

Modelo 3D de mucosa oral: estudo piloto em novas superfícies implantares

Fernandes, B.¹, Cruz, M.¹, Garret, G.², Carvalho, O.², Marques, J.¹, Craig, M.³

¹ Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oraís (GIBBO-UICOB), Faculdade de Medicina Dentária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
² Center for Microelectromechanical Systems (CMEMS), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal
³ School of Clinical Dentistry, University of Sheffield

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Os biomateriais dentários requerem modelos de estudo que permitam avaliar a sua biocompatibilidade e eficácia, previamente à sua aplicação em ensaios clínicos.¹ O modelo de cultura celular em monocamada é extensamente utilizado na literatura, contudo não se assemelha à fisiologia organotípica humana.² Face às suas limitações, sentiu-se a necessidade de desenvolvimento de um modelo de cultura tridimensional, permitindo uma resposta experimental mais robusta e preditiva e contribuindo para a diminuição da amostragem animal.^{2,3,4} Tendo em vista a procura de otimização da resposta biológica e inibição da adesão bacteriana nas superfícies implantares, definiu-se como estratégia a incorporação de agregado trióxido mineral (MTA) como revestimento bioativo e agente antibacteriano.⁵ Contudo, não existem estudos da sua utilização em superfícies de implantes dentários.⁶

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de modelo organotípico tridimensional de mucosa oral (MMO) e caracterização da resposta em contacto com superfícies implantares de Zircónia revestidas com MTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram produzidos 36 discos de Zircónia estabilizada com Ítria (Y-PSZ) texturizados com laser Nd:YAG. Metade destes discos foram incorporados com MTA (grupo MTA) e outra metade foi utilizada como controlo (grupo Y-PSZ). As amostras foram colocadas em contacto com o MMO, com cultura de queratinócitos imortalizados (FNB6) e fibroblastos orais normais (NOF) em insert de placas de cultura de 12 poços. Para o modelo 2D foram semeados fibroblastos gengivais (HGF hTERT) nas amostras durante 7 dias. Na cultura 3D foi realizada análise histológica com recurso a coloração de hematoxilina e eosina e a medição da citotoxicidade celular pela libertação da lactato desidrogenase (LDH) através de técnica colorimétrica. Foi realizada a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) no modelo 2D e em ambos os modelos de cultura foi avaliada a viabilidade celular por um métodos à base de resazurina nos tempos pré-definidos. Em todos os ensaios utilizou-se o modelo celular sem discos como controlo positivo, meramente para validação das condições experimentais. No ensaio da LDH foi utilizado como controlo negativo um modelo 3D submetido previamente a lise celular, por forma a determinar a libertação máxima de LDH.

Todos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Foram realizadas comparações entre grupos através do teste ANOVA ou teste de Mann-Whitney (teste post-hoc de Tukey) usando um software de estatística apropriada (IBM® SPSS® para Mac versão 27.0.1.0). A significância foi definida como $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

As imagens histológicas dos modelos demonstraram um epitélio estratificado queratinizado com polaridade basal. Os fibroblastos apresentaram-se uniformemente distribuídos no tecido conjuntivo, com poucas células e a matriz extracelular apresentou-se corada de rosa, indicando deposição de matriz pelos mesmos. Contudo, não foi possível observar as papilas de tecido conjuntivo e as cristas epiteliais características do epitélio oral. A viabilidade celular das amostras de estudo não apresentou diferenças estatisticamente significativas em ambos os modelos de cultura celular ($p > 0,05$). Apesar da citotoxicidade superior no grupo de MTA (25%), não foram encontradas diferenças significativas quando comparado com o grupo Y-PSZ (16%) e Controlo+ (8%) ($p > 0,05$). Os resultados deste estudo sugerem que as amostras de Zircónia com e sem MTA não são citotóxicas para as células dos tecidos periimplantares, tanto no modelo 2D como no modelo 3D e, adicionalmente, o comportamento dos fibroblastos em monocamada e das células em cultura tridimensional não parece ser influenciado pela presença de MTA nas superfícies implantares. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura.^{6,7,8} Neste sentido, estudos posteriores com novas abordagens de incorporação de MTA nas superfícies implantares e avaliação da resposta celular devem ser realizados.

RESULTADOS

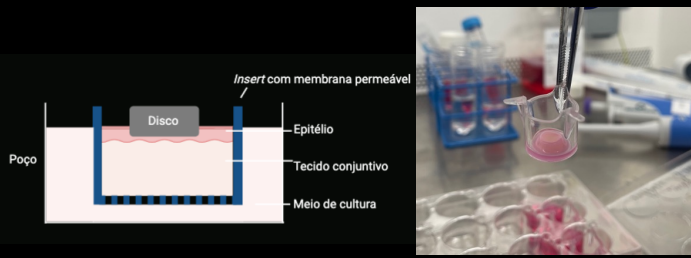


Figura 1 – (A) Imagens esquemática de MMO com disco inserido. Criado com biorender.com. (B) MMO construído com queratinócitos (FNB6) e fibroblastos (NOF) em insert de placas de cultura de 12 poços.

