



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LUCIANA CORRÊA FERREIRA

**EFEITOS DO LPS BACTERIANO NOS PROCESSOS
FUNCIONAIS E DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
PROGENITORAS DA POLPA DENTÁRIA**

2014

LUCIANA CORRÊA FERREIRA

**EFEITOS DO LPS BACTERIANO NOS PROCESSOS FUNCIONAIS E
DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS DA POLPA
DENTÁRIA**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Bruno Das Neves Cavalcanti

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Ferreira, Luciana Corrêa

Efeitos do LPS bacteriano nos processos funcionais e de
diferenciação de células progenitoras da polpa dentária / Luciana
Corrêa Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação
em Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientador: Bruno Das Neves Cavalcanti.

1. Células tronco. 2. Odontoblastos. 3. Lipopolissacarídeos. 4.
Diferenciação celular. I. Cavalcanti, Bruno Das Neves, orient. II.
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio
de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 17 de dezembro de 2014
E-mail: luciana.ferreira@fosjc.unesp.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Bruno Das Neves Cavalcanti (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof.Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Aletéia Massula de Melo Fernandes

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 17 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

À Deus, fonte de amor e de luz, que me dá ânimo para sempre seguir em frente.

Ao meu pai, Sebastião (in memoriam), que sempre se dedicou a família até seu último suspiro e sempre me inspirou em cada passo, em cada decisão. Se hoje eu sou forte, devo isso a você.

À minha mãe, Mariléi, que na sua simplicidade e leveza de encarar a vida, sempre esteve ao meu lado, dando-me apoio, confiando e respeitando minhas decisões.

Ao meu esposo, Edwin, pelo apoio, dedicação, paciência e confiança. Seu coração grande transborda amor e bondade e me inspira para ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado, tornando minha caminhada mais leve.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, pela ótima convivência e pela prontidão em auxiliar.

À querida amiga Flávia Leal, pela amizade construída, pelas risadas, pelo companheirismo e pela parceria no trabalho. Nunca imaginei que um trabalho em conjunto pudesse dar tão certo.

À querida Cláudia Bin, pela ótima convivência e auxílio no laboratório.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Das Neves Cavalcanti, por me ensinar e me orientar com empenho e dedicação. Aprendi muito nesses dois anos com os seus ensinamentos.

À querida Márcia Sampaio Campos, pela ajuda e ensinamentos com os ensaios de PCR, com uma dedicação inspiradora.

Ao professor Ivan Balducci pelo auxílio com a estatística deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da UNESP pelo apoio e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Bolsa de Mestrado e reserva técnica, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora e aos seus funcionários.

À Biblioteca Profa Leila Novaes, do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP de São José dos Campos e aos seus funcionários, pelos recursos oferecidos.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP de São José dos Campos, pela minha graduação e pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para participar e despendido seu tempo na análise deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Fonte, diferenciação e caracterização das células tronco	13
2.2 Reações celulares frente à exposição de substâncias utilizadas na terapia de reparo pulpar	17
2.3 Reações das células da polpa frente à inflamação pulpar	25
2.4 Reações de diferentes células dentais frente à exposição ao LPS .	29
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Condições de cultivo celular	37
4.2 Isolamento das células progenitoras	38
4.3 Grupos experimentais	40
4.4 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina	41
4.5 Ensaio de formação de nódulos minerais	43
4.6 Ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	44
4.7 Ensaios de RT-PCR para detecção de RNAm para DSPP e DMP-1 ..	49
4.7.1 Extração do RNA	50
4.7.2 RT PCR (Obtenção dos cDNAs).....	51
4.7.3 Amplificação por PCR.....	52
4.8 Análise Estatística	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina	55

5.2 Ensaio de formação de nódulos minerais	56
5.3 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	58
5.3.1. IL-1 β	58
5.3.2 TNF- α	59
5.4 Ensaio de PCR para detecção de RNAm para DSPP, DMP-1	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS	70
ANEXO	76

