

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - PATOLOGIA BUCAL

DIEGO NASCIMENTO

CISTOGÊNESE: DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE ESTUDO *IN VITRO*

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - PATOLOGIA BUCAL

DIEGO NASCIMENTO

CISTOGÊNESE: DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE ESTUDO *IN VITRO*

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final à obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho e, principalmente, da minha formação pessoal e profissional. Palavras não são suficientes para demonstrar a gratidão e o carinho que sinto por todas elas. Espero ter sido capaz de agradecer durante todos os dias de convívio com cada um através de pequenos gestos e, sobretudo, respeito e educação.

Buscando formalizar esse sentimento de gratidão, registro essas palavras de agradecimento especial aos meus pais, Gisley e Sergio, por serem pais carinhosos e atentos, terem fornecido excelentes oportunidades de educação, incentivado minhas escolhas, além de ensinar valores de bondade e respeito. À minha irmã, Lelis, um dos meus portos seguros, agradeço pelo carinho diário e inacabável, pelo sorriso sincero e por ser uma das pessoas que mais comemora minhas conquistas. Ainda, posso considerar-me um homem de sorte, uma vez que desde que nasci a vida vem permitindo o convívio com a Neide, pessoa a quem considero uma segunda mãe. A ela fica o agradecimento por oferecer o carinho e amor que uma mãe demonstra por um filho.

À minha querida esposa, Nina, torna-se quase impossível a tarefa de agradecer através de palavras. Seu incentivo, apoio e paciência diários foram determinantes para a conclusão de mais essa etapa. À Nina agradeço imensamente pelo carinho, companheirismo e pela alegria de compartilhar todos os momentos da minha vida.

Externo minha gratidão à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de formação, à Faculdade de Odontologia, aos professores de Estomatologia e Patologia Bucal da Universidade, e aos integrantes da banca examinadora desse trabalho. Em especial, agradeço ao meu orientador, professor Pantelis Varvaki Rados, por ter me recebido de braços abertos como seu orientando e pelos seus inesquecíveis ensinamentos ao longo dos dois últimos anos. À professora Lisiane Bernardi, pessoa fundamental para a realização desse trabalho, sou imensamente grato pela sua disponibilidade, paciência e por todas as orientações. Ainda, é muito importante direcionar um

profundo agradecimento à futura colega e amiga Luiza Meurer Brand, bolsista de Iniciação Científica, por ter participado ativamente no desenvolvimento desse estudo, e com quem compartilhei alegrias e frustrações durante a elaboração do mesmo.

A todos os demais familiares, amigos e colegas que sempre me apoiaram e incentivaram, muito obrigado pelo carinho.

RESUMO

Os cistos inflamatórios são comuns na clínica odontológica. Sua patogenia está associada a infecção dos canais radiculares gerando resposta inflamatória frente ao desafio de inibir a proliferação microbiana. O tratamento preconizado é a desinfecção do sistema de canais radiculares através da terapia endodôntica. Contudo, a lesão pode persistir mesmo após estabelecido o tratamento. Os mecanismos envolvidos na origem e manutenção do cisto inflamatório não estão completamente esclarecidos. Em busca de novas evidências, o objetivo do presente estudo é aprimorar um modelo *in vitro* de cistogênese, desenvolvido previamente pelo nosso grupo de pesquisa.. Um total de 1×10^5 células HaCaT foram utilizadas para formar esferoides em placas tratadas com agarose de baixa fusão. Após 24 horas, os esferoides foram coletados, embebidos em colágeno não polimerizado (grupo HaCat), ou associados a 1×10^5 fibroblastos (grupo HaCat + hFIB), ou ainda associados a 1×10^5 fibroblastos e 1×10^5 leucócitos coletados do sangue humano periférico (grupo HaCat + hFIB + LEUK) e transferidos individualmente para placas de 24 poços. Os grupos experimentais de esferoides foram mantidos assim por um período de até 7 dias. Diferentes concentrações de fibroblastos (4×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5) foram utilizadas para identificar qualitativamente a melhor concentração a ser adotada. Foram capturadas imagens dos 3 grupos nos dias 1, 3, 5 e 7. O software ImageJ foi utilizado para análise da integridade e área de cada esferoide. Para comparação dos dados, o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi utilizado e o teste One Way Anova aplicado ($p < 0.05$). Os grupos HaCat + hFIB e HaCat + hFIB + LEUK, além de não apresentarem dispersão significativa das células, mostraram manutenção estrutural dos esferoides em todos os dias observados, enquanto o grupo HaCat mostrou dispersão após 7 dias ($p < 0.05$). Portanto, o modelo de cistogênese proposto no presente estudo a partir do grupo HaCat + hFIB + LEUK aproxima as características observadas *in vitro* e *in vivo*. Novas pesquisas abordando a origem dos cistos inflamatórios utilizando nosso modelo podem ser realizadas visando ampliar o conhecimento do tema.

