

TAÍS CARVALHO DE OLIVEIRA

**Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células da
medula óssea de camundongos**

São Paulo

2021

TAÍS CARVALHO DE OLIVEIRA

**Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células da
medula óssea de camundongos**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Biomateriais e Biologia oral

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez

São Paulo

2021

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

Oliveira, Taís Carvalho de.

Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células da medula óssea de camundongos / Taís Carvalho de Oliveira; orientador Victor Elias Arana Chavez. -- São Paulo, 2021.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Biomateriais e Biologia oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. MDPC-23. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Calcitriol. 4. Medula óssea. 5. Clastogênese. I. Arana Chavez, Victor Elias. II. Título.

Oliveira TC. Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células da medula óssea de camundongos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 01 / 06 /2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luiz Lage Marques

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Karina Fitipaldi Bombonato Prado

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP – FORP-USP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a) Inmaculada Casado Gómez

Instituição: Universidad Complutense de Madrid

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho às duas pessoas da minha família que perdi para este mundo, mas ganhei para a eternidade (graças a Deus). Seguiremos aqui com muitas saudades, com a certeza que nos veremos novamente. Aos meus tios

José Francisco de Oliveira e Francisco Dinoar de Araujo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, pela minha vida e por ter me sustentado até aqui, por ter colocado pessoas especiais em meu caminho e por me abençoar com uma família maravilhosa. Agradeço por me dar a oportunidade de fazer este curso e iluminar a minha mente para este estudo. A Ti eu rendo graça por tudo que és.

Aos meus familiares que me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos, por todas as palavras de carinho e de ânimo, aos meus pais pelas orações, ensinamentos e pelas palavras de sabedoria que me fizeram chegar até aqui. Muito obrigada!

Em especial quero agradecer ao meu esposo Fernando por sempre me encorajar nas vezes em que pensei em desistir, por entender que muitas vezes abri mão de desfrutar alguns momentos juntos e por experimentar um amor verdadeiro: minha filha Esther.

À tia Magali Araujo por nunca negar esforços em me ajudar, em todas as etapas acadêmicas da minha vida, por ler e corrigir este trabalho, bem antes de ficar pronto, e muitos outros também.

Não poderia deixar de agradecer ao meu professor Victor Arana-Chavez, por sua dedicação e ajuda (até hoje), mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço pelas oportunidades hoje ainda oferecidas, por todo o conhecimento compartilhado durante a minha iniciação científica que me fizeram inclinar para este trabalho de pós graduação.

Agradeço à minha querida amiga Vivian Bradaschia por me ouvir sempre, pela consultoria nos ensaios de laboratório, mesmo morando longe, por ler e fazer apontamentos importantes a este trabalho.

Aos técnicos: Elis Chinen e Douglas Souza que me ajudaram e acompanharam a minha evolução e crescimento no laboratório, às minhas colegas do curso e do café:

Claudia Cotomácio, Lorraine Faria, Gabriela Magliano, Juliana Cristina e às alunas de iniciação científica: Larissa e Giuliana. A todos que compartilharam comigo boas e más experiências, momentos de alegria, sofrimento e força, obrigada!!!

A cada vitória dou o reconhecimento devido a meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. Senhor, mais uma vez obrigada pelo fim de mais esta etapa.

"Mas quem pratica a verdade vem para a luz, para que seus atos possam ser manifestos, porque eles são feitos em Deus".

João 3:21 (King James, 1611)

RESUMO

Oliveira TC Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células da medula óssea de camundongos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão corrigida.

Reabsorções internas das paredes dentinárias levantam dúvidas sobre a origem de células clásticas na polpa dentária em casos idiopáticos. Estudos recentes sugeriram que as células MDPC-23 (*odontoblast-like*) podem se diferenciar em células clásticas, contrariando estudos anteriores. O presente estudo teve como objetivo observar a influência do calcitriol (1,25-dihidroxitamina D3) e do lipopolissacarídeo (LPS) na indução da diferenciação de células MDPC-23 (semelhantes a odontoblastos) em células semelhantes a clastos. Como as células MDPC-23 têm origem ectomesenquimal e células clásticas possuem origem hematopoiética, o estudo foi proposto para comparar, *in vitro*, o potencial clastogênico de dois modelos de origem embrionárias distintas frente a diferentes estímulos. Dois grupos, MDPC-23 e células da medula óssea de camundongos, foram cultivados e tratados com LPS ou 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol). No sexto dia, o ensaio de metiltiazolil-tetrazólio (MTT) foi realizado para observar a viabilidade celular diante dos tratamentos. Em seguida, o ensaio citoquímico foi executado para identificar células positivas para TRAP. Adicionalmente foi feito estudo da expressão gênica dos marcadores da clastogênese, OPG, RANK, RANKL, Csf1r, M-Csf1 e catepsina K, através da PCRq. No ensaio de MTT, a viabilidade celular não foi alterada com os tratamentos em comparação com os subgrupos controle. Células TRAP positivas estavam presentes apenas nos subgrupos medula óssea, induzidos com LPS ou calcitriol. O grupo medula óssea apresentou amplificação para todos os genes alvos mencionados. Já para os subgrupos do grupo MDPC-23 apresentaram expressão gênica significativa, diante dos tratamentos, apenas para os genes Csf1r e catepsina K. Concluiu-se, portanto, que embora apresente expressão relativa para os genes Csf1r e catepsina K, sob tratamento, as células MDPC-23 não foram capazes de se diferenciar em células clásticas.

Palavras-chave: MDPC-23. LPS. Calcitriol. Medula óssea. Clastogênese.

ABSTRACT

Oliveira TC. Effects of lipopolysaccharide and calcitriol on mdpc-23 differentiation into osteoclasts [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Corrected version.

Resorption of internal dental walls raises doubts about the origin of clastic cells in idiopathic cases. Recent studies have suggested that MDPC-23 cells (odontoblast-like) can differentiate into clast-type cells, contrasting to previous finding. The present study aimed to observe the influence of calcitriol and lipopolysaccharide (LPS) to induce the differentiation of MDPC-23 (odontoblast-like) cells into clast-like cells. As MDPC-23 cells have ectomesenchymal origin and clastic cells hematopoietic origin, the study was proposed to compare, *in vitro*, the clastogenic potential of two different models of embryonic origin against different stimuli. Two groups, MDPC-23 and mouse bone marrow cells were cultured in LPS and 1.25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). On the sixth day, after treatments, methyl tetrazolium (MTT) assay was performed to observe cell viability. Then, a cytochemical assay was performed to identify TRAP positive cells. In addition, gene expression of clastogenesis markers, OPG, RANK, RANKL, *Csf1r*, *M-Csf1* and cathepsin K, was performed using the PCRq. Cell viability wasn't disturbed at cited concentrations treatments compared to the control subgroups with the MTT assay. There were no TRAP positive cells in all MDPC-23 subgroups or in the control subgroup of bone marrow. TRAP positive cells were present only in bone marrow induced subgroups LPS and calcitriol. Bone marrow subgroups had gene expression amplification for all targets mentioned. Otherwise, MDPC-23 group had significant gene expression only for *Csfr* and cathepsin K. The others specific targets had no amplification in MDPC-23 subgroups. It was concluded that although the treatments were not toxic and MDPC-23 cells had significant gene expression for *Csf1r* and cathepsin K, these cells did not present TRAP positive cells, and therefore were not able to differentiate into clastic cells.

Keywords: MDPC-23. LPS. Calcitriol. Bone Marrow. Clastogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	EMBRIOLOGIA: ORIGEM DAS CÉLULAS INDIFERENCIADAS DO ORGANISMO	19
2.2	CÉLULAS TRONCO TOTIPOTENTE E MULTIPOTENTE.....	21
2.3	CÉLULAS CLÁSTICAS	23
2.3.1	Obtenção de células clásticas in vitro	26
2.4	ORIGEM DAS CÉLULAS CLÁSTICAS NA REABSORÇÃO DENTÁRIA INTERNA.....	27
2.5	CÉLULAS DA PAPILA APICAL E ORIGEM ODONTOBLÁSTICA	28
2.5.1	Linhagem MDPC-23	29
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	OBTENÇÃO DA LINHAGEM MDPC-23 E CULTURA SOB TRATAMENTO.....	35
4.2	OBTENÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS CLÁSTICAS	35
4.3	TRATAMENTOS, GRUPOS E SUBGRUPOS.....	36
4.4	ENSAIO MTT PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	37
4.5	MÉTODO CITOQUÍMICO DA FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP)	39
4.6	EXPRESSÃO GÊNICA.....	40
4.6.1	Extração de RNA total das culturas celulares	40
4.6.2	Aferição da integridade, qualidade e quantidade do RNA total	40
4.6.3	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase .	41
4.6.4	PCR quantitativa em tempo real	41
4.6.5	Análise estatística	43

5	RESULTADOS	45
5.1	VIABILIDADE CELULAR	45
5.2	FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP).....	47
5.3	EXPRESSÃO GÊNICA	49
5.3.1	Aferição da quantidade, qualidade e integridade do RNA total	49
5.3.2	Análise quantitativa da expressão gênica	50
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICES	67
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

As células responsáveis pela reabsorção da matriz mineralizada dos tecidos duros, embora inicialmente descritas como osteoclastos, são também capazes de reabsorver cartilagem calcificada, onde são chamadas de condroblastos e tecidos dentários, os odontoclastos, sendo denominadas em geral como células clásticas.

A reabsorção interna é a destruição progressiva da dentina intra-radicular e dos túbulos dentinários ao longo dos terços médio e apical das paredes do canal como resultado de atividades clásticas. Embora o processo pareça ser regulado por citocinas e fatores de transcrição que são semelhantes àqueles envolvidos na remodelação óssea, até hoje não se sabe exatamente o que leva à diferenciação em odontoclastos (nos casos de reabsorção interna idiopática) sendo sua formação relacionada (em alguns estudos) às células dendríticas (que estão presentes a polpa) e às células da papila apical.

Os osteoclastos têm sua origem na linhagem monocítica através de sinalizações de precursores mesenquimais e hematopoiéticos. Para sua obtenção *in vitro*, através da cultura de células da medula óssea, há na literatura protocolos já estabelecidos utilizando citocinas como M-CSf1 (*macrophage-colony stimulating facto1*), IL-1 (interleucina 1) e RANKL (receptor activator of nuclear fator kappa B ligand), e o que será empregado no presente estudo que são indutores da clastogênese: a endotoxina LPS (lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas) e o hormônio da vitamina D3, calcitriol.

As células MDPC-23 (*mouse derived papilla cells*) são conhecidas como uma linhagem imortalizada odontoblástica por sintetizarem proteínas características de odontoblastos. Embora haja relatos da obtenção de células características de clastos a partir de células MDPC-23, várias evidências apontam para a necessidade da presença de citocinas indutoras e precursores clásticos, de origem hematopoiética, para a indução da diferenciação clástica. Portanto, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular da clastogênese no interior do canal radicular em casos idiopáticos. Sendo as células MDPC-23 de origem ectomesenquimal e as células clásticas de origem hematopoiética, o presente estudo foi desenvolvido para comparar duas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, MDPC-23 (odontoblastos) e

células extraídas da medula óssea de camundongos Balb-c, quando induzidas à diferenciação, se expressam igualmente fatores característicos de células clásticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

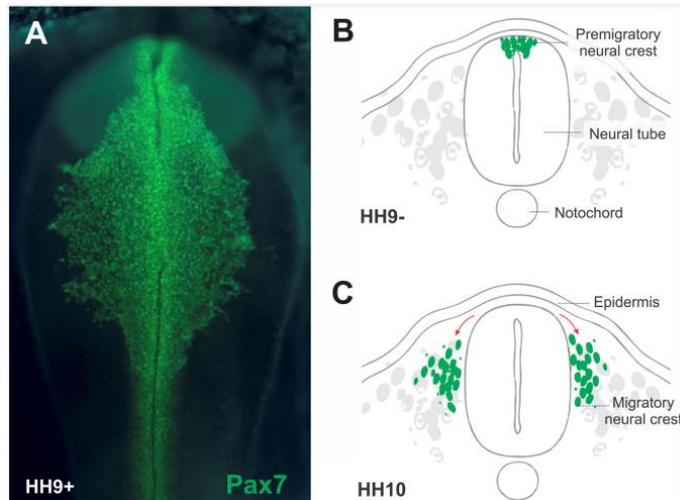
2.1 EMBRIOLOGIA: ORIGEM DAS CÉLULAS INDIFERENCIADAS DO ORGANISMO

Para o entendimento das origens celulares das culturas desse estudo, se faz necessário um breve conhecimento prévio sobre o desenvolvimento embrionário onde as células indiferenciadas que irão protagonizar a evolução de precursores e estruturas embrionárias, assim como o estabelecer os tecidos celulares de um indivíduo.

A gástrula é a fase fundamental da embriogênese animal na qual camadas germinativas são especificadas, reorganizadas e moldadas em um corpo plano com rudimentos de órgãos (Muhr; Ackerman, 2020). Assim, a endoderme forma órgãos dos sistemas gastrointestinal e respiratório, bem como o timo, a paratireóide, a bexiga e a uretra. O ectoderma é responsável pelo desenvolvimento da pele e dos apêndices da pele, do sistema nervoso e de partes dos órgãos sensoriais. O mesoderma, dessa maneira, forma o sistema circulatório e o sangue, o sistema linfático, os ossos, a cartilagem, os músculos e muitos órgãos internos, como o rim, o baço, os ureteres e o córtex adrenal (Donovan; Cascella, 2020).