Ferreira LC. Efeitos do LPS bacteriano nos processos funcionais e de diferenciação de células progenitoras da polpa dentária [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Os processos de reparo da polpa dentária frente a procedimentos conservadores passam, em geral, pelo confronto entre possíveis microrganismos presentes na área da exposição e as células responsáveis pela diferenciação e produção de tecido mineralizado. Entretanto, a literatura ainda necessita de informações sobre o efeito direto de produtos bacterianos sobre este processo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (*E. coli*) sobre células progenitoras da polpa dental, utilizando-se condições basais e com mineralização pré-induzida por meio osteogênico. Para isso, células progenitoras caracterizadas foram submetidas a diferentes concentrações de LPS bacteriano (com ou sem indutor da mineralização [IM]), para observação da atividade de fosfatase alcalina (ALP). A concentração mínima de 200 ng/ml, para se verificar alteração de atividade enzimática de ALP, foi usada para se observar os efeitos funcionais de mineralização (pelo alizarin vermelho - ARS), expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α , além da expressão dos genes DSPP e DMP-1. Os dados quantitativos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. As células em meio osteogênico com as diferentes concentrações de LPS apresentaram baixa atividade da ALP no curto prazo, comparadas às tratadas com meio α -MEM. Estas apresentaram alta atividade, comparadas ao controle. 200 ng/ml do LPS afetaram o processo de mineralização ao longo do tempo, reduzindo a ação de mineralização dos grupos que o associaram ao indutor de mineralização. Houve expressão de IL-1 β e TNF- α para todos os grupos em todos os tempos, além disso, para a IL-1 β , o grupo que associou os 200ng/ml de LPS com o meio indutor após 7 dias apresentou maior expressão. Houve expressão do gene DMP-1 e não expressão de DSPP e ocorreu uma maior expressão gênica nos grupos tratados com meio indutor da mineralização no gene DMP-1. Esses achados sugerem que o potencial inflamatório do LPS sobre as células progenitoras da polpa contribui para o processo de mineralização precoce. No longo prazo, este processo não é sustentável, uma vez que o LPS o detém.

Palavras-chave: Células-tronco. Odontoblastos. Lipopolissacarídeo. Diferenciação celular.

Ferreira LC. Effects of the bacterial LPS on the functional and differentiation processes of dental pulp progenitor cells [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Dental pulp repair processes due to conservative procedures are, in general, affected by the conflicts between possible microorganisms at the area of exposure and cells responsible for differentiation and production of mineralized tissue. However, the literature still lacks information on how bacterial products affect these processes directly. The *purpose of this study was to evaluate the bacterial lipopolysaccharide (E. coli LPS) effects on dental pulp progenitor cells, regarding the expression of differentiation genes and function of mineralization, using basal conditions and pre-induced mineralization by osteogenic media.* Characterized progenitor cells was initially submitted to different LPS concentrations (with or without osteogenic medium [IM]), to observe alkaline phosphatase activity (ALP). The minimal concentration (200 ng/ml) to observe phosphatase enzymatic activity was used to assess the functional mineralization effects (by alizarin red staining - ARS), cytokine production (IL-1 β e TNF- α), besides the gene expression for odontoblast differentiation markers (DSPP and DMP-1). Quantitative data will be statistically analyzed by ANOVA and Tukey's test. Cells in osteogenic medium with different concentrations of LPS showed low ALP activity short-term compared to those treated with α -MEM. These showed high activity, compared to control. 200 ng/ml of LPS did affect the mineralization process over time, reducing the action of mineralization of the groups that have associated LPS with the IM. There was expression of IL-1 β and TNF- α for all groups at all times, additionally, IL-1 β for the group that has associated 200 ng/ml of LPS with osteogenic media after 7 days showed higher expression. There was expression of DMP-1 and DSPP genes and the expression in groups treated with IM was greater in DMP-1. These findings suggest that the inflammatory potential of LPS on the pulp progenitor cells contribute to an early mineralization process. In the long-term, this process is not sustainable, since LPS arrests the mineralization process of progenitor cells.