Palavras-chave: matriz de colágeno 3D, modelo cístico, cistogênese, cisto inflamatório, esferoides, microambiente cístico.

ABSTRACT

Inflammatory cysts are common in dental practice. Pathogeny is established as consequence of infection in root canal system when an inflammatory response takes place due to the challenge of inhibit bacterial aggression. Treatment aims disinfection of root channels and endodontic obturation. However, some inflammatory cysts persist even after treatment establishment. Mechanisms evolved in cystic origin and maintenance are not completely understood. Searching new evidence, the present study aims improve a cystogenesis model previously published by our research group. A total of 1×10^5 cells were used to form spheroid structures on agarose treated plates. After 24 hours, spheroids were collected and embedded in 600 μL polymerized collagen (HaCat group) or associated to 1×10^5 hFIB cells (HaCat + hFIB group) or 1×10^5 hFIB cells and 1×10^5 human peripheral blood leukocytes (HaCat + hFIB + LEUK group). Then, they were transferred to a 24 wells plate for a period up to 7 days. Different number of fibroblasts (4×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5) was used to determine the ideal concentration to associate to collagen matrix. Images of spheroids from 3 groups were captured in day 1, 3, 5 and 7. ImageJ software was used to analyze the integrity and area of each spheroid. To data comparison, GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA) was used and the One Way Anova test applied ($p < 0.05$). HaCat + hFIB and HaCat + hFIB + LEUK groups showed no cell dispersion and maintenance of spheroids integrity, while HaCaT group demonstrate cell dispersion after 7 days ($p < 0.05$). Therefore, cystogenesis model proposed in this study using HaCat + hFIB + LEUK group approximate *in vitro* to *in vivo* conditions. Exploring our model, new researches about origin of inflammatory cysts should be conducted aiming the improvement of actual knowledge.

Keywords: 3D collagen matrix, cyst model, cystogenesis, radicular cyst, spheroid, cyst microenvironment

Sumário

1. REFERENCIAL TEÓRICO	8
1.1 TEORIAS DA FORMAÇÃO DO CISTO INFLAMATÓRIO	9
1.1.1 Teoria da Pressão Osmótica	9
1.1.2 Teoria do Abscesso	10
1.1.3 Teoria da Fusão de Cordões Epiteliais	10
1.2 RESPOSTA CELULAR E A LESÃO CÍSTICA	11
1.3 MODELOS DE ESTUDO <i>IN VITRO</i> COM ESFEROIDES	16
2. OBJETIVO	18
3. ARTIGO 1.....	19
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	19
5. PERSPECTIVAS.....	19
REFERÊNCIAS.....	21

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As lesões periapicais inflamatórias são patologias frequentemente observadas na clínica odontológica (Philippi et al., 2003). Um levantamento realizado no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, compreendendo os anos de 1995 a 2004, demonstrou que 63,24% das lesões diagnosticadas foram de origem inflamatória e, dessas, 28,28% representaram lesões periapicais (Mendez et al., 2012). Microscopicamente, tais lesões são classificadas em abscessos, granulomas ou cistos periapicais (Nair et al., 1996).

Os cistos periapicais, também denominados cistos inflamatórios, são os cistos mais comuns nos ossos maxilares (Regezi et al., 2008; Johnson et al., 2014). São lesões que se originam a partir da infecção dos canais radiculares levando o organismo a promover resposta inflamatória frente ao desafio de impedir a proliferação microbológica. Radiograficamente, é observada imagem radiolúcida arredondada situada no periápice do dente de origem, podendo apresentar forma achatada quando atinge maiores proporções. A perda da lâmina dura e a possível reabsorção radicular complementam as características radiográficas (Neville et al., 2009).

Exceto em fases de agudização em processos crônicos, após estabelecidas, essas lesões não causam sintomatologia dolorosa, já que, uma vez que o tecido pulpar tenha passado por processo de necrose, os testes de sensibilidade pulpar térmicos e elétricos apresentam resposta negativa. No entanto, os eventos inflamatórios ocorrem entre a câmara pulpar infectada e a região periapical, e podem culminar na destruição dos tecidos envolvidos e na formação da lesão cística (Nair, 2004). Assim, tumefação e leve sintomatologia podem ser observadas em cistos maiores, associados com mobilidade e deslocamento dos dentes envolvidos. A desinfecção e obturação endodôntica dos canais radiculares são a forma de tratamento a ser estabelecida (Nair, 2004; Peterson e Gutmann, 2001; Gagliani et al., 2005). No entanto, a manutenção cística pode ser observada mesmo após estabelecida a terapia.