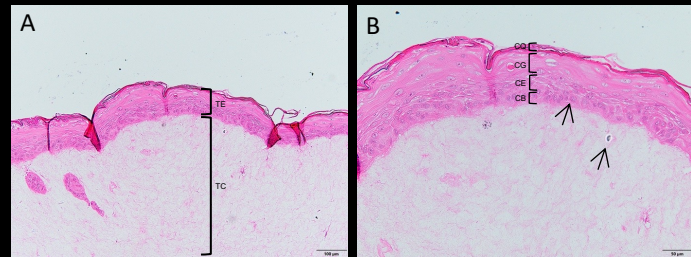


Figura 2 – Imagens histológicas de modelo tridimensional de mucosa oral contendo queratinócitos (FNB6) e fibroblastos (NOF), identificados com setas. Os modelos foram fixados, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. Os dados são representativos de 3 modelos diferentes (N=3). As escalas de barras representam 100µm (A) e 50µm (B). Legenda: TE – Tecido Epitelial; TC – Tecido Conjuntivo; CQ – Camada Queratinizada; CG – Camada Granulosa; CE – Camada Espinhosa; CB – Camada Basal.

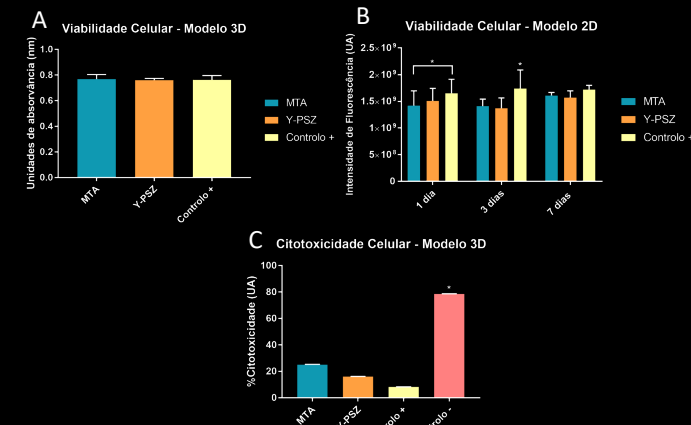


Figura 3 – Gráficos de barras representando a viabilidade celular dos modelos 3D (A) e 2D (B) e a percentagem de citotoxicidade nos modelos 3D (C), expressas em unidade de absorvância (nm) e unidades arbitrárias (UA) de valores de intensidade de fluorescência, respetivamente. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Significância estatística apresentada: * $p < 0,05$.

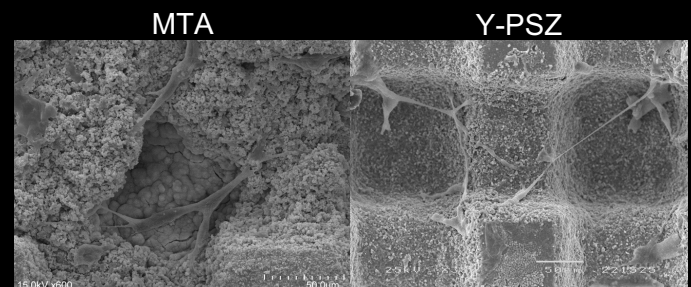


Figura 4 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos fibroblastos após 1 dia de cultura celular nos discos. Ampliação 600x.

CONCLUSÕES

O modelo de mucosa oral tridimensional apresentado pode ser considerado uma hipótese válida para o estudo de materiais dentários. Não foram observadas diferenças na resposta celular nas amostras com incorporação de MTA em comparação com o controlo.

ACKNOWLEDGMENT

Este trabalho foi apoiado pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia - Portugal) sob o projeto FunImp 01-0145-FEDER-030498. Co-financiado por:

REFERÊNCIAS

- Cavallaro, M., Barros, A., Louback, R., & Rossi, M. (2018). Modelos tridimensionais da cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. *Vigil. sanit. debate*, 6(1), 72-83.
- Rofail, S., Wu, G., Nedeljkovic, J., Meyer, M., Rezaifarman, T., & Citbu, S. (2019). Evaluation of a novel oral mucosa in vitro implantation model for analysis of molecular interactions with dental abutment surfaces. *Clinical Implant Dentistry and Related Res*, 21(1), 25-33.
- Klausner, M., Handa, Y., & Alzawa, S. (2021). In vitro three-dimensional organotypic culture models of the oral mucosa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 57(2), 148-159.
- Almeida, T., Al-Sahaf, S., Bolt, R., Brook, I., & Moharamzadeh, K. (2018). Characterization of Multilayered Tissue-Engineered Human Alveolar Bone and Gingival Mucosa. *Tissue Eng Part C Methods*, 24(2), 99-107.
- Torabinejad, M., Parirokh, M., & Dummer, P. (2018). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J*, 51(3), 284-317.
- Naik, R., Pudukattakatti, P., & Hattarki, S. (2014). Can MTA be: Miracle trioxide aggregate? *J Indian Soc Periodontol*, 18(1), 5-8.
- Khedmat, S., Sarraf, P., Seyedjafari, E., Sarraf-Rad, P., Noori, F. (2021). Comparative evaluation of the effect of cold ceramic and MTA-Angelus on cell viability, attachment and differentiation of dental pulp stem cells and periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2021 Dec 7;21(1):628.
- Silva E.J., Senina P.M., De-Deus G., Zaia A.A. (2016) Ocytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. *Int Endod J*, 49(6):574-80.