Keywords: Stem cell. Odontoblasts. Lipopolysaccharide. Cell differentiation.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento conservador da polpa dental tem por objetivo preservar a vitalidade pulpar de dentes, em situações causadas por fatores como lesões cariosas profundas, fraturas coronárias e exposição acidental da polpa (Bodem et al., 2004; Leonardo, 2008). Neste caso, procedimentos conservadores como a pulpotomia ou o capeamento pulpar direto são de importância, consistindo na remoção ou não da parte coronária do tecido pulpar, seguida da proteção do tecido remanescente com material que preserve sua vitalidade e estimule o reparo (Miyashita et al., 2007; Leonardo, 2008). O prognóstico desses procedimentos depende de fatores como a idade da polpa, pois quanto mais envelhecida, menor a possibilidade de sucesso, do local da exposição pulpar, uma vez que uma exposição axial é mais desfavorável comparada à exposição oclusal dada a permeabilidade, dificuldade de isolamento e do material utilizado para o capeamento pulpar que pode ter maior ou menor grau de citotoxicidade (Cho et al., 2013; Cohen, Hargreaves, 2007).

Tais intervenções conduzem a uma reação inflamatória local, que reúne células e moléculas extracelulares presentes no tecido, as quais seriam responsáveis pela formação da ponte de dentina reparadora (Goldberg et al., 2008). De certa forma, há evidências de que essa reação inflamatória participa do processo de reparação pulpar (Sloan, Smith, 2007; Goldberg et al., 2008; Silva et al., 2009, Cavalcanti et al., 2011; Simon et al., 2011). Nesse processo, ocorre um aumento na permeabilidade vascular que permite a passagem de células do sistema imune e de substâncias – as citocinas – que modulam as respostas inflamatórias e o reparo do local inflamado (Cooper et al., 2010; Silva et al., 2009; El Salhy et al., 2013).

No contexto do reparo pulpar, frente a procedimentos conservadores, sabe-se que a polpa possui células progenitoras com potencial de diferenciação em odontoblastos e de produzir dentina (Chang et al., 2005; Ji et al., 2010; He et al., 2013), demonstrando grande capacidade reparadora (Chang et al., 2005). Adicionalmente, acredita-se que estas células têm participação na resposta imune durante a infecção pulpar, onde os produtos bacterianos parecem ativar vias de sinalização que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Chang et al., 2005). Esta ativação pode ser devida a presença de receptores TLR4, fato já descrito para odontoblastos, os quais respondem a estes produtos bacterianos, sugerindo sua participação no sistema imune. (Oliveira, Santos, 2012).

Quanto aos produtos bacterianos, é sabido que bactérias Gram-negativas presentes na polpa dental infectada e no periápice liberam as endotoxinas após lise de suas paredes celulares. Essas endotoxinas – o lipopolissacarídeo (LPS) – também têm seu envolvimento no processo inflamatório por meio da promoção de respostas biológicas (Schein, Schilder, 1975; Watanabe, Inoue, 2013). O LPS acumula-se nas lesões periapicais, aumenta a permeabilidade vascular, reúne leucócitos e estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α . (Maltos et al., 2004; Watanabe, Inoue, 2013). Além de induzir a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (Kishimoto et al., 2012), autores sugerem que o LPS é capaz de estimular os odontoblastos, aprimorando a resposta imune inata (Oliveira, Santos, 2012). Na literatura, a sinalização do LPS foi capaz de reduzir as funções dos odontoblastos através da supressão da expressão da sialofosfoproteína da dentina (DSPP) (Nomiya et al., 2007) – uma proteína não colagenosa presente na dentina, presente no processo de diferenciação (Gibson et al., 2013). A expressão de DSPP é controlada pela proteína da matriz de dentina 1 (DMP-1), um indicador da diferenciação osteogênica/odontoblástica de

células pulpares (Abd-Elmeguid et al., 2012; Yun et al., 2012; Gibson et al., 2013).

Apesar destas informações, fica claro que a literatura ainda necessita de evidências de como a ação bacteriana influi no processo de reparo mediado por células progenitoras da polpa dental, de modo que desenvolveremos o trabalho avaliando o potencial do LPS bacteriano em estimular ou não os processos de diferenciação e de mineralização de células progenitoras da polpa dental.