Microscopicamente, caracterizam-se pela presença de uma cavidade revestida, parcial ou totalmente, por tecido epitelial escamoso estratificado (podendo

apresentar exocitose, espongirose ou hiperplasia), circundado por tecido conjuntivo fibroso adjacente, com presença de infiltrado inflamatório. Células mucosas dispersas ou áreas de epitélio colunar pseudoestratificado ciliado podem ser observadas. O lúmen cístico pode apresentar fluido e restos celulares. Ainda, alguns cistos podem apresentar corpúsculos de Rushton, caracterizados por calcificações lineares ou em forma de arco. A presença de calcificações distróficas, cristais de colesterol com células gigantes multinucleadas, hemácias e áreas de pigmentação por hemossiderina podem complementar o quadro histológico (Neville et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção da lesão não estão completamente esclarecidos, sendo, provavelmente, relacionados à persistência da infecção no complexo apical do sistema de canais radiculares (Nair, 2006) com a conseqüente proliferação dos restos epiteliais de Malassez (Nair, 2004; Keinan et al., 2013). É provável que exista relação de equilíbrio entre crescimento e morte celular programada. Fatores como a presença de componentes inflamatórios, interação entre o epitélio e estroma, metabolismo ósseo e atividades enzimáticas influenciam diretamente na patogenia dessas lesões. Nesse sentido, possivelmente o mecanismo responsável pela manutenção e crescimento dessas lesões císticas esteja relacionado à interação epitélio-estroma (Bernardi et al., 2015).

Teorias de desenvolvimento cístico têm sido propostas, entretanto, os processos envolvendo o desenvolvimento, crescimento e regressão da lesão cística ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.1 TEORIAS DA FORMAÇÃO DO CISTO INFLAMATÓRIO

Na tentativa de elucidar a formação do cisto inflamatório, três teorias foram propostas: teoria da pressão osmótica, teoria do abscesso e teoria da fusão de cordões epiteliais.

1.1.1 Teoria da Pressão Osmótica

A teoria da pressão osmótica assume que a origem cística ocorre através da formação de uma cavidade central no maciço de células epiteliais, em consequência da restrição nutritivas das células centrais que terminam sofrendo degeneração e necrose (Toller, 1948; Nair, 1997). Esse processo resultaria na atração de neutrófilos às áreas centrais, os quais coalesceriam em combinação às células degeneradas e exsudato tecidual formando uma cavidade cística revestida por tecido epitelial estratificado remanescente nas periferias (Nair et al., 2008). Adicionalmente, essa teoria, proposta no início do século XX, afirma que o desenvolvimento e a manutenção dos cistos são provenientes da maior pressão hidrostática dentro da cavidade cística, quando comparada à pressão dos tecidos circundantes à lesão (James, 1926). Ainda, evidências indicariam que a hipertensão osmótica do fluído cístico estaria relacionada à cistogênese (Toller, 1948). Entretanto, essa hipótese tem ficado em segundo plano, sendo que as teorias seguintes vêm sendo melhor aceitas e pesquisadas.

1.1.2 Teoria do Abscesso

Outra ideia também defendida sugere que a proliferação de células epiteliais estimuladas pela infecção presente nos canais radiculares daria origem aos cistos inflamatórios (Summers, 1974). A fim de analisar essa hipótese, pesquisadores criaram um modelo de cistogênese desenvolvido em animais. Dispositivos foram implantados no dorso de ratos, inoculados com células epiteliais, e expostos a bactérias depois de 7 dias. Após duas e 14 semanas em que as células contidas nos dispositivos foram expostas à suspensão com bactérias, os resultados mostraram o desenvolvimento de lesões císticas. Esse achado reforça a hipótese de que a resposta inflamatória aguda gera áreas de abscesso na região apical que são posteriormente envolvidas por um tecido epitelial reacional e proliferativo. (Nair et al., 2008).

1.1.3 Teoria da Fusão de Cordões Epiteliais

Por fim, a teoria da fusão de cordões epiteliais parece ser uma proposta complementar à teoria do abscesso. Ela defende que ocorre proliferação e fusão de

cordões epiteliais resultando na formação de uma massa esférica tridimensional, a qual aprisiona uma parte de tecido conjuntivo. Assim, a formação cística ocorreria em consequência da degeneração do tecido conjuntivo aprisionado, uma vez que ele perde o aporte sanguíneo (Lin et al., 2007).

1.2 RESPOSTA CELULAR E A LESÃO CÍSTICA

Uma vez que as teorias a respeito da origem dos cistos inflamatórios convergem para a resposta inflamatória decorrente da infecção dos canais radiculares, o mapeamento dos mediadores químicos e o entendimento do papel dos mesmos sobre a complexidade dos mecanismos envolvidos na indução da proliferação dos restos epiteliais de Malassez e na atividade osteolítica, ainda se fazem necessários (Lin et al., 2007).