Provenientes da camada ectodérmica, as células da crista neural (das margens dorsais do tubo neural) darão origem à tecidos como à dentina, ao tecido conjuntivo, a alguns ossos e cartilagens da face e da parte anterior do crânio (Figura 2.1). Precocemente estas células migram para povoar as primeiras regiões do arco branquial (faríngea) que formarão o ectomesênquima. Apesar de sua origem embrionária ectodérmica, as células ectomesenquimais se comportarão como células mesenquimais multipotentes originando tecidos conjuntivos moles e duros craniofaciais (Katchburian; Arana-Chavez, 2017).

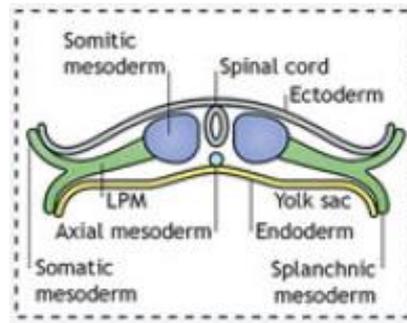
Figura 2. 1 - Células da crista neural se soltam do tubo neural e passam por uma migração extensa (A): imunohistoquímica com um anticorpo para o marcador da crista neural destaca células da crista neural saindo do tubo neural de um embrião de galinha. (B): Diagrama representando uma seção transversal de um embrião de galinha ocupando a porção dorsal do tubo neural. (C): células da crista neural eventualmente sofrem transição epitelial para mesenquimal para sair do tubo neural e passam por extensas migrações



Fonte: Bronner e Simões-Costa (2016).

Já as células mesodérmicas dos somitos, e as células mesodérmicas da placa lateral produzirão as cartilagens e ossos na parte posterior do crânio, o esqueleto axial, e o esqueleto apendicular respectivamente (Figura 2.2). Contudo, as diferentes estruturas formadas no organismo estão relacionadas com o tempo e a localização em que estas células se apresentam durante o período embrionário. Dependendo dessas variáveis, tempo e localização, as células começam um processo de diferenciação e maturação que originarão linhagens distintas, tornando-se células multipotentes e perdendo sua capacidade pluripotente original. Um exemplo seriam as células hematopoiéticas e as células mesenquimais, ambas possuindo sua origem celular na camada mesodérmica, mas sendo progenitoras de células que formarão sistemas distintos (circulatório e constitutivo respectivamente) (Ferretti; Hadjantonakis, 2019).

Figura 2.2 - Secção transversal mostrando as estruturas mesodérmicas que surgem no celoma



Fonte: Prummel et al. (2020).

2.2 CÉLULAS TRONCO TOTIPOTENTE E MULTIPOTENTE

As células-tronco são uma ferramenta importante para compreender a organogênese e a capacidade regenerativa do organismo. No estudo de mecanismos patogénéticos, estas células pluripotentes auxiliam os pesquisadores na compreensão da fisiopatologia de várias doenças oferecendo a possibilidade de desenvolver novos medicamentos (Daley, 2010).

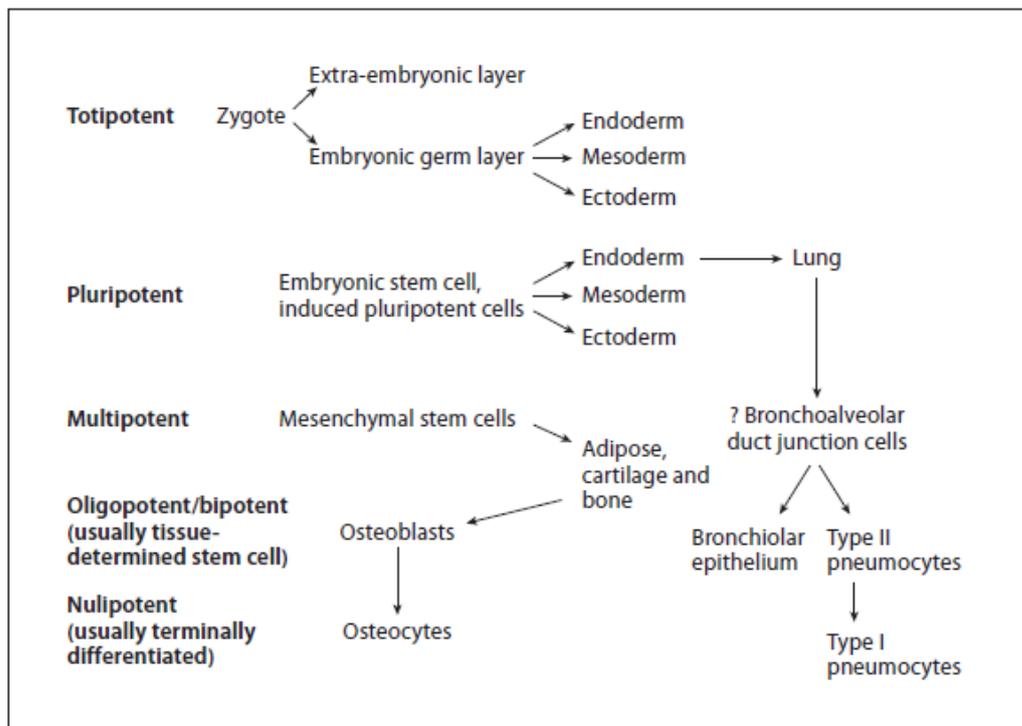
As principais características das células-tronco são: (a) autorrenovação (capacidade de proliferar extensivamente), (b) clonalidade (geralmente decorrente de uma única célula) e (c) potência (capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células). Essas propriedades podem diferir entre várias células-tronco. Por exemplo, as células-tronco embrionárias derivadas do blastocisto têm uma maior capacidade de autorrenovação e potência, enquanto as células-tronco encontradas no tecido adulto têm autorrenovação limitada, uma vez que não proliferariam extensivamente e só podem se diferenciar em células específicas do tecido (Kolios; Moodley, 2013).

As células totipotentes podem se diferenciar em tecidos embrionários e extra-embrionários (Rossant, 2001). As células pluripotentes podem se diferenciar em tecido de todas as 3 camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) (De Miguel et al., 2010). As células-tronco multipotentes podem se diferenciar em tecido derivado de uma única camada germinativa, como as células-tronco

mesenquimais que formam o tecido adiposo, osso e cartilagem (Ratajczak et al., 2012). As células-tronco residentes no tecido são chamadas oligopotentes, pois podem formar células diferenciadas de um tecido específico (Marone et al., 2002) (Figura 2.3).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são as células multipotentes mais reconhecidas. Eles podem ser de uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, osso, sangue do cordão umbilical e sangue periférico (Augello et. al., 2010; Bruder et. al., 1997). Recentemente, as MSCs foram diferenciadas em tecido neuronal derivado do ectoderma. Este é um exemplo de transdiferenciação, ou seja, quando a célula de uma camada germinativa (mesoderme) se diferencia em tecido neuronal de outras camadas germinativas (ectoderme) (Barzilay et al., 2009).

Figura 2.3 - Esquema da hierarquia das células-tronco. Células totipotente formam tecidos embrionários e extra-embrionários. As células pluripotentes formam as 3 camadas germinativas, enquanto as células multipotentes geram células limitadas a 1 camada germinativa



Fonte: Kolios e Moodley (2013).

2.3 CÉLULAS CLÁSTICAS

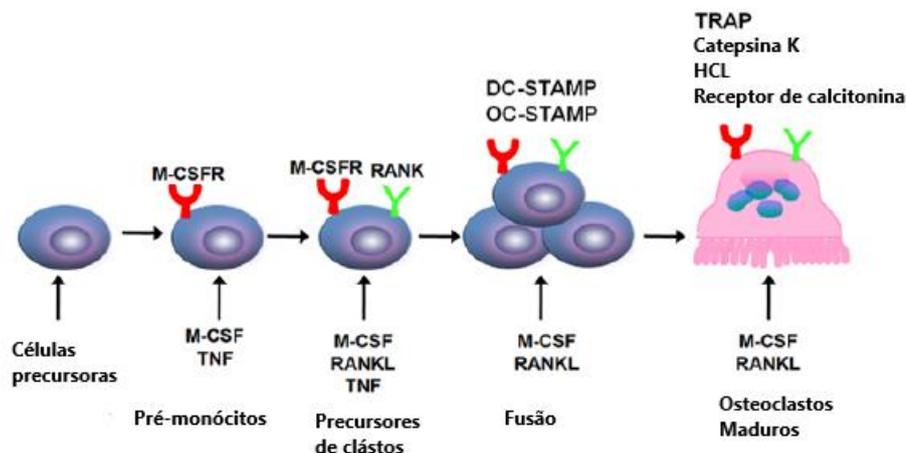
A esqueletogênese começa com a migração de células mesenquimais derivadas destas linhagens embrionárias para os locais dos futuros ossos. No local, elas formam condensações de alta densidade celular que delineiam a forma e o tamanho dos futuros ossos. Dentro das condensações, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos e formam modelos de cartilagem (formação endocondral) ou se diferenciam em osteoblastos para formar diretamente o osso (formação intramembranosa) (Berendsen; Olsen, 2015).

Intimamente relacionado ao surgimento do osteoblasto, as células clásticas têm sua origem também mesodérmica, porém descendem dos tecidos hematopoiéticos, da linhagem monócito-fagocítica. Concomitantemente, há a diferenciação das células osteoblásticas iniciais e o desenvolvimento das células clásticas acontecendo em seus progenitores, ainda não tendo quaisquer marcadores característicos. Entre os dias 16 e 17 de vida intrauterina, células de camundongos adquirem marcadores específicos de osteoclastos, como a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e os receptores da calcitonina (CTR) (Taylor et al., 1989). Finalmente, entre os dias 17 e 18 de desenvolvimento embrionário, elas se fundem e se tornam células clásticas ativas que invadem a cartilagem mineralizada e formam a cavidade da medula óssea primitiva (Scheven et al., 1986). A partir da formação das células clásticas a manutenção da homeostase do cálcio no organismo é possível, controlado por três hormônios reguladores de cálcio: hormônio da paratireoide (PTH) e vitamina D (1,25 OH.2-D3), que estimulam a reabsorção, e calcitonina (CTR), que inibe a reabsorção osteoclástica (Lerner, 2000).

Desde a descoberta da via de sinalização RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa B*) / RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) / OPG (*osteoprotegerin*), a compreensão dessa célula e seu papel na biologia óssea avançou consideravelmente. Até 2003, mais de 60 proteínas estavam associadas às vias que regulam o osteoclasto (Boyle et al., 2003). Devido a abrangência de vias e moléculas reguladoras da clastogênese, o presente estudo se aterá a principal via de sinalização já estabelecida e conhecida na literatura, a via RANK, RANKL e OPG (Yasuda, 2021).

A diferenciação em clastos, ou clastogênese, ocorre em resposta ao fator estimulador de macrófago (M-CSf1) expresso por células dendríticas, linfócitos T, osteócitos, células indiferenciadas e osteoblastos (Marino et al., 2014), o qual se liga ao receptor Csf1r presente na membrana plasmática das células precursoras de células clásticas. O ligante ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (RANKL) é outra molécula expressa por essas células, que ao se ligar ao receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) da membrana plasmática das células precursoras dos clastos, ativa fatores que promovem a diferenciação em pré-clastos e também induz a expressão de moléculas mediadoras da fusão como a proteína transmembrana específica de célula dendrítica (DC-STAMP - *dendritic cell specific transmembrane protein*) e a proteína transmembrana estimuladora de osteoclasto (OC-STAMP - *osteoclast stimulatory transmembrane protein*) (Yagi et al., 2006) (Figura 2.4). A osteoprotegerina (OPG), ao contrário, impede a diferenciação e ativação dos clastos, pois compete com o RANK pelo mesmo sítio de ligação (RANKL) e assim, pode interferir no processo de reabsorção (Lacey et al., 1998).

Figura 2.4 - Esquema representativo da clastogênese



Fonte: Adaptação de Boyce (2013).