Acredita-se que o LPS não terá efeito direto na viabilidade celular, uma vez que as concentrações a serem utilizadas são baixas (20 a 20000 ng/ml). Por outro lado, mesmo nas concentrações citadas, espera-se que o LPS possa impedir o processo de diferenciação celular, fato que poderá ser confirmado com uma redução da atividade funcional de mineralização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fonte, diferenciação e caracterização das células tronco

As células-tronco são células clonogênicas, ou seja, com habilidade de se proliferar e formar colônias, capazes de se auto-renovar e conhecidas por serem pluripotentes, isto é, têm a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células (Dissanayaka et al., 2011; Rosa et al., 2012).

Miura et al. (2003) verificaram que o dente decíduo humano esfoliado contém células-tronco multipotentes [células-tronco de dente decíduo humano esfoliado (SHED)]. SHED foram identificadas como sendo uma população de células clonogênicas, altamente proliferativas, capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo células neurais, adipócitos e odontoblastos. Após o transplante *in vivo*, observou-se que SHED são capazes de induzir a formação óssea, gerar dentina e sobreviver em cérebro de rato, juntamente com a expressão de marcadores neuronais. Mostra-se que um órgão humano naturalmente esfoliado contém uma população de células tronco, que é completamente diferente de células tronco previamente identificadas. SHED não são somente derivadas de um recurso de tecido muito acessível, mas também são capazes de fornecer células suficientes para uma potencial aplicação clínica. Assim, o dente decíduo pode ser um recurso único inesperado para terapias de células-tronco, incluindo o transplante de células-tronco autólogas e engenharia de tecidos.

Goldberg e Smith (2004) demonstraram que os odontoblastos produzem a maioria dos componentes da matriz extracelular (ECM)

encontrados na dentina e estão implicados na mineralização da dentina. As principais diferenças na ECM pulpar explicam por que a polpa é normalmente um tecido não mineralizado. *In vitro* ou *in vivo*, algumas moléculas de ECM da dentina atuam como nucleadores de cristal e contribuem para o crescimento de cristal, enquanto que outros são inibidores da mineralização. Após o tratamento de lesões de cárie em progressão moderada, odontoblastos e células da camada subodontoblástica de Höhl estão implicados na formação da dentina reacional. A cicatrização de lesões mais profundas em contato com a polpa resulta na formação de dentina reparadora pelas células pulpares. A resposta para o capeamento pulpar direto com materiais como o hidróxido de cálcio é a formação de uma ponte de dentina, resultado a partir do recrutamento e da proliferação de células indiferenciadas, que podem ser tanto as células-tronco ou células maduras trans-diferenciadas. Uma vez diferenciadas, as células sintetizam uma matriz que sofre mineralização. Os modelos animais têm sido utilizados para testar a capacidade de moléculas potencialmente bioativas para promover o reparo pulpar após a sua implantação na polpa. Moléculas de ECM ou induzem a formação de pontes de dentina ou grandes áreas de mineralização na polpa coronária. Eles também podem estimular o fechamento total da polpa no canal radicular. Enfim, algumas moléculas encontradas na matriz extracelular da dentina podem ter potencial no tratamento odontológico como agentes bioativos para o reparo da polpa ou engenharia tecidual.

Para testar a hipótese de que as células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) podem se diferenciar em odontoblastos funcionais e células endoteliais. Sakai et al. (2010) semearam SHED em lâminas de dente e as implantaram por via subcutânea em ratos imunodeficientes. SHED se diferenciaram em odontoblastos funcionais que geraram dentina tubular, conforme determinado por coloração de tetraciclina e microscopia confocal. Essas células também se