A análise imunoistoquímica é um dos métodos mais aplicados para investigar a atividade celular em patologias do periápice (Modi et al., 2018). A partir de então, citocinas inflamatórias, proteínas envolvidas no processo de proliferação e morte celular, e componentes de matriz extracelular vêm sendo analisados no componente epitelial e no estroma dos cistos radiculares a partir de biópsias de humanos (Bando et al., 1993; Meghji et al., 1996; Honma et al., 1998; Oshima et al., 2000; Dezerega et al., 2010).

1.2.1 Citocinas Inflamatórias

Evidências sugerem que a presença de endotoxinas bacterianas e citocinas inflamatórias envolvidas no processo de reabsorção óssea, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , modulariam a proliferação epitelial em cistos inflamatórios (Bando et al., 1993; Meghji et al., 1996; Honma et al., 1998; Oshima et al., 2000; Dezerega et al., 2010).

Após análise de 12 lesões císticas de origem inflamatória, verificou-se a expressão de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (em 8, 6 e 8 cistos, respectivamente) nas células endoteliais de vasos sanguíneos localizados na cápsula de tecido conjuntivo. IL-8 e

TNF- α foram encontrados em apenas duas lesões, ambas relacionadas à presença de macrófagos. Os resultados mostram que as células epiteliais expressaram a maior marcação para citocinas, seguidas em menor proporção pelas células endoteliais. Os autores observaram que as células epiteliais são as principais responsáveis pela síntese de IL-1 e IL-6, as quais fornecem um mecanismo para o crescimento contínuo do cisto estimulando a reabsorção óssea (Bando et al., 1993).

Além disso, as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 α estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição que promovem a expressão de proteínas regulatórias dos processos de sobrevivência celular. A IL-6 possui receptores na membrana de células epiteliais e do estroma, e tem sua ação relacionada a eventos fisiológicos e patológicos, com ação autócrina e parácrina. Ela liga-se a seu receptor (IL-6R), levando à fosforilação das proteínas JAK e STAT3, sendo que a última é translocada ao núcleo celular, desencadeando a transcrição de gene cuja função está envolvida na proliferação celular (Yu et al., 2009). Por sua vez, a IL-1 α tem mecanismo de ação envolvendo a ativação de NF κ B (envolvida na indução da transcrição do gene da IL-1 β), MAPK e TNF- α (Hartupee et al., 2008).

A expressão das citocinas foi também observada em nível de mRNA, a partir das células epiteliais de 5 cistos radiculares biopsiados em humanos. Todas as amostras expressaram IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 de forma marcante, à exceção de uma lesão que expressou IL-1 β com menor intensidade (Oshima et al., 2000).

Um estudo analisou a resposta inflamatória em lesões periapicais induzidas em ratos, considerando as fases aguda e crônica da lesão. As expressões de IL-1 α e IL-1 β nas células epiteliais durante a fase aguda, com predomínio da IL-1 β , foram observadas. Esse predomínio foi encontrado nas células epiteliais adjacentes aos osteoclastos, indicando uma contribuição para a expansão da lesão. Contudo, durante a fase crônica a expressão de IL-1 β foi significativamente menor, fato que poderia ser relacionado com a redução do crescimento da lesão (Matsumoto et al., 1998).

1.2.2 Mediadores de Proliferação e Apoptose

A marcação para o anticorpo Ki-67 fornece informações quanto a proliferação de células epiteliais em diferentes lesões, como as tumorais e císticas (Ayoub et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Martins et al., 2017; Soluk Tekkesin et al., 2012). Por outro lado, a marcação de enzimas proteolíticas, como as caspases, indica processos de apoptose induzida, enquanto a marcação de metaloproteinases fornece informações sobre degradação de colágeno (Kimi et al., 2001; Khalifa et al., 2010; Soluk Tekkesin et al., 2012). Ainda, a expressão de proteínas bcl-2, bcl-xL e bcl-w está associada a ação anti-apoptose, enquanto bax, bak e bok está relacionada a eventos pró-apoptóticos (Soluk Tekkesin et al., 2012).

A análise da expressão de proteínas em lesões nos ossos maxilares mostrou que os cistos inflamatórios apresentaram significativa expressão de bax no tecido epitelial e ki-67 no tecido conjuntivo. Os autores do estudo sugerem que a grande inflamação crônica sub-epitelial pode estimular a proliferação de fibroblastos e de células endoteliais (Soluk Tekkesin et al., 2012). A comparação da expressão imunoistoquímica em cistos inflamatórios e cistos residuais, mostrou que o antígeno Ki-67, citocina TGF- β 1 ou fator de crescimento transformador beta 1 (citocina importante em processos biológicos como metabolismo ósseo, angiogênese e reparo tecidual), ICAM-1 ou molécula de adesão intercelular 1 (citocina importante para adesão de leucócitos em células endoteliais e sua migração para o foco inflamatório) podem ser importantes marcadores para análise do comportamento biológico de cistos inflamatórios (Martins et al., 2017).