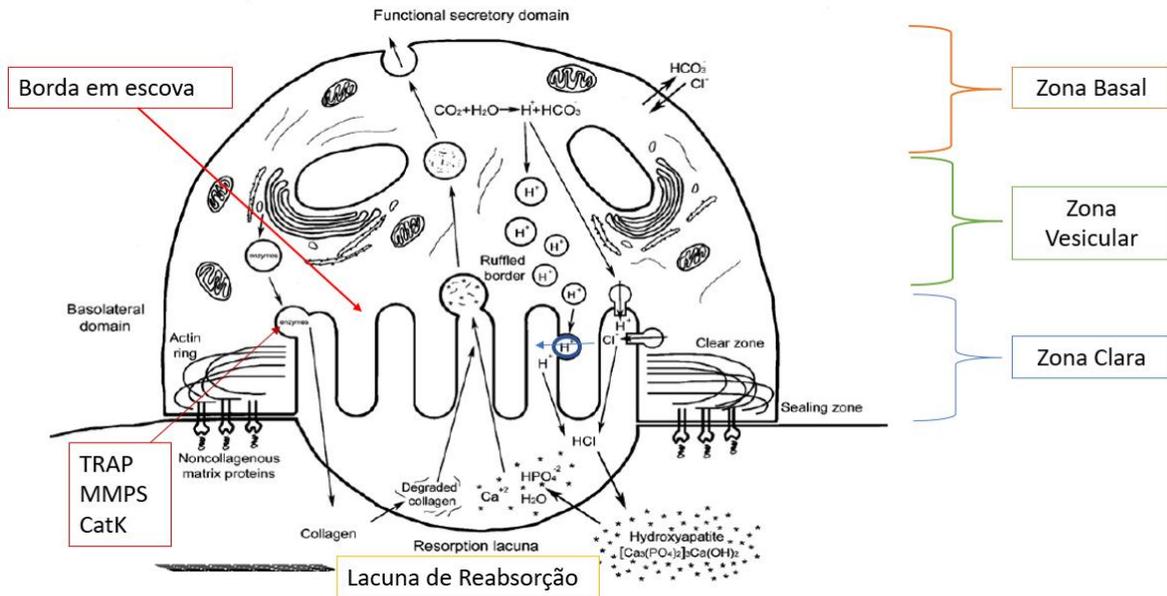
Uma vez ocorrendo a ligação do RANKL ao RANK, são desencadeadas respostas celulares que promoverão a fusão e diferenciação. Primeiramente, ocorre o recrutamento da molécula TRAF6, a qual promove a ativação das moléculas NF- κ B (RANK), que irão transcrever ou regular a expressão de vários genes envolvidos nas respostas imunes, inflamatórias e fisiológicas (Suda et al., 2002). Após a fusão das células precursoras, os pré-clastos se direcionam ao substrato mineralizado. No

caso de substratos como o osso e a dentina, os osteoclastos contatam a matriz e reconhecem a sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) de proteínas não colágenas presentes, como a osteopontina e a sialoproteína óssea, através de integrinas de membrana (Sodek; McKee, 2000). Entretanto, o esmalte que é desprovido de proteínas com a sequência RGD também é reabsorvido por essas células (Arana-Chavez; Andia-Merlin, 1998).

Ao aderir ao substrato, forma-se a zona clara, uma região do citoplasma rica em filamentos de actina que formam um anel para aderência e delimitação da área a ser reabsorvida. A zona clara é um estado característico da ativação das células clásticas (McMichael et al., 2006). Uma vez aderidas ao substrato, inicia-se a degradação da matriz mineralizada pela produção de prótons (H⁺) ficando a região acidificada (pH entre 4 e 5). Numerosas enzimas de natureza lisossomal, (MMPs), são secretadas incluindo proteases, principalmente do tipo catepsina-K (Zhao et al., 2010). Um dos marcadores característicos dos osteoclastos é a enzima lisossomal fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

A figura 2.5 apresenta de forma sucinta uma célula clástica ativa ilustrando as regiões de zona clara, basal e vesicular, borda em escova, tráfego de vesículas e a lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção (adaptado de Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

Figura 2.5 - O mecanismo de reabsorção óssea: as vias moleculares envolvidas na acidificação da lacuna de reabsorção e na liberação de enzimas lisossomais, que dissolvem a matriz óssea inorgânica e orgânica



Fonte: adaptado de Arana-Chavez e Bradaschia-Correa (2009).

2.3.1 Obtenção de células clásticas *in vitro*

Estudos *in vitro* utilizam células da medula óssea, na qual estão presentes os precursores das células clásticas, induzidas com diversos fatores. Um método estabelecido é a indução com calcitriol (vitamina D3), por meio do qual se estabelecem culturas de clastos TRAP-positivos que expressam moléculas características dessas células (Holliday et al., 1995). A molécula de 1,25 dihidroxivitamina D3 possui em sua porção terminal uma sequência de aminoácidos homóloga aos ligantes da família TNF (fator de necrose tumoral), citocina que induz a clastogênese. O receptor de vitamina D (VDR) é um membro da superfamília de receptores nucleares e desempenha papel central na regulação da expressão de vários genes envolvidos na homeostase de cálcio / fosfato, proliferação, diferenciação celular e resposta imune (Wang et al., 2012). As células precursoras dos osteoblastos presentes na medula óssea de camundongos possuem VDR e na presença do calcitriol estas células induzem a osteoclastogênese devido ao aumento da sua expressão de RANKL e de M-CSf1 pela via NF- κ B (Cong et al., 2015).

O VDR está claramente presente nas células do epitélio intestinal, túbulos renais, células da glândula paratireóide, pele (queratinócitos), epitélio mamário, pâncreas (células das ilhotas beta), glândula pituitária, esqueleto (osteoblastos e condrócitos), sistema imunológico (monócitos, macrófagos, e linfócitos T) e tecidos germinativos (Wang et al., 2012). Além disso, o receptor de vitamina D foi detectado também nos ameloblastos, odontoblastos e seus respectivos precursores, desde os estágios iniciais de desenvolvimento até o processo de mineralização dos dentes (Bailleul-Forestier et al., 1996).

2.4 ORIGEM DAS CÉLULAS CLÁSTICAS NA REABSORÇÃO DENTÁRIA INTERNA

Nos tecidos mineralizados como a dentina, o cimento e o esmalte, as células clásticas são indistintas dos osteoclastos morfológica e funcionalmente (Katchburian; Arana-Chavez, 2017). No dente formado, a dentina que circunda a cavidade pulpar às vezes é reabsorvida internamente, aparentemente envolvendo a via de sinalização RANK/RANKL (Harokopakis-Hajishengallis, 2007). Outros estudos relataram a expressão de RANKL/OPG em polpa dentária, em linhagens celulares de odontoblastos (Rani; MacDougall, 2002), e até em fibroblastos de polpa dentária de dente decíduo humano após reabsorção (Lossdorfer et al., 2002). A reabsorção interna da dentina começa na câmara pulpar ou no canal radicular (Sahara et al., 1994). Acredita-se que as células da polpa dentária podem ser produtoras de citocinas que medeiam a linhagem monócito-fagocítica para formar odontoclastos (Lau et al., 2007), e que o sistema RANK/RANKL pode estar envolvido na reabsorção dentinária (Uchiyama et al., 2009).

Em casos de reabsorção interna, a camada odontoblástica e a predentina são danificadas, resultando na exposição dentinária para a ação reabsortiva dos odontoclastos. Os eventos lesivos para causar tais danos não foram completamente elucidados e vários fatores etiológicos foram propostos para a perda das camadas supracitadas, incluindo as alterações distróficas idiopáticas em polpas normais (Trope, 1998). Entretanto, nesses casos, não foram encontradas células inflamatórias no tecido pulpar, gerando questionamentos sobre os únicos

precursores envolvidos na reabsorção interna da dentina: as células hematopoiéticas e os monócitos (Duan et al., 2013). Quando idiopática, forma incomum de reabsorção dentária, os fatores iniciadores envolvidos não são completamente compreendidos. Esta forma de reabsorção é tipicamente assintomática e os dentes afetados podem responder normalmente ao teste térmico e / ou elétrico da polpa (Moody; Muir, 1991).

Surgem, portanto, para esses casos, hipóteses sobre a formação clástica na polpa dentária, relacionando seu aparecimento às células dendríticas (Patel et al. 2010), que estão presentes na polpa dentária, e cuja origem embrionária é a mesma dos osteoclastos (Rivollier et al., 2004; Krishnamurthy et al., 2019) e às células da linhagem odontoblástica, MDPC-23, que derivam de células ectomesenquimais indiferenciadas e que também têm sido relatadas como a possível fonte dos odontoclastos (Duan et al., 2013; Li et al., 2018).

2.5 CÉLULAS DA PAPILA APICAL E ORIGEM ODONTOBLÁSTICA

As células da papila apical, também chamadas de células ectomesenquimais indiferenciadas, são capazes de se diferenciar, migrar para uma região desfavorável possuindo propriedades imuno-modulatórias (Egusa et al., 2012). Contudo, essas células são capazes de sobreviver em meios hostis como uma inflamação periapical ou uma pulpite irreversível sugerindo que ambientes hipóxicos aumentariam a proliferação e o potencial angiogênico dessas células (Wang et al., 2012).

Durante a formação do indivíduo após a migração das células da crista neural e do estabelecimento do tecido ectomesênquimal, o epitélio oral primitivo aumenta de espessura e se prolifera, subjacente a este processo, ocorre a condensação do ectomesenquima, a qual resultará na formação da papila dentária, considerada a fonte indutora de precursores odontoblásticos. Uma variedade de interações epitelio-ectomesenquimal são responsáveis pelo início da formação dentária. (Bronner; Simões-Costa, 2016). Moléculas sinalizadoras a partir de células epiteliais começam a diferenciação em ameloblastos, modificando a lâmina basal interna, e induzindo as células da papila dental a se diferenciar em odontoblastos (Thesleff, 2003).

Após a dentinogênese, os odontoblastos se apresentam alinhados ao longo da periferia da polpa dentária exibindo forma colunar, núcleo polarizado, organelas de síntese bem desenvolvidas, desempenhando importante função na manutenção da integridade dentária devido à sua capacidade de depositar novas camadas de dentina ao longo da vida. Entretanto, difere de outras células do organismo por possuir um único prolongamento celular que surge de seu corpo celular colunar alto e penetra no túbulo dentinário (Katchiburian; Arana-Chavez, 2017). Além disso, células *odontoblast-like* posteriormente diferenciadas também são capazes de formar uma camada de dentina terciária em resposta à fatores que podem afetar a polpa (Smith; Lesot, 2001). As células ectomesenquimais indiferenciadas presentes na polpa, se tornarão as células que produzem a dentina reparadora. Embora os mecanismos exatos que induzem a diferenciação das células pulpares em células odontoblásticas ainda sejam desconhecidos, as novas células surgem após a sinalização de um fator de crescimento que desencadeia uma cascata de eventos envolvendo quimiotaxia, divisão, migração, adesão e diferenciação celular. Acredita-se que principalmente as células da camada subodontoblástica - e também outras células pulpares indiferenciadas - possuem capacidade latente para esta diferenciação específica (Arana-Chavez, Massa, 2004).

2.5.1 Linhagem MDPC-23

A linhagem imortalizada MDPC-23 foi desenvolvida a partir das células de papila apical de primeiros molares de camundongos com 18 dias de vida fetal, capazes de sintetizar proteínas específicas da dentina como sialofosfoproteína dentinária (DSSP) e a proteína de matriz dentinária-1 (DMP1). Na presença de vitamina D ($10^{-8}M$), essas células aumentam sua expressão gênica de osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN); porém, com dexametasona (DEX), são diminuídas as expressões de fosfatase alcalina (ALP) e colágeno tipo 1 (Hanks et al., 1998). Por esse motivo, essas células, são comumente consideradas como sendo da linhagem de odontoblastos, e através de métodos moleculares, foram classificadas como *odontoblast-like*, devido à expressão constante de DSSP, proteína característica de

odontoblastos (Sun et al., 1998). Embora haja uma grande variedade de estudos para verificar a citotoxicidade e a biocompatibilidade dos materiais odontológicos (Ferreira et al., 2020; Costa et al., 1999) pouco se sabe da capacidade indiferenciada dessas células.

O LPS foi o primeiro componente bacteriano demonstrado que é capaz de induzir reabsorção óssea *in vitro* (Shuto et al., 1994). Através dele, são induzidas a produção de citocinas, incluindo o TNF- α e IL-1, por fibroblastos, macrófagos e outras células capazes de induzir a formação e ativação dos osteoclastos (Mizutani et al., 2013). Além disso, é capaz de promover a diferenciação, fusão, sobrevivência e ativação dos osteoclastos, independentes de IL-1, TNF- α e RANKL, através da via de receptores do tipo Toll (TLRs) (Suda et al., 2002, Itoh et al., 2003, Inubushi et al., 2012). Esses TLRs são ativados por padrões moleculares específicos associados à patógenos (PAMPs). Diferentes componentes microbianos são detectados por diferentes TLRs, os quais são expressos em várias células, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, osteoblastos, células clásticas, tipos específicos de células T (Bar-Shavit, 2007) e células MDPC-23 (Park et al., 2011).

Na presença do LPS, tem-se sugerido que as células *odontoblast-like*, MDPC-23, apresentariam células multinucleadas TRAP-positivas e marcadores característicos de células clásticas, como a TRAP através da via TLR4 (Li et al., 2018). Não obstante, através da indução com RANKL e M-CSf1, a mesma linhagem também se comportaria como células clástica, mudando fenotipicamente e expressando quantidades aumentadas de genes específicos de células clásticas como OSTM1 (*osteopetrosis-associated transmembrane protein 1*) CLCN7 (*chloride channel*), CTSK (*cathepsin K*) e MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*). Entretanto, as proteínas características de odontoblastos como a DSPP e a DMP1, seriam inibidas (Duan et al., 2013).

Em contraste com o vasto conhecimento sobre diferenciação de osteoclastos, pouco se sabe, e muito se confunde, sobre a origem dos odontoclastos, e as moléculas envolvidas na sua diferenciação. Embora a literatura relata a necessidade da presença de células da linhagem monócito-fagocítica para a obtenção de células clásticas *in vitro* (Cong et al., 2015), relatos da obtenção dessas células a partir da linhagem MDPC-23, com protocolos já estabelecidos para a obtenção de osteoclastos, chamam atenção para a origem das células clásticas nos casos de

reabsorções internas idiopáticas. Uma vez que as células MDPC-23 têm origem ectomesenquimal e as células clásticas têm origem hematopoiética, é necessário o esclarecimento sobre a capacidade de diferenciação das células MDPC-23 através da comparação, caso ambas as linhagens celulares apresentem, quando induzidas, fatores característicos das células clásticas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo é avaliar, *in vitro*, se expressam igualmente fatores característicos de células clásticas duas linhagens celulares de origens diferentes: MDPC-23 (odontoblast-like) e células da medula óssea de camundongos Balb-c, ambas culturas, expostas ao LPS e ao calcitriol para indução da diferenciação.

Os objetivos específicos desse estudo são:

- Análise da viabilidade/toxicidade celular, por meio de ensaios de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina];
- Análise da presença ou ausência de células clásticas utilizando ensaio citoquímico da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP);
- Análise das expressões gênicas por meio do método PCRq (método quantitativo da reação em cadeia da polimerase).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para ambas as culturas, o estudo foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP (CEUA/FOUSP), com a aprovação do mesmo, número de protocolo: 004/2018, (ANEXO A).

4.1 OBTENÇÃO DA LINHAGEM MDPC-23 E CULTURA SOB TRATAMENTO

Células da linhagem de odontoblastos de camundongos MPDC-23 foram gentilmente cedidas pela professora Karina Fittipaldi Bombonato-Prado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As células foram mantidas, até o início dos trabalhos, em tubos criogênicos de 2ml em tambores de nitrogênio líquido e cultivadas na densidade de 110 células por mm², todos os ensaios foram realizados na passagem 46.

4.2 OBTENÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS CLÁSTICAS

Quinze camundongos Balb-c de ambos os sexos com 4 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, foram anestesiados com 0,1 mL/kg peso corporal do animal, com uma combinação de ketamina (Dopalen, Vetbrands) e xilazina (Anasedan, Vetbrands), sacrificados por deslocamento cervical, dissecadas as tíbias e os fêmures que foram colocados imediatamente em uma placa de Petri sobre o gelo com meio MEM- α (Essencial Mínimo Modificado Alfa, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado, contendo 100U ml⁻¹ penicilina, 100 μ g ml⁻¹ estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma das epífises, de cada espécime, foi removida para a extração da medula. Os espécimes foram colocados, com as epífises ausentes voltadas para baixo, em um tubo cônico de centrifugação de 0,6 ml fechado com um orifício confeccionado na extremidade, para a saída da medula óssea, a qual foi expelida do

canal medular e coletada em um outro tubo cônico de centrifugação de 1,5 ml através da centrifugação sob 3500 rpm por 30 segundos (Faria 2021) (Figura 4.1). As células coletadas foram lavadas duas vezes em meio α -MEM suplementado e cultivadas em densidade de 1×10^6 .

Figura 4.1 - Esquema da obtenção das células da medula óssea dos camundongos



Fonte: O autor.

4.3 TRATAMENTOS, GRUPOS E SUBGRUPOS

Ambas as linhagens celulares (MDPC-23 e de células da medula óssea) foram cultivadas em meio Essencial Mínimo Modificado Alfa (MEM- α , Life Technologies, Grand Island, NY, USA) contendo 100 U ml^{-1} penicilina, $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C e 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico umidificado. A troca de meio foi realizada diariamente durante os 6 dias de experimento. No grupo induzido das culturas (GI), foram adicionados os tratamentos: $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Escherichia coli Lipopolissacarídeo (LPS) (0111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) (Li et al., 2018) ou 1,25- dihidroxivitamina D3 a 10^{-8}M , ($4,16 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), (Holliday et al., 1995), configurando os subgrupos LPS e VD3 respectivamente. Os subgrupos controle (GC) de ambas as culturas (MDPC-23 e de células da medula óssea) recebeu trocas de meio suplementado somente (sem LPS e VD3) (Tabela 4.1). As culturas foram realizadas em placas de Petri (para o protocolo de extração de RNA, $n=06$) e placas de 96 poços (para as análises: MTT e TRAP, $n=09$).

Tabela 4.1 - apresentação dos grupos, subgrupos e tratamentos

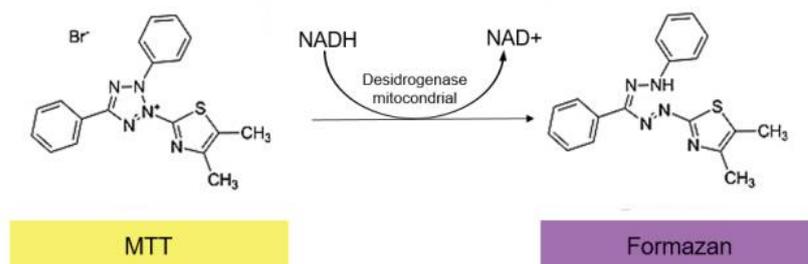
	Tratamento	Grupos	
		MO (Medula óssea)	OD (MDPC-23)
Subgrupos	Controle (sem indução, só troca de meio)	CON-mo	CON-od
	Indução com Lipopolissacarídeo 1 µg/mL	LPS-mo	LPS-od
	Indução com Calcitriol 10 ⁻⁸ M	VD3-mo	VD3-od

Fonte: O autor.

4.4 ENSAIO MTT PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolína] é um dos mais utilizados devido à sua sensibilidade de detecção de toxicidade dos tratamentos. O teste do MTT quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídios, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do MTT ao formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases (Figura 4.2). Dessa forma, a redução do MTT ao formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Figura 4.2: Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) ao formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água)

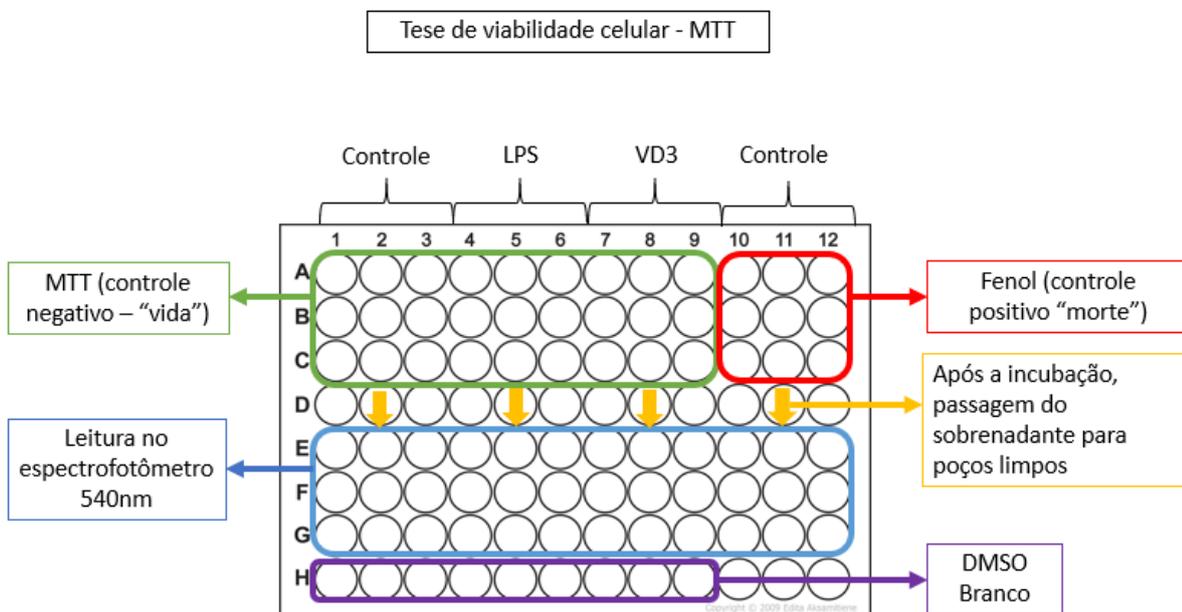


Fonte: Magalhães et al. (2018)

O preparo da solução de MTT foi feito em atmosfera estéril na concentração de 5 mg/ml em tampão fosfato salino (PBS). Após pesagem e solubilização, a solução foi filtrada em membrana de 0,10 µm para frasco âmbar devido a sua fotossensibilidade. Posteriormente, a solução de MTT foi fracionada em tubos de polipropileno (Falcon) de 50 ml, armazenados a -20 °C cobertos com papel alumínio. para garantir a estabilidade do reagente por 6 meses, conforme especificações do fabricante.

Para a realização do presente teste, ao sexto dia, o meio de cultura das placas (96 poços) foi removido e as células lavadas com 100 µl de PBS, pH 7,4 à 37°C. Após a remoção do PBS, 100 µl da solução de MTT (5 mg/ml) foi adicionada aos poços identificados como “MTT (controle negativo – células vivas)”, 100 µl de fenol foi colocado nos poços identificados como “Fenol (controle positivo – células mortas)”.

Figura 4.3 - A figura ilustra a distribuição dos subgrupos e das soluções para o teste de MTT em ambas as culturas (MDPC-23 e de células da medula óssea)



Fonte: O autor.

Após 4 h de incubação das células em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, foi removido todo MTT dos poços e 100 µl de solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, permitindo a eluição dos cristais de

formazan. DMSO foi também adicionado nos poços identificados como “DMSO Branco” (Figura 4.3). As placas foram homogeneizadas por 5 minutos em agitador de placa. Após a solubilização dos cristais de formazan, todo o conteúdo dos poços (em verde e vermelho na Figura 4.3) foi transferido para poços limpos inferiores da placa (em azul, na Figura 4.3), usando ponteiras novas para cada poço. Foi realizada então a leitura da absorbância utilizando-se espectrofotômetro de microplacas Synergy HT, software GEN5 da Bio Tek (BioTek Instruments, Inc., VT, EUA) e comprimento de onda de 540nm.

Este ensaio foi realizado em triplicata (n=9). A viabilidade celular foi avaliada após a subtração das absorbâncias das amostras da média das absorbâncias do DMSO branco. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com o programa GraphPad Prism, versão 9.0 (GraphPad Software, CA, EUA) utilizando análise de variância One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett's múltiplas comparações. As análises foram realizadas comparando o subgrupo controle com os subgrupos tratados de cada cultura estudada e o valor de significância estabelecido como $P < 0,05$.

4.5 MÉTODO CITOQUÍMICO DA FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP)

Para identificação de células clásticas, as culturas foram submetidas à citotóxica-TRAP. Ao sexto dia de indução, as células cultivadas foram primeiramente lavadas em PBS 0,01M à 37°C. Foram então fixadas em solução de formaldeído a 2%, com a placa posicionada sobre gelo picado durante os 20 minutos de fixação. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS, permeabilizadas com solução de triton-x-100 a 1% (em PBS) e coradas seguindo o protocolo do fabricante (Leukocyte assay phosphatase assay, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Os experimentos foram realizados 3 vezes em triplicata. As placas foram fotografadas e examinadas em um microscópio invertido Axiovert 40 CFL Zeiss acoplado ao sistema de captura e análise de imagens AxioCam (Zeiss, Göttingen, Germany), os dados obtidos foram qualitativos (presença ou ausência de células clásticas).

4.6 EXPRESSÃO GÊNICA

4.6.1 Extração de RNA total das culturas celulares

Ao sexto dia de tratamento, o RNA total foi extraído das culturas, (tratadas ou não com calcitriol ou LPS), utilizando-se o sistema PureLink™ RNA Mini kit (Invitrogen, Thermo Scientific Inc., DE, USA), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente as culturas foram lavadas 2 vezes com 2ml de tampão PBS a 0,01M a 37°C, na segunda lavagem, as células foram soltas das placas de Petri com o auxílio de um raspador (Cell-lifter – Sarsted) sobre o gelo, e a suspensão de células coletada e transferida para um tubo cônico de centrifugação de 2ml. As amostras foram centrifugadas a 2000 G por 5 minutos a 4°C em uma centrífuga refrigerada Microfuge® 22R Centrifuge (Beckman Coulter™, USA) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 300 µL de tampão de lise foi adicionado às amostras que foram transferidas para o sistema de colunas de separação, para isolamento do RNA. Após o isolamento e a lavagem das amostras, realizou-se a eluição do RNA com 50 µl de água RNase “free”.

4.6.2 Aferição da integridade, qualidade e quantidade do RNA total

As amostras de RNA total foram homogeneizadas e aliqüotadas para as análises de integridade, qualidade e quantidade de RNA. Para a quantificação de RNA total utilizou-se Kit Qubit™ RNA BR Assay (Thermo Scientific Inc., DE, USA) e a leitura foi obtida em fluorímetro Qubit™ 1.0 (Thermo Scientific Inc., DE, USA) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA total foi avaliada através do espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific Inc., DE, USA) nas proporções das absorbâncias (A260 / A280 e 260/230) que indicam a pureza do RNA. Somente amostras de RNA total com taxas adequadas de pureza (A260/A280 = 1.8-2.1 e 260/230 >1.7) foram utilizadas para as subseqüentes análises.

Para verificação da integridade do RNA, as amostras foram desnaturadas a 65°C no termociclador Veriti™ 96-Well (Thermo Scientific Inc., DE, USA) e imediatamente colocadas sobre gelo. Trezentos nanogramas de RNA total foram utilizados para esta análise. O gel de agarose foi preparado a 1% em tampão TAE 1X utilizando o corante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Thermo Scientific Inc., DE, USA) a 0,01% e o tampão concentrado 6X para carregamento de amostras (Sinapse INC). A integridade do RNA foi observada em transiluminador de Ultra-violeta (UV) Gel Doc XR+ Gel Documentation System utilizando o software Quantity ONE (BIO-Rad, Richmond, EUA).

4.6.3 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A partir da concentração de RNA total obtida, foi realizado cálculo para a geração de 50 ng/μl de DNA complementar (cDNA) em volume total de 20 μl. Utilizamos o kit de RT-PCR SuperScript™ VILO™ Master Mix Invitrogen. O protocolo seguido, informado pelo fabricante, foi realizado no termociclador Veriti™ 96-Well (Thermo Scientific Inc., DE, USA).

4.6.4 PCR quantitativa em tempo real (PCRq)

Para a análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real, foram escolhidas sondas de hidrólise Taq Man®.Gene Expression (Thermo Fisher Scientific) específicas para genes moduladores de células clásticas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Descrição das sondas utilizadas o estudo

Sonda Taq Man®	Símbolo	Gene Alvo Amplificado
Mm 01143545_m1	Hmbs	Gene de referência / endógeno
Mm 01205928_m1	Tnfrsf1-11B	OPG
Mm 00437135_m1	Tnfrsf1-11A	RANK
Mm 00441906_m1	Tnfsf11	RANKI
Mm 01266652_m1	Csf1r	Csf1r (receptor)
Mm 00432686_m1	Csf1	M-Csf1
Mm 00484039_m1	Ctsk	Ctsk (catepsina K)

Fonte: O autor.

Cada reação de PCRq foi realizada, utilizando-se 50ng de cDNA de cada amostra (1 µl), 10µl de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1 µl da sonda específica, em um volume total de 20 µl, completados com água ultra pura. Cada amostra foi testada em duplicata com 3 repetições e 2 controles negativos em cada experimento (No Template Control - NTC). As condições de termociclagem utilizadas para estes genes foram: um ciclo inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15s e a 60°C por 1:00 min.

Os valores obtidos na reação de PCR em tempo real foram expressos em cycle threshold (CT) e a expressão de cada gene alvo foi determinada utilizando-se a fórmula $\log_2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi utilizado como normalizador endógeno o gene hydroxymethylbilane synthase (Hmbs), expresso em ambas as culturas com mínima variabilidade de expressão. Como amostra de referência o subgrupo CON-mo foi utilizado devido à expressão, em homeostase, de todos os genes de interesse, permitindo assim avaliar as expressões em ambas culturas celulares sob efeito dos tratamentos.

4.6.5 Análise estatística

Os resultados do PCRq foram expressos como quantificação relativa (RQ), ou seja, este índice expressa a variação relativa do gene em estudo do grupo experimental em relação a amostra de referência, o subgrupo CON-mo. Os dados estatísticos foram obtidos através da análise de variância two-way ANOVA com pós teste de múltiplas comparações de Holm-Šídák's. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. A expressão relativa para cada gene alvo foi calculada através do cálculo $\log_2^{-\Delta\Delta CT}$.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

Este estudo avaliou, com o ensaio MTT, se a viabilidade celular das culturas foi alterada após 6 dias de tratamento.

Com exceção do subgrupo LPS-mo, a viabilidade das células submetidas aos tratamentos não revelou diferença estatística significativa quando comparada com as células não tratadas (subgrupo CON ou controle negativo-CN). Apenas quando os subgrupos foram comparados aos respectivos controles positivos houve diferenças estatísticas significativas. Ambos controles positivos (CP) apresentaram baixa viabilidade celular, com diferença estatística significativa em relação aos demais subgrupos e aos grupos controles. A Tabela 5.1 apresenta um resumo dos dados de absorbância obtidos no ensaio de MTT.

Tabela 5.1 - Viabilidade celular dos grupos OD e MO (n=9). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de absorbância. CP: controle positivo de citotoxicidade. P: significância estatística. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas dos subgrupos controle (CON) com os subgrupos de tratamento (LPS e VD3) e o controle positivo (CP)

Subgrupo/ grupo	CON n=9	LPS n=9	VD3 n=9	CP n=3	P
OD	0,053 \pm 0,014	0,064 \pm 0,017	0,048 \pm 0,006	-0,003 \pm 0,001****	****P<0,0001
MO	0,037 \pm 0,008	0,055 \pm 0,009***	0,043 \pm 0,007	-0,004 \pm 0,000****	***P=0,0002 ****P<0,0001

Fonte: O autor.

Os valores de absorbância (540 nm) dos subgrupos estudados foram submetidos às seguintes equações para a geração dos gráficos de viabilidade celular:

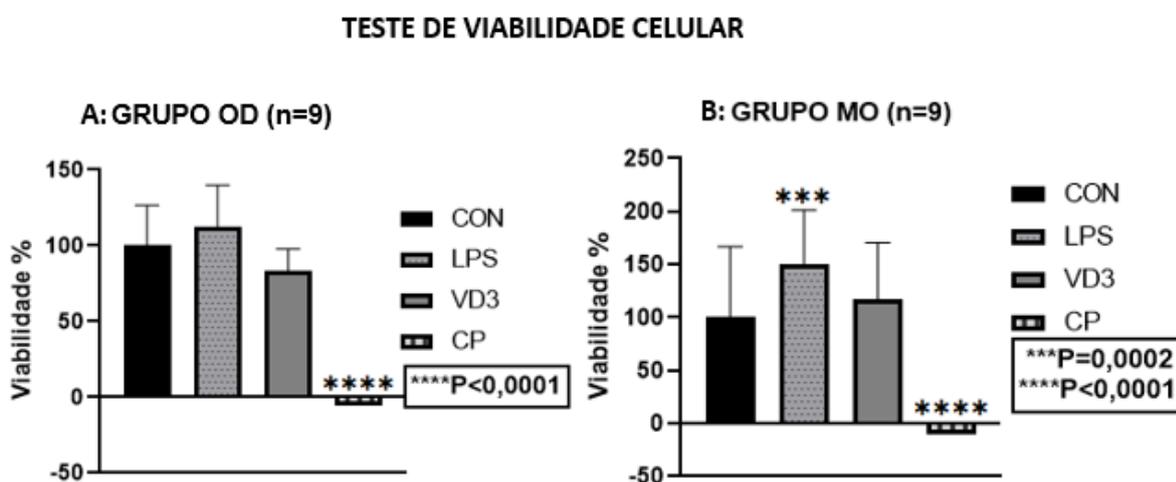
$$\% \text{ viabilidade celular} = (\text{media do subgrupo}/\text{media do subgrupo CON}) * 100;$$

$$\% \text{ desvio padrão} = (\text{desvio padrão do subgrupo}/\text{media do subgrupo}) * 100$$

Os gráficos, gerados pelo programa GaphPad Prism, versão 9.0 (GraphPad Software, CA, EUA), foram obtidos e transformados em porcentagem da viabilidade celular, onde o subgrupo controle de cada grupo seria 100% da viabilidade celular (Figura 5.1).

A descrição das análises estatísticas dos grupos MO e OD foi colocada nos apêndices A e B deste estudo para consulta.

Figura 5.1 - Viabilidade celular após 6 dias de tratamento com LPS, VD3 ou fenol (controle positivo de citotoxicidade -CP). A) Células OD; B) Células MO. Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação aos respectivos subgrupos controle (CON). **** $P < 0,0001$, controle positivo (CP) comparado aos demais subgrupos. *** $P < 0,0002$ comparado ao controle negativo- CN (subgrupo CON)



Fonte: O autor.

Em ambos os grupos (OD e MO), os tratamentos com LPS e ou VD3 não reduziram a viabilidade celular das culturas, não havendo diferenças estatísticas em relação aos subgrupos controle (CON) (Figura 5.1, gráficos A e B). Entretanto, a viabilidade celular do subgrupo LPS-mo foi significativamente maior (Figura 5.1, gráfico B) em comparação ao subgrupo controle CON-mo. Tal diferença provavelmente se deve ao fato de o subgrupo CON-mo ter apresentado menor densidade celular em relação aos demais. Como esperado, o tratamento com fenol nos subgrupos CP induziu morte celular significativa. Em resumo, os resultados confirmam que os tratamentos com LPS ou VD3 não induziram toxicidade e morte celular.

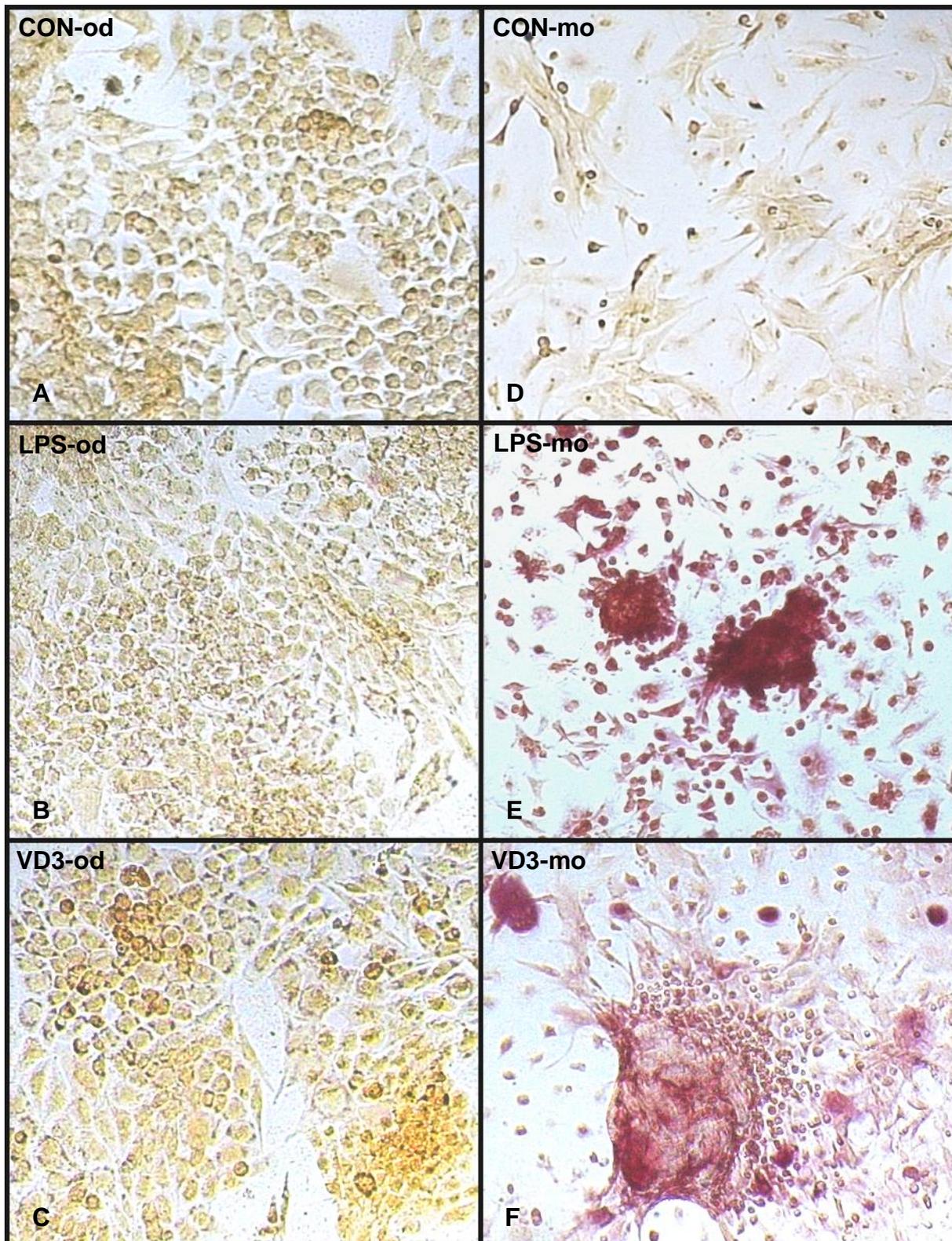
5.2 FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP)

Com o intuito de verificar se ambas as culturas, sob mesmo tratamento indutor da clastogênese, produziram fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), as mesmas foram submetidas à citoquímica-TRAP, ao sexto dia de tratamento.

Neste ensaio observamos a diferença de tamanho de núcleo das células das culturas. Os núcleos das células do grupo OD apresentam-se maiores em comparação aos núcleos da cultura MO (Figura 5.2, A e D). A marcação para TRAP esteve presente apenas nos subgrupos: LPS e VD3 do grupo MO (Figura 5.2, E e F).

Nas imagens, as células clásticas são as células multinucleadas (contendo 2 ou mais núcleos) e com contorno bem definido. É possível observar a presença de células clásticas gigantes e também mononucleares. No subgrupo controle do grupo MO não foi observada presença da TRAP, mas apenas agrupamentos de células progenitoras sem diferenciação (Figura 5.2, D).

Figura 5.2 - Ensaio citoquímico para TRAP. Fotomicrografias com 20X de aumento tiradas após 6 dias de tratamento com LPS e VD3. Células gigantes, mono e multinucleadas são observadas apenas no grupo MO com os tratamentos LPS e VD3 (E e F)



Fonte: O autor.

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA

5.3.1 Aferição da quantidade, qualidade e integridade do RNA total

Os resultados obtidos para verificação da quantidade e da qualidade (pureza) das amostras de RNA total foram obtidos através do fluorímetro (ng/ml) e do espectrofotômetro, respectivamente. As relações de absorvância: 260/280 e 260/230, obtidas em todas as amostras ficaram, entre 1,9 e 2,4, valores aceitos para amostras puras (Tabela 5.2).

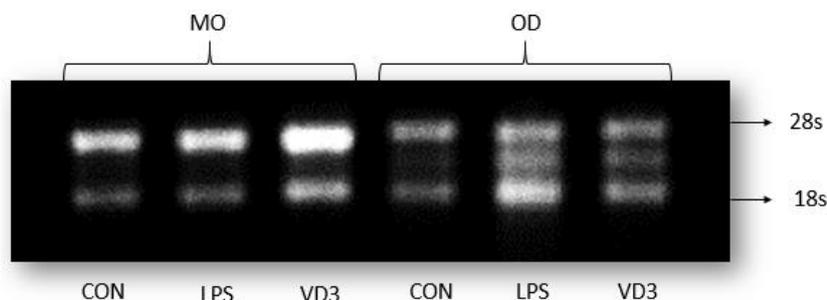
Tabela 5.2 - Resultados obtidos para avaliação da quantidade e qualidade (pureza) das amostras de RNA total. Todas as amostras estão dentro do padrão de aceitação considerado adequado nas proporções 260/280 e 260/230

Subgrupos	Qubit	NANODROP	
	[]ng/ml	260/280	260/203
CON-od	570,7	2,15	2,34
LPS-od	738,0	2,13	2,33
VD3-od	550,4	2,15	2,42
CON-mo	194,6	2,14	2,17
LPS-mo	285,0	2,11	2,19
VD3-mo	369,4	2,10	2,14

Fonte: O autor.

Para avaliação da integridade do RNA extraído, 300ng de RNA total foram utilizados das amostras. A integridade do RNA total foi observada em transiluminador UV onde se visualizam bandas formadas pelas subunidades 18s e 28s (mais abundantes no RNA total). Todas as amostras obtiveram bandas nítidas e sem arraste, como demonstrado na Figura 5.3, confirmando que todas as amostras estavam íntegras. Observamos também a subunidade 5,8s (banda central) no grupo OD, que aparece em decorrência do kit de extração de RNA utilizado.

Figura 5.3 - Análise da integridade do RNA dos grupos MO e OD. Imagem representativa de eletroforese em gel de agarose 1% de três amostras de cada grupo. Em ambos os grupos são observadas as bandas correspondentes às subunidades 18s e 28s. No grupo OD observa-se também a subunidade 5,8s



Fonte: O autor.

5.3.2 Análise quantitativa da expressão gênica

Para a análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real, foram escolhidas sondas específicas que modulam a clastogênese. Os dados estatísticos foram obtidos através da análise de variância two-way ANOVA com pós teste de múltiplas comparações de Holm-Šídák's com $p < 0,05$. Utilizamos como amostra de referência para comparações o grupo CON-mo, devido à expressão, em homeostase, de todos os genes de interesse, permitindo assim avaliar o efeito dos tratamentos sobre os genes alvo em ambas culturas celulares. Nas figuras 5.4 e 5.5, a expressão gênica da amostra de referência é representada pela linha horizontal em zero. A expressão relativa para cada gene alvo foi calculada através do cálculo $\log_2^{-\Delta\Delta CT}$.

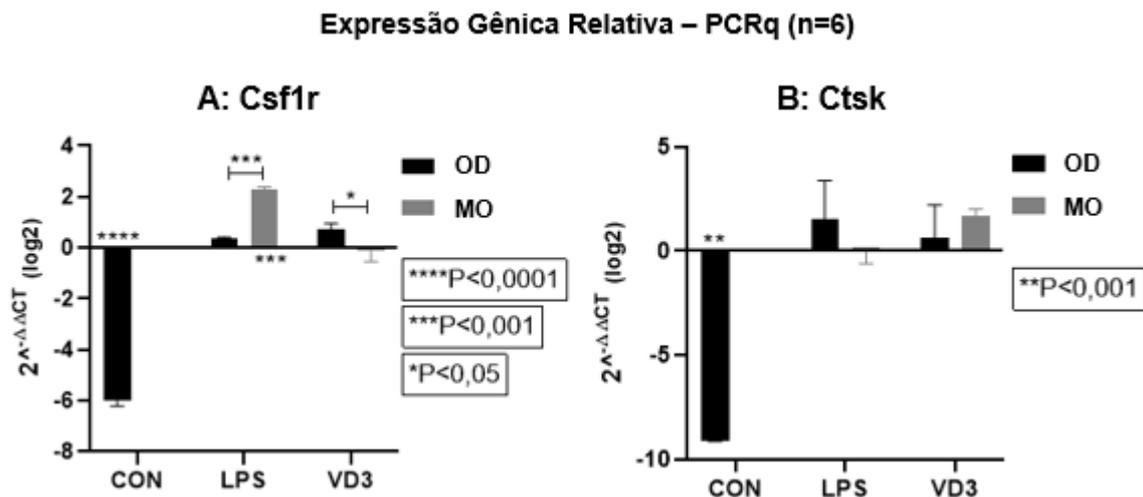
O subgrupo CON-od apresentou expressão significativamente menor dos genes *Csf1r* e *Ctsk* (6 vezes e 9 vezes, respectivamente) em relação ao grupo CON-mo (Figura 5.4, gráficos A e B). O tratamento com LPS ou VD3 por 6 dias induziu um aumento da expressão desses genes nas células OD, mas não significativamente diferente do subgrupo CON-mo. Todos os demais genes alvo não tiveram amplificação nas células do grupo OD.

As células MO tratadas com LPS por 6 dias apresentaram aumento significativo somente do gene *Csf1r* (Figura 5.4, gráfico A), tanto em relação ao subgrupo CON-

mo (amostra de referência) como em relação ao subgrupo LPS-od. O Tratamento com VD3 não alterou a expressão gene *Csf1r* em relação ao subgrupo CON-mo, mas a expressão foi significativamente menor em relação ao subgrupo VD3-od (Figura 5.4, gráfico A).

A descrição das análises estatísticas dos genes alvo em relação aos grupos e subgrupos foi colocada nos apêndices C, D, E e F deste estudo para consulta (onde estiver MDPC-23, lê-se OD).

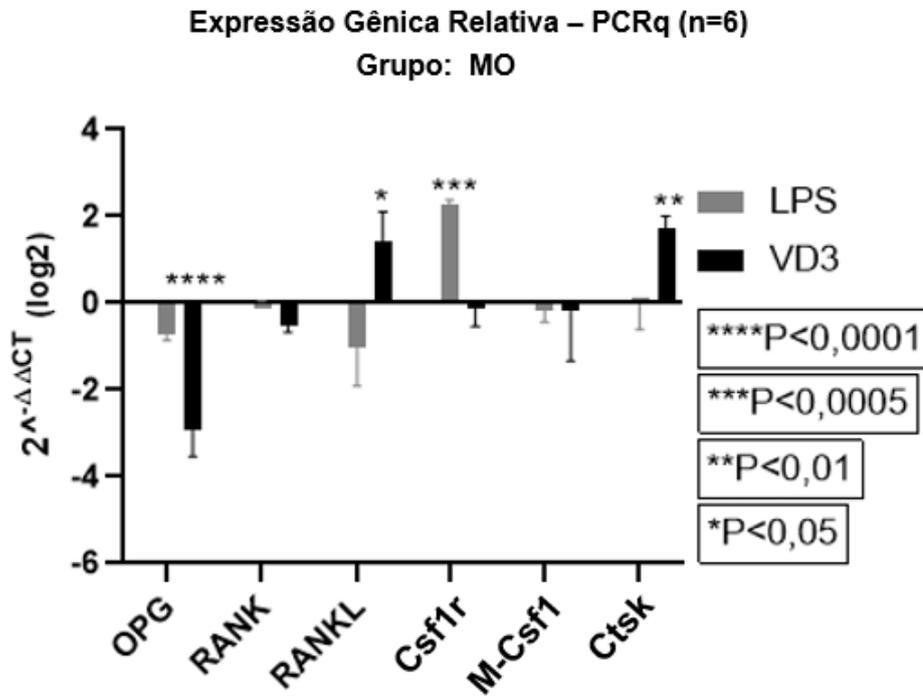
Figura 5.4 - Expressão relativa dos genes *Csf1r* (A) e *Ctsk* (B) pelo método do CT comparativo ($\log_2^{-\Delta\Delta CT}$) em células OD e MO tratadas com LPS ou VD3 por 6 dias. A expressão gênica do subgrupo CON-mo (amostra de referência) é representada pela linha horizontal em zero. Asteriscos com intervalo = comparação entre subgrupos; asteriscos sem intervalo = comparação com amostra de referência (subgrupo CON-mo)



Fonte: O autor.

O tratamento das células MO com LPS induziu um aumento significativo na expressão do gene *Csf1r*, mas não alterou significativamente a expressão de outros genes característicos das células clásticas após 6 dias de indução. Já o tratamento com VD3 induziu redução significativa do gene *OPG* e aumento significativo dos genes *RANKL* e *Ctsk* em relação à amostra de referência (subgrupo CON-mo) (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Expressão relativa de genes característicos de células clásticas, calculada pelo método do CT comparativo ($\log_2^{-\Delta\Delta CT}$) em células MO tratadas com LPS ou VD3 por 6 dias. Comparações feitas em relação ao subgrupo CON-mo, representado pela linha horizontal em zero



Fonte: O autor.

Portanto, no grupo MO, todos os genes alvo utilizados no estudo apresentaram amplificação.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que as células MDPC-23 não se diferenciam em odontoclastos frente ao estímulo com LPS ou calcitriol. Apesar da expressão de duas citocinas importantes para diferenciação clástica diante dos tratamentos, a ausência de células clásticas no ensaio citoquímico TRAP sugere que a linhagem estudada tenha limitação na sua diferenciação nesse tipo de células.

O fator estimulador de colônia de macrófagos (M-Csf1), secretado por osteoblastos e o ativador do receptor ligante NF-kB (RANKL), expresso em osteoblastos, osteócitos, células dendríticas maduras, células T e precursores hematopoiéticos, são as duas citocinas essenciais que conduzem a diferenciação, proliferação, ativação e sobrevivência das células clásticas (Marino et. al., 2014).

Alguns relatos da literatura sugerem que as células MDPC-23 poderiam gerar células multinucleadas TRAP-positivas após a indução por RANKL e M-Csf1 (Duan et. al., 2013), ou LPS (Li et. al., 2017). Diante disso, questionamentos foram levantados a respeito da capacidade indiferenciada dessa linhagem, da origem das células clásticas e seu surgimento na polpa dentária.

Conhecidos na literatura como estimuladores da reabsorção óssea, o LPS e o calcitriol induzem a diferenciação in vitro das células clásticas através de receptores diferentes, porém a principal via direta ou indireta para sua ativação ainda é considerada a via RANK-RANKL. Assim, o presente estudo avaliou, in vitro, duas linhagens celulares de origens diferentes, as células MDPC-23 (pré-odontoblastos) e células da medula óssea de camundongos Balb-c, as duas expostas ao LPS e ao calcitriol, investigando a influência desses tratamentos na odontoclastogênese.

Através do ensaio de MTT, verificamos que os tratamentos não causaram distúrbios no metabolismo, portanto, na viabilidade celular das culturas. Contudo, a marcação para TRAP, presente apenas nas células MO tratadas com LPS e calcitriol confirma a necessidade da presença tanto de precursores de células clásticas (origem monocítica), como de células blásticas (células estromais ou suas citocinas produzidas), para que ocorra a clastogênese, independente da região mineralizada a ser reabsorvida (Holliday et al., 1995; Uchiyama et al., 2009; Cong et al., 2015; Suda et al., 2002).

Na cultura de células da medula óssea induzidas por 6 dias com calcitriol, ocorreu a supressão gênica do inibidor da clastogênese, OPG, cuja expressão ficou diminuída em 6 vezes, enquanto as expressões de RANKL e Ctsk aumentaram significativamente em relação ao controle. Esses achados confirmam as fases e estágios da clastogênese descritos por Marino e colaboradores (2014). Em contraste, na ausência de fatores indutores, todos os genes alvo foram expressos, porém em equilíbrio homeostático, não havendo ativação da clastogênese e, conseqüentemente, não havendo produção da TRAP. Assim, devido à expressão equilibrada dos genes estudados, o subgrupo CON-mo foi escolhido para comparação com os tratamentos.