diferenciaram em células endoteliais vasculares, como o determinado pela coloração de beta-galactosidase. *In vitro*, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), induziu as SHED para expressar VEGFR2, CD31, e VE-caderina (marcadores do endotélio) e a organizar em brotos semelhantes aos capilares. VEGF induziu a fosforilação de ERK e AKT (indicativo de diferenciação), enquanto a inibiu a fosforilação de STAT3 (indicativo de caracterização das células tronco). Este trabalho demonstrou que SHED podem se diferenciar em células endoteliais angiogênicas e odontoblastos capazes de gerar dentina tubular.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) têm sido usadas para a aplicação clínica em engenharia de tecidos e medicina regenerativa (TERM). Segundo Nakamura et al. (2009), até o momento de seu estudo, a fonte mais comum de MSCs foi de medula óssea. No entanto, o aspirado de medula óssea é um procedimento invasivo e doloroso para o doador. Este estudo centrou-se na caracterização de células-tronco de dentes decíduos humanos (SHED) em comparação com as células tronco da polpa dentária (DPSC) e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BM MSCs). Os autores compararam as características como a taxa de proliferação e a expressão do marcador de células-tronco de DPSC, SHED, e BM MSCs pelos ensaios de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e imunofluorescência para STRO-1. Além disso, o perfil da expressão dos genes DPSC e SHED foi analisado através do DNA microarray e qRT-PCR. Todas as células isoladas a partir das três fontes exibiram características de MSCs, incluindo a morfologia fibroblástica e a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais. A taxa de proliferação das SHED foi significativamente mais elevada do que a das DPSC e BM MSCs ($p < 0,05$). A comparação dos perfis da expressão gênica indicaram 4.386 genes com expressão alterada entre DPSC e SHED, por 2 vezes ou mais. Alta expressão nas SHED foi observada para genes que participam nas vias relacionadas com a proliferação celular e na matriz extracelular, incluindo várias

citocinas, tal como o fator de crescimento de fibroblastos e o fator de crescimento de tumor beta. Concluíram que devido às suas vantagens de alta capacidade de proliferação, fonte abundante de células e coleta indolor com invasão mínima, as SHED poderiam ser uma opção desejável como fonte de células para aplicações terapêuticas em potencial.

No trabalho de Kanafi et al. (2014), o objetivo foi imobilizar as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) em microesferas de alginato e determinar sua viabilidade celular, proliferação, características de células tronco e potencial osteogênico. As DPSCs humanas isoladas da polpa dentária foram imobilizadas em 1% w/v de microesferas de alginato. Sua viabilidade e proliferação foram determinadas pelo azul de tripan e ensaio de MTT, respectivamente. Características de células tronco foram verificadas através da classificação das células com CD73 e CD90. O potencial osteogênico foi avaliado pela presença de osteocalcina. A coloração de vermelho de alizarina e complexona O-cresolftaleína confirmou e quantificou a deposição de cálcio. O RT-PCR avaliou a expressão de marcadores osteogênicos – ALP, Runx-2 e OCN. Mais do que 80% das DPSC imobilizadas foram viáveis ao longo do estudo de 3 semanas. A proliferação pareceu controlada e consistente ao contrário nas DPSCs do grupo controle. A presença de marcadores CD73 e CD90 confirmou a natureza das DPSCs imobilizadas. A presença de osteocalcina (OCN), um marcador de osteoblastos, foi confirmada nas microesferas no 21º dia. Os ensaios de mineralização mostraram elevada deposição de cálcio, indicando elevado potencial osteogênico das DPSCs imobilizadas. Os genes osteogênicos ALP, Runx-2 e OCN também foram regulados nas DPSCs imobilizadas. Surpreendentemente, as DPSCs imobilizadas no grupo controle cultivadas em meio para células tronco convencionais mostraram aumento da expressão de genes osteogênicos e de osteocalcina. Com esses resultados, os autores concluíram que a células-tronco da polpa dentária imobilizadas em hidrogel de alginato apresentaram potencial osteogênico reforçado e mantiveram a viabilidade

das células, ambos os quais são fundamentais para a regeneração do tecido ósseo.

2.2 Reações celulares frente à exposição de substâncias utilizadas na terapia de reparo pulpar

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem investigado a ação de diversas substâncias sobre as células provenientes da polpa, bem como as células progenitoras da polpa, com o intuito de revelar as respostas que se relacionam com a capacidade regeneradora dessas células.