Em outro estudo, a análise microscópica e imunoistoquímica de 20 cistos inflamatórios indicou correlação positiva entre índices de apoptose e a expressão de proteínas da família bcl-2, sugerindo que eventos apoptóticos têm participação no desenvolvimento das lesões císticas. A família bcl-2 é um grupo de proteínas intimamente associada a regulação da apoptose, da qual fazem parte proteínas com propriedades indutoras, como a bax, e inibidoras, entre as quais a bcl-2. Os resultados do estudo evidenciam, independentemente de o tecido epitelial apresentar características hiperplásicas ou atróficas, que todas as lesões analisadas expressaram sinais de apoptose em células epiteliais (Loyola et al., 2005).

Objetivando investigar a morte celular por apoptose em lesões periapicais, outro estudo analisou a expressão imunoistoquímica para ssDNA (fita simples de

DNA), p53, Bax, Bcl-2, caspase-3, Fas, Fas ligante (Fas-L) e antígeno Ki-67 em 19 cistos inflamatórios e 5 cistos residuais. A ssDNA é um dos produtos da morte celular programada, p53 é uma proteína associada a proliferação celular em várias lesões, Bax e Bcl-2, são proteínas importantes na regulação da apoptose e distribuídas no citoplasma celular. Fas e Fas-L pertencem à família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNF), sendo essa uma molécula que desencadeia reações relacionadas à apoptose, e aquela uma glicoproteína da membrana da célula, que transmite sinais para morte celular programada. Ainda, a apoptose depende da ativação das caspases, sendo que a caspase-3 ativada cliva várias proteínas celulares causando alterações na morfologia celular. Os resultados mostraram, entre outros achados, que no núcleo de células epiteliais localizadas na camada basal e para basal houve expressão de Ki-67 e p53, enquanto ssDNA foi observada no núcleo de células supra basais e superficiais. A expressão de caspase-3 ocorreu no núcleo de células epiteliais superficiais e em células inflamatórias subepiteliais. Nos cistos que apresentaram processo inflamatório com maior intensidade, a expressão da caspase-3 foi maior e de Bcl-2 menor. Além disso, foi observada maior marcação para Ki-67 em lesões com expressão mais intensa de caspase-3. Os dados apresentados no estudo sugerem que fatores relacionados a apoptose estão envolvidos na patogenia dos cistos de origem inflamatória e que esses fatores podem sofrer influência das características do tecido epitelial e do processo inflamatório (Suzuki et al., 2005).

Após análise imunoistoquímica de 13 cistos inflamatórios, foi encontrada expressão positiva para laminina-1 e Ki-67 em 10 (76,9%) e 7 (53,8%) das lesões, respectivamente. O Ki-67, anticorpo que apresenta marcação em todas as fases do ciclo celular, apresentou-se nas células epiteliais basais de forma predominante. Ainda, quanto mais significativa a marcação para esse anticorpo, maior foi a intensidade da inflamação no tecido conjuntivo. Portanto, os autores sugerem que a inflamação crônica age como estímulo à proliferação epitelial e, enquanto a inflamação crônica de baixa intensidade incentiva a proliferação das células epiteliais, a de alta intensidade a desfavorece devido a um maior dano às células progenitoras. Os cistos inflamatórios que não apresentaram expressão de laminina-1 mostraram grande presença de inflamação no tecido conjuntivo. Esse fato pode ser explicado pela perda da capacidade das células epiteliais em formar a membrana basal com continuidade devido a presença de citocinas inflamatórias, as quais aumentam a

secreção de metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2). Os autores concluem que a laminina-1 e o Ki-67 podem prever o comportamento biológico de lesões císticas (Ayoub et al., 2011).

1.2.3 Matriz Extracelular

A transformação em cistos inflamatórios, a partir de granulomas periapicais que apresentam proliferação epitelial, foi relacionada à presença da metaloproteinase-13 devido à sua capacidade de estimular a proliferação epitelial e a reabsorção óssea, favorecendo a progressão da lesão (Leonardi et al., 2005). Por sua vez, o desequilíbrio entre a MMP-1 -metaloproteinase correlacionada com a presença de inflamação - e o inibidor tecidual da MMP-1 (TIMP-1) pode estar relacionado à expansão de lesões císticas inflamatórias. Em uma série de 30 cistos inflamatórios, todos os casos apresentaram forte expressão de MMP-1 (Lin et al., 1997).

A matriz metaloproteinase-2 (MMP-2), gelatinase da família das MMPs, e a caspase-3, cisteína com papel importante no desencadeamento da apoptose e importante associação com eventos de morte celular, foram avaliadas imunohistoquimicamente em 7 cistos inflamatórios. Desses, 5 apresentaram marcação positiva para MMP-2 no citoplasma de células epiteliais das camadas superficial e supra basal, enquanto 6 apresentaram expressão para caspase-3 no citoplasma das células da camada superficial do epitélio e no núcleo de células epiteliais próxima à camada basal. Os autores concluem que a expressão das proteínas analisadas está relacionada com o crescimento e a progressão das lesões, embora, quando comparados com ameloblastomas e ceratocitstos, os cistos inflamatórios tenham apresentado menores valores estatísticos (Khalifa et al., 2010).

Estudos realizados através de análise imunohistoquímica seguida de microscopia por polarização, verificaram que o acúmulo de fibras colágenas maduras é uma característica em cistos inflamatórios. A presença de citocinas e fatores de crescimento na cápsula fibrosa poderia resultar nesse padrão de tecido conjuntivo denso (Singh et al., 2012; Vij et al., 2011). O fator XIII, relacionado ao estímulo da proliferação de fibroblastos, foi observado em camadas intermediárias da parede cística, característica que pode influenciar o processo de deposição de colágeno nos cistos de origem inflamatória (Toida et al., 1990).

Ainda que a expressão de mediadores químicos em cistos inflamatórios estabelecidos esteja bem descrita na literatura, o papel desses mediadores na origem, desenvolvimento, manutenção e progressão da lesão ainda não está completamente elucidado. Assim, o desenvolvimento de modelos que possibilitem o estudo dessas lesões, pode contribuir para o esclarecimento da patogenia dessa lesão.

1.3 MODELOS DE ESTUDO *IN VITRO* COM ESFEROIDES

Modelos matemáticos têm sido utilizados para desenvolver teorias complementares a respeito do desenvolvimento cístico (Ward et al., 2004; Cerruti et al., 2013). Contudo, esses modelos não explicam por que nem todas as lesões periapicais evoluem para cistos inflamatórios. Assim, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas no âmbito da biologia celular. Entre os diferentes métodos de estudo está a utilização de culturas celulares 3D *in vitro*. Esses modelos trazem uma alternativa à utilização de modelos animais, além de apresentar vantagens como reprodutibilidade, praticidade e confiabilidade (Friedrich et al., 2009).

Modelos de pesquisa através de esferoides, um tipo de cultura celular 3D, vêm sendo utilizados para o estudo de diferentes lesões, como tumores epiteliais e cistos (Cerruti et al. 2013; Zaroni et al., 2016). Isso é possível uma vez que os esferoides possibilitam simular morfologia e funcionalidade celular, possuem padrão de diferenciação semelhante aos complexos células-matriz extracelular e célula-célula, além permitir reproduzir condições patofisiológicas do meio (Friedrich et al., 2009; Zaroni et al., 2016).

A utilização de esferoides para o melhor entendimento da origem e progressão de cistos inflamatórios pode ser de grande utilidade, uma vez que o conhecimento atual sobre o tema provém de estudos realizados a partir de lesões biopsiadas, ou seja, casos em que a lesão se encontra estabelecida no momento em que é estudada (Nickolaychuk et al. 2002, Meliou et al. 2011, Guler et al. 2012).

Recentemente, foi publicado um modelo que possibilita o estudo de cistogênese *in vitro*, no qual estruturas semelhantes a cistos foram obtidas a partir de duas linhagens de células: HaCaT (originadas de células epiteliais) e Cal27 (derivadas

de células de carcinoma espinocelular oral). Em tal modelo, as estruturas semelhantes a cistos foram originadas a partir de esferoides de 1×10^5 células embebidos em uma matriz de colágeno (originada da cauda de rato) a uma concentração 1,8mg/mL. Ao longo de 15 dias, verificou-se que, na maioria das amostras, as esferas mantiveram sua integridade. A análise histológica com coloração por hematoxilina-eosina do dia 3 revelou a formação de uma cavidade revestida por tecido epitelial semelhante à morfologia encontrada em cistos inflamatórios biopsiados em humanos. Esse achado foi confirmado por imagens confocais. Os autores afirmam que não está claro o motivo pelo qual a cavidade se estabelece nos esferoides, podendo este fato estar relacionado à necrose das células centrais ou à sua diferenciação e descamação. Ainda, sugerem que esse modelo de cistogênese pode ser utilizado para novas pesquisas que visem o estudo da patogenia dos cistos inflamatórios (Laureano et al., 2019).

Considerando que os eventos envolvidos na origem dos cistos inflamatórios não estão completamente esclarecidos na literatura e que estruturas císticas podem ser formadas a partir de esferoides, o objetivo do presente estudo é de aprimorar os esferoides gerados por Laureano et al (2019), enriquecendo o seu microambiente cístico a partir da associação de células do estroma, tais como fibroblastos e células inflamatórias. O desenvolvimento de um modelo de cistogênese mais próximo da estrutura cística *in vivo*, pode contribuir com futuros estudos que visem correlacionar cistogênese em modelos 3D e cistos inflamatórios biopsiados em humanos.

2. OBJETIVO

Tornar a organização estrutural do modelo de *cyst-like spheroids*, proposto por Laureano et al. (2019), mais similar às condições observadas *in vivo* por meio da adição de fibroblastos e leucócitos à matriz de colágeno.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo previamente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e publicado por Laureano et al. (2019) destaca-se pelo seu pioneirismo no estudo da cistogênese a partir de estruturas 3D utilizando esferoides. O presente estudo visou complementar a pesquisa previamente citada e demonstrou evidências inovadoras e promissoras.

Nossos resultados mostram que a adição de fibroblastos e leucócitos à matriz de colágeno não prejudica a integridade dos esferoides. Adicionalmente, parece coerente afirmar que o modelo apresentado aproximou-se ainda mais das características observadas *in vivo*.

Apesar de outras variáveis existentes no microambiente cístico (por exemplo, microrganismos, produtos bacterianos, presença de outras células inflamatórias) ainda não terem sido contempladas pelo atual modelo, a continuidade do presente estudo parece constituir-se em uma tarefa possível e necessária. A obtenção de cortes histológicos das estruturas císticas, associadas a posterior análise imunohistoquímica e comparação com espécimes obtidas de modelo *in vivo*, podem fornecer dados a serem explorados.

Apesar de questões a respeito dos mecanismos envolvidos na origem e manutenção dos cistos inflamatórios ainda não poderem ser respondidas de forma conclusiva, nosso modelo fornece mais embasamento para futuras análises. Ainda, o aprimoramento do modelo apresentado pode contribuir para possíveis pesquisas que se proponham a analisar alternativas terapêuticas para o tratamento dos cistos inflamatórios.

5. PERSPECTIVAS

A comparação de resultados obtidos em modelos *in vitro* com as análises histopatológicas de cistos inflamatórios biopsiados em humanos são importantes para compreender os mecanismos envolvidos na patogenia dessa lesão. Ainda, a correlação das características clínicas dos tecidos envolvidos na progressão e

manutenção do cisto inflamatório com as características císticas observadas em modelos *in vitro* pode apresentar resultados relevantes, embasando a realização de futuras pesquisas que investiguem alternativas terapêuticas.

Novos estudos que explorem o modelo proposto neste artigo podem ser realizados a fim de investigar os mecanismos envolvidos na cistogênese e obter respostas mais conclusivas.

REFERÊNCIAS

- Ayoub, M.S. et al. Immunohistochemical detection of laminin-1 and Ki-67 in radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Clin Pathol*, v.11, n.4, 2011.
- Bando, Y. et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, v.22, p.221-227, 1993.
- Bernardi, L. et al. Radicular cyst: an update of the biological factors related to lining epithelium. *J Endod*, v.41, n.12, p.1951-1961, 2015.
- Cerruti, B. et al. Polarity, cell division, and out-of-equilibrium dynamics control the growth of epithelial structures. *J Cell Biol*, v.203, n.2, p.359-372, 2013.
- Dezerega, A. et al. Monocyte chemoattractant protein-3: possible involvement in apical periodontitis chemotaxis. *Int Endod J*, v.43, p.902-908, 2010.
- Fennemma et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*, v.31, n.2, p.108-115, 2013.
- Friedrich, J. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*, v.4, n.3, p.309-324, 2009.
- Gagliani, M.M. et al. Periapical resurgery versus periapical surgery: a 5-year longitudinal comparison. *Int Endod J*, v.38, p.320-327, 2005.
- Guler, N. et al. Ki-67 and MCM-2 in dental follicle and odontogenic cysts: the effects of inflammation on proliferative markers. *The Scientist World J*, p.1-8, 2012.
- Hartupée, J. et al. IL-1 α -induced NF κ B activation and chemokine mRNA stabilization diverge at IRAK1. *J Biol Chem*, v.283, n.23, p.15689-15693, 2008.
- Honma, M. et al. Localization of mRNA for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by in situ hybridization, and induction of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to radicular cyst contents. *J Oral Pathol Med*, v.27, p.399-404, 1998.
- Ivanov, D.P.; Grabowska, A.M.; Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Scient Reports*, v.7, 2017.
- James, W.W. Do epithelial odontomes increase in size by their own tension? *Proc R Soc Med*, v.19, p.73-77, 1926.
- Johnson, N.R. et al. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Invest Clin Dent*, v.5, p.9-14, 2014.
- Khalifa, G.A. et al. Evaluation of neoplastic nature of keratocystic odontogenic tumor versus ameloblastoma. *J Egypt Natl Canc Inst*, v.22, p.61-72, 2010.
- Keinan, D; Cohen, R.E; The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. *J Endod*, v.39, n.5, May-2013.

Kimi, K. et al. Immunohistochemical analysis of cell-cycle and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*, v.34, n.7, p.434-42, 2001.

Laureano, N.K. et al. Development of an *in vitro* model to study tooth cystogenesis. *Int End J*, p.1-8, julho, 2019.

Leonardi, R. et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*, v.38, p.297-301, 2005.

Lin, S.K. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, v.26, p.458-463, 1997.

Lin, L.M. et al. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod*, v.33, n.8, p.908-916, 2007.

Loreto, C. et al. Possible role of apoptosis in the pathogenesis and clinical evolution of radicular cyst: an immunohistochemical study. *Int End J*, v.46, p.642-648, 2013.

Loyola, A.M. et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J*, v.38, p.465-69, 2005.

Martin, L; Speight, P.M. Odontogenic cysts. *Diagnostic Histopathology*, v.21, n.9, p.359-69, Sept 2015.

Martins, R. et al., Comparative immunoexpression of ICAM-1, TGF- β 1 and Ki-67 in periapical and residual cysts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.22, n.1, p.24-30, 2017.

Matsumoto, A. et al. An immunohistochemical study of the behavior of cells expressing interleukin-1 α and interleukin-1 β within experimentally induced periapical lesions in rats. *J Endod*, v.24, n.12, p.811-816, 1998.

Meghji, S. et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Archs Oral Biol*, v.41, n.6, p.523-531, 1996.

Mendez, M. et al. A 10-year study of specimens submitted to oral pathology laboratory analysis: lesion occurrence and demographic features. *Braz Oral Res*, v.26, n.3, p.235-41, May-Jun 2012.

Meliou, E. et al. Immunohistochemical expression of notch signaling in the lining epithelium of periapical cysts. *J Endod*, v.37, n.2, p.176-180, 2011.

Modi, T.G. et al. Expression of Ki-67 in odontogenic cysts: a comparative study between odontogenic keratocysts, radicular cysts and dentigerous cysts. *J Oral Maxillofac Pathol* v.22, n.1, p.146, 2018.

Nair, P.N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*, v.39, p.249-281, 2006.

Nair, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*, v.13, p.121-148, 1997.

Nair, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.15, n.6, p.348-81, 2004.

Nair, P.N.R. et al. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.106, n.2, p.294-303, Aug 2008.

Nair, P.N.R. et al. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.81, n.1, p.93-102, Jan 1996.

Neiva, K.G. et al. Cross talk initiated by endothelial cell enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia*, v.11, n.6, p.583-593, 2009.

Neville, B.W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial 3ª edição*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

Nickolaychuk, B. et al. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinases in proliferating and differentiating odontogenic epithelia of inflammatory and developmental cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.93, n.6, p.720-729, 2002.

Oliveira, M.G. et al. Odontogenic Epithelium: immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Head and Neck Pathol*, v.5, p.1-7, 2011.

Oshima, M. et al. Profiles of cytokine expression. In radicular cyst-lining epithelium examined by RT-PCR. *J Oral Sci*, v.42, p.239-246, 2000.

Peterson, J.; Gutmann, J.L. The outcome of endodontic resurgery: a systematic review. *Int Endod J*, v.34, p.169-175, 2001.

Philippi, C.K. et al. Distribution of CD8 e CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J*, v.14, n.3, p.182-86, 2003.

Regezi, J.A., Sciubba, J.J., Jordan, R.C.K., *Patologia Oral: Correlações Clinicopatológicas*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Sing, H.P. et al. A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma on biological behavior of odontogenic cysts: a histochemical study. *Nat J Maxillofac Surg*, v.3, p.15-20, 2012.

Suluk Tekkesin, M et al., Expression of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patologi Derg*, v.48, n.1, p.49-55, 2012.

Summers, L. The incidence of epithelium in periapical granulomas and the mechanism of cavitation in apical dental cysts in man. *Archs Oral Biol*, v.19, p.1177-1180, 1974.

Suzuki et al., Immunohistochemical analysis of apoptosis-relates factors in lining eputhelium or radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, v.34, p.46-52, 2005.

Toida, M. et al. Distribution on factor XIIIa-containing cells and collagenous components in radicular cysts: histochemic and immunohistochemic studies. J Oral Pathol Med, v.19, p.155-159, 1990).

Toller, P.A. Experimental investigations into factors concerning the growth of cysts of the jaw. Proc R Soc Med, v.41, p.681-688, 1948.

Tsunematsu, T. et al. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez possess stem cell properties. Laboratory Investigation, v.96, 1063-1075, 2016.

Vij, R. et al. Evaluation of collagen in connective tissue walls of odontogenic cysts – a histochemical study. J Oral Pathol Med, v.40, p.257-262, 2011.

Yu, H. et al. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nature Rev, v.9. ,p.798-809, 2009.

Ward, J.P. et al. A model on the dynamics of odontogenic cyst growth. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/237293937_A_model_on_the_dynamics_of_odontogenic_cyst_growth.

Zanoni, M. et al. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Sci Rep, v.6, p.1-11, 2016.