

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

GABRIELA GAVILÁN HADID

**Análise do comportamento de esferoides de células tronco
mesenquimais do tecido pulpar humano em um modelo
simulado do canal dentário**

**Ribeirão Preto
2020**

GABRIELA GAVILÁN HADID

**Análise do comportamento de esferoides de células tronco
mesenquimais do tecido pulpar humano em um modelo
simulado do canal dentário**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de concentração em Endodontia.

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

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.

Catálogo da Publicação

Hadid, Gabriela Gavilán

Análise do comportamento de esferoides de células tronco mesenquimais do tecido pulpar humano em um modelo simulado do canal dentário. Ribeirão Preto, 2020.

85p.: il; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Odontologia Restauradora-Endodontia.

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

1. Células tronco. 2. Polpa dentária. 3. Esferoides celulares

HADID Gabriela Gavilan. **Análise do comportamento de esferoides de células tronco mesenquimais do tecido pulpar humano em um modelo simulado do canal dentário 2020. 85p. Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.**

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, no Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e no Laboratório de Pesquisa em Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as **peçoas** que colaboraram e participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho.

Minha **família** por todo o suporte e incentivo ao longo desses anos.

Meus **amigos** e **colegas** do Laboratório de Imunogenética Molecular do departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, por todo o apoio e ajuda.

À **Dra. Janaína de Andréa Dernowsek** (Instituto Renato Archer, Campinas, SP) por nos ter apresentado a tecnologia dos esferoides mostrando as perspectivas para seu uso e por ter confeccionado todos os moldes em acrílico utilizados nesse trabalho.

Ao Pós-Doutorando **Jardel Mazzi Chaves** do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, pela ajuda com a aquisição da micro tomografia do dente incisivo.

Aos meus **colegas** do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, por ter me recebido no início do mestrado.

Agradeço à **Prof. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado** e aos funcionários técnicos **Sr. Roger Rodrigo Fernandes**, **Sr. Dimítrius Pitol** e **Sra. Aline Ferraresi Tiballi** do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, pelo suporte.

Finalmente, agradeço ao **Professor Geraldo A. Passos** pela oportunidade que me foi dada, pela orientação e por todos os ensinamentos.

RESUMO

HADID, G.G. **Análise do comportamento de esferoides de células tronco mesenquimais do tecido pulpar humano em um modelo simulado do canal dentário.**

Células tronco são células com capacidade de auto renovação, de replicação assimétrica e de diferenciação em diferentes tecidos. Pesquisas recentes baseadas na regeneração tecidual por meio de células-tronco abriram a possibilidade da utilização destas células isoladas polpa dentária na odontologia regenerativa. A polpa dentária madura constitui uma fonte rica em células-tronco. A maioria das células dentro do corpo humano interage com células vizinhas e matriz extracelular estabelecendo uma organização tridimensional única. Estudos *in vitro* normalmente utilizam células aderentes ao plástico, provenientes de culturas em monocamada (culturas convencionais em duas dimensões, 2D). Entretanto, as culturas 2D, embora muito úteis para estudos da genética e biologia molecular, ainda não reproduzem todos os processos fisiológicos e funcionais que acontecem *in vivo*. As culturas de agregados celulares (esferoides) são aquelas em que as células não aderem ao plástico e formam estruturas em três dimensões (3D), fisiologicamente mais próximas dos tecidos no corpo. Isto permite criar agregados celulares, que embora sem uma matriz, oferecem condições fisiológicas mais próximas da situação *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a formação de esferoides de células tronco da polpa dentária em um modelo *in vitro* simulando de um canal dentário e seu potencial de diferenciação odontoblástica.

Palavras-chave: Células tronco; polpa dentária; esferoides celulares.

ABSTRACT

HADID, G.G. Behavior analysis of mesenchymal stem cell spheroids of human pulp tissue in a simulated dental canal model.

Stem cells are cells capable of self-renewal, asymmetric replication and differentiation in different tissues. Recent research based on tissue regeneration through stem cells has opened the possibility of using stem cells isolated from dental pulp in regenerative dentistry. Mature dental pulp is a rich source of stem cells. Most cells within the human body interact with neighboring cells and extracellular matrix establishing a three-dimensional organization. In vitro studies typically use plastic-adherent cells from monolayer cultures (conventional two-dimensional cultures, 2D). However, 2D cultures, while very useful for studies of genetics and molecular biology, do not yet reproduce all the physiological and functional processes that take place in vivo. Cell aggregates (spheroids) cultures are those in which cells do not adhere to plastic and form three-dimensional (3D) structures, physiologically closer to tissues in the body. This allows creating cellular aggregates, which although without a matrix, offer physiological conditions closer to the in vivo situation. The objective of this work was to evaluate the formation of spheroids using dental pulp stem cells in an in vitro model simulating a dental canal and its potential for odontoblastic differentiation.

Keywords: Stem cells; dental pulp; cellular spheroids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. HIPÓTESE	23
3. PROPOSIÇÃO	27
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Células tronco isoladas da polpa dentária humana	37
5.2 Cultura convencional das shed cells em monocamada (2D)	38
5.3 Cultura das shed cells em 3D para formação de esferoides em moldes com micro pinos.....	38
5.4 Sistema modelo para mimetizar o canal dental <i>in vitro</i>	39
5.5 Curvas de crescimento.....	40
5.6 Morfologia dos esferoides	41
5.7 Extração de RNA total.....	42
5.8 Quantificação e avaliação do grau de pureza das preparações de RNA total	43
5.9 Análise da integridade das preparações de RNA total	43
5.10 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	44
5.11 Diferenciação das shed cells em odontoblastos.....	46
5.12 Determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP).....	46
5.13 Formação de matrizes mineralizadas.....	47
5.14 Determinação da viabilidade celular.....	47
5.15 Localização intracelular de proteínas específicas por imunofluorescência	48
6. RESULTADOS	51
6.1 Curva de crescimento da cultura 2D.	53
6.2 Curva de crescimento da cultura 3D molde com micro pinos.	53
6.3 Formação de esferoides.....	55
6.4 Análise histológica da estrutura dos esferoides.....	56
6.5 Viabilidade dos esferoides	57
6.6 Viabilidade celular cultura 2D	58
6.7 Avaliação da integridade do RNA total	59
6.8 Avaliação da expressão transcricional por RT-qPCR.	60
6.9 Atividade da Fosfatase alcalina (ALP).....	63
6.10 Análise da formação de nódulos de mineralização	66

6.11 Análises de imunolocalização	68
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O elemento dentário é constituído por quatro tecidos principais; esmalte, dentina, polpa e cimento. O esmalte é o único tecido dentário derivado do ectoderma, sendo o cimento e o complexo dentino-pulpar derivados do mesênquima (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018).

A polpa dentária, constituída por tecido conjuntivo, preenche a cavidade pulpar. Ela é responsável pela vitalidade pulpar e está composta por uma matriz de colágeno disposta na forma de fibras entrelaçadas, suspensas em uma substância rica em proteínas de consistência gelatinosa, o que permite o transporte de nutrientes (DONG et al., 2019).

A polpa dentária adulta, assemelha-se ao tecido conjuntivo embrionário e constitui uma fonte rica em células-tronco. Além disso, a polpa abriga diferentes tipos de células como odontoblastos, fibroblastos, células inflamatórias, assim como fibras nervosas e vasos sanguíneos (KENNETH; STEPHEN C, 2011).

Todos os componentes que formam o tecido pulpar são essenciais para a viabilidade do tecido. Um elemento crucial no complexo dentino-pulpar são os odontoblastos. Estas células estão localizadas na periferia do tecido pulpar e possuem extensões até a parte mais interna da dentina. Na porção coronal da polpa adulta as células odontoblásticas possuem geralmente forma colunar e na polpa jovem possuem forma colunar alta. Na porção média da polpa predomina uma forma celular mais cuboide, enquanto próximo ao forâmen apical formam uma camada escamosa de células chatas (WIDBILLER et al., 2019).

Na parte mais externa da polpa saudável encontra-se uma camada de odontoblastos, imediatamente abaixo da pré-dentina e possuem processos odontoblásticos que passam pela pré-dentina à parte interna da dentina. Em seguida da camada de odontoblastos, encontra-se a zona estreita de aproximadamente 40 µm e pobre em células, chamada camada livre de células de Weil ou zona de Weil. Subsequentemente da zona pobre em células encontra-se a zona rica em células, ou área sub odontoblástica rica em fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, células tronco mesênquimais indiferenciadas que são de extrema importância no reparo celular nas injúrias da polpa (YOKOI et al., 2019).

Na porção mais interna da polpa encontra-se a polpa propriamente dita, constituída por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, nervos e fibroblastos como células mais predominantes. Embora todos os componentes da polpa dentária sejam de extrema importância e indispensáveis para o tecido, os odontoblastos são as células mais características e especializadas do complexo dentino pulpar. Elas são responsáveis pela dentinogênese tanto durante o desenvolvimento do dente quanto durante a sua maturidade (WIDBILLER et al., 2019).

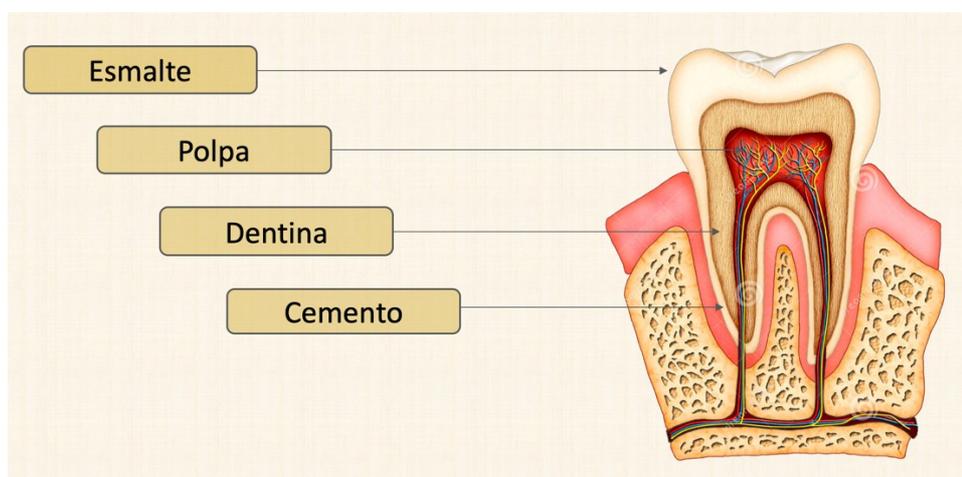


Figura 1. Elemento dentário e os diferentes tecidos que o compõem.

Fonte: <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photos-dental-anatomy-image8747128>

O tecido pulpar é muito dinâmico, portanto, responde a estímulos externos de diferentes maneiras. A incapacidade de se expandir e a escassez de circulação colateral da polpa dentária, explicam sua suscetibilidade a lesões, complicando a sua regeneração (BAKHITAR et al., 2018).

Existem várias patologias que afetam o elemento dentário. A mais comum é a cárie dentária; uma infecção localizada, destrutiva e progressiva podendo afetar a qualquer tecido dentário começando normalmente pelos mais superficiais (esmalte e dentina respectivamente) e que se não for controlada, pode causar pulpíte, necrose pulpar e potencial perda dentária (DUNCAN; KOBAYASHI; SHIMIZU, 2018).

A pulpíte é a inflamação da polpa dentária que pode ser reversível, irreversível ou crônica hiperplásica. A primeira é tratada pela remoção do irritante local, ao passo que na irreversível e crônica hiperplásica é indicada remoção do tecido danificado mediante o tratamento endodôntico. A necrose pulpar pode suceder tanto a pulpíte quanto a injúria traumática aos vasos sanguíneos apicais, cortando o suprimento sanguíneo levando a morte pulpar, sendo o tratamento

endodôntico o tratamento indicado (DUNCAN; COOPER; SMITH, 2019).

Apesar da elevada taxa de sucesso nos tratamentos endodônticos e das alternativas tecnológicas atuais nos tratamentos endodônticos, a complexidade dos sistemas de canais radiculares continua sendo um grande desafio levando a uma alta taxa de insucesso nos tratamentos endodônticos (ÜREYEN KAYA et al., 2018).

Os materiais obturadores dos canais radiculares utilizados desde longa data e até hoje são excelentes e substituem os tecidos biológicos. Entretanto, são materiais biocompatíveis, não são materiais biológicos funcionais (ATHANASIADOU et al., 2018).

Pesquisas recentes da regeneração por meio da engenharia tecidual com a utilização de células-tronco abriu a possibilidade da utilização destas células isoladas da polpa dentária em odontologia regenerativa (LIANG et al., 2018).

As células-tronco são células que ainda não passaram pelo processo de diferenciação celular. Elas têm a capacidade de se dividir por períodos indefinidos, geralmente ao longo de toda a vida do indivíduo (GILBERT, 2003).

Estas células possuem duas características importantes que as caracterizam: 1) A capacidade de auto renovação ou propriedade de proliferar e gerar outras células tronco idênticas; 2) a replicação assimétrica ou a capacidade de manter a propriedade de auto renovação em uma das células filhas (KUMAR et al., 2008; VALLEJO-DIEZ et al., 2018).

As principais fontes de células-tronco são encontradas nos três estágios do desenvolvimento humano: na fase embrionária (blastocisto e embrião); na fase fetal (tecidos fetais, placenta e anexos embrionários) e na fase adulta (em todos os tecidos e órgãos do organismo adulto). Entretanto, a quantidade/qualidade das células-tronco tende a diminuir com efeito do envelhecimento do organismo (ZAGO, 2006)

Existem três tipos de células tronco, dependendo do lugar de origem. As embrionárias encontradas no embrião; as adultas presentes nos tecidos do corpo e as pluripotentes induzidas também chamadas de células reprogramadas, as quais são produzidas em laboratório por meio de manipulações genéticas (COVAS, 2006).

De acordo com a sua capacidade de diferenciação elas podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e onipotentes, com a possibilidade de se transformar em todos ou apenas um único tipo de tecido (BAKOPOULOU; ABOUT, 2016).

A possibilidade da utilização de células-tronco em medicina proporcionou novos horizontes para a saúde. As propriedades dessas células abriram novas perspectivas de pesquisas que vão desde a criação de tecidos e órgãos e o tratamento de doenças até a sua aplicação na farmacologia, para testar novos medicamentos (KITANO et al., 2017).

No campo da odontologia, pesquisas também estão sendo realizadas na tentativa de substituir o tecido danificado por um tecido obtido em laboratório a partir de células-tronco (ITOH et al., 2018).

Espera-se no futuro a possibilidade de substituir tecidos dentários danificados por tecidos semelhantes produzidos em laboratório a partir de células-tronco da polpa dentária (DISSANAYAKA et al., 2014).

A maioria das células dentro do corpo humano interage com células vizinhas e os componentes e matriz extracelular (ECM) para estabelecer uma organização tridimensional (3D). Essas interações célula-célula e célula-ECM formam uma rede de comunicação bioquímica complexa e de sinais mecânicos, que são críticos para a fisiologia celular normal. Como resultado, células cultivadas em frascos de poliestireno formando monocamada (2D) podem não apresentar propriedades fisiológicas específicas encontradas nos órgãos e tecidos (LEE et al., 2017).

A cultura de esferoides em 3D é um método para criar agregados de células sem uma matriz mas que propicia condições de cultura fisiologicamente mais próximas do que acontece *in vivo*. Várias tentativas foram feitas nas últimas duas décadas para desenvolver modelos de cultura de células em 3D para preencher a lacuna entre ensaios baseados em células e os estudos *in vivo* em animais (LIN; CHANG, 2008).

A polpa dentária é uma importante fonte de células-tronco progenitoras autólogas prontas para o seu uso na regeneração tecidual. O modelo de esferoides ajuda a entender a diferenciação, organização do tecido e homeostase de células-tronco e oferece novas alternativas para a regeneração de tecidos neurais, ósseos e dentários (SMITH; COOPER, 2017).

As células tronco mesenquimais isoladas da polpa dentária de dentes humanos decíduos (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*, ou *shed cells*) (RAO et al., 2019) representam uma opção promissora na restituição do tecido biológico pulpar perdido, oferecendo uma alternativa de tratamento nas diferentes patologias pulpares. O presente trabalho foi desenvolvido tendo como base essa perspectiva.

2. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Células tronco mesenquimais isoladas da polpa dentária de dente decíduo (*shed cells*) poderão ser utilizadas como sistema-modelo para formação de esferoides em culturas 3D, mimetizando um canal dentário assim como reproduzir sua diferenciação em odontoblastos.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a formação *in vitro* de esferoides a partir de células tronco da polpa dentária (*shed cells*) em um modelo simulado de um canal dentário (incisivo central superior) e o potencial de diferenciação odontoblástica desses esferoides.

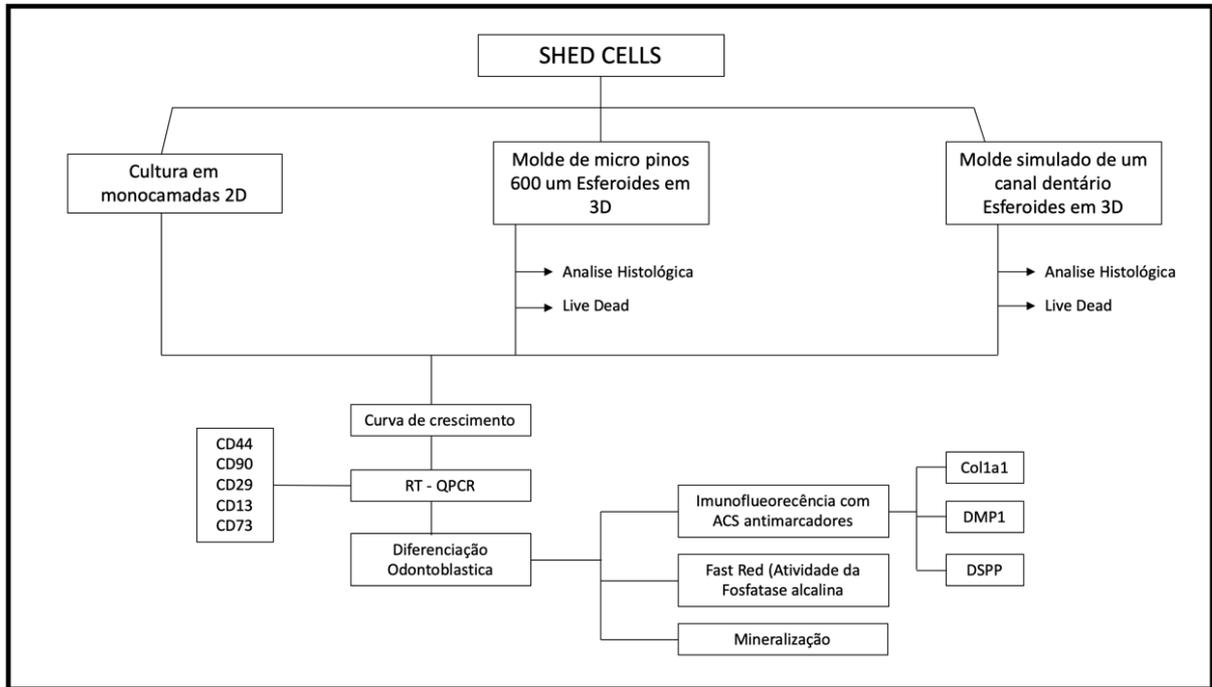
Além disso, faremos comparações da formação de esferoides utilizando o protocolo clássico com moldes de agarose formados com micro pinos e com uma estrutura que mimetiza o canal dentário humano.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a formação de esferoides de *shed cells* em um modelo simulado do canal dentário (molde de canal), comparando com a formação dessas estruturas geradas em moldes de micro pinos.
2. Analisar a diferenciação odontoblástica partindo de *shed cells* cultivadas em monocamada (2D) e de esferoides (culturas em 3D).
3. Analisar os fatores que influenciam na viabilidade dos esferoides dependendo de sua forma e tamanho.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Células tronco isoladas da polpa dentária humana

A linhagem de células tronco isoladas da polpa dentária de um dente decíduo humano foi cedida pela Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O isolamento e a caracterização desta linhagem foram realizados a partir da polpa dentária obtida de um dente decíduo normal de criança de sexo masculino de 7 anos de idade, cujo dente foi extraído sob anestesia local na Clínica Odontológica CERA (São Paulo, SP) com consentimento dos responsáveis.

A polpa dentária foi extraída com instrumento odontológico, lavada duas vezes com PBS (0,01 M, pH 7,4), suplementado com antibióticos (100 U/ μ L de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina), e transferida para placas de Petri de 35 mm (Corning, USA) com DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) contendo meio HAM F12 (THERMO FISHER) suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (ATENA, CAMPINAS, BRASIL). As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera com 5% de CO₂ (KERKIS et al., 2007).

Após a proliferação *in vitro* das shed cells por duas semanas, as mesmas foram lavadas duas vezes com PBS estéril e a temperatura ambiente e dissociadas em solução de tripsina 0,25% (Invitrogen) e logo em seguida semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² com uma densidade de $\sim 10^4$ células/garrafa.

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

Para o congelamento (criopreservação), as células foram ressuspensas em meio contendo 40% de SBF, 50% de DMEM (SIGMA-ALDRICH) e 10% de DMSO (SIGMA-ALDRICH) em uma densidade de 5×10^5 células/ml e colocadas em tubos plásticos apropriados (criotubos Corning). A temperatura dos tubos foi diminuída gradativamente a cada 18 horas (-20°C e depois -80°C). Após esta etapa, os criotubos foram mergulhados em nitrogênio (N₂) líquido a -192°C em bujões de criopreservação, sendo identificados com o nome da linhagem, a data da criopreservação e o nome da pessoa que manipulou.

Para o descongelamento e a posterior cultivo dessas células, os criotubos foram removidos dos bujões de N₂ líquido e colocados em banho-maria a 37° C por 2 minutos. Em seguida as células foram lavadas duas vezes em PBS estéril, e

colocadas em garrafas de 25 cm² contendo meio HAM F12 e 15% de SBF e as culturas prosseguidas como descrito acima.

A caracterização imunofenotípica das shed cells foi realizada num trabalho anterior de nosso grupo (DERNOWSEK et al 2017) por meio de citometria de fluxo e utilizando anticorpos monoclonais para a detecção de marcadores específicos de células tronco mesenquimais. A linhagem de shed cells que estudamos apresenta o seguinte fenótipo: CD90⁺, CD73⁺, CD29⁺, CD13⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD14/CD45⁻ e CD34⁻.

5.2 Cultura convencional das shed cells em monocamada (2D)

As shed cells são aderentes ao plástico e foram cultivadas em monocamada em garrafas plásticas de poliestireno de 25 cm² ou de 75 cm² (Corning) conforme o caso com meio HAM F12 e 15% de SBF suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e os antibióticos penicilina, estreptomicina e plasmocin que previne desenvolvimento de bactérias e microplasmas. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

5.3 Cultura das shed cells em 3D para formação de esferoides em moldes com micro pinos.

O esquema para preparação dos moldes de agarose e desenvolvimento das culturas de esferoides em 3D nos moldes de micro pinos de acrílico com 600 µm de diâmetro é apresentado na Figura 2. Utilizamos um molde de agarose com micro poços não aderentes permitindo que, as células uma vez semeadas nesses compartimentos, se agreguem entre si formando uma estrutura tridimensional (3D) chamada de esferoide. Para isso, as células são cultivadas em cultura convencional 2D, tripsinizadas e semeadas no molde de agarose para permitir a formação dos esferoides.

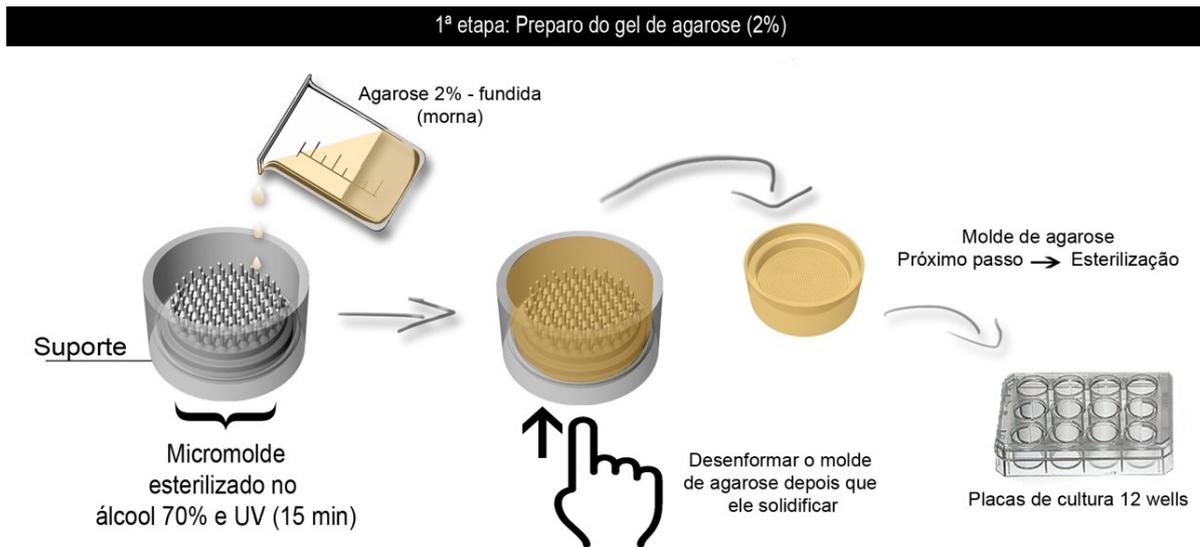


Figura 2. Ilustração do protocolo para confecção dos moldes de agarose. Fonte: Dernowsek, et. al. 2016.

5.4 Sistema modelo para mimetizar o canal dental *in vitro*

Para a obtenção da imagem em 3D do canal dentário, foi selecionado um incisivo central superior e realizada a tomografia em um micro tomógrafo (SkyScan 1174v2; Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) do Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) com a colaboração do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto e do Pós-Doutorando Jardel Mazzi Chaves. Os moldes foram projetados utilizando o software Rhinoceros gerando um arquivo estereolitográfico (STL) (Figura3). Esse modelo computacional foi levado para uma impressora 3D (Polyjet Objet Connex 350, Stratasys, Eden Prairie, MN, USA) para gerar a impressão de um molde em acrílico com as medidas reais do dente incisivo central superior, utilizando a tecnologia de impressões 3D de biomateriais, do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (Campinas-SP) (colaboração da Dra. Janaína A. Dernowsek).

O modelo do canal dental obtido em acrílico, a partir da impressão 3D, foi utilizado como modelo negativo para a confecção dos blocos de agarose (modelo positivo do canal dental). A agarose é manipulada na fase líquida (fundida a 42°C) e colocada no molde até sua gelificação. Isto cria um modelo negativo o qual é transferido para as placas de cultura “multiwell” de 12 poços (Corning) e preenchida com meio HAM F12. As shed cells foram então semeadas nesse modelo negativo para formação dos esferoides.



Figura 3. Modelo 3D do canal dental de um dente incisivo superior obtido por tomografia por meio de um equipamento microCT (SkyScan 1174v2; Bruker micro-CT, Kontich, Belgium).

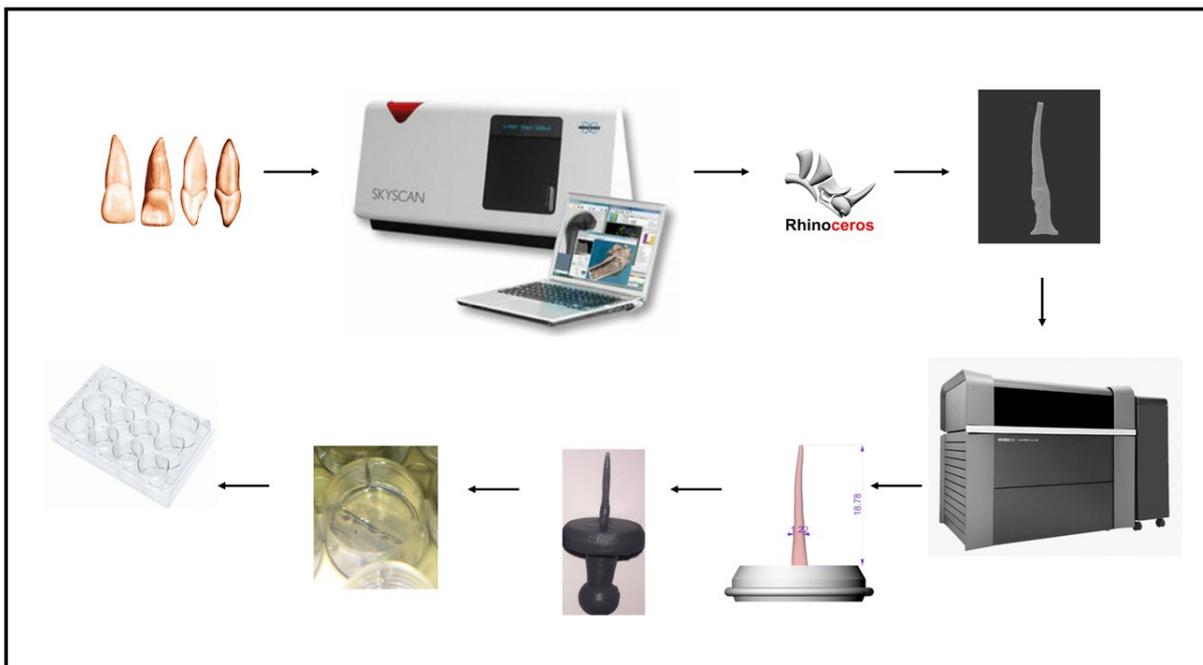


Figura 4. Esquema do processo de preparo do molde simulado do canal dentário, desde a escolha da peça dentária, a tomografia até a criação do molde de agarose na placa de 12 poços.

5.5 Curvas de crescimento

a) Culturas das shed cells em monocamada (2D)

As shed cells foram semeadas em uma placa de 12 poços na proporção de 3×10^4 células por poço. A proliferação das células foi determinada por meio de contagens (após tripsinização) em intervalos de tempo pré determinados utilizando um contador de células automático (CellOmeter Auto T4, Nexcelom Biosciences).

Uma curva de crescimento foi desenhada considerando a média aritmética e desvio padrão da média de triplicatas.

b) Esferoides

As shed cells foram semeadas sobre os conjuntos de micro moldes agarose que estavam inseridos em cada um dos poços de uma placa de 12 poços e na proporção de $1,25 \times 10^4$ células/poço. Logo após o início da formação dos esferoides, ou seja, com 12 horas de cultura, os mesmos foram dissociados por tripsinização e as células contadas usando um contador automático. O processo foi repetido em intervalos de tempo pré determinados.

O mesmo tipo de procedimento foi realizado utilizando o molde em agarose do canal dental, onde se desenvolveram os esferoides. Neste caso, foram semeadas 3×10^5 células/molde.

Curvas de crescimento para cada tipo de esferoide foram desenhadas considerando a média aritmética e desvio padrão da média de triplicatas.

5.6 Morfologia dos esferoides

a) Análise histológica da estrutura dos esferoides

Para realizar as análises histológicas, tanto os esferoides formados no molde com micro pinos, quanto os esferoides formados no molde do canal (24 horas de formação) foram removidos dos seus respectivos moldes.

As estruturas foram fixadas com formol 10% tamponado em PBS, posteriormente inclusas em resina histoquímica (Leica Microsystems). Os blocos de resina com o material já incluído foram levados para um micrótomo, que produziu-se finas camadas de resina contendo as estruturas de esferoides que foram cuidadosamente colocadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina-eosina. Foram selecionadas aleatoriamente 10 imagens de campos histológicos de cada grupo, que foram capturadas por meio de um microscópio Leica DM 6000 M (Leica Microsystems) ou com o microscópio Leica AF6000, conforme o caso.

Esse procedimento foi realizado com o apoio do Laboratório de Pesquisa Morfológica do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

b) Viabilidade dos esferoides

Foi realizado um teste utilizando o kit LIVE/DEAD viability/cytotoxicity (Thermo Fisher) para avaliarmos a viabilidade dos esferoides. Os esferoides com 24 horas de formação, foram removidos dos moldes da agarose e sobrepostos em laminais histológicas com 2 μ l de ETHD1 e 0,05 μ l de calceína diluídas em 1ml de PBS estéril.

As laminais com as amostras foram observadas no sistema LSM 780 de um microscópio invertido Axio Examiner (Leica Microsystems) com a objetiva 40x oil NA 1.3x, no Laboratório Multiusuários do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

5.7 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit mirVana miRNA Isolation Kit Ambion (Grand Island, NY, USA). Foram utilizadas para a extração de RNA total das *shed cells* em cultura 2D e das duas culturas 3D indiferenciadas. As células foram destacadas das garrafas por tripsinização. A tripsina foi inativada com meio de cultura contendo 10% de SFB, e as células colhidas por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos. O botão de células resultantes foi lavado duas vezes com PBS estéril e adicionamos 1ml de solução de lise. Agitou-se vigorosamente (1 minuto no vortex) para homogeneizar e lisar completamente as células. Adicionou-se 100 μ l de miRNA Homogenate Additive e misturou-se bem (vortex por 20 segundos). A mistura foi deixada em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1mL de fenol ácido-clorofórmio e a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por mais 1 minuto. O lisado de células foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo e então foi adicionado etanol 100% (pelo menos 1,25 vezes do volume da fase aquosa recuperado após a centrifugação) e à temperatura ambiente. Para cada amostra foi montada uma coluna com tubo coletor, adicionou-se 700 μ L da mistura (fase aquosa + etanol) nas colunas e as mesmas foram centrifugadas por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda a mistura fosse filtrada.

Por último, 700 μ L de miRNA Wash Solution 1 foram adicionados à coluna e centrifugado por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado, e então 500 μ L

de miRNA Wash Solution 2/3 foi aplicado na coluna e centrifugado por 10 segundos a 10.000 x g. O último passo foi repetido e, após descartar o líquido, o tubo foi centrifugado por 1 minuto para remover resíduos líquidos do filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e a ela foram adicionados 100µL de água MilliQ/DEPC pré-aquecida a 95°C. O tubo foi centrifugado por 30 segundos para a recuperação do RNA total.

5.8 Quantificação e avaliação do grau de pureza das preparações de RNA total

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria UV no aparelho NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). Neste trabalho consideramos que uma unidade (1U) de absorbância A260 corresponde a 40µg de RNA/mL.

Além disso, avaliamos pureza das preparações por meio de cálculo das razões absorbância em diferentes comprimentos de onda de UV. Só utilizamos amostras livres de fenol que apresentaram razão A230/A260 aprox. 0,7 e livres de contaminação com proteínas razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0.

5.9 Análise da integridade das preparações de RNA total

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese microfluídica através de RNA 6000 Nano chips e no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer® Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).



Figura 5. Aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chip utilizados na eletroforese microfluídica.

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que anteriormente estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando 550µL do RNA 6000 Nano gel em uma coluna com filtro e centrifugou-se a 1.500 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente. Uma alíquota de 65µl foi colocada em um tubo de 0,5 mL livre de nucleases e em seguida, foi adicionado 1µL de RNA 6000 Nano Dye. A amostra foi submetida a agitação em vortex por 10 segundos, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano chip que foi colocado na priming station. Primeiramente foram pipetados 9µl da mistura gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada à priming station o gel foi distribuído por todo o chip. Em seguida, outros 9µl da mistura foram pipetados nos demais pontos indicados com a letra G.

Foram pipetados 5µl do RNA 6000 Nano Marker em cada uma das amostras, bem como na posição do marcador e 1µL do marcador na posição indicada. Por último, pipetou-se 1 µl de cada amostra de RNA nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um vortex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, CHN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto e em seguida, colocou-se o chip no bioanalisador para proceder-se a corrida eletroforética. O resultado das corridas foi obtido pelo Agilent 2100 Expert Software (eletroferograma e densitometria dos géis) após aproximadamente 30 minutos de corrida. Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes aos padrões das espécies de RNAr 28S, 18S, 5S e RNAt 4S e com RNA Integrity Number (RIN) ≥ 7.5 foram utilizadas.

5.10 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Os níveis de expressão dos genes foram avaliados por RT-qPCR (*Reverse Transcription Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), foram utilizadas para avaliação dos níveis de transcrição dos seguintes genes: genes CD44, CD13, CD73, CD90, CD29, GAPDH (controle endógeno), nos grupos da cultura em 2D, e das duas culturas em 3D (molde pino e molde do canal). Para as culturas em 3D foram preparadas 3 placas de 12 poços com moldes de agarose para o molde do canal, contendo cada molde esferoides formados a partir de 3×10^5 células, e duas

placas de 12 poços com moldes de micro poços contendo esferoides formados a partir de $1,25 \times 10^4$ células. Quantidades determinadas pelas curvas de crescimento.

As reações de qRT-PCR foram preparadas utilizando o reagente SYBR GREEN (Applied Biosystems) em placas de 48 poços com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi Applied Biosystems Stepone One juntamente com o software de leitura de mesmo nome (Stepone versão 2.1 Applied Biosystems).

O processo constituiu-se de duas etapas, a primeira delas consiste na avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso foi realizada uma quantificação absoluta de cada par de primers, inclusive do gene constitutivo, utilizando diluições seriadas 1:10 a 1:1000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, dos primers. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.

A segunda etapa consiste da reação de PCR quantitativa propriamente dita. Para tal, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-las entre si. O volume final da reação era de 20 μ l : 7,4 μ l de água livre de nucleases; 0,8 μ l de cada primer na concentração de 10 μ M ; 10 μ l de solução de Syber Green e 1 μ l de cDNA sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total.

A ferramenta web Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) foi utilizada para selecionar os pares dos primers que abrangiam regiões de junções intron/exon com uma temperatura de melting de 60° C.

A sequência dos cDNAs desses genes foram recuperadas do banco de dados NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>). As sequências forward e reverse (apresentadas na orientação 5' para 3') foram as representadas na figura 6.

Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (GenBank acc NM 008084.2) cujos primers foram GGGTGTGAACCACGAGAAAT e CCTTCCACAATGCCAAAGTT).

A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001). Para análise estatística dos dados, foi utilizado o teste One-way ANOVA, de acordo com a necessidade por meio do software estatístico GrapPad Prism.

Gene	Primer	Sequências	TM
CD 29	Left	TGCGAGTGTGGTGTCTGTAA	60°C
	Right	GAAGGCTCTGCACTGAACAC	
CD 44	Left	AAGGTGGAGCAAACACAACC	60°C
	Right	ACTGCAATGCAAACCTGCAAG	
CD 13	Left	ACGCCACCTCTACCATCATC	60°C
	Right	AACGAGCCACCACCATAATC	
CD 90	Left	GCCTTCACTAGCAAGGACGA	60°C
	Right	GCCCTCACACTTGACCAGTT	
CD 73	Left	ACCTGAGACACACGGATGAA	60°C
	Right	GTTCTCCCAGGTAATTGTGCC	
GAPDH	Left	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	60°C
	Right	CCTTCCACAATGCCAAAGTT	

Figura 6. Primers utilizados para validação do perfil de expressão.

5.11 Diferenciação das shed cells em odontoblastos.

A indução química de diferenciação em odontoblastos das shed cells tanto da cultura celular 2D quanto das duas culturas dos esferoides em 3D, foi realizada mediante a adição de 5µg/mL de ácido ascórbico (Gibco) e 2,16 g/mL de β-glicerolfosfato (Sigma) ao meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF. Estas condições de cultura induzem a diferenciação odontoblástica das shed cells. 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. Coletamos amostras de três períodos diferentes durante a indução de diferenciação, ou seja, após 7, 10 e 14 dias em cultura para a cultura 2D. Para os grupos 3D, foram utilizadas células 2D previamente induzidas para diferenciação, e foram levadas para os moldes do canal dentário e no molde com micro pino para a formação dos esferoides 24 horas antes dos testes, após 7, 10, 14 dias em cultura.

Para cada tempo foram preparadas uma placa de 12 poços com 12 moldes de cada grupo de culturas 3D. Já no grupo de culturas 2D foram preparadas placas de 24 poços sendo pipetadas 10⁴ células em cada poço da placa de cultura.

5.12 Determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que atua na mineralização da matriz orgânica e, portanto, sua atividade está relacionada com a alta atividade mineralizante durante a diferenciação das *shed cells* em odontoblastos.

A detecção de fosfatase alcalina in situ (ALP) foi realizado aos 7, 10 e 14 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37°C. Em seguida, 320 mg de reagente Triz (Sigma) foi dissolvido em 20 mL de água desionizada e ambos os 7 mg de reagente Fast Red (Sigma) e 8 mg de naftol (Sigma) diluído em 2 mL de dimetilformamida (Merck) foram adicionados. C

Cada poço recebeu 1 mL deste solução de trabalho e a placa foi levada para o incubadora com 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Após esse período, a solução foi removida dos poços e a placa foi deixada secar à temperatura ambiente para a obtenção da documentação fotográfica. As imagens coloridas foram convertidas em binárias imagens usando o software Image J e depois convertido escala de cinza, para permitir que os pixels sejam contados por um análise quantitativa.

5.13 Formação de matrizes mineralizadas

A formação de matriz mineralizada foi detectada nos períodos 7, 10 e 14 dias, foram localizadas manchas das áreas ricas em cálcio. As amostras foram lavadas com PBS e desidratadas com álcool 70% durante uma hora a 18°C e corado com 2% de Alizarin Red S, pH 4,2, por 10 min. O teor de cálcio foi avaliado usando um método colorimétrico. Resumidamente, 280 µL de ácido acético a 10% foi adicionado a cada poço corado com Alizarin Red S e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min sob agitação. Esta solução foi transferida para um tubo de microcentrífuga e após vórtice por 1 min, a pasta foi sobreposta com 100 µL de óleo mineral (Sigma-Aldrich), aquecido a exatamente 85°C por 10 min e transferido para o gelo por 5 min. Posteriormente foi centrifugada a 20.000 g por 15 min e 100 µL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga. Então, 40 µL de 10% de amônio foi adicionado hidróxido para neutralizar o ácido e este solução contendo 140 µL foi lida a 405 nm em 96- formato de poço usando fundo transparente de paredes opacas (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) na placa leitor de placas µQuant (Biotek, Winooski, VT, EUA). As imagens digitais adquiridas foram processadas com o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

5.14 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada em triplicata das amostras pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-i)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma),

um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis, e cujo produto da redução é colorido e pode ser quantificado por espectrofotometria num comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983).

As células foram incubadas em meio de cultura a 37°C contendo MTT (5 mg/mL) por 4 h (Sanyo Electric Co.) (placas de 24 poços). O meio foi removido, acrescentando em seguida 1 mL de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol – Merck, em 134 µL de ácido clorídrico a 0,04 N – Merck) e a placa de cultura mantida em um agitador de placas (Lab-Line Instruments, IL, EUA) por 10 minutos. Alíquotas de 150 µl de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em um espectrofotômetro (µQuanti, Biotec Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e os dados expressos como absorbância. O teste de viabilidade celular foi utilizado apenas para a cultura 2d.

5.15 Localização intracelular de proteínas específicas por imunofluorescência

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência para detectar e localizar antígenos específicos usando anticorpos que comprovem a diferenciação das shed cells em odontoblastos. Os anticorpos utilizados foram anti Col1a1, anti DMP1 e anti DSPP. Foi realizada a imunolocalização das proteínas marcadoras de diferenciação odontoblástica.

As culturas em 2D foram feitas em lamínulas plástico Thermanox® (Nunc, Roskilde, Danmark), as duas culturas em 3D foram semeadas em plástico Thermanox depois da fixação, durante os períodos de 7, 10, 14 dias foram fixados à temperatura ambiente com 4% paraformaldeído (Acros Organics, New Jersey, NJ, EUA) em tampão fosfato 0,1 M (PB) (Acros Organics), pH 7,2 por 10 min. Após lavagem em PBS, as células foram processadas para marcação de imunofluorescência para detecção das proteínas marcadoras colageno (Col1a1), DMP1, DSPP. As células fixadas com paraformaldeído foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% (Acros Organics) em PBS por 10 min. Em seguida, as amostras foram bloqueadas com 5% de leite desnatado dissolvido em PBS por 30 min. Anticorpos primários, seguidos anticorpos secundários foram adicionados. As incubações foram realizadas em ambiente umidificado por 60 minutos em temperatura ambiente. Entre cada passo de incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes (5 min cada) em PBS. Antes de montar as lâminas para observação ao microscópio, núcleos celulares foram corados com 300 nM 4', 6-diamidino-

Dicloridrato de 2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes) por 5 min e as amostras foram lavadas com H₂O. As lamínulas Thermanox foram colocadas em lâminas de microscópio (Knittel, Braunschweig, Alemanha) e as lamínulas de vidro redondo de 12 mm da Fisherbrand (Fisher Scientific) foram montados com um kit antifade (Prolong; Molecular Probes) na superfície contendo células. O as amostras foram examinadas sob epifluorescência usando um microscópio de luz (Leica DMLB, com N Plan (310 / 0,25, 320 / 0,40) e HCX PL Fluotar (340 / 0,75), equipado com uma câmera digital Leica DC 300F (Leica; Bensheim, Alemanha). As imagens digitais adquiridas foram processadas com o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

Todas as etapas de imunolocalização foram realizadas no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, sob a supervisão da Profa. Dra. Karina F. Bombonato-Prado.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Curva de crescimento da cultura 2D.

As contagens das células foram feitas em triplicatas. O crescimento foi quantificado e representado por uma curva de crescimento.

As células cultivadas em monocamadas no momento das contagens dos diferentes tempos apresenta a fase de crescimento exponencial que atinge o pico máximo em 48 horas, porém não foi possível observar o início do declínio até o momento da última contagem.

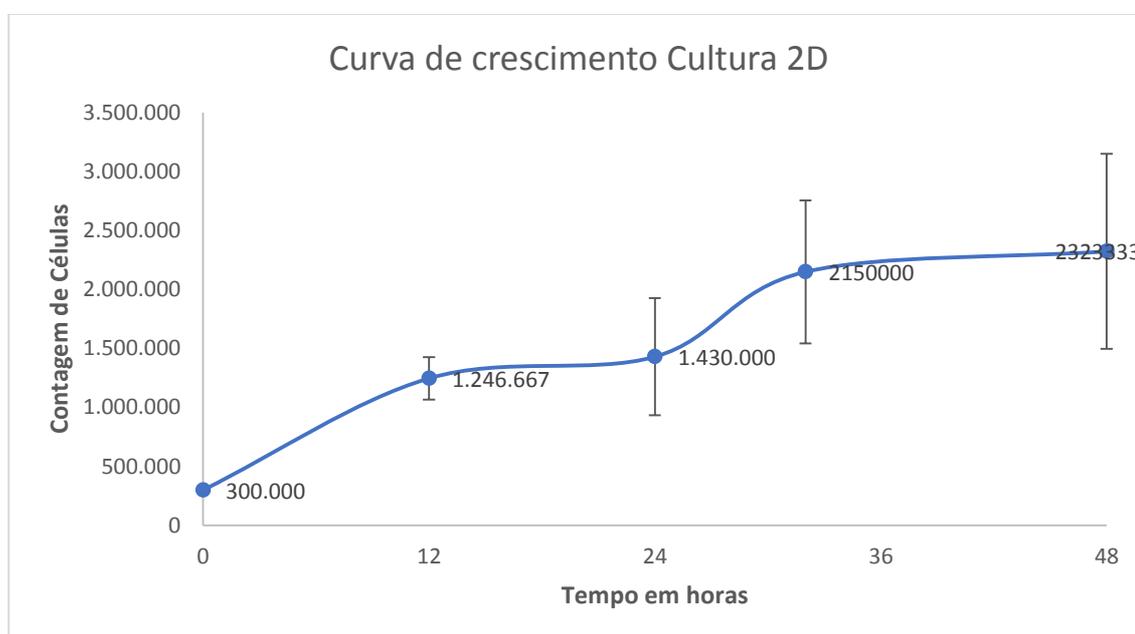


Figura 7. Curva de crescimento de esferoides de *shed cells* em cultura 2d (Tempo em horas, médias aritméticas de três determinações independentes e desvio padrão).

6.2 Curva de crescimento da cultura 3D molde com micro pinos.

As contagens das células dos esferoides formados no molde com micro pinos também foram feitas em triplicatas. O crescimento dos esferoides foi quantificado e representado por uma curva de crescimento. A curva mostrou a fase de crescimento exponencial que atinge o pico máximo em 72 horas e observa-se o início do declínio em 96 horas.

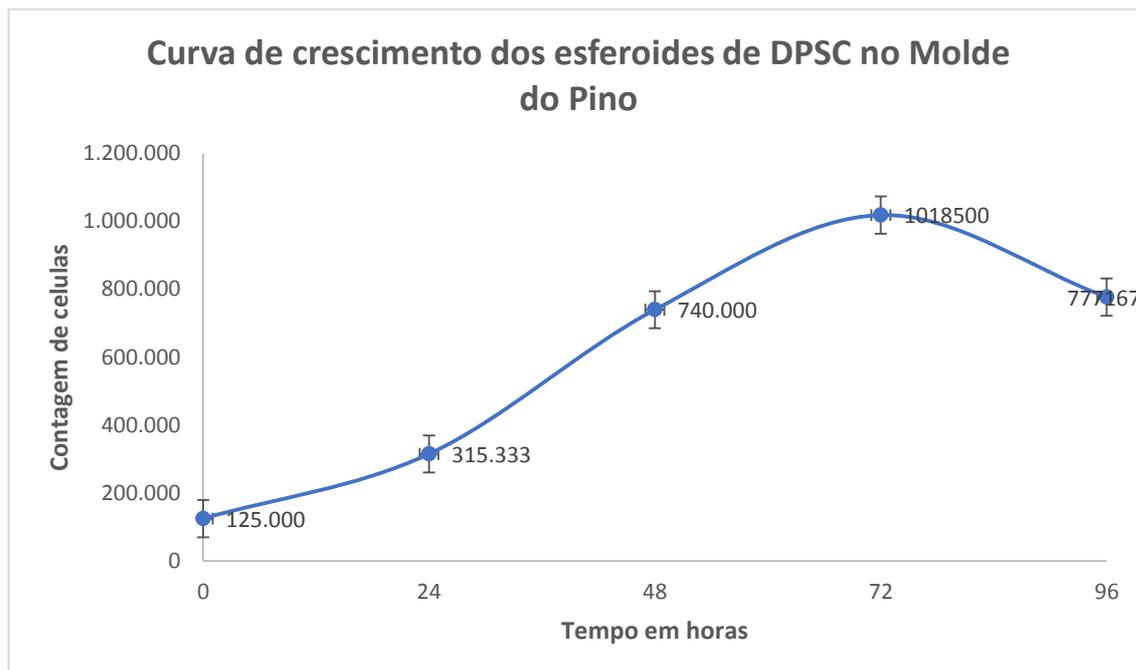


Figura 8. Curva de crescimento de esferoides de *shed cells* formados no molde com micro pinos (Tempo em horas, médias aritméticas de três determinações independentes e desvio padrão).

Para a curva de crescimento dos esferoides no molde do canal dentário, foram determinadas as contagens em tempos diferentes do molde com micro pinos, partindo de testes pilotos onde a formação de esferoides teve lugar em períodos mais curtos comparado com a formação de esferoides no molde com micro pinos. A quantidades de células pipetadas também foi determinada partindo do princípio de que a área do molde do canal é maior que a área dos moldes com micro pinos.

A formação de esferoides no molde do canal dentário apresenta a fase de crescimento exponencial que atinge o pico máximo em 24 horas e observa-se o início do declínio em 32 horas.

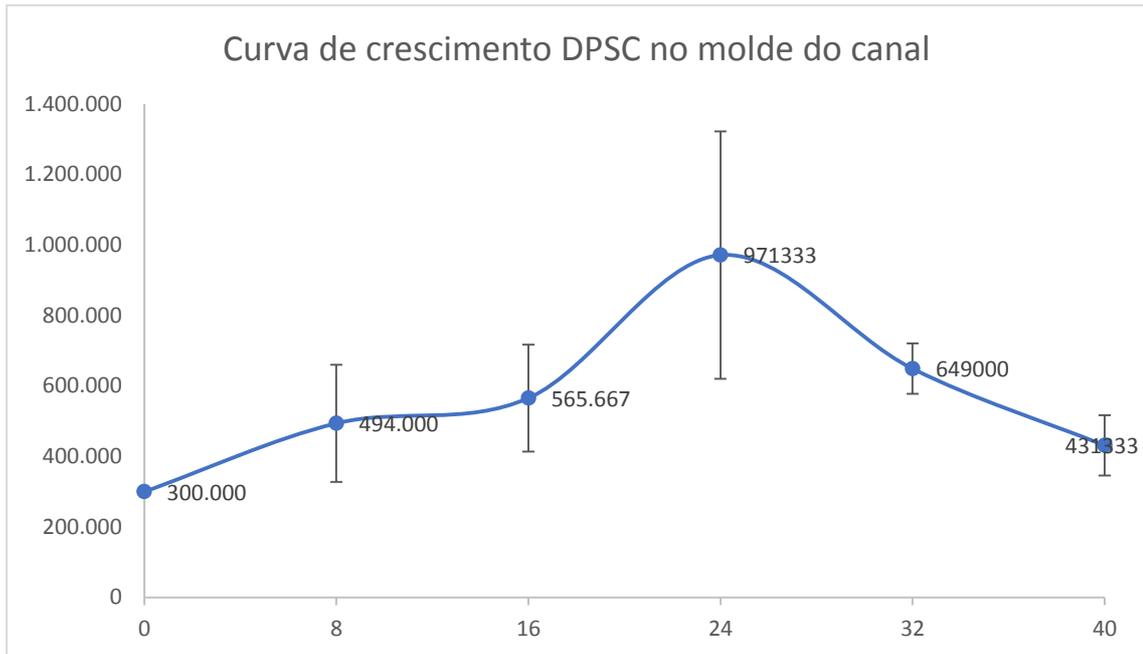


Figura 9. Curva de crescimento de esferoides da *shed cells* formados no molde do canal dentário (Tempo em horas, médias aritméticas de três determinações independentes e desvio padrão).

6.3 Formação de esferoides

Desde a semeadura das *shed cells* até 96 horas de cultura para os esferoides formados no molde com micro pinos e até 40 horas para os esferoides formados no molde do canal dentário, foi possível observar a formação dos esferoides a partir de 24 horas (Figura 10 e 11).

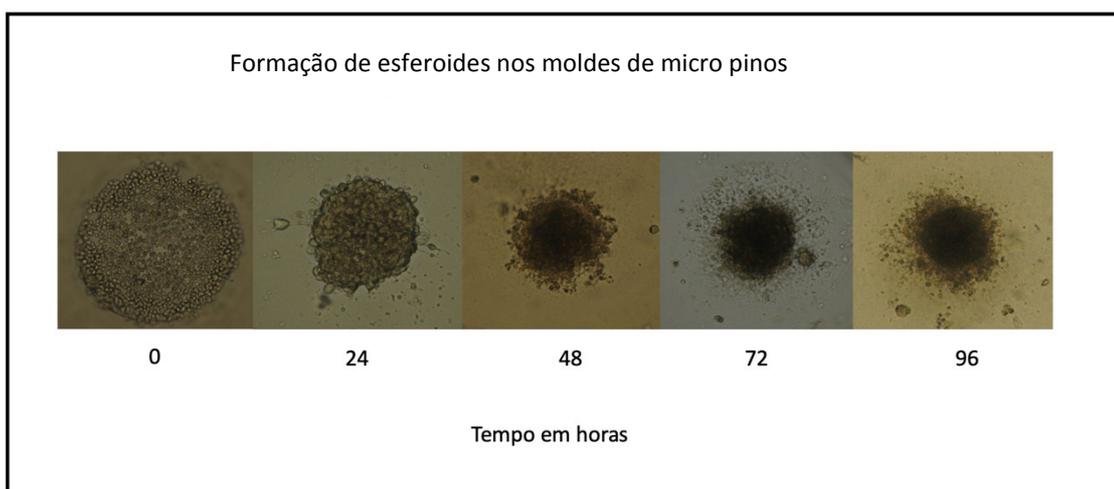


Figura 10. Fotomicrografias de culturas em 3D para formação dos esferoides de *shed cells* no molde de micro pinos de 600 µm. (Visualização por microscopia óptica, aumento de 10x).

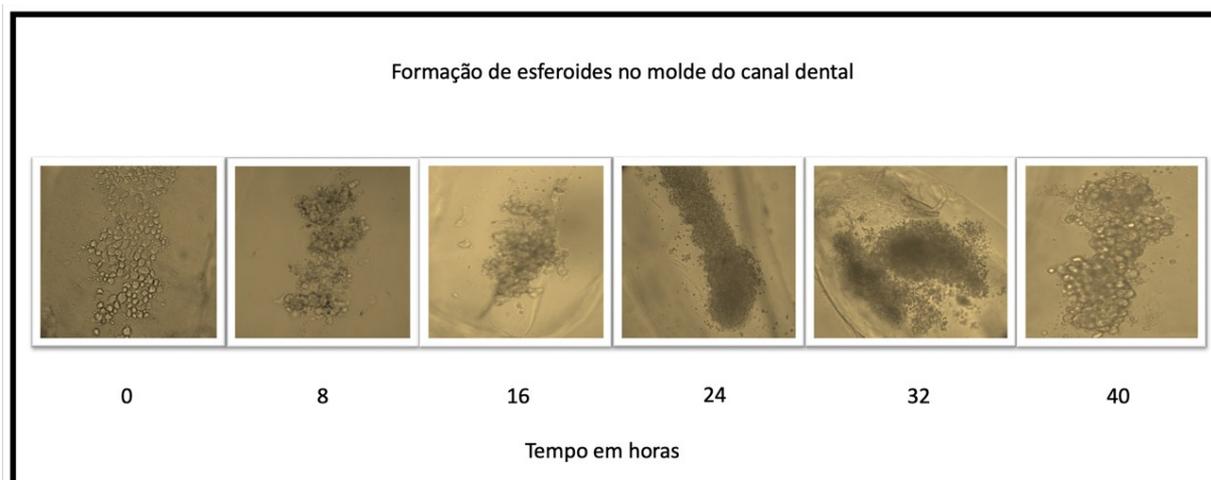


Figura 11. Fotomicrografias de culturas 3D para formação dos esferoides de *shed cells* no molde simulado do canal dental. (Visualização por microscopia óptica, aumento de 10x).

6.4 Análise histológica da estrutura dos esferoides

Esferoides formados no molde com micro pinos e no molde do canal (24 horas de formação) foram removidos dos moldes.

As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina. Os esferoides formados no molde com micro pinos apresentaram forma mais regular comparados aos esferoides formados no molde do canal dentário. Já os esferoides formados no molde do canal dentário apresentam formas variadas seguindo geralmente a forma do canal dentário, por tanto apresentam tamanho maior.

As imagens obtidas mostram que os espaços vazios no interior dos esferoides tendem a aumentar em consequência da morte celular. Neste trabalho pode ser observado que os esferoides formados apresentam diferenças morfológicas entre cada condição de cultivo 3D. O molde da cultura celular 3D envolvida é variável de acordo com o grau de compactação celular, podendo ser maior ou menor.

É possível também nesta análise, a observação das interações célula-célula, bem como prolongamentos celulares, e célula-matriz extracelular, pela presença de filamentos na superfície celular. Os filamentos presentes na superfície das células possuem características dos componentes da matriz extracelular.



Figura 12. Fotomicrografias dos esféroides desenvolvidos nos moldes de micro pinos e no molde do canal dentário (hematoxilina-eosina).

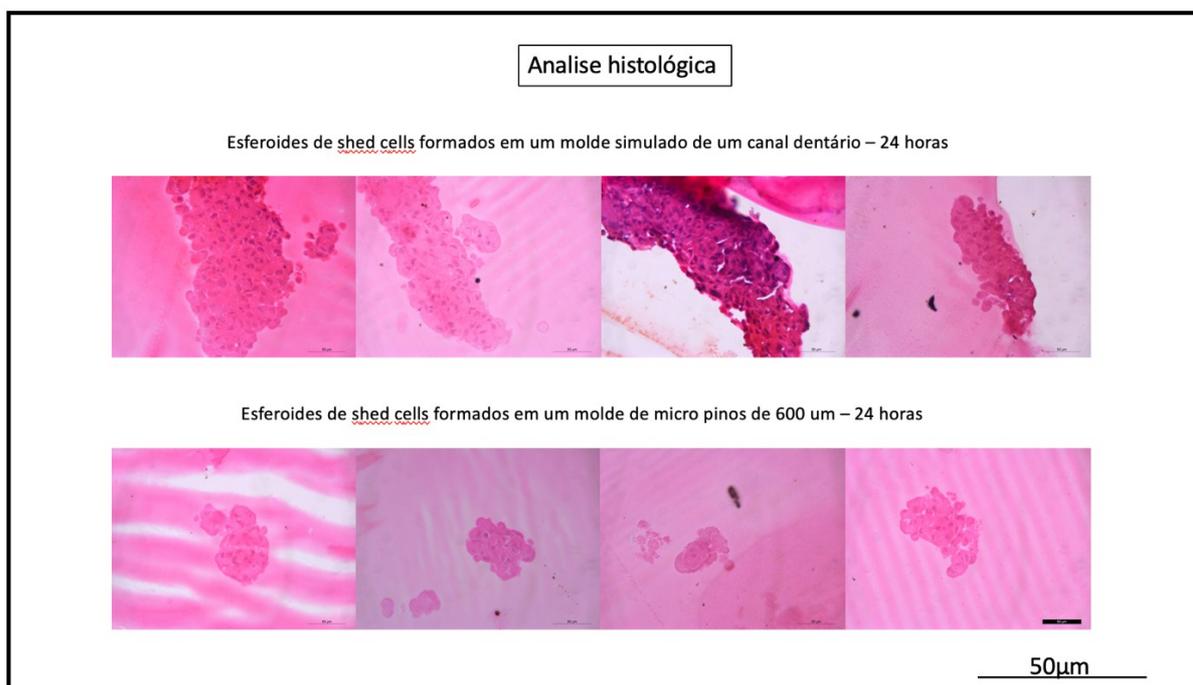


Figura 13. Fotomicrografias dos esféroides desenvolvidos nos moldes de micro pinos e no molde do canal dentário (hematoxilina-eosina).

6.5 Viabilidade dos esféroides

Os esféroides das duas culturas 3D foram retiradas de dois moldes no tempo de 24 horas e foram colocadas em lâminas histológicas para serem observadas no mesmo momento.

Notou-se grande diferença de tamanho entre os dois grupos de cultura 3D na e na quantidade de células mortas. Além disso, muitas destas células mortas desprenderam-se dos esferoides. Hipóxia e privação de nutrientes podem ter sido a causa do número de células mortas em esferoides formados no canal dentário, considerando o tamanho dos esferoides obtidos, em comparação com os esferoides formados no molde com micro pinos que apresentou menor quantidade de células mortas.

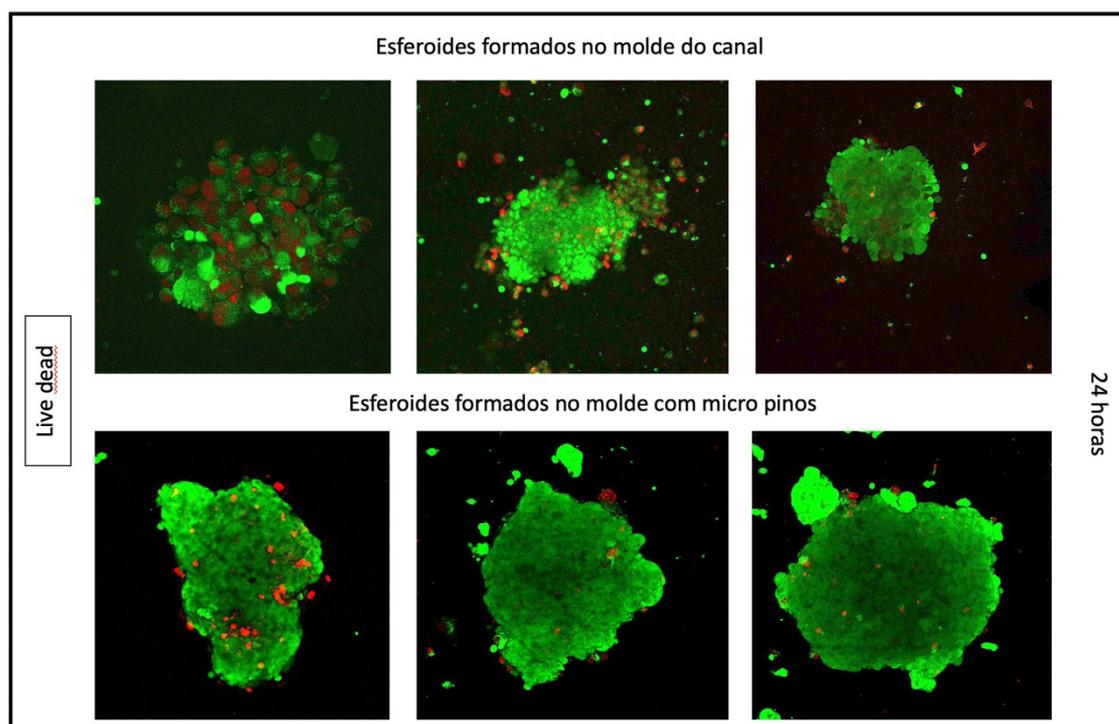


Figura 14. Imagens de esferoides formados no molde do canal dentário e no molde com micro pinos com 24 horas de formação, observadas no sistema LSM 780 no microscópio invertido AxioExaminer na objetiva40x oil NA 1.3x.

6.6 Viabilidade celular cultura 2D

O teste de MTT foi realizado para verificar a viabilidade celular na cultura 2D durante a diferenciação nos períodos 7, 10 e 14. Diferenças significativas entre os grupos foram observadas ($p < 0,05$). Foram pipetadas 10^4 células por poço em placas de 24 poços.

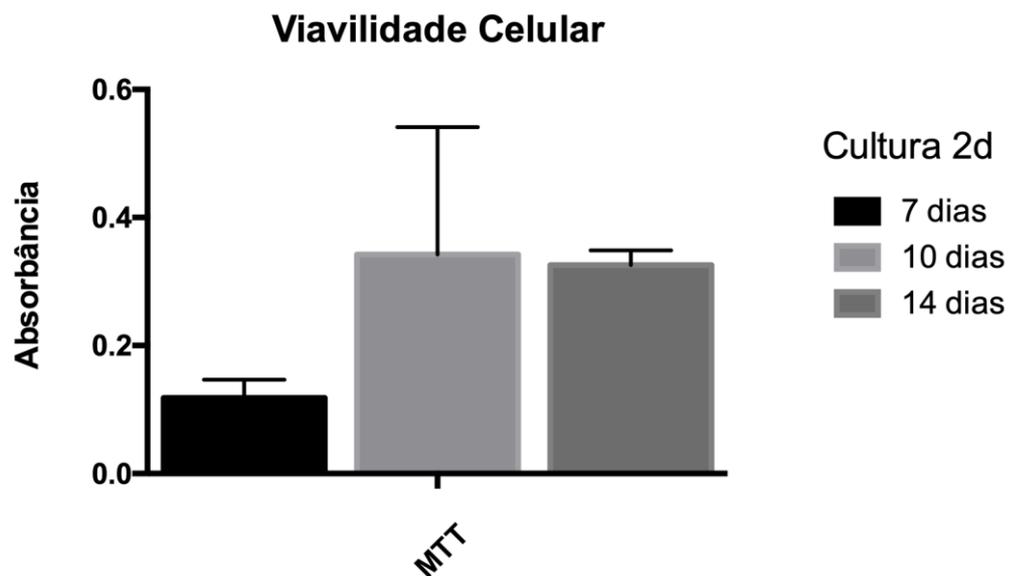
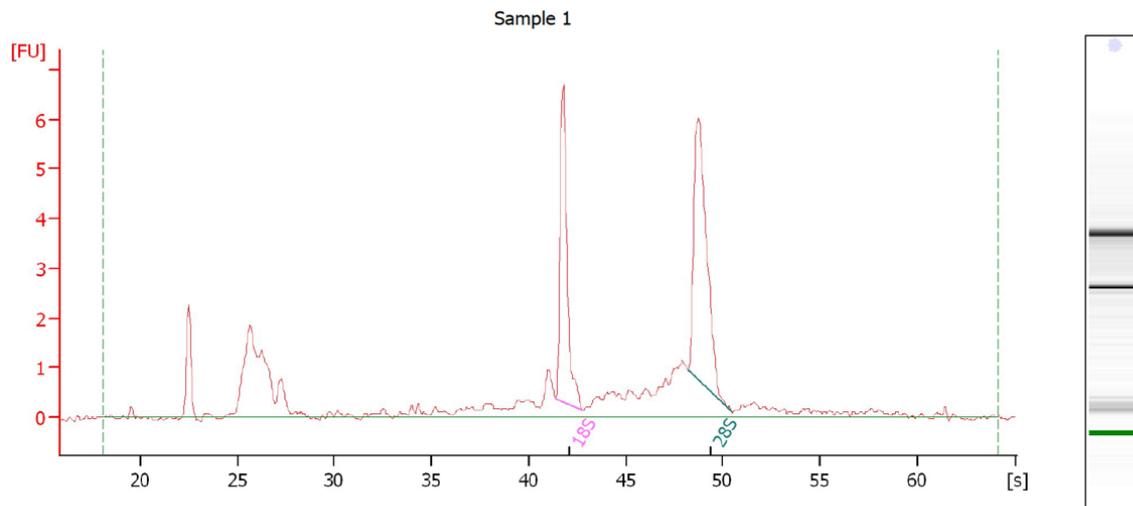


Figura 15. Ensaio de MTT em culturas 2D. Teste One-Way ANOVA $p < 0,05$.

6.7 Avaliação da integridade do RNA total

A qualidade de todas as amostras de RNA total estudadas, provenientes das culturas, foram avaliadas por eletroforese micro fluídica utilizando Bioanalyzer 2100 da Agilent. A integridade das amostras pode ser observada pela imagem do gel virtual e da densitometria, nas quais podem ser vistas as frações de RNAr (RNA ribossômico) 28S, 18S e RNAs 4-5S exibindo perfil de excelente integridade. Na figura em questão, representamos as amostras das culturas 2D, 3D no molde canal e 3D no molde com micro pinos.



Overall Results for sample 1 : Sample 1

RNA Area:	41.4	RNA Integrity Number (RIN):	8.4 (B.02.07)
RNA Concentration:	72 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.3	Result Flagging Label:	RIN: 8.40

Fragment table for sample 1 : Sample 1

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,731	1,994	6.1	14.8
28S	3,546	4,203	8.3	19.9

Figura 16. Eletroferograma obtido por eletroforese microfluidica de uma das amostras de RNA total. Foi possível observar as frações de RNAr 28S, 18S, 5S e RNAt 4S nas proporções que permitiram um excelente índice de integridade. Todas as amostras de RNA total estudadas apresentaram esse tipo de perfil.

6.8 Avaliação da expressão transcricional por RT-qPCR.

Os níveis transcricionais dos genes CD44, CD13, CD73, CD90, CD29 foram avaliados por RT-qPCR (Figura 21).

Observamos que o grupo do molde com micro pinos possui maior nível de expressão desses genes comparado aos demais grupos, incluindo a cultura 2D.

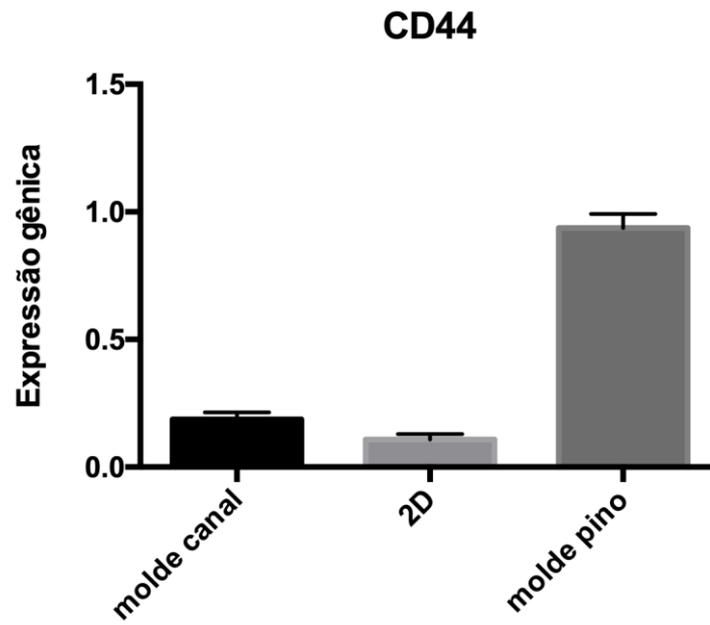


Figura 17. Análise da expressão transcricional do gene CD44 por RT-qPCR. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

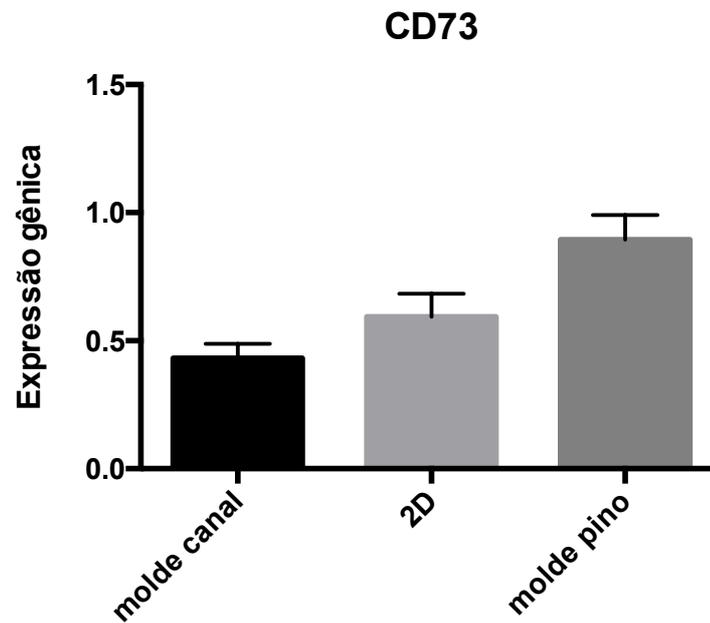


Figura 18. Análise da expressão transcricional do gene CD73 por RT-qPCR. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

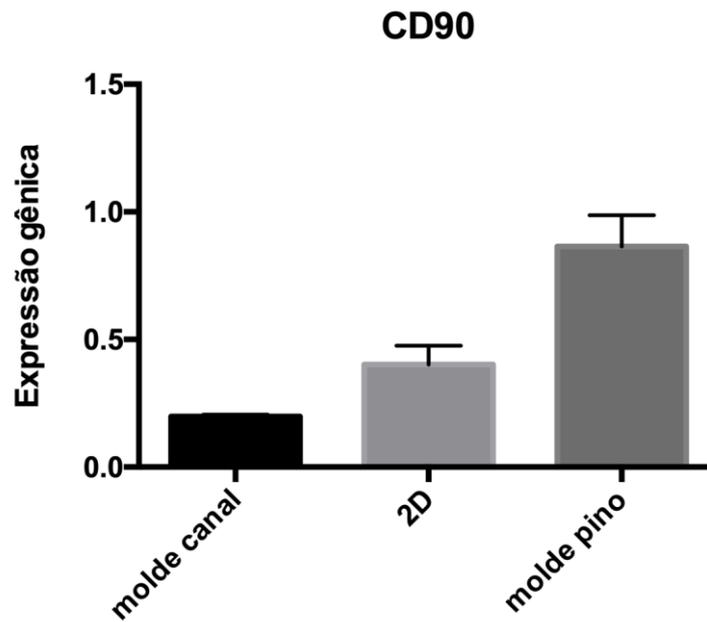


Figura 19. Análise da expressão transcricional do gene CD90 por RT-qPCR. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

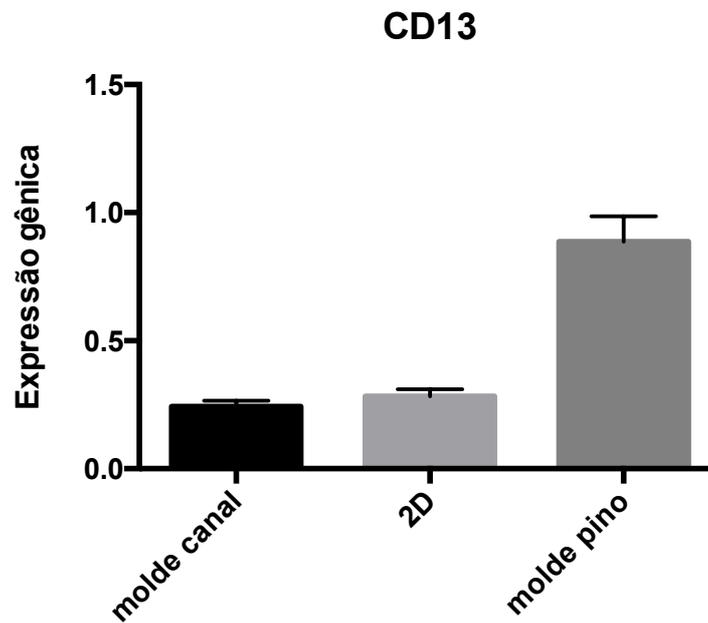


Figura 20. Análise da expressão transcricional do gene CD13 por RT-qPCR. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

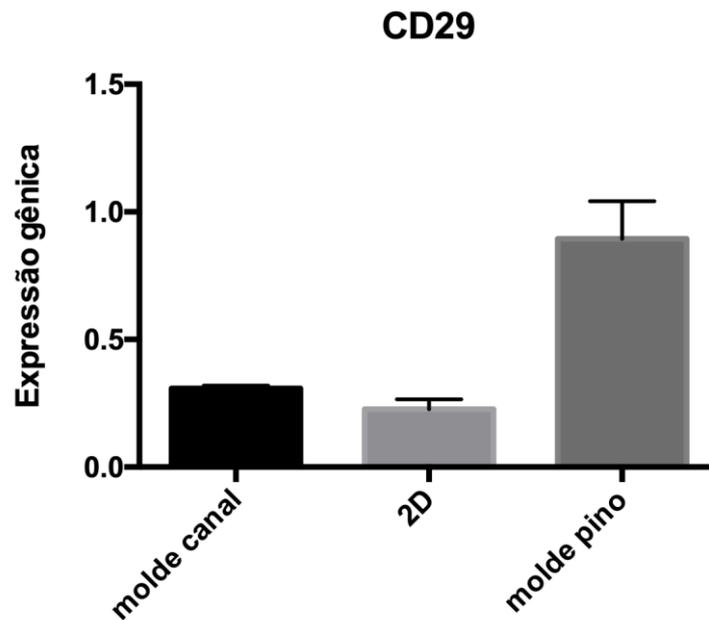


Figura 21. Análise da expressão transcricional do gene CD29 por RT-qPCR. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

Marcadores de células tronco mesenquimais

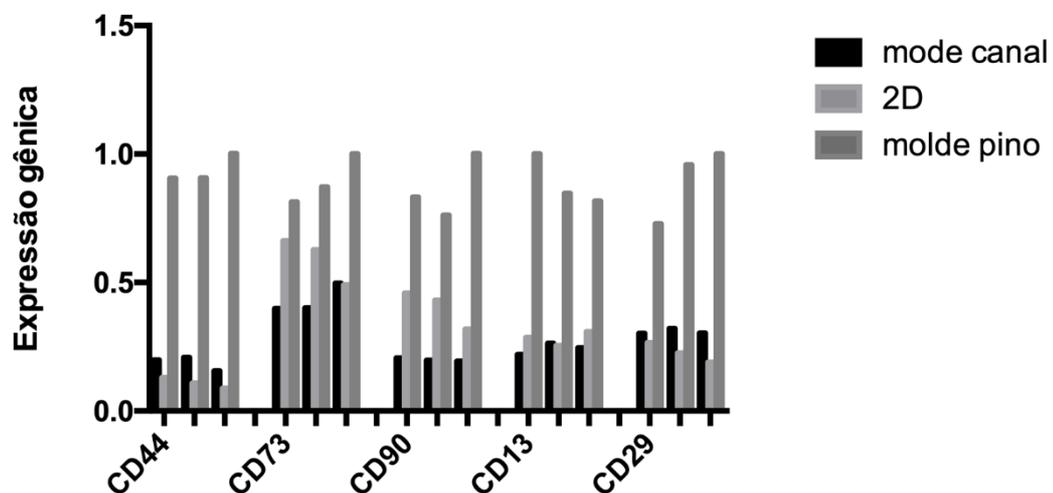


Figura 22. Análise da expressão transcricional por RT-qPCR dos grupos de estudo. Teste estatístico ANOVA $p < 0,05$.

6.9 Atividade da Fosfatase alcalina (ALP)

A detecção de ALP por meio da coloração *in situ* revelou que o ALP foi depositado continuamente durante o período experimental, com detecção significativamente maior após 7 e 14 dias de cultura, em todos os grupos

investigados. Enquanto foi observado o aumento de células semelhantes a odontoblastos após 7 dias de cultura em todos os grupos.

Os resultados revelaram diferenças significativas na atividade da fosfatase alcalina em diferentes grupos avaliados. O grupo da cultura 2D apresenta um nível de atividade de fosfatase alcalina mais elevado comparado com os grupos de esferoides formados no molde do canal dentário e no molde com micro pinos, seguido pelo grupo de esferoides formados no molde com micro pinos que apresenta um nível de atividade de fosfatase alcalina mais elevado, evidenciando uma diferença significativa com os esferoides formados no molde do canal dentário. Foi realizado o teste estatístico ANOVA com a diferença significativa $p < 0,05$ entre os grupos molde pino e molde canal molde canal e a cultura 2D.

Na análise qualitativa por imagens foram detectadas diferenças em aumento nos diferentes períodos dos testes nos grupos de estudo, indicativo positivo na diferenciação odontoblastica.

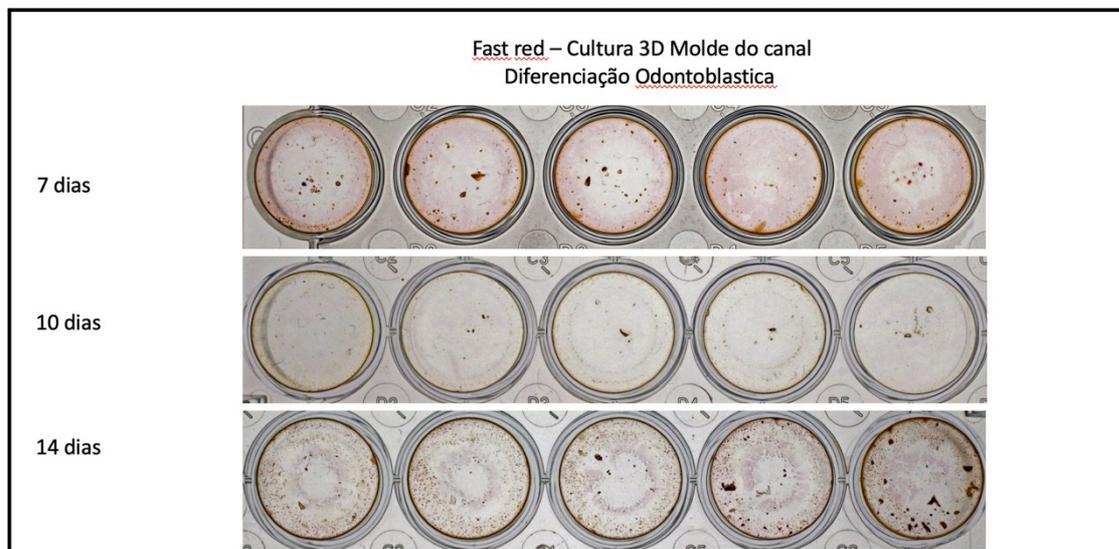


Figura 23. Análise qualitativa da atividade da fosfatase alcalina no grupo de esferoides formados no molde do canal dentário nos períodos determinados.

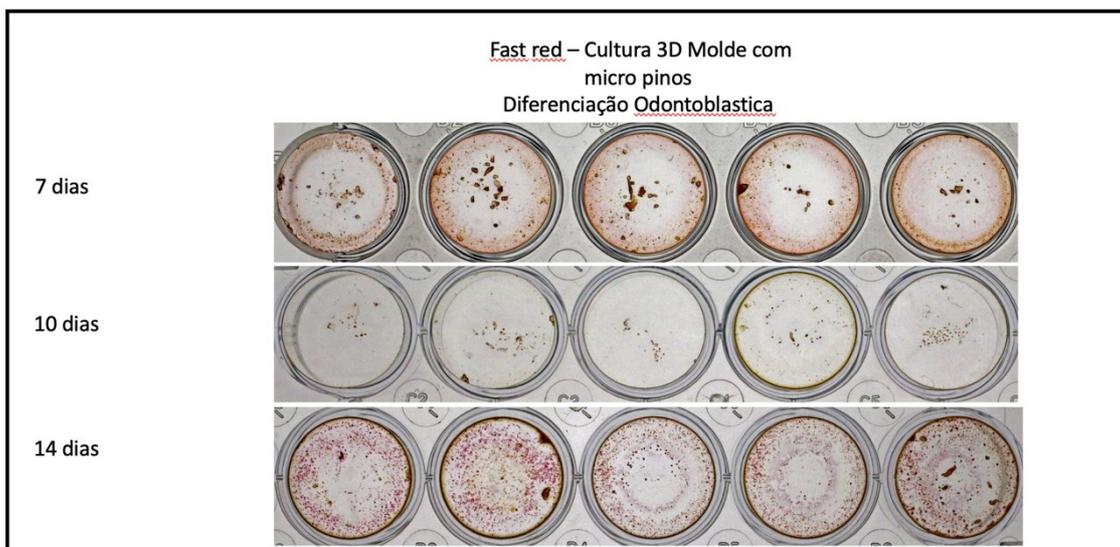


Figura 24. Análise qualitativa da atividade da fosfatase alcalina no grupo de esferoides formados no molde com micro pinos nos períodos determinados.

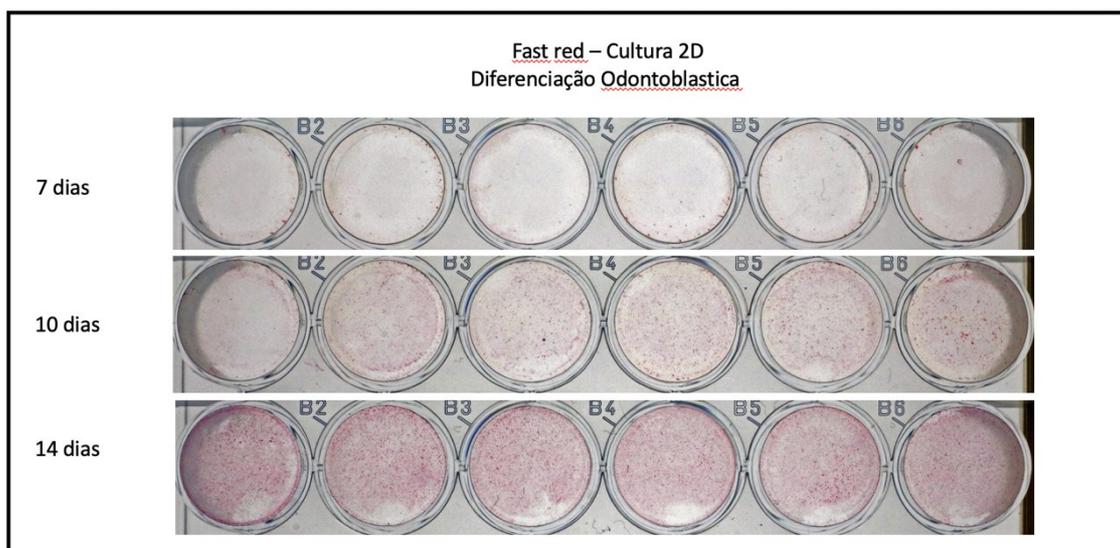


Figura 25. Análise qualitativa da atividade da fosfatase alcalina no grupo da cultura 2D em monocamadas nos períodos determinados.

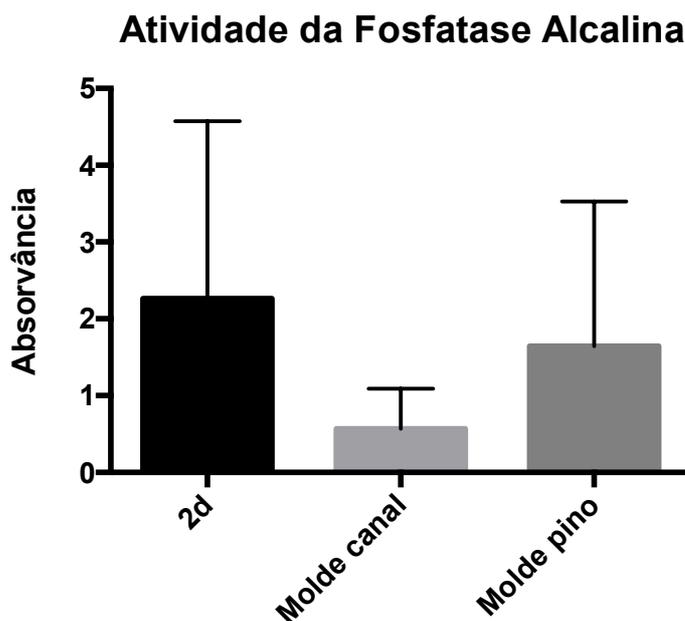


Figura 26. Medida da atividade de fosfatase alcalina nas culturas de 2D, esferoides formados no molde do canal dentário e no molde com micro pinos. Teste estatístico One-way ANOVA ($p < 0,05$).

6.10 Análise da formação de nódulos de mineralização

Para a avaliação da formação de nódulos mineralizados, as células foram cultivadas em 2D e tridimensionalmente em placas de 12 wells. Ao final dos 7, 10 e 14 dias, os esferoides foram removidos, e o meio foi removido dos poços da cultura 2D. Foram lavados com solução tampão (PBS-Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA) e preenchidos com solução fixadora de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, os poços foram desidratados em uma série de soluções alcoólicas crescente e corados com Alizarin red S a 2% (Sigma-Aldrich, USA), pH=4,2, por 10 minutos, corando em vermelho os nódulos e mineralização, ricos em cálcio.

A análise das imagens foi feita por método qualitativo colorimétrico. Foi possível observar aumento nos nódulos de mineralização nos diferentes períodos em todos os grupos de estudo, indicando a possível diferenciação das células 2D, esferoides formados no molde do canal dentário e no molde com micro pinos.

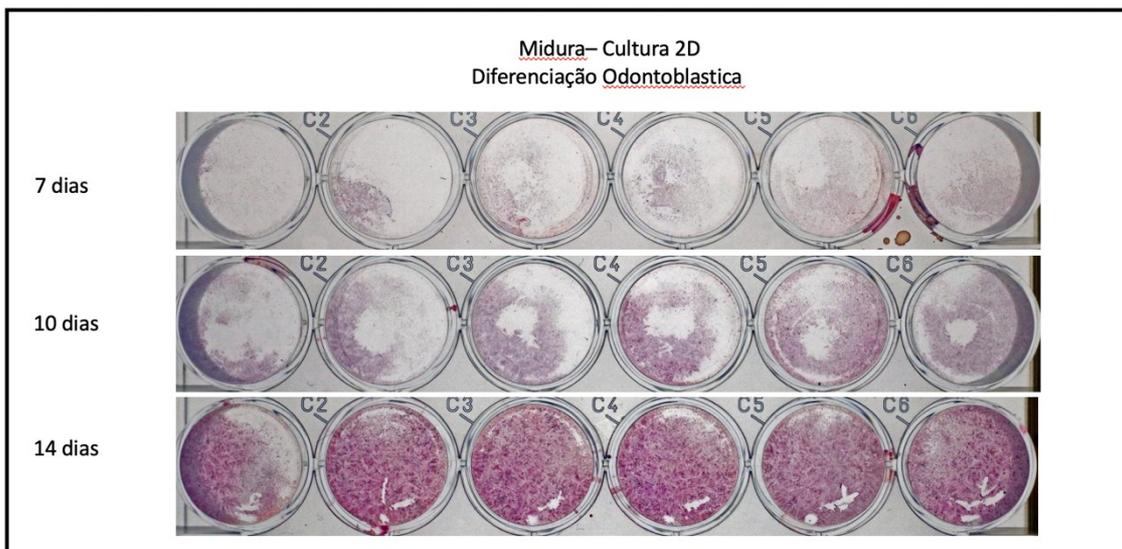


Figura 27. Análise qualitativa da formação de nódulos de mineralização no grupo da cultura 2D nos períodos determinados.

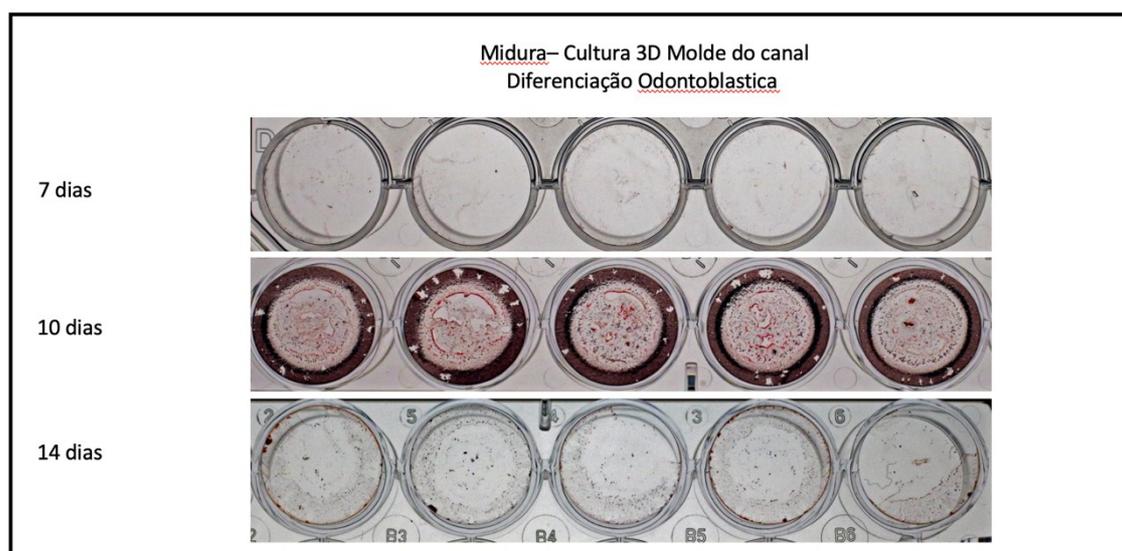


Figura 28. Análise qualitativa da formação de nódulos de mineralização no grupo da cultura de esferoides formados no molde do canal dentário nos períodos determinados.

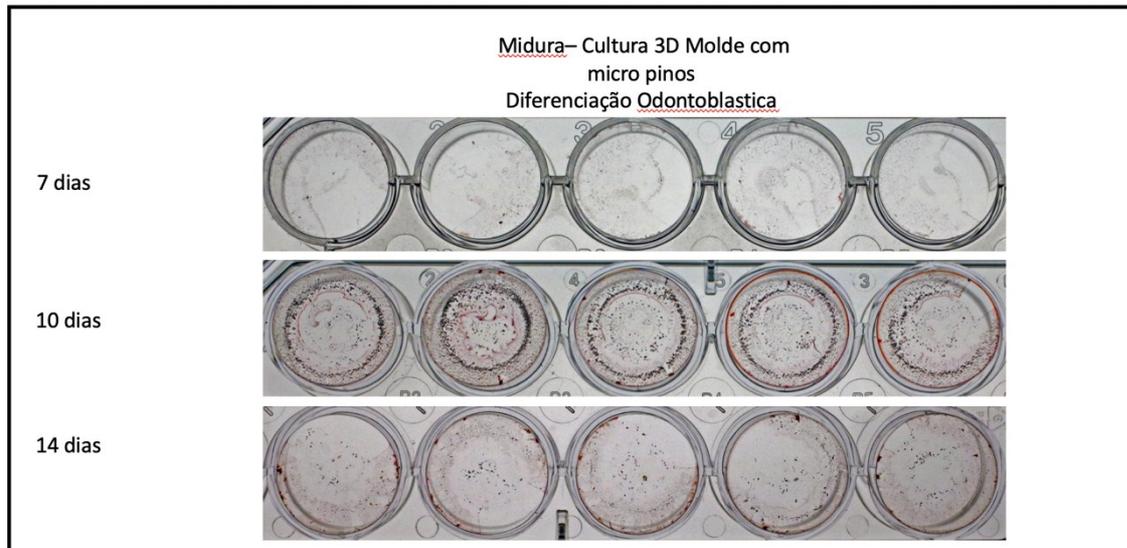


Figura 29. Análise qualitativa da formação de nódulos de mineralização no grupo de esferoides formados no molde com micro pinos nos períodos determinados.

6.11 Análises de imunolocalização

Observamos aumento na localização dos antígenos específicos usando anticorpos que comprovem a diferenciação das *shed cells* em odontoblastos. Os anticorpos utilizados foram Col1a1, DMP1, DSPP. Foi realizada a imunolocalização nos grupos na cultura 2D, esferoides formados no molde do canal dentário e no molde com micro pinos induzidas por 7, 10 e 14 dias com meio de diferenciação osteoblástica.

Na figura 30, a qual mostra cultura de células 2D, observamos maior expressão de Col1a1, DMP1, DSPP, corroborando com o fenótipo da diferenciação odontoblástica. Não foi possível localizar esferoides nas imagens nos grupos molde canal dentário e molde com micro pinos.

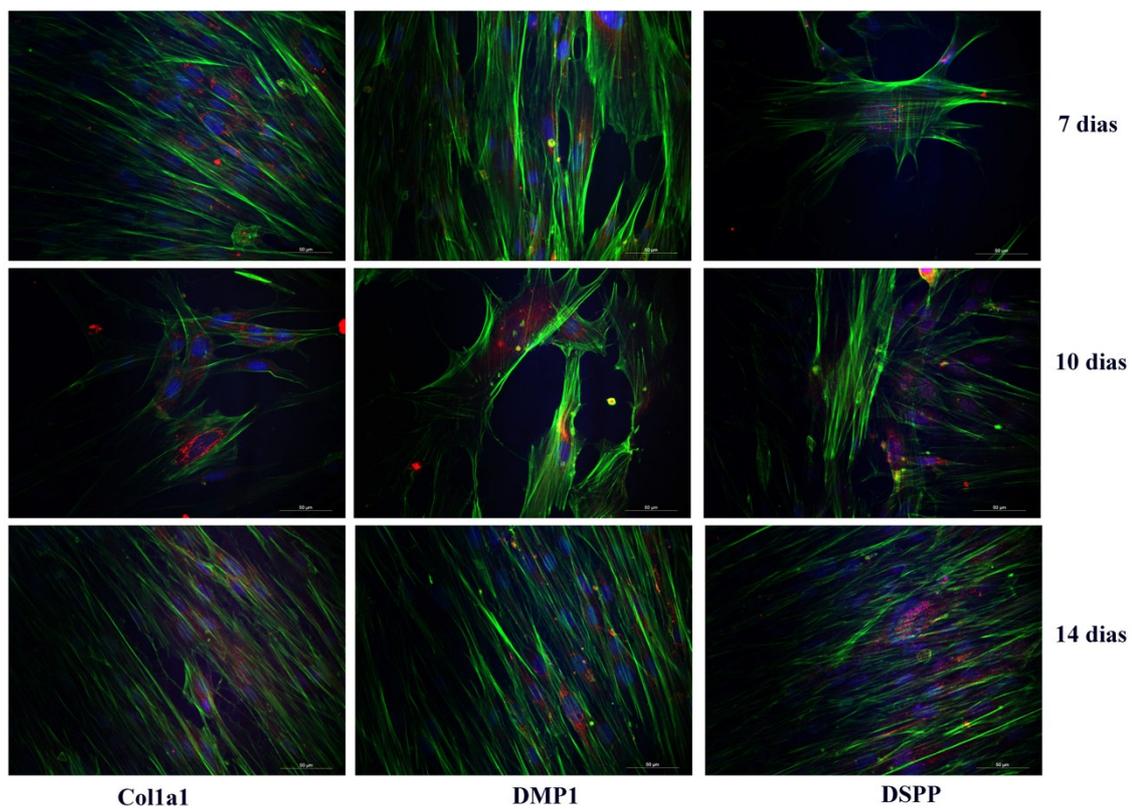


Figura 30. Imunolocalização dos marcadores Col1a1, DMP1, DSPP indicativos de diferenciação odontoblástica no grupo de cultura 2D.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A polpa dentária adulta, assemelha-se ao tecido conjuntivo embrionário e constitui uma fonte rica em células-tronco (KITANO et al., 2017). Todos os componentes que formam o tecido pulpar são essenciais para a viabilidade do tecido (WIDBILLER et al., 2019).

A polpa dentária é considerada por ser rica em células progenitoras. Entretanto, essas células ainda não estão totalmente caracterizadas. Estudos mais aprofundados sobre a biologia das células tronco e seu envolvimento com outras linhagens oferecerão grandes avanços no campo da medicina e odontologia regenerativa. (DUNCAN; COOPER; SMITH, 2019).

No campo da odontologia, pesquisas também estão sendo feitas na tentativa de substituir o tecido danificado por tecido obtido em laboratório a partir de células-tronco.

Contudo, as culturas em monocamada 2D, utilizadas rotineiramente nos laboratórios de pesquisa, possuem algumas desvantagens diante do que acontece no tecido vivo. Para melhor simulação do microambiente, a cultura tridimensional (3D) é a mais indicada atualmente (DONG et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de esferoides de *shed cells* desenvolvidos em culturas 3D para dar início ao aperfeiçoamento de um sistema-modelo diferente do que vem sendo utilizado com o intuito de tentar reproduzir o microambiente do canal dental in vivo. Para isso, utilizamos o modelo com micro pinos e o modelo do canal dentário. As *shed cells* foram escolhidas, pois são células com potencial de diferenciação significativo para a utilização como alternativa de tratamento de injúrias da polpa dental.

Quanto à caracterização das *shed cells*, constatamos a expressão de marcadores de superfície característicos de origem mesenquimal, tais como CD90, CD73, CD29, CD13, e CD44 confirmando sua identidade de células tronco. O que corrobora os achados de (FABRE et al., 2019)

O modelo escolhido para a realização deste trabalho foi o esferoide multicelular 3D. Este poderá representar e mimetizar morfológica e funcionalmente o microambiente in vivo (LEE et al., 2017).

Para execução desse modelo, utilizou-se a estratégia de confeccionar moldes de agarose a partir de um molde negativo, o qual impede a aderência das células.

A agarose foi considerada como uma superfície semi-sólida e não-aderente adequada para o cultivo de esferoides (YU et al., 2019).

No modelo negativo do canal dentário a primeira tentativa, foi utilizar moldes de agarose com uma forma cilíndrica do molde mantendo-o na posição vertical. Entretanto, essa disposição não se mostrou adequada para o desenvolvimento dos esferoides, pois os mesmos apesar de se desenvolverem, se agregavam todos na parte inferior do molde.

Assim, optou-se em utilizar os moldes na posição horizontal com o intuito de proporcionar melhor distribuição e interação celular para a formação dos esferoides. Esta condição apresentou resultados satisfatórios tanto para a formação dos esferoides como para a manipulação dos mesmos.

Para o desenvolvimento dos modelos, planejou-se elaborar duas condições de cultivo 3D de *shed cells*: esferoides formados no molde com micro pinos e esferoides formados no molde do canal dentário, a fim de avaliar quanto aos aspectos estruturais e funcionais, entre elas em função das diferenças celulares.

Os esferoides formados no molde com micro pinos apresentaram uma forma regular, menos morte celular e expressão genica de marcadores de células tronco mesenquimais com expressões mais acentuadas.

Já os esferoides formados no molde do canal dentário apresentaram formas variadas seguindo geralmente a forma do canal dentário e com maior diâmetro.

O tamanho dos esferoides tem influência direta na viabilidade celular, sendo caracterizado por duas fases. A fase inicial de crescimento celular é determinada pela agregação e proliferação celular. A fase estacionária revela a não proliferação celular seguido da formação de um centro necrótico, causado pelo tamanho do esferoide (> 200 – 300 μm), o qual dificulta a chegada de nutrientes e oxigênio ao centro do esferoide, neste contexto a viabilidade celular é mais afetada no centro do esferoide. A necrose neste caso acontece pelas alterações da tensão de oxigênio, glicose, lactato e concentração de ATP (KHANNA-JAIN, 2012).

Neste trabalho, notou-se grande diferença de tamanho entre os dois grupos de cultura 3D, na quantidades de células mortas como avaliado pelas reações que

evidenciam ao microscópio de fluorescência, as células vivas e as mortas (kit live-dead) além de diferenças significativas na expressão gênica de marcadores de células tronco mesenquimais. Além disso, muitas células morreram e desprenderam-se dos esferoides. Hipóxia e privação de nutrientes podem ter sido a causa do número de células mortas em esferoides formados no canal dentário, considerando o tamanho dos esferoides obtidos. A mesma porcentagem média de viabilidade celular, de 75 %, foi encontrada no estudo de (AMANN et al., 2014) utilizando um modelo parecido de cultura 3D, porém com linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas associadas a fibroblastos. Em uma pesquisa utilizando células tumorais de mama na formação dos esferoides foi examinado que com o decorrer dos dias houve aumento de proliferação celular (TALUKDAR; OLEFSKY; OSBORN, 2011).

A concentração celular também foi outro fator levado em consideração para a formação de esferoides nos diferentes grupos, partindo do princípio de que os moldes possuem tamanhos diferentes. As quantidades foram determinadas mediante a testes pilotos de semeando diferentes números de células. Dependendo das linhagens celulares, a baixa densidade celular pode impedir a formação de esferoides na cultura 3D, bem como interferir na comunicação célula - célula (VOISSIERE et al., 2017). Determinou-se que um inóculo de $1,5 \times 10^5$ células para o molde micro pinos e 3×10^5 células para o molde do canal dentário era o mais adequado.

A análise da morfologia celular interna por histologia H&E confirmam grandes espaços vazios no interior dos esferoides durante o tempo em que a maioria das células está concentrada na periferia. Isso sugere que a falta de nutrientes como glicose e lactato no interior dos esferoides podem causar morte celular. (LARRAÑAGA et al., 2015).

No trabalho de (AMANN et al., 2014) a histologia com H&E mostra que os espaços vazios no interior dos esferoides tendem a aumentar em consequência da morte celular.

Neste trabalho pudemos observar que os esferoides formados apresentam diferenças morfológicas entre cada condição de cultivo 3D, dependendo do molde da cultura celular 3D envolvida, o grau de compactação celular é maior ou menor.

É possível também nesta análise, a observação das interações célula-célula, bem como prolongamentos celulares, e célula-matriz extracelular, pela presença de

filamentos na superfície celular. Os filamentos presentes na superfície das células possuem características de componentes da matriz extracelular.

Neste sentido, pode-se começar a entender as diferenças entre os parâmetros avaliados neste trabalho, comparando como moldes diferentes podem interferir na formação dos esferoides, e diante disso como esses esferoides podem ser utilizados. Ainda que alguns pontos devam ser estudados para a construção de evidências mais conclusivas sobre as inter-relações que acontecem entre os componentes dos modelos de cultura, o presente trabalho apresentou evidências de que o modelo de esferoides 3D foi eficaz em formar esferoides em condições específicas com as linhagens celulares escolhidas.

Um segundo método para avaliar a viabilidade celular foi o teste do MTT.

Como parâmetros de diferenciação celular, medimos a atividade da fosfatase alcalina e realizamos imunofluorescência dos marcadores DSP, DMP1, Col1a1 e análise da formação de nódulos de mineralização.

Quanto a imunofluorescência foi possível avaliar, por enquanto, só células que foram cultivadas em monocamada 2D. Para os esferoides 3D existem ainda dificuldades na adequação dos protocolos de imunofluorescência.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que atua na mineralização da matriz orgânica e, portanto, sua atividade está relacionada com a alta atividade celular mineralizante (COELHO et al., 2019). Os resultados das análises de atividade da ALP, da detecção de depósitos de cálcio, e da imunolocalização da proteínas, confirmam que células em cultura 3D podem ser diferenciadas em diferentes moldes. Tanto os esferoides cultivados no molde com micro pinos quanto os esferoides cultivados no molde do canal dentário apresentaram aumento qualitativo e quantitativo das marcações, apresentando diferença significativa a favor do molde com micro pinos.

Neste trabalho buscamos contribuir com o entendimento do comportamento das células tronco durante a formação de esferoides, tendo como foco diferentes moldes, um deles simulando um canal dental humano. Os resultados apresentados contribuem para melhor entendimento do processo de formação dos esferoides e da diferenciação odontoblástica com culturas em 3D.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo revelam o potencial do uso de esferoides de *shed cells*, na engenharia tecidual dentária.

A diferenciação odontoblástica foi possível em todos os grupos de cultura, porém ainda representam grande desafio e exige recapitulação das técnicas atuais para adequá-las as culturas em 3D. Além disso, existe diferença significativa entre os tipos de cultura 3D, esferoides maiores formados no molde do canal dental possuem desvantagens frente a esferoides menores.

A formação de esferoides em moldes com micro pinos e o uso de *scaffolds* deve ser considerado para o uso em conjunto no molde do canal dental.

A formação de esferoides se assemelha a que acontece *in vivo* e exhibe a possibilidade para a base de uma nova estratégia biológica de preenchimento de canais radiculares no futuro. Além disso, este método poderia ser combinado com outras estratégias atuais de revascularização e revitalização de canais radiculares tratados e alternativas para os tratamentos endodônticos atuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, Anton et al. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. **Journal Of Breath Research**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.034001-035001, 19 jun. 2014. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1752-7155/8/3/034001>.

ATHANASIADOU, E. et al. Biological interactions of a calcium silicate based cement (Biodentine™) with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. **Dental Materials**, v. 34, n. 12, p. 1797–1813, 2018.

BAKOPOULOU, A.; ABOUT, I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

BAKHTIAR, H. et al. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine - pulp complex : a systematic review. **Progress in Biomaterials**, n. 0123456789, 2018.

COELHO, Maria Carolina et al. Effect of grape seed extract (GSE) on functional activity and mineralization of OD-21 and MDPC-23 cell lines. **Brazilian Oral Research**, [s.l.], v. 33, p.1-34, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0013>.

DONG, Qing et al. Dental Pulp Stem Cells: Isolation, Characterization, Expansion, and Odontoblast Differentiation for Tissue Engineering. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.91-101, 2019. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_9.

DUNCAN, H. F.; COOPER, P. R.; SMITH, A. J.. Dissecting dentine–pulp injury and wound healing responses: consequences for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.261-266, 6 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13064>.

DUNCAN HF; KOBAYASHI Y; SHIMIZU E. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. **Curr Oral Health Rep**, v.5, n.4, p.276–285, 2018. doi:10.1007/s40496-018-0194-y.

DISSANAYAKA WL., et al. Scaffold-free Prevascularized Microtissue Spheroids for Pulp Regeneration. **J Dent Res**. v.93, n.12, p.1296-1303, 2014. DOI: 10.1177/0022034514550040.

DONG Q., et al. Dental Pulp Stem Cells: Isolation, Characterization, Expansion, and Odontoblast Differentiation for Tissue Engineering. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1922, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_9.

DERNOWSEK JÁ., et al. Posttranscriptional Interaction Between miR-450a-5p and miR-28-5p and STAT1 mRNA Triggers Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v118, p.4045–4062, 2017. DOI 10.1002/jcb.26060

FABRE, Hugo et al. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2019, p.1-19, 20 jun. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/2186728>.

GILBERT, S F. **Biologia do Desenvolvimento**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 5 ed., 2003; p. 373.

HOLLANDS, P.; ABOYEJI, D.; ORCHARTON, M. Dental pulp stem cells in regenerative medicine. **British Dental Journal**, v. 224, n. 9, p. 747–750, 2018.
ITOH, Y. et al. Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. **Journal of Dental Research**, 2018.

RAO, Nanquan et al. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorate Diabetic Nephropathy In Vivo and In Vitro by Inhibiting Advanced Glycation End Product-Activated Epithelial-Mesenchymal Transition. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2019, p.1-15, 1 dez. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/2751475>.

TALUKDAR, Saswata; OLEFSKY, Jerrold M; OSBORN, Olivia. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 32, n. 9, p.543-550, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2011.04.004>.

KHANNA-JAIN, Rashi. Growth and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Maintained in Fetal Bovine Serum, Human Serum and Serum-free/Xeno-free Culture Media. **Journal Of Stem Cell Research & Therapy**, [s.l.], v. 02, n. 04, p.01-11, 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000126>.

KITANO, K. et al. Bioengineering of functional human induced pluripotent stem cell-derived intestinal grafts. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 765, 2017.

KENNETH M.H; STEPHEN C. (2011) Estrutura e funções do complexo dentina-polpa. *In: Cohen Vias da Polpa*. (Lous H. Berman Editor) Elsevier, Espanha.

KENNETH M.H; STEPHEN C. (2011) Estrutura e funções do complexo dentina-polpa. *In: Cohen Vias da Polpa*. (Lous H. Berman Editor) Elsevier, Espanha.

KUMAR V, ABBAS A, FAUSTO N.; MITCHELL, R. N. Robbins. **Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Robbins. **Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LEE, S. H. et al. Three-dimensional Sphere-forming Cells Are Unique Multipotent Cell Population in Dental Pulp Cells. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1302–1308, 2017.

LIANG, Z. et al. Minced Pulp as Source of Pulpal Mesenchymal Stem Cells with Odontogenic Differentiation Capacity. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 1, p. 80–86, 2018.

LARRAÑAGA, Aitor et al. Effect of bioactive glass particles on osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on lactide and caprolactone based scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 103, n. 12, p.3815-3824, 1 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35525>.

LEE, Sunq Hee et al. Three-dimensional Sphere-forming Cells Are Unique Multipotent Cell Population in Dental Pulp Cells. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 43, n. 8, p.1302-1308, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.016>.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 9–10, p. 1172–1184, 2008.

SMITH, A. J.; COOPER, P. R. Regenerative Endodontics: Burning Questions. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 9, p. S1–S6, 2017.

SMITH AJ; COOPER PR, Regenerative Endodontics: Burning Questions. **American Association of Endodontists**, v.43, n.9, p. S1-S6, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.002>.

SCHMALZ G; WIDBILLER M; GALLER KM, Signaling Molecules and Pulp Regeneration. **American Association of Endodontists**, v.43, n.9, p. s7–s11, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.003>.

ÜREYEN KAYA, B. et al. Mechanical reduction in intracanal *Enterococcus faecalis* when using three different single-file systems: an *ex vivo* comparative study. **International Endodontic Journal**, p. 1–9, 2018.

VALLEJO-DIEZ et al. Generation of two induced pluripotent stem cells lines from a Mucopolysaccharydosis IIIB (MPSIIIB) patient. **Stem Cell Res**, v.1 n.33 p. 180-184, 2018. Doi: 10.1016/j.scr.2018.10.019.

VOISSIERE, Aurélien et al. Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 7, p.181-340, 13 jul. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0181340>.

WIDBILLER, M. et al. Isolation of primary odontoblasts: Expectations and limitations. **Australian Endodontic Journal**, p. 1–10, 2019.

YOKOI, M. et al. Effect of attenuation of fibroblast growth factor receptor 2b signaling on odontoblast differentiation and dentin formation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 55, n. 3, p. 211–219, 2019.

YU, Haiyue et al. Effects of 3-dimensional Bioprinting Alginate/Gelatin Hydrogel Scaffold Extract on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.706-715, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2019.03.004>.

ZAGO M.A. (2006) Células-Tronco Mesenquimais. *In: Células-Tronco A Nova Fronteira da Medicina*. (Zago MA e Covas DT Editores) Atheneu, São Paulo.