Ainda no grupo MO, o tratamento com LPS teve diferença significativa somente para o gene alvo *Csf1r*. No restante dos genes foi detectada sua expressão, mas sem diferença estatística em relação ao grupo sem tratamento. Observamos no ensaio para TRAP que o tratamento de 6 dias com LPS, apresentou células gigantes em menor quantidade quando comparadas ao tratamento com calcitriol. É possível então, que nesta fase, as células apresentem um estágio tardio (atrasado) da clastogênese em relação às induzidas com a vitamina D3. Por este motivo, temos ainda a expressão do gene alvo *Csf1r* aumentada significativamente. Como o receptor para M-CSF1 é um dos protagonistas no início do processo de diferenciação das células clásticas, é possível que se o tratamento fosse estendido por mais dias, poderiam aumentar as expressões do restante dos genes escolhidos. Seria necessário, portanto, um estudo detalhando as fases da clastogênese (como o de Marino e colaboradores em 2014) quando usamos LPS como indutor na concentração empregada no presente estudo.

Podendo se diferenciar apenas em células derivadas de sua camada germinativa, as células da papila dentária são células ectomesenquimais, as quais devem sua denominação por aparecerem em regiões específicas do crânio e da face, após a migração de células da crista neural, as quais têm origem ectodérmica. Essas células, apesar da sua origem, comportam-se como células mesenquimais multipotentes, ou seja, possuem capacidade de diferenciação limitada a células de natureza conjuntiva. Por outro lado, a diferenciação em tecidos de uma camada diferente da sua origem embrionária, quando ocorre, recebe o nome de transdiferenciação e deve ser considerado como um evento tópico (local) e com

significado biológico limitado (Barzilay et. al., 2009). Assim, a transdiferenciação celular é um evento singular e ectópico (ocorrendo em alguns tecidos específicos), fenômeno que não foi verificado na linhagem MDPC-23 do presente estudo, pois não foram encontradas células clásticas TRAP-positivas nem células morfológicamente semelhantes às mesmas. Em concordância, observamos também ausência da amplificação para a maioria dos genes alvos estudados, com exceção dos genes *Csf1r* e *CtsK*.

O tratamento com LPS ou calcitriol induziu o aumento da expressão dos genes supracitados nas células MDPC-23 ao compararmos com próprio subgrupo CON-od, porém, não significativamente diferente da amostra de referência. Desse modo, em ambos os tratamentos, as células MDPC-23 passam a expressar semelhante à amostra de referência, com diferença estatística altamente significativa em relação ao subgrupo CON-od. Contudo, mesmo diante das expressões significativas mencionadas, a diferença morfológica apresentada e a ausência da enzima TRAP observadas no ensaio citotóxico dão a certeza que a linhagem MDPC-23 não se diferenciou e tampouco se comportou como células clásticas.

Quanto à expressão aumentada para a catepsina k, presente nos ensaios da linhagem, acredita-se que seja devida à capacidade migratória das células da papila dentária, degradando matriz extracelular e alcançando as regiões onde haja a necessidade da síntese de um tecido mineralizado. Em nível molecular, a catepsina é a principal peptidase envolvida na remodelação óssea por osteoclastos, devido à capacidade de clivar em múltiplas regiões a tripla-hélice das moléculas de colágeno (Novinec & Lenarčič, 2013), as quais constituem o maior componente da matriz orgânica do osso e da dentina.

A expressão gênica do *Csf1r* (e por conseguinte a produção e ativação do receptor) controla, desenvolve e desempenha papéis importantes na imunidade inata, regulando o desenvolvimento da maioria dos macrófagos, osteoclastos, células de Langerhans da pele, células de Paneth no intestino delgado e células da microglia no cérebro. (Stanley e Chitu 2014). É possível que o gene *Csf1r* tenha sido expresso para regular mudanças celulares frente aos tratamentos com calcitriol e LPS (endotoxina pró-inflamatória).

Porém, somente a expressão gênica da proteína não significa síntese e secreção da mesma, nem a sua ativação. Contudo, ainda que produzidas e

ativadas, tais alterações conformacionais seriam em direção a células sintetizadoras de tecidos mineralizados, uma vez que o mesmo tratamento com calcitriol a 10^{-8} M reportou aumento de expressão de osteocalcina e osteopontina, além de proteínas dentinárias específicas (Sun et. al., 1998). Da mesma forma, frente à exposição ao LPS nos parâmetros utilizados no presente estudo, as células MDPC-23, que futuramente iriam se diferenciar em odontoblastos e produzir dentina terciária como forma protetiva da polpa diante da endotoxina, aumentam sua expressão angiogênica para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Botero et.al., 2003) e possivelmente facilitando a chegada das células de defesa na região afetada.

Os resultados do presente modelo *in vitro* apontam para a permanência do alto grau de incertezas sobre a patogênese das reabsorções internas idiopáticas. Contudo, a via OPG / RANKL / RANK ainda é a principal responsável pela diferenciação dos odontoclastos a partir das células monocíticas (Ohazama et al. 2004; Patel et al. 2010). A detecção precoce e um diagnóstico diferencial correto são essenciais nesse tipo de reabsorção e, até o momento, o tratamento de canal radicular continua sendo o único tratamento de escolha em dentes com diagnóstico de reabsorção radicular interna. Isso pode ser devido, em parte, à rara ocorrência deste tipo de reabsorção e a falta de um modelo *in vivo* para reproduzir as condições para o estudo.

Em suma, considerando a ausência de células clásticas no ensaio citoquímico (TRAP), o presente estudo sugere que ambos os tratamentos direcionariam as células MDPC-23 para produção de tecido mineralizado e não para a reabsorção do mesmo, ao contrário das células da medula óssea, que são induzidas para a diferenciação em células que reabsorvem tecido mineralizado. Ainda assim, mais estudos são necessários para confirmação da presença das proteínas cujas expressões se apresentaram aumentadas e para elucidar sua atuação celular sob os tratamentos.

7 CONCLUSÕES

Diante dos parâmetros utilizados no presente estudo, é possível concluir que:

A linhagem celular MDPC-23, sob indução do LPS e do calcitriol, não foi capaz de se diferenciar em células clásticas, diferentemente das células da medula óssea que foram marcadas positivamente com TRAP;

A linhagem celular MDPC-23 é morfologicamente diferente das células da medula óssea e dos precursores de células clásticas, previamente e depois da indução com LPS e calcitriol;

A linhagem celular MDPC-23 não apresentou amplificação gênica para a maioria dos genes alvos escolhidos e relacionados com a clastogênese, enquanto a expressão desses genes pelas células da medula óssea foi evidente.

REFERÊNCIAS¹

Arana-Chavez VE, Andia-Merlin RY. Scanning electron microscopy examination of resorbing enamel surfaces in unexfoliated primary molar teeth. *J Dent Child*. 1998. May-Jun. 65: 182 -5.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009. Mar. 41:446-50. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.007.

Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;36(8):1367-73. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.006.

Augello A, Kurth TB, De BC. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*. 2010. Sep;20:121–133. doi: 10.22203/ecm.v020a11.

Bailleul-Forestier I, Davideau JL, Papagerakis P, Noble I, Nessmann C, Peuchmaur M, et al. Immunolocalization of Vitamin D Receptor and Calbindin-D28k in Human Tooth Germ. *Pediatr Res*. 1996. Apr;39,636–642. doi: 10.1203/00006450-199604000-00013.

Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of cellular biochemistry*. 2007. Dec;102(5),1130–1139. <https://doi.org/10.1002/jcb.21553>.

Barzilay R, Melamed E, Offen D. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells*. 2009. Oct;27:2509– 15. doi: 10.1002/stem.172.

Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015. Nov;80:14-8. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.035.

Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013. Oct;92(10):860-7. doi: 10.1177/0022034513500306.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

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

Botero TM, Mantellini MG, Song W, Hanks CT, Nör JE. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. *Eur J Oral Sci*. 2003. Jun;111(3):228-34. doi: 10.1034/j.1600-0722.2003.00041.x.

Bronner ME, Simões-Costa M. The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Curr Top Dev Biol*. 2016. Jan;116:115-34. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.12.003.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997. Feb;64:278–94. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278:aid-jcb11>3.0.co;2-f.

Cong L, Zhang C, Tu G. Osteoblastic NF- κ B pathway is involved in $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced osteoclast-like cells formation in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015. May;1;8(5):5988-96.

Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*. 1999. Nov;15(6):434-41. doi: 10.1016/s0109-5641(99)00071-8.

Daley GQ. Stem cells: roadmap to the clinic. *J Clin Invest*. 2010. Jan;120:8–10. doi: 10.1172/JCI41801.

De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev*. 2010. Dec;6:633–649. doi: 10.1007/s12015-010-9170-1.

Donovan MF, Cascella M. Embryology, Weeks 6-8. 2020. Oct. 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. Jan; PMID: 33085328. Bookshelf ID: NBK563181.

Duan X, Yang T, Zhang Y, Wen X, Xue Y, Zhou M. Odontoblast-like MDPC-23 cells function as odontoclast with RANKL-M-CSF induction. *Archives of Oral Biology*. 2013. Mar .58: 272 -78. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.05.014.

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

Faria LP. Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo *in vitro* [Tese - Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021.

Ferreira I, Laranjo M, Marto CM, Casalta-Lopes J, Serambeque B, Gonçalves AC, et al. GuttaFlow® Bioseal Cytotoxicity Assessment: In Vitro Study. Basel, Switzerland: *Molecules.* 2020. Sep;25(18), 4297. doi: 10.3390/molecules25184297.

Ferretti E, Hadjantonakis AK. Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues. *Curr Opin Cell Biol.* 2019. Dec. 61: 110-6. doi: 10.1016/j.ceb.2019.07.012.

Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect. Tissue Res.* 1998. 37(3-4):233-49. doi: 10.3109/03008209809002442.

Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J. Oral Sci.* 2007. Mar;49:1–12. doi: 10.2334/josnurd.49.1.

Holliday LS, Dean AD, Greenwald JE, Gluck SL. C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulates mouse bone marrow cultures. *J Biol Chem.* 1995. Aug. 270: 18983-9. doi: 10.1074/jbc.270.32.18983.

Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, Kudo Y, Ao M, Ishikado A, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bovine lactoferrin on lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2012. Jul;287,23527–36. doi: 10.1074/jbc.M111.324673.

Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Takami M, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol.* 2003. Apr;170,3688–95. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3688.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral: texto, atlas, correções clínicas.* 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013. Dec;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615.

Krishnamurthy A, Ytterberg AJ, Sun M, Sakuraba K, Steen J, Joshua V, et al. Citrullination Controls Dendritic Cell Transdifferentiation into Osteoclasts. *J Immunol*. 2019. Jun. 1;202(11):3143-50. doi: 10.4049/jimmunol.1800534.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998. Apr;93(2):165-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x.

Lau YS, Danks L, Sun SG, Fox S, Sabokbar A, Harris A, et al. RANKL-dependent and RANK-independent mechanisms of macrophage-osteoclast differentiation in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007. Sep;105:7-16. doi: 10.1007/s10549-006-9438-y.

Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol*. 2000. Mar;19(2):107-20. doi: 10.1016/s0945-053x(00)00052-4.

Li C, Qi WT, Jiang HW. Odontoclastogenesis of mouse papilla-derived MDPC-23 cells induced by lipopolysaccharide. *Int Endod J*. 2018. Feb;51 Suppl 2: e 115-e124. doi: 10.1111/iej.12771.

Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*. 2002. Jul;71:45-52. doi: 10.1007/s00223-001-2086-7.

Magalhães WLE, Thá EL, Leme DM. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. 1ª Ed. Versão digital; Paraná: Embrapa; 2018. Comunicado técnico 427. Acesse: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>.

Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep*. 2014. Sep;10;3:570. doi: 10.1038/bonekey.2014.65.

Marone M, De Ritis D, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, et al. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma*. 2002. Mar;43(3):493-501. doi: 10.1080/10428190290011967.

McMichael BK, Kotadiya P, Singh T, Holliday LS, Lee BS. Tropomyosin isoforms localize to distinct microfilament populations in osteoclast. *Bone*. 2006. Oct;39:694-705. doi: 10.1016/j.bone.2006.04.031.

Mizutani H, Ishihara Y, Izawa A, Fujihara Y, Kobayashi S, Gotou H, et al. Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* upregulates inflammatory cytokines, prostaglandin E2 synthesis and osteoclast formation in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Periodont. Res*. 2013. Dec;48:748-56. doi: 10.1111/jre.12065.

Moody GH, Muir KF. Multiple idiopathic root resorption. A case report and discussion of pathogenesis. *J Clin Periodontol* 1991. Sep;18(8):577-80. doi: 10.1111/j.1600-051x.1991.tb00092.x.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983. Dec;16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Muhr J, Ackerman KM. Embryology, Gastrulation. 2020 Apr 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 32119281. Access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554394/>.

Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*. 2013. Sep;394(9):1163-79. doi: 10.1515/hsz-2013-0134.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *Journal of Dental Research*. 2004. Mar;83;3:241-4. doi: 10.1177/154405910408300311.

Park JH, Kwon SM, Yoon HE, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH. Lipopolysaccharide promotes adhesion and migration of murine dental papilla-derived MDPC-23 cells via TLR4. *Int J Mol Med*. 2011.Feb;27(2):277-81. doi: 10.3892/ijmm.2010.568.