Para Goldberg et al. (2008), o reparo da polpa dental por capeamento direto com hidróxido de cálcio ou por implantação de moléculas bioativas da matriz extracelular (ECM) implica numa cascata de quatro etapas: uma inflamação moderada, o comprometimento da reserva de células-tronco adultas, sua proliferação e diferenciação terminal. A ligação entre a inflamação inicial e o comprometimento celular ainda não está bem estabelecida, mas aparece como um fator-chave potencial no processo de reparação. Ou a liberação de citocinas devido a eventos inflamatórios ativam as células tronco (progenitoras) residentes, ou as células inflamatórias e os fibroblastos de polpa passam por uma conversão fenotípica em progenitores semelhantes aos osteoblastos/odontoblastos implicados na formação de dentina reparadora. A ativação de células dendríticas apresentadoras de antígenos por processos inflamatórios leves pode também promover a diferenciação de células semelhantes aos osteoblastos/odontoblastos e a expressão de moléculas de ECM implicadas na mineralização. O reconhecimento de bactérias por receptores específicos da membrana de odontoblastos e fibroblastos desencadeia uma resposta inflamatória e imune no tecido pulpar que também modularia o processo de reparação.

Paranjpe et al. (2010) cultivaram células-tronco da polpa dentária (DPSCs) em MTA cinza e analisaram os níveis de expressão gênica, secreção do fator de crescimento endotelial vascular e a morfologia da superfície. O MTA promoveu a sobrevivência e a proliferação celular, o que foi significativamente diferente dos controles. MTA regulou a expressão de fatores de transcrição, como Runx2 e genes como osteocalcina, fosfatase alcalina e sialoproteína de dentina, que são importantes genes odontoblásticos, mostrando, assim, a capacidade de promover a diferenciação das células da polpa em células semelhante aos odontoblastos, que, por sua vez, são responsáveis pela formação da ponte de dentina. O MTA induziu aproximadamente 1,7 vezes o aumento na secreção de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular, que é importante no processo de reparação e regeneração de tecidos. As diferenças entre o controle e os grupos MTA foram estatisticamente significativas. A análise por MEV revelou as diferenças nas morfologias de superfície entre o grupo controle e os grupos MTA. No geral, este estudo sustenta a natureza biocompatível do MTA e do possível mecanismo de formação de ponte de dentina juntamente com o reparo do tecido, todos os quais contribuem para um resultado de um tratamento bem sucedido.

Cavalcanti et al. (2011) analisaram o efeito do diferentes materiais de capeamento pulpar sobre a secreção de interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-8 (IL-8) pela migração de neutrófilos humanos. Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue de três doadores saudáveis. Os grupos experimentais foram o hidróxido de cálcio [Ca₂(OH)], um sistema adesivo (Single Bond) e o agregado de trióxido mineral (MTA). Células não tratadas foram utilizadas como controle. Câmaras Transwell® foram usadas na realização dos ensaios para simular uma situação *in vivo* de quimiotaxia de neutrófilos. Os materiais de capeamento pulpar foram colocados na câmara inferior e os neutrófilos humanos, na câmara superior. As células foram contadas e o meio de cultura foi analisado

utilizando kits de ELISA para a detecção e quantificação de IL-1 β e IL8. A secreção de IL-8 foi significativamente mais elevada em todos os grupos em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). O grupo do sistema adesivo mostrou maiores níveis de IL-8 do que o grupo do MTA ($p < 0,05$). A secreção de IL-1 β foi significativamente maior apenas no grupo MTA ($p < 0,001$). Concluiu-se que apenas MTA é capaz de melhorar a secreção de IL-1 β e todos os materiais testados aumentaram a secreção de IL-8. Estes resultados, combinados com todas as outras vantagens biológicas do MTA indicam que o mesmo poderia ser considerado o material de escolha para capeamento pulpar dental.

Com a finalidade de identificar as mudanças genéticas iniciais relacionadas com a diferenciação odontogênica quando o agregado trióxido mineral (MTA) é aplicado em células-tronco da polpa dentária (DPSC). Seo et al. (2013) obtiveram células odontogênicas diferenciadas (DