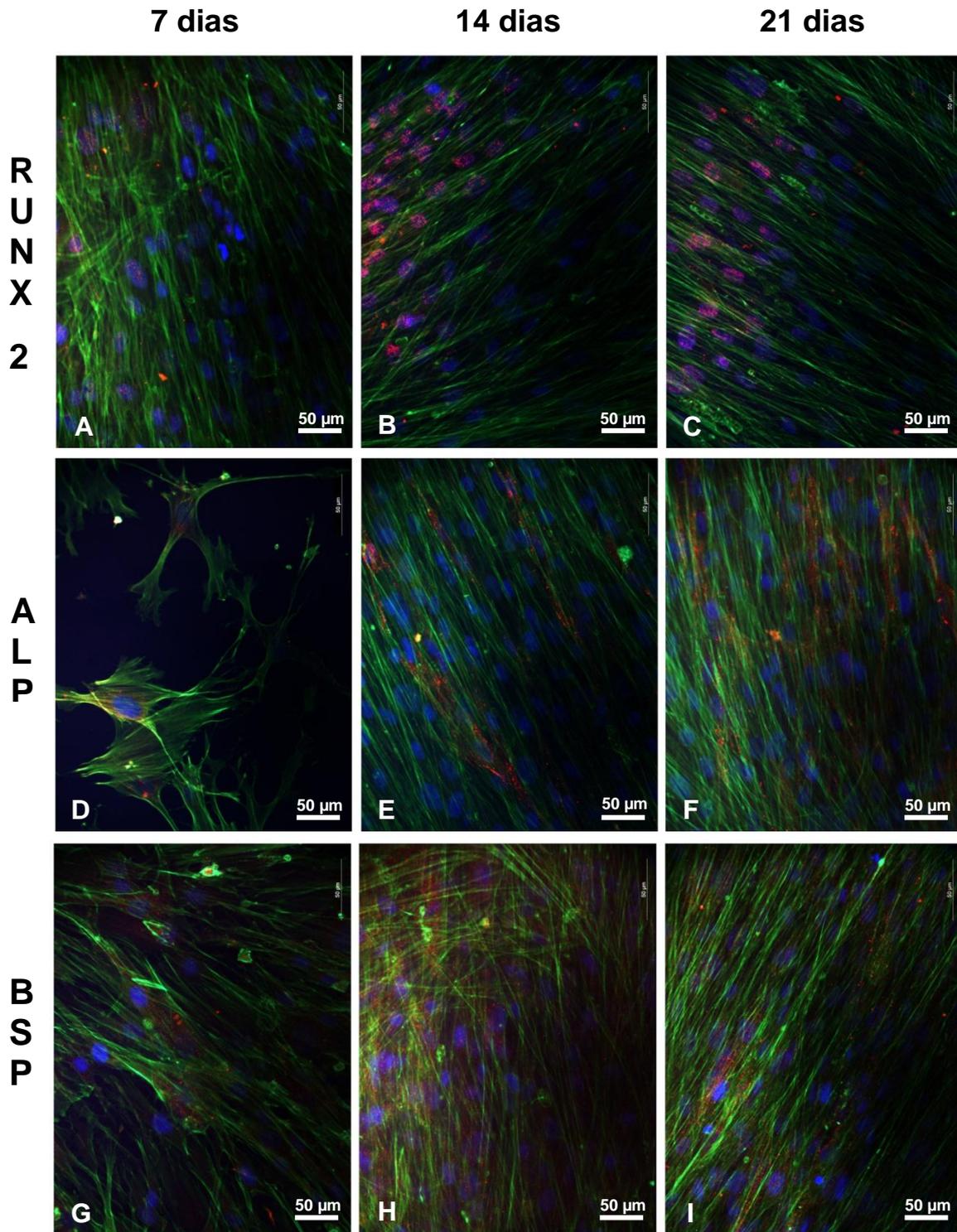


Figura 15. Epifluorescência de triplas marcações de cultura de shed cells após diferenciação osteoblástica (aumento 40x). Observamos a marcação para núcleos celulares em azul (DAPI), marcação do cito esqueleto de actina é detectado por marcação verde (faloidina), marcação para RUNX 2 em fluorescência vermelha após (A) 7 dias, (B) 14 dias, (C) 21 dia, marcação para ALP em fluorescência vermelha após (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 21 dias, marcação para BSP em fluorescência vermelha após (G) 7 dias, (H) 14 dias, (I) 21 dias.

5.8 Expressão dos marcadores relacionados à osteogênese: RUNX 2, ALPL, BGLAP, SP7 e BSP

Para analisar a estatística comparando os resultados das expressões dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica RUNX 2 (Runt-related transcription factor 2), ALPL (Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney), BGLAP (Bone gamma-carboxyglutamate – gla protein), SP7 (Osterix) e BSP (Bone sialoprotein) nos tempos 7 e 14 dias de diferenciação osteoblástica dos grupos cultura 2D, esferoides 3D pino 600 µm, cultura 2D e 3D inoculadas no molde lesão periapical demonstrados nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20, respectivamente, foi realizada utilizando o teste estatístico T não pareado, bicaudal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

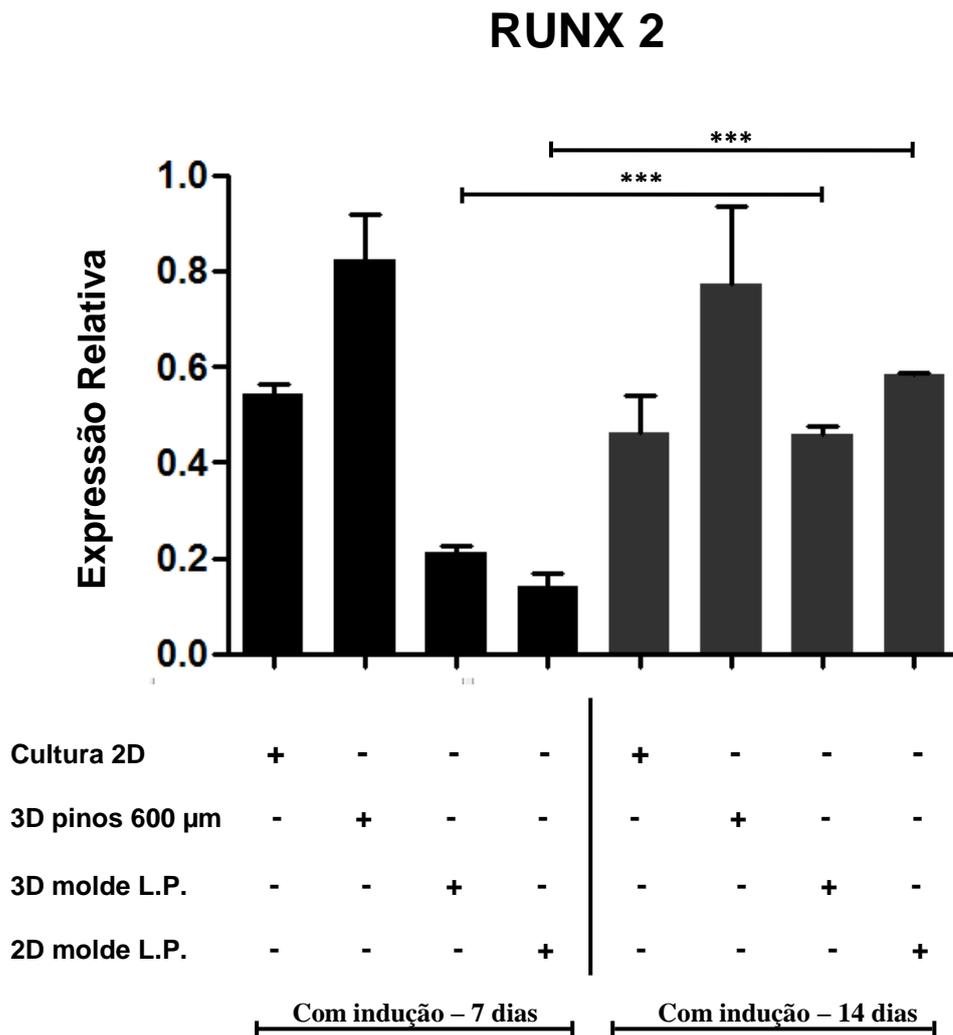


Figura 16. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene RUNX2, marcador da osteogênese, das amostras: cultura 2D, esferoides do molde de micropinos de 600 μ m, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico T com teste F comparados os grupos. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

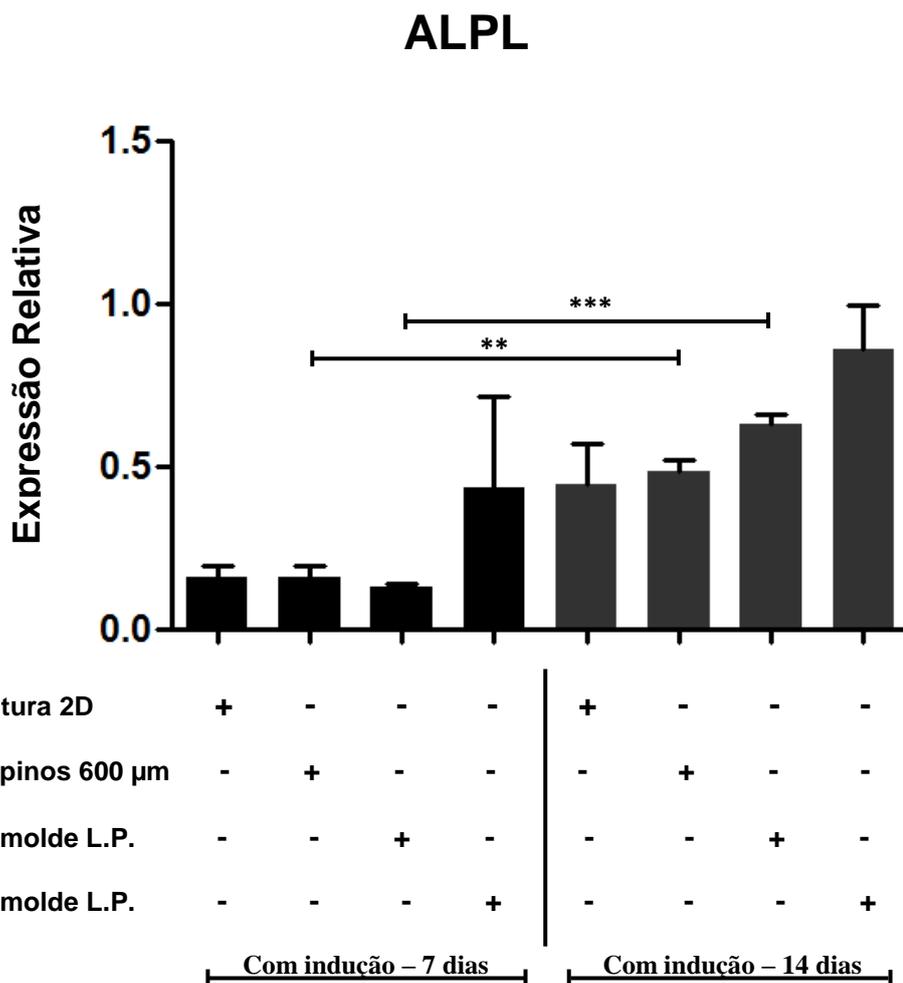


Figura 17. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene ALPL, marcador da osteogênese, das amostras: cultura 2D, esferoides do molde de micropinos de 600 μ m, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico T com teste F comparados os grupos. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

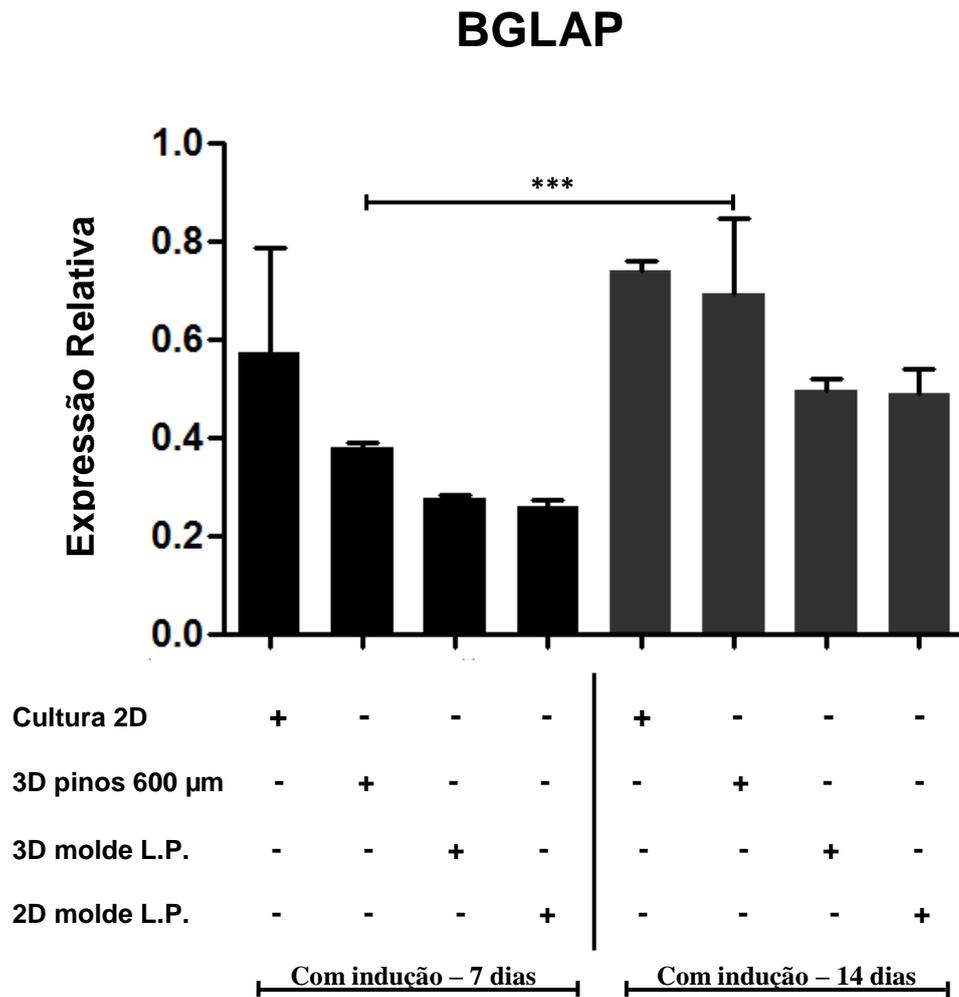


Figura 18. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene BGLAP, marcador da osteogênese, das amostras: cultura 2D, esferoides do molde de micropinos de 600 μ m, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico T com teste F comparados os grupos. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

SP7

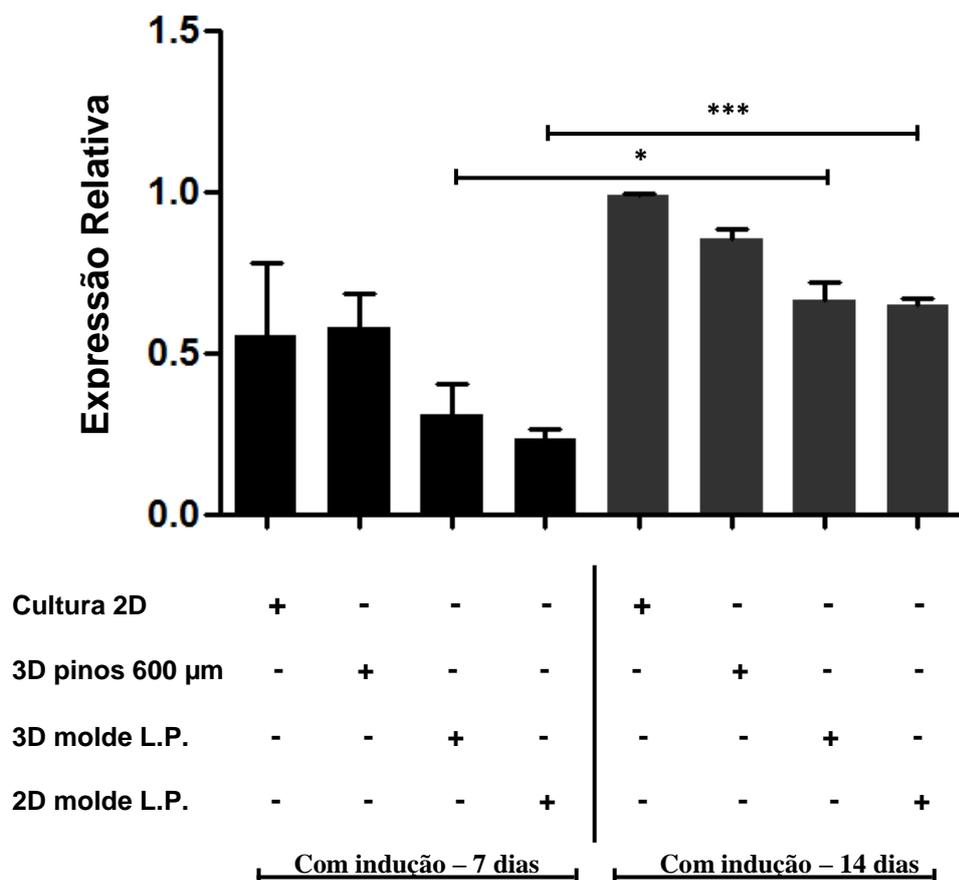


Figura 19. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene SP7, marcador da osteogênese, das amostras: cultura 2D, esferoides do molde de micropinos de 600 μm, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico T com teste F comparados os grupos. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

BSP

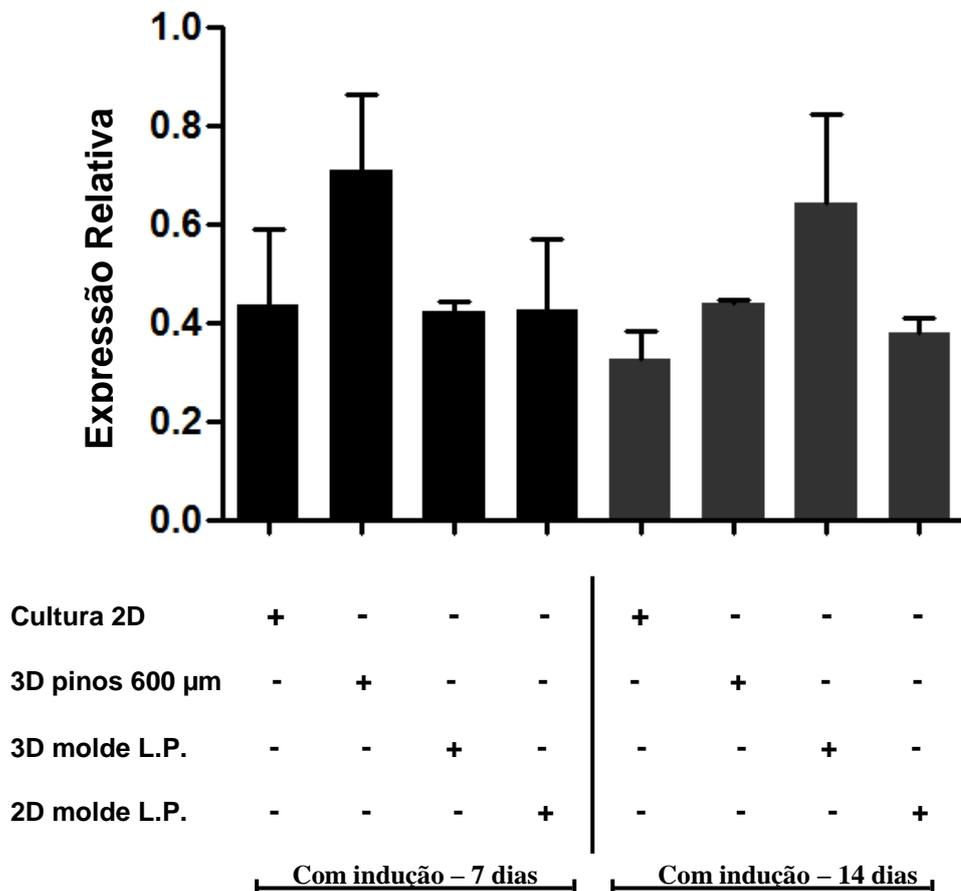


Figura 20. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene BSP, marcador da osteogênese, das amostras: cultura 2D, esferoides do molde de micropinos de 600 µm, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico T com teste F comparados os grupos. *** p < 0.001; **p<0,01; *p<0,05. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

5.9 Expressão dos marcadores de células tronco mesenquimais: CD13, CD29, CD44, CD73 e CD90

Para analisar a estatística comparando os resultados das expressões dos genes marcadores de células tronco mesenquimais indiferenciadas CD13 (H-CAM), CD29 (β1-integrin), CD44 (H-CAM), CD73 (ecto-5' nucleotidase, SH3, SH4) e CD90 (Thy-1) das shed cells, sem e com indução osteoblástica nos tempo 7 e 14 dias dos grupos: cultura 2D, esferoides 3D pino 600 µm, cultura 2D e 3D inoculadas no

molde lesão periapical demonstrados nas Figuras 21, 22, 23, 24 e 25 foi realizado o teste estatístico One-Way ANOVA com correção de Tukey's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

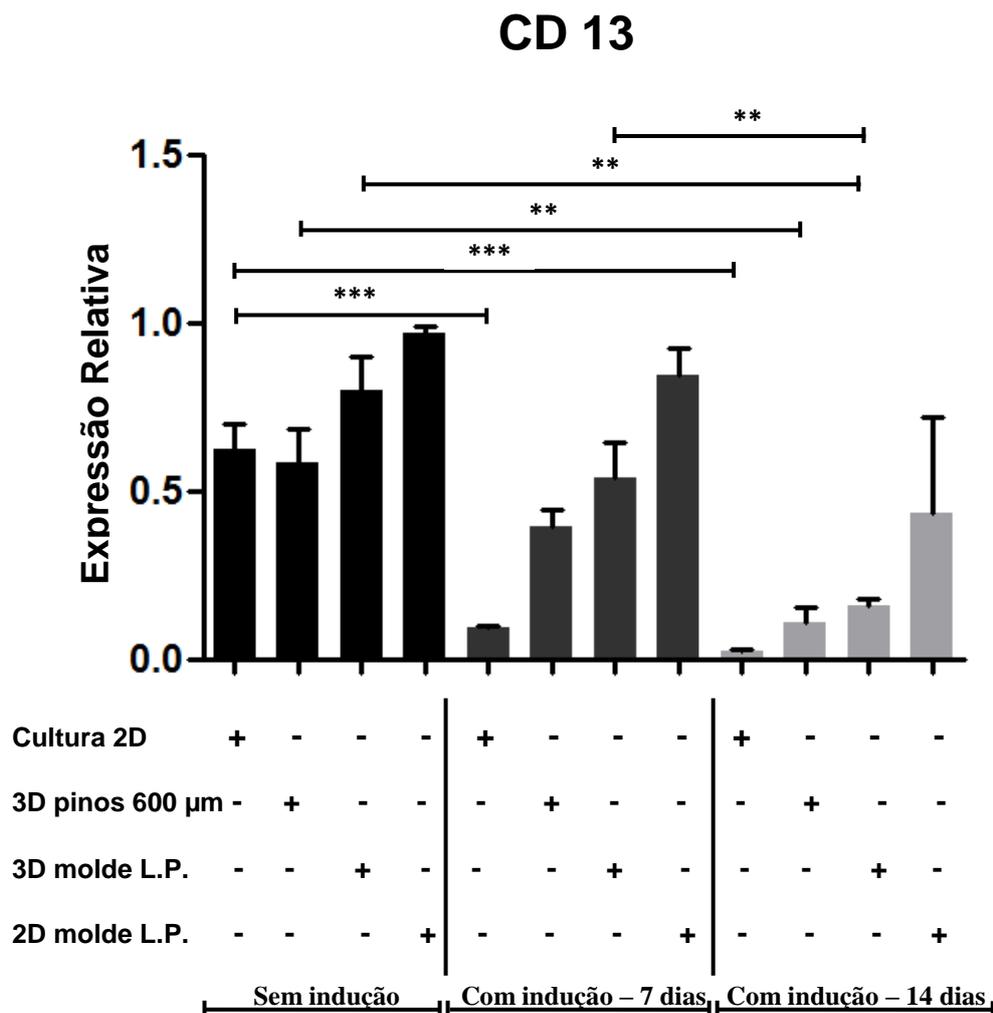


Figura 21. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene CD13, marcador de células tronco mesenquimais, das amostras: cultura 2D (controle), esferoides do molde pinos de 600 μm , esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical, sem e com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico *One-Way* ANOVA com teste de Tukey's comparados ao grupo controle. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

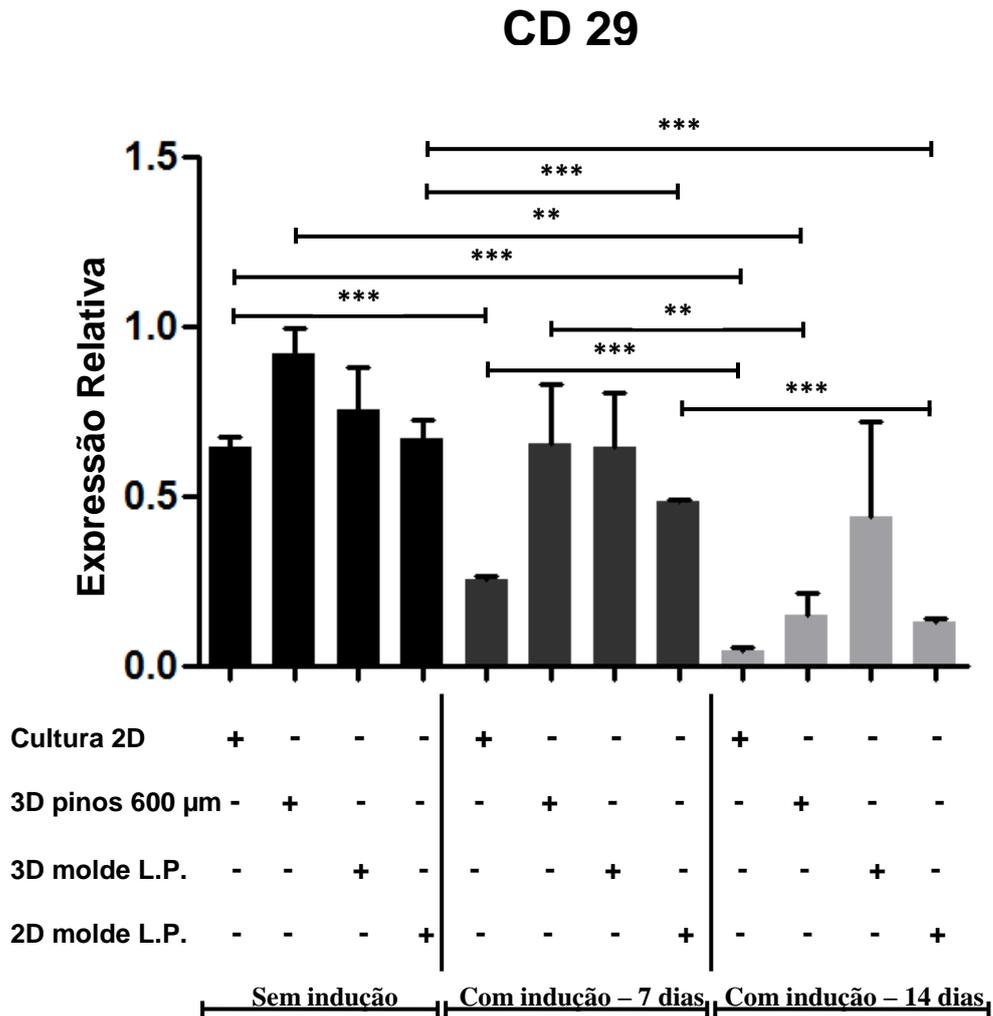


Figura 22. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene CD29, marcador de células tronco mesenquimais, das amostras: cultura 2D (controle), esferoides do molde pinos de 600 µm, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical, sem e com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico *One-Way* ANOVA com teste de Tukey's comparados ao grupo controle. *** p < 0.001; **p<0,01; *p<0,05. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

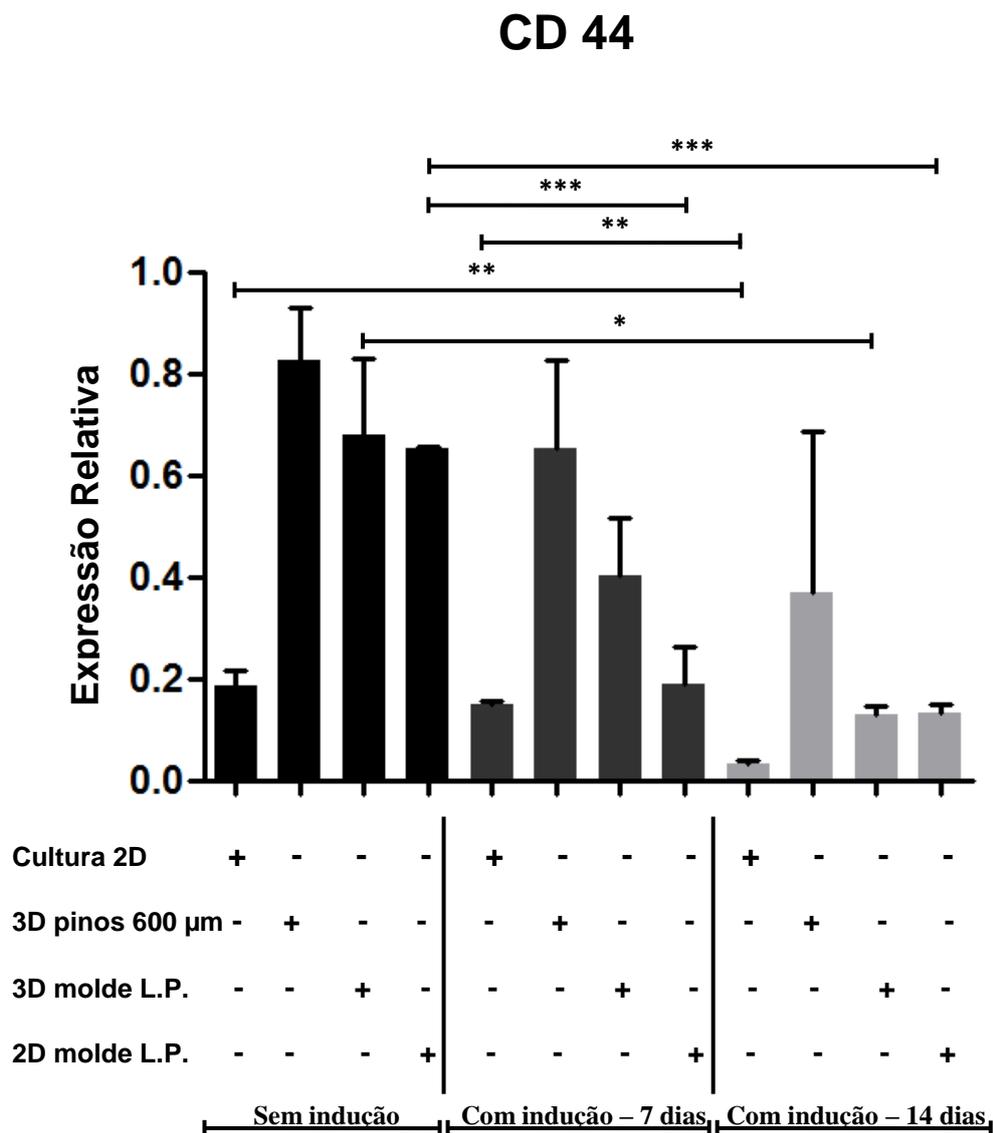


Figura 23. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene CD44, marcador de células tronco mesenquimais, das amostras: cultura 2D (controle), esferoides do molde pinos de 600 µm, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical, sem e com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico *One-Way* ANOVA com teste de Tukey's comparados ao grupo controle. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

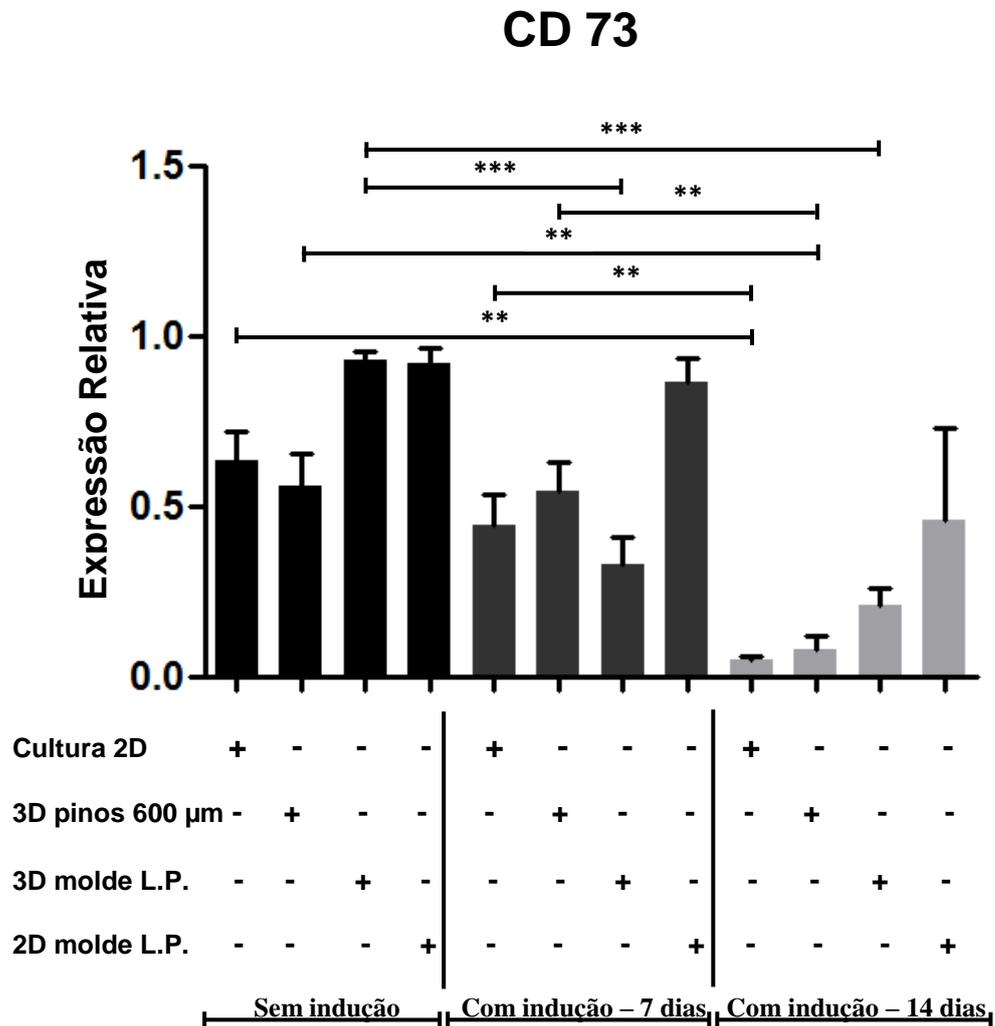


Figura 24. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene CD73, marcador de células tronco mesenquimais, das amostras: cultura 2D (controle), esferoides do molde pinos de 600 μ m, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical, sem e com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico *One-Way* ANOVA com teste de Tukey's comparados ao grupo controle. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

CD 90

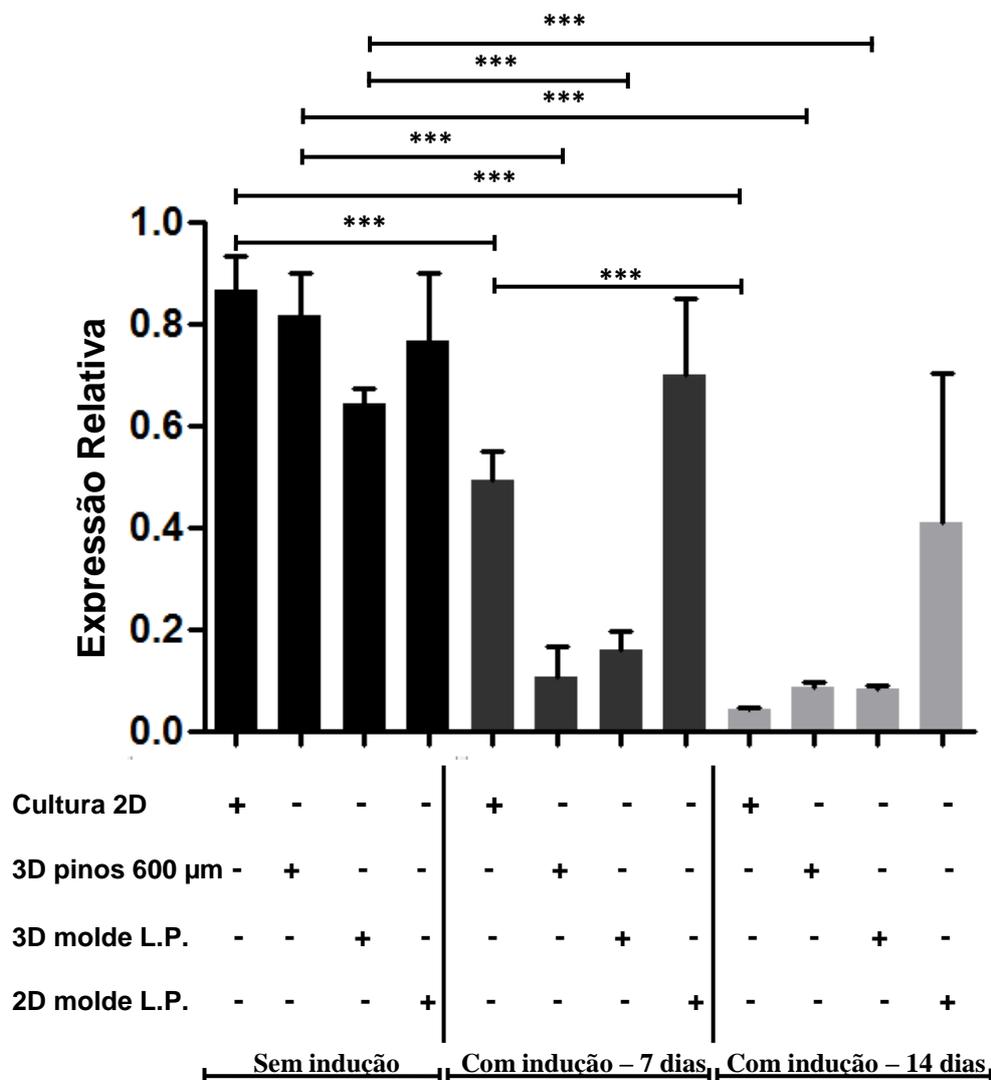


Figura 25. Expressão relativa do transcrito relacionado ao gene CD90, marcador de células tronco mesenquimais, das amostras: cultura 2D (controle), esferoides do molde pinos de 600 µm, esferoides e cultura 2D no molde mimetizando a lesão periapical, sem e com indução osteoblástica de 7 e 14 dias. O controle endógeno utilizado foi o GAPDH. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste estatístico *One-Way* ANOVA com teste de Tukey's comparados ao grupo controle. *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Foram realizadas as devidas triplicatas experimentais.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que são múltiplos os fatores que podem causar lesões periapicais, como a contaminação polibacteriana da polpa e sistema de canais radiculares, trauma físico e até mesmo fatores iatrogênicos. O tratamento endodôntico e restaurador são imprescindíveis para a cura dessa doença e posterior reabilitação do elemento dental. Nos últimos anos, se tem visto a busca incessante através de estudos, de materiais que preencham todos os quesitos necessários para o preparo biomecânico, limpeza e obturação do sistema de canais radiculares, e mais ainda daqueles que apresentam melhores propriedades físico-químicas e biológicas tais como biocompatibilidade, citotoxicidade e bioatividade, que possam favorecer a osteogênese na região periapical (GIL et al., 2009; LIMA et al., 2017; TORRES et al., 2020).

Tanto a presença, quanto a persistência da lesão periapical vêm sendo estudada ao longo dos anos, e estudos mostram que as causas estão relacionadas com a complexidade do sistema de canais radiculares, extravasamento de materiais obturadores, infecções extraradiculares, e lesões císticas verdadeiras. Porém, além destes fatores, o fator intrínscico do hospedeiro também tem sido levado em consideração, ou seja, a resposta auto-imune do seu organismo frente o reparo da lesão periapical. Estudos envolvendo polimorfismos genéticos têm mostrado diferentes aspectos da resposta do organismo do hospedeiro e na capacidade desses polimorfismos de gerar imunocomprometimentos, como o desequilíbrio da expressão gênica envolvida no processo de cicatrização desta lesão, conseqüentemente, fazendo com que a mesma persista ou ocorra novamente (TORRES et al., 2020).

Graças aos grandes avanços da biologia celular, a pesquisa científica no campo das células tronco está crescendo em várias áreas da saúde incluindo a odontologia. Esta nova área denominada odontologia regenerativa, vem se ampliando com o intuito de preservar e regenerar tecidos periodontais, dentais e periapicais utilizando células tronco (PRASAD et al., 2019).

As células tronco mesenquimais da polpa dentária de dentes decíduos (shed cells) já estão sendo usadas como um sistema modelo para a regeneração de tecidos em diversas áreas. Embora esse tipo celular apresente dificuldade de fixação

e pequena quantidade em tecidos vivos, possui uma alta taxa proliferativa e de diferenciação, sendo relevantes para futuros tratamentos da regeneração óssea de lesões periapicais (GONZÁLEZ et al., 2018). Dessa maneira, foi avaliado no presente estudo, células tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (shed cells) com o objetivo de estabelecer um sistema modelo experimental de recomposição biológica da cavidade de lesão periapical por meio do uso destas células, e através de ensaios de viabilidade celular, histológico, de biologia molecular e bioquímicos, comparar culturas celulares convencionais (2D) e de esferoides multicelulares (3D) de shed cells em um sistema modelo mimetizando a lesão periapical de um incisivo lateral superior in vitro por impressão 3D.

Para a realização da fase experimental, inicialmente foi estabelecida a cultura 2D das shed cells com meio de cultura Dulbecco modified Eagle Medium suplementado com Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco®) e com 20% de soro fetal bovino, assim como sua ploriferação, ou seja, ao atingir 70% de confluência da garrafa, foi realizado repique e congelamento das passagens para que não houvesse início da diferenciação celular, pois as células tronco mesmo quando indiferenciadas, expressam em baixos níveis, genes que estão diretamente relacionados ao destino final de diferenciação que elas podem ocorrer (ZIPORI et al., 2004).

As células dentro do organismo in vivo interagem com células vizinhas e com componentes da matriz extracelular e assim, estabelecem uma organização 3D formando tecidos. Essas interações formam uma rede de sinais mecânicos e comunicações bioquímicas complexas, os quais são importantes para a fisiologia celular normal, uma vez que as células de modo geral, apresentam como resposta, fenótipos e genótipos diferentes para cada estímulo externo (LIN & CHANG, 2008). Pensando nisso, no presente estudo foi realizada a cultura 3D de esferoides multicelulares de shed cells utilizando molde negativo de acrílico composto por pinos de 600 µm e após esterelização, solidificação e maturação do gel de agarose, obtiveram-se moldes positivos em meio de cultura nos poços da placa Multiwell de 12 poços. O gel de agarose permitiu então, a interação célula-célula e célula-matriz extracelular das shed cells, semelhante ao desenvolvimento embrionário e morfogênese tecidual, onde ocorrem adesões e diferenciações celulares complexas

contribuindo para a formação dos esferoides multicelulares (LIN & CHANG, 2008), que foram utilizados para posterior inoculação no molde positivo de gel de agarose mimetizando a cavidade de uma lesão periapical.

No presente estudo, foi pensado uma maneira de reproduzir o ambiente in vivo de uma lesão periapical in vitro, para análise e avaliação do comportamento celular das culturas 2D e 3D, antes e após a diferenciação osteoblástica das shed cells, neste ambiente mimetizando a real área de uma lesão periapical. Portanto foi selecionada uma tomografia computadorizada (Cone Beam) de um paciente do acervo de exames radiográficos da Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que apresentava lesão periapical e necessidade de tratamento endodôntico de um dos incisivos laterais superiores. Após escaneamento e delimitação das áreas da lesão, no Instituto Renato Archer, foi realizada a impressão 3D com fotopolímero do molde negativo da lesão periapical, assim, criou-se um sistema modelo para avaliação do comportamento das duas culturas celulares (2D e esferoides 3D).

O estabelecimento das culturas celulares in vitro é de extrema importância para que processos biológicos e mecanismos celulares sejam caracterizados e estudos sejam realizados sob condições experimentais específicas e adequadas (ZHANG & COMER, 2018). Portanto, para a avaliação da formação e viabilidade celular dos esferoides 3D de shed cells, foram realizadas curvas de crescimento, utilização do *Live/Dead Kit* e histologia convencional para caracterização quantitativa e qualitativa, respectivamente, dos esferoides formados a partir do molde pino 600 μm e do comportamento da inoculação destes esferoides e das células da cultura 2D inoculados no sistema modelo da lesão periapical.

Assim, através dos resultados obtidos, foi possível observar que o esferoide 3D do molde pinos 600 μm , em menos de 24 horas já havia sido formado, através da comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular, com uma morfologia geométrica esferoidal e ótima viabilidade celular durante seu crescimento. Após ter sido inoculado no molde mimetizando lesão periapical, observamos que os esferoides de formato esferoidal começam a se agregar em menos de 24 horas, só que agora através de comunicações bioquímicas e de membranas esferoide-esferoide, gerando um único esferoide com formatos diversos na cavidade em que

estão inseridos e durante todo esse processo, observamos que a viabilidade celular continuou alta. A cultura 2D inoculada diretamente no sistema modelo da lesão periapical, gerou um único esferoide grande, o qual foi formado em menos de 8 horas, nos mostrando a intensidade desta comunicação bioquímica e adesividade entre uma célula e outra. Quanto à viabilidade celular, observamos que este esferoide apresentou alta quantidade de células viáveis na região periférica e células apoptóticas na zona central, o que era esperado, uma vez que esta é uma característica observada nos esferoides celulares maiores, ou seja, podem formar um centro oco tipo lúmen vascular através da apoptose de células centrais polarizadas, formando uma camada de células mortas, decorrente da hipóxia ocorrida pela dificuldade de chegada do oxigênio e nutrição dessas células que estão situadas na zona central do esferoide multicelular, e portanto, apresentando queda da viabilidade celular mais rápida em relação ao esferoide do molde pinos 600 μm (KORFF et al., 1998).

As culturas 2D de shed cells foram submetidas a diferenciação osteoblástica com adição de dexametasona (Sigma) 10^{-7} M, 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco) e 2,16 g/mL de β -glicerolfosfato (Sigma) ao meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 15% de SBF (ROSA, BELOTI, 2003) para que ocorresse a osteogênese pela proliferação de células precursoras, as quais se diferenciaram em osteoblastos produzindo a matriz extracelular não mineralizada, que foi posteriormente calcificada (SCHWARTZ; BOYAN, 1994). Desse modo foram realizados: teste de viabilidade MTT nos tempos 3, 7 e 10 dias para avaliação da proliferação celular durante esse processo; análise de atividade da fosfatase alcalina nos tempos 7, 10 14 e 21 dias; mineralização avaliando a deposição de matriz mineralizada nos tempos 7, 14, 17 e 21 dias e imunofluorescência com marcadores de proteínas na osteogênese, como RUNX 2, ALP e BSP nos períodos de 7,14 e 21 dias de diferenciação.

Resultados do ensaio do MTT nos mostram que as culturas de shed cells ao longo do terceiro ao décimo dia em meio indutivo osteoblástico, tiveram um aumento gradual na viabilidade, portanto, as shed cells se ploriferaram normalmente. A análise de atividade da fosfatase alcalina nos mostra que o seu aumento significativo se deu nos períodos iniciais entre 10 e 14 dias e diminuição entre 14 e 21 dias, resultado esperado, uma vez que a fosfatase alcalina (ALP) é um marcador das

fases iniciais da diferenciação osteoblástica e sua produção neste processo é estimulada pelo β -glicerolfosfato, o qual promove a mineralização em culturas de células tronco mesenquimais (ORIMO; SHIMADA, 2008). Os resultados de imagem macroscópica do processo de mineralização nos revelaram que há presença de nódulos de mineralização nos períodos entre 17 e 21 dias. Na imunofluorescência, marcadores de RUNX2, ALP e BSP apresentaram marcações nos três períodos, porém em níveis maiores no tempo de 21 dias.

Posteriormente, junto a cultura 2D, foi realizada a formação de esferoides 3D no molde pino 600 μ m e inoculação destes esferoides, assim como da cultura 2D diferenciados, no molde mimetizando a lesão periapical nos tempos 7 e 14 dias de diferenciação, para análise de expressão dos genes RUNX 2, ALPL, BGLAP, SP7 e BSP. Os resultados nos mostram que os grupos induzidos a diferenciação osteoblástica com 7 dias apresentaram expressão relativa de todos os genes envolvidos neste processo. Porém, aos 14 dias de diferenciação, houve aumento da expressão de RUNX2, ALPL, BGLAP e SP7. A expressão do BSP não teve mudança ao longo do período de 7 a 14 dias em todos os grupos.

Segundo Dominici et al. (2006) e Wagner & Ho (2007), existe a necessidade de identificação e caracterização das células tronco mesenquimais, pois não existiam padronizações até tais anos. Até que a Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu que estas células devem expressar pelo menos um dos marcadores como CD73, CD90 e CD105 e não deve ter marcadores hematopoiético, pensando nisso, foi avaliada nesse estudo também, a expressão dos genes marcadores de células tronco mesenquimais CD13, CD29, CD44, CD73 e CD90 dos grupos com indução osteoblástica de 7 e 14 dias em comparação aos grupos sem indução. Os resultados mostraram que os grupos sem indução apresentaram alta expressão relativa destes genes, estando de acordo com essa premissa e demais estudos da literatura (BONNAMAIN et al., 2013; XIAO et al., 2014; BAKOPOULOU, et al., 2016; COLLADO-GONZÁLEZ, et al., 2017; WANG et al., 2018; ZAINURI et al., 2018; ZHAI et al., 2019). Com 7 dias de indução, houve diminuição da expressão desses marcadores e com 14 dias, a diminuição foi maior ainda. Portanto, observamos que à medida que os genes marcadores da osteogênese foram sendo mais expressos durante a indução osteoblástica, as expressões dos genes marcadores de células

tronco mesenquimais foram decaindo. Fato esse, importante para que a diferenciação da cultura 2D e esferoides (3D) de shed cells ocorram e possam ter aplicabilidade no tratamento de reabsorções ósseas, como a lesão periapical, na Odontologia.

No nosso grupo de pesquisa, trabalhos envolvendo a diferenciação osteoblástica de shed cells já foram desenvolvidos e obtiveram resultados positivos. Dernowsek em 2018 avaliou o controle pós-transcricional envolvendo redes de interação miRNAs-mRNAs durante a indução osteoblástica desta mesma linhagem celular, que junto aos achados desse e demais estudos, contribuirão para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos e genéticos envolvidos na linhagem osteoblástica de culturas 2D e esferoides (3D) de células tronco imaturas da polpa dentária, assim como suas utilizações para tratamentos de lesões periapicais na endodontia.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- Evidenciamos novos métodos de cultivo celular utilizando esferoides multicelulares (3D) a partir da cultura 2D de células tronco da polpa dentária de dentes decíduos (shed cells).
- Caracterizamos através de ensaios de viabilidade, histologia, biologia molecular e bioquímicos os esferoides multicelulares (3D) de shed cells, antes e após indução osteogênica em diferentes períodos.
- Comprovamos a utilização de esferoides multicelulares de shed cells após diferenciação osteoblástica e na recomposição de cavidade de lesão periapical in vitro simulada por impressão 3D.
- Nossos achados contribuem para melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvendo a linhagem osteoblástica de culturas 2D e esferoides multicelulares (3D) de shed cells, assim como sua utilização na odontologia regenerativa, com foco na regeneração de lesões periapicais.

Referências

ALVES, F.R.; ANDRADE-JUNIOR, C.V.; MARCELIANO-ALVES, M.F.; PEREZ, A.R.; ROCAS, I.N.; VERSIANI, M.A., et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A correlative bacteriologic, micro-computed tomography, and cryopulverization approach. **J Endod**, 42, 11, 1667-1672, 2016.

BAKOPOULOU, A. & ABOUT, I. Stem cells of dental origin: current research trends and key milestones towards clinical application. **Stem Cells Int**, 2016.

BENDER, I. B.; SELTZER, S.; SOTANOFF, W. Endodontic success - a reappraisal of criteria. Part II. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 22: 790-802, 1966.

BERGENHOLTZ, G.; LEKHOLM, U.; MILTHON, R.; HEDEN, G.; ÖDESJO, B.; ENGSTRÖN, B. Retreatment of endodontic fillings. **Scand J Dent Res**, 87: 217-224, 1979.

BONNAMAIN, V.; THINARD, R.; SERGENT-TANGUY, S.; HUET, P.; BIENVENU, G.; NAVEILHAN, P.; FARFES, J. C.; ALLIOT-LICHT, B. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. **Front in Physiol**, 2013.

CAPLAN, A.I. All MSCs are pericytes? **Stem Cell Int**, 3:229-230, 2008.

COLLADO-GONZÁLEZ, M.; PECCI-LLORET, M. P.; GARCÍA-BERNAL, D.; AZNAR-CERVANTES, S.; OÑATE-SÁNCHEZ, R. E.; MORALEDA, J. M.; CENIS, J. L.; RODRÍGUEZ-LOZANO, F.J. Biological effects of silk fibroin 3D scaffolds on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). **The Socie of the Nippon Dent Univ**, 106(2): 125-234, 2018.

DERNOWSEK, J. A.; ASSIS, A.F.; DONATE, P. B.; MANLEY, N.R.; PASSOS G. A. Predicted miRNA-mRNA-mediated posttranscriptional control associated with differences in cervical and thoracic thymus function. **Mol Immunol**, 99:39-52, 2018.