Patel S, Ricucci D, Durak C, Tay F. Internal root resorption: a review. *J Endod*. 2010. Jul;36(7):1107-21. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.014.

Prummel KD, Nieuwenhuize S, Mosimann C. *Development*. 2020. Jun. 19;147(12): dev 175059. doi: 10.1242/dev.175059.

Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2000. Mar;3:145-52. doi: 10.1006/mcbr.2000.0205.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Poniewierska A, Suszynska M, Ratajczak J. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci*. 2012. Jun;57:1–17. doi: 10.2478/v10039-012-0020-z.

Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood*. 2004. Dec;15;104(13):4029-37. doi: 10.1182/blood-2004-01-0041.

Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001.19(6):477-82. doi: 10.1634/stemcells.

Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell and Tissue Research*. 1994. Jul;277(1):19-26. doi: 10.1007/BF00303076.

Scheven BA, Kawilarang-De Haas EW, Wassenaar AM, Nijweide PJ. Differentiation kinetics of osteoclasts in the periosteum of embryonic bones in vivo and in vitro. *Anat Rec*. 1986. Apr;214(4):418-23. doi: 10.1002/ar.1092140413.

Shuto T, Jimi E, Kukita T, Hirata M, Koga T. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor suppresses lipopolysaccharide-induced osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*. 1994. Feb;134, 831–7. doi:10.1210/endo.134.2.8299579.

Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001. 12(5):425-37. doi: 10.1177/10454411010120050501.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol*. 2000. Oct;24:99-126. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240106.x.

Stanley ER, Chitu V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014. Jun;2;6(6):a021857. doi: 10.1101/cshperspect.a021857.

Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM, Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. *Journal of Cellular Physiology*. 2002. Jan;190,101–8. doi: 10.1002/jcp.10041.

Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bègue-Kirn C, Wataha JC, et al. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connec. Tissue Res.* 1998. 37:251-61. doi: 10.3109/03008209809002443.

Taylor LM, Tertinegg I, Okuda A, Heersche JN. Expression of calcitonin receptors during osteoclast differentiation in mouse metatarsals. *J Bone Miner Res.* 1989. Oct;4(5):751-8. doi: 10.1002/jbmr.5650040515.

Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int.* 2003. Sep; 34(8):613-20.

Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998.May;10:515–22.

Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N, et al. Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclastic differentiation. *Journal of Dental Research.* 2009. Jul;88(7):609-14. doi: 10.1177/0022034509340008.

Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012. Jul;1;523(1):123-33. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001.

Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T. Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *J Bone Miner Metab.* 2006. 24:355-8. doi: 10.1007/s00774-006-0697-9.

Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab.* 2021. Jan;p3. doi: 10.1007/s00774-020-01175-1.

Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: Functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010. May;42:576-9. doi: 10.1016/j.biocel.2009.12.018.

APÊNDICE A – TESTE MTT – GRUPO OD: ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Table Analyzed MTT TD GRUPOS BLK
Data sets analyzed A-D

ANOVA summary

F 20.75
P value <0.0001
P value summary ****
Significant diff. among means (P < 0.05)? Yes
R squared 0.7054

Brown-Forsythe test

F (DFn, DFd) 1.934 (3, 26)
P value 0.1488
P value summary ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)? No

Bartlett's test

Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary
Are SDs significantly different (P < 0.05)?

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0.01076	3	0.003586	F (3, 26) = 20.75	P<0.0001
Residual (within columns)	0.004494	26	0.0001728		
Total	0.01525	29			

Data summary

Number of treatments (columns) 4
Number of values (total) 30

Number of families 1
Number of comparisons per family 3
Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
CON-mdpc-23 vs. LPS-mdpc-23	-0.006889	-0.02245 to 0.008675	No	ns 0.5740 B LPS-mdpc-23
CON-mdpc-23 vs. VD3-mdpc-23	0.009333	-0.006231 to 0.02490	No	ns 0.3356 C VD3-mdpc-23
CON-mdpc-23 vs. NC-DEATH	0.06033	0.03832 to 0.08234	Yes ****	<0.0001 D NC-DEATH

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
CON-mdpc-23 vs. LPS-mdpc-23	0.05733	0.06422	-0.006889	0.006197	9	9	1.112	26
CON-mdpc-23 vs. VD3-mdpc-23	0.05733	0.04800	0.009333	0.006197	9	9	1.506	26
CON-mdpc-23 vs. NC-DEATH	0.05733	-0.003000	0.06033	0.008764	9	3	6.884	26

APÊNDICE B – TESTE MTT- GRUPO MO: ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Table Analyzed MTT TD GRUPOS BLK
Data sets analyzed E-H

ANOVA summary

F 40.49
P value <0.0001
P value summary ****
Significant diff. among means (P < 0.05)? Yes
R squared 0.8237

Brown-Forsythe test

F (DFn, DFd) 1.396 (3, 26)
P value 0.2663
P value summary ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)? No

Bartlett's test

Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary
Are SDs significantly different (P < 0.05)?

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value		
Treatment (between columns)	0.008246	3	0.002749	3	0.002749	F (3, 26) = 40.49	P<0.0001
Residual (within columns)	0.001765	26	6.789e-005	26	6.789e-005		
Total	0.01001	29					

Data summary

Number of treatments (columns) 4
Number of values (total) 30

Number of families 1
Number of comparisons per family 3
Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
CON-mo vs. LPS-mo	-0.01856	-0.02831 to -0.008801	Yes ***	0.0002 F LPS-mo
CON-mo vs. VD3-mo	-0.006222	-0.01598 to 0.003532	No ns	0.2884 G VD3-mo
CON-mo vs. NC-DEATH	0.04133	0.02754 to 0.05513	Yes ****	<0.0001 H NC-DEATH

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
CON-mo vs. LPS-mo	0.03733	0.05589	-0.01856	0.003884	9	9	4.777	26
CON-mo vs. VD3-mo	0.03733	0.04356	-0.006222	0.003884	9	9	1.602	26
CON-mo vs. NC-DEATH	0.03733	-0.004000	0.04133	0.005493	9	3	7.525	26

APÊNDICE C – PCRQ: ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA GENE ALVO CTSK

Table Analyzed CK - duplic

Two-way ANOVA Ordinary
Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	35.44 0.0008 ***	Yes		
Row Factor	46.81 0.0004 ***	Yes		
Column Factor	14.13 0.0029 **	Yes		

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	61.61	2	30.81	F (2, 6) = 29.36	P=0.0008
Row Factor	81.38	2	40.69	F (2, 6) = 38.78	P=0.0004
Column Factor	24.56	1	24.56	F (1, 6) = 23.41	P=0.0029
Residual	6.295	6	1.049		

Difference between column means

Mean of MDPC-23	-2.300
Mean of MO	0.5611
Difference between means	-2.861
SE of difference	0.5914
95% CI of difference	-4.308 to -1.414

Data summary

Number of columns (Column Factor)	2
Number of rows (Row Factor)	3
Number of values	12

Compare cell means regardless of rows and columns

Number of families	1
Number of comparisons per family	15
Alpha	0.05

Holm-Šidák's multiple comparisons test	Mean Diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
CON:MDPC-23 vs. CON:MO	-9.088 Yes	**	0.0014
CON:MDPC-23 vs. LPS:MDPC-23	-10.62 Yes	***	0.0007
CON:MDPC-23 vs. LPS:MO	-9.053 Yes	**	0.0014
CON:MDPC-23 vs. VD3:MDPC-23	-9.741 Yes	**	0.0010
CON:MDPC-23 vs. VD3:MO	-10.81 Yes	***	0.0006
CON:MO vs. LPS:MDPC-23	-1.534 No	ns	0.7888
CON:MO vs. LPS:MO	0.03450 No	ns	0.9813
CON:MO vs. VD3:MDPC-23	-0.6531 No	ns	0.9500
CON:MO vs. VD3:MO	-1.718 No	ns	0.7734
LPS:MDPC-23 vs. LPS:MO	1.568 No	ns	0.7888
LPS:MDPC-23 vs. VD3:MDPC-23	0.8805 No	ns	0.9360
LPS:MDPC-23 vs. VD3:MO	-0.1843 No	ns	0.9813
LPS:MO vs. VD3:MDPC-23	-0.6876 No	ns	0.9500
LPS:MO vs. VD3:MO	-1.752 No	ns	0.7734
VD3:MDPC-23 vs. VD3:MO	-1.065 No	ns	0.9163

APÊNDICE D – PCRQ: ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA GENE ALVO CSF1R

Table Analyzed MSC-R duplic

Two-way ANOVA Ordinary
Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	29.04	<0.0001 ****	Yes	
Row Factor	50.18	<0.0001 ****	Yes	
Column Factor	20.43	<0.0001 ****	Yes	

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	23.78	2	11.89	F (2, 6) = 254.1	P<0.0001
Row Factor	41.08	2	20.54	F (2, 6) = 439.0	P<0.0001
Column Factor	16.73	1	16.73	F (1, 6) = 357.5	P<0.0001
Residual	0.2807	6	0.04679		

Difference between column means

Mean of MDPC-23	-1.633
Mean of MO	0.7285
Difference between means	-2.361
SE of difference	0.1249
95% CI of difference	-2.667 to -2.056

Data summary

Number of columns (Column Factor)	2
Number of rows (Row Factor)	3
Number of values	12

Compare cell means regardless of rows and columns

Number of families	1
Number of comparisons per family	15
Alpha	0.05

Holm-Šidák's multiple comparisons test	Mean Diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
CON:MO vs. CON:MDPC-23	6.006	Yes ****	<0.0001
LPS:MDPC-23 vs. CON:MDPC-23	6.371	Yes ****	<0.0001
LPS:MO vs. CON:MDPC-23	8.298	Yes ****	<0.0001
VD3:MDPC-23 vs. CON:MDPC-23	6.748	Yes ****	<0.0001
VD3:MO vs. CON:MDPC-23	5.900	Yes ****	<0.0001
LPS:MDPC-23 vs. CON:MO	0.3651	No ns	0.3455
LPS:MO vs. CON:MO	2.292	Yes ***	0.0004
VD3:MDPC-23 vs. CON:MO	0.7423	No ns	0.0678
VD3:MO vs. CON:MO	-0.1063	No ns	0.6407
LPS:MO vs. LPS:MDPC-23	1.927	Yes ***	0.0009
VD3:MDPC-23 vs. LPS:MDPC-23	0.3773	No ns	0.3455
VD3:MO vs. LPS:MDPC-23	-0.4713	No ns	0.2589
VD3:MDPC-23 vs. LPS:MO	-1.549	Yes **	0.0026
VD3:MO vs. LPS:MO	-2.398	Yes ***	0.0003
VD3:MO vs. VD3:MDPC-23	-0.8486	Yes *	0.0458

APÊNDICE E – PCRQ: ANÁLISES ESTATÍSTICAS – GRUPO MO

Table Analyzed MO

Two-way ANOVA Ordinary
Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	60.35 <0.0001 ****	Yes		
Row Factor	24.62 <0.0001 ****	Yes		
Column Factor	4.942 0.0152 *	Yes		

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	37.34	12	3.112	F (12, 21) = 10.47	P<0.0001
Row Factor	15.23	6	2.539	F (6, 21) = 8.542	P<0.0001
Column Factor	3.058	2	1.529	F (2, 21) = 5.144	P=0.0152
Residual	6.242	21	0.2972		

Data summary

Number of columns (Column Factor)	3
Number of rows (Row Factor)	7
Number of values	42

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families	7
Number of comparisons per family	2
Alpha	0.05

Holm-Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff.	Below threshold?	Summary Adjusted P Value
OPG			
CTRL vs. LPS	0.7334 No	ns	0.1929
CTRL vs. VD3	2.900 Yes	****	<0.0001
RANK			
CTRL vs. LPS	-0.04333 No	ns	0.9374
CTRL vs. VD3	0.5265 No	ns	0.5712
RANKL			
CTRL vs. LPS	1.027 No	ns	0.0736
CTRL vs. VD3	-1.420 Yes	*	0.0329
TRAP			
CTRL vs. LPS	-1.107 No	ns	0.0552
CTRL vs. VD3	2.476 Yes	***	0.0004
MSC-R			
CTRL vs. LPS	-2.292 Yes	***	0.0008
CTRL vs. VD3	0.1063 No	ns	0.8474
MSC			
CTRL vs. LPS	0.1722 No	ns	0.9290
CTRL vs. VD3	0.1881 No	ns	0.9290
CK			
CTRL vs. LPS	0.03450 No	ns	0.9501
CTRL vs. VD3	-1.718 Yes	**	0.0096

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Tel. (11) 3091 7842

ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo comparativo da clastogênese entre células MDPC-23 e células indiferenciadas da medula óssea de camundongos.", registrada com o nº 004/2018, sob a responsabilidade de Victor Elias Arana-Chavez, Tais Carvalho de Oliveira, Elisângela Chinen e Lorraine Perciliano de Faria que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 05/03/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/03/2018 A 05/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Balb-c
Nº de animais	80
Peso/Idade	23g / 30 dias
Sexo	Masculino/Feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina da USP

São Paulo, 07 de março de 2018.

 Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
 Coordenador do CEUA-FOUSP