DIRAMI, G.; RAVINDRANATH, N.; PURSEL, V.; DYM M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. **Biol Reprod**, 61, 225–230, 1999.

DOMICI, M.; Le BLANC, K.; MULLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytot**, 8, 315-317, 2006.

ESTRELA, C.; PÉCOR, J. D.; ESTRELA, C. R. A.; GUEDES, O. A.; SILVA, B. S. F.; SOARES, C. J.; SOUSA-NETO, M. D. Common operative procedural errors and clinical factors associated with root canal treatment. **Braz Dent J**, 28(2): 179-190, 2017.

FRIEDMAN, S.; LÖST, C.; ZARRABIAN, M.; TROPE, M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. **J Endod**, 21: 384-90, 1995.

GIL, A. C.; NAKAMURA, V. C.; LOPES, R. P.; LEMOS, E. M.; CALIL, E.; AMARAL, K. F. Contemporary review of the thermo plasticized obturation, using the thermo mechanical compacting technique. **Rev UNG**, 2, 2009.

GONZÁLEZ, M.C.; PECCI-LLORET, M.O.; GARCÍA-BERNAL, D.; AZNAR-CERVANTES, S.; OÑATE-SANCHEZ, R.E.; MORALEDA, J.M.; RODRÍGUEZ-LOZANO, F.J. Biological effects of silk fibroin 3D scaffolds on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). **Odontology**, 2018.

HOLTFRETER, J. A study of the mechanisms of gastrulation. **J Exp Zool**, 95: 171-212, 1944.

HWANG, Y.C.; HWANG, I.N.; OH W.M. PARK, J.C.; LEE, D.S.; SON, H.H. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. **J Mol Histol**, 39:153-160., 2008.

IOHARA, K.; ZHENG, L.; ITO, M.; TOMOKIYO, A.; MATSUSHITA, K.; NAKASHIMA, M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. **Stem Cells Int**, 24: 2493-2503, 2006.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D. STUKART-PARSONS, G.C., GOMES MASSIRONI, S.M.; PEREIRA, L.V.; CAPLAN, A.I.; CERRUTI, H.F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. **Cells Tiss Organs**, 184:105-16, 2007.

KORFF, T.; AUGUSTIN, A. G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. **J Cell Biol**, 143, 1341-1352, 1998.

LIMA, N. F. F.; dos SANTOS, P. R. N.; PEDROSA, M. S.; DELBONI, M. G. Bioceramic sealers in endodontics: a literature review. **RFO UPF**, 22, 248-254, 2017.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnol J**, 3:1172-1184, 2008.

LIU, H.; LI, W.; GAO, C.; KUMAGAI, Y.; BLACHER, R. W.; DENBESTEN, P. K. Dentonin, a fragment of MEPE enhanced dental pulp stem cell proliferation. **J Dent Res**, 83(6):496-9, 2004.

MAZZI, J.F.; PETEAN, I.B.F.; SOARES, I.M.V.; SALLES, A.G.; ANTUNES, L.A.; SEGATO, R.A.B.; Da SILVA, L.A.B.; KÜCHLER, E.C.; ANTUNES, L.S., SOUSA-NETO, M.D. Influence of genetic polymorphisms in gene of bone remodeling and angiogenesis process in the apical periodontitis. **Braz Dent J**, 29(2): 179-183, 2018.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? **Rev. Genet na Esc**, 12-15, 2006.

NAGANO, M.; RYU, B.Y.; BRINSTER, C.J.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. **Biol Repro**, 68, 2207–2214, 2003.

ORIMO, H.; SHIMADA, T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphatase-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. **Molec and cel bioch**, 315(1): 51-60, 2008.

PETEAN, I.B.F.; KÜCHLER, E.C.; SOARES, I.M.V.; SEGATO, R.A.B.; Da SILVA, L.A.B.; ANTUNES, L.A.A.; SALLES, A.G.; ANTUNES, L.S.; De SOUSA-NETO, M.D. Genetic polymorphisms in RANK and RANKL are associated with persistent apical periodontitis. **J Endod**, 2019.

PARENT-MASSIN, D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. **Cell Biol Toxicol**, 17, 87-94, 2001.

PRASAD, M. G. S.; JUVVA, R.; DUVVI, N. B.; Towards a new era in the management of large periapical lesion in permanent tooth using stemcells: a-2 year clinical application report. **J Dent Shiraz Univ Med Sci**, 20(2): 137-140, 2019.

QUALITY, A. G. **Chicago: American Association of Endodontics**, 77:44-5 1987.

QUARLES, L.D.; QUARLES, D.A.; YOHAY, L.W.; LEVER, R. *et al.* Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. **J Bone Miner Res**, 7:683–692, 1992.

REIT, C.; Decision strategies in endodontics: on the design of recall program. **Endod Dent Traumatol**, 28: 95-9. 1987.

RODRIGUEZ-HERNANDES, C. *et al.* Cell culture: History, Development and Prospects. **Int J Curr Res Acad Rev**, 2:188-200, 2014.

ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cells. **Braz Dent J**, 14:16-21, 2003.

SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone biomaterial interface. **Journal of Cellular Biochemistry**, 56:340-347, 1994.

SILVA, L.A.; NOVAES, A.B., JR.; DE OLIVEIRA, R.R.; NELSON-FILHO, P.; SANTAMARIA, M., JR., SILVA, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **J Endod**, v.38, n. 3, p. 360-366, 2012

SIQUEIRA JR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; RICUCCI, D.; HÜLSMANN, M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. **British Dent J**, v.216, 216:305-312, 2014.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, 30: 297-306, 1997.

STRINDBERG, L. Z. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. Na analytic study based on radiographic and clinical follow-up examination. **Acta Odont Scand**, 14: 3-175, 1956.

TANIMURA, A.; MCGREGOR, D.H.; ANDERSON, H.C. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. **Proc Soc Exp Biol Med**, 172(2):173-7, 1983.

TORRES, A. F. C. ; ANTUNES, L. S. ; de OLIVEIRA, N. F. ; KÜCHLER, E. C. ; GOMES, C. C. ; ANTUNES, L. A. A. Genetic polymorphism and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periapical lesions : systematic review. **J Endod**, 46, 1, 2020.

VOISSIERI, A.; JOUBERTON, E.; MAUBERT, E.; DEGOUL, F.; PEYRODE, C.; CHEZAL, J-M. et al. Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. **PLoS ONE** 12(7): e0181340, 2017.

WAGNER, W. & HO, A. D. Mesenchymal stem cell preparations - comparing apples and oranges. **Stem Cell Rev**, 3, 239-248, 2007.

WANG, H.; ZHONG, Q.; YANG, T.; QI, Y.; FU, M.; YANG, X.; QIAO, L.; LING, Q.; LIU, S.; ZHAO, Y. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro, **Molec Med Rep**, 17: 6551-6559, 2018.

XIAO, L.; KUMAZAWA, Y.; OKAMURA, H. Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids in vitro: A journey to survival and organogenesis. **Biol Cell**, 106, 405-419, 2014.

ZAINURI, M.; PUTRI, R. R.; BACHTIAR, E. W. Establishing methods for isolation of stem cells from human exfoliated deciduous from carious deciduous teeth. **Interv Med & Appl Scien**, 10(1): 33-37, 2018.

ZHAI, Y.; WANG, Y.; RAO, N.; LI, J.; LI, X.; FANG, T.; ZHAO, Y.; GE, L. Activation and biological properties of human β defensin 4 in stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. **Front Physiol**, 10:1304, 2019.

ZHANG, L.; COMER, J.M. Experimental methods for studying cellular heme signaling. **Cells**, 7(6), 2018.

ZIPORI, D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. 33:211-215, 2004.

ZIPORI, D. The Stem Cells: Plasticity is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. **Stem Cell**. 23:719-726, 2005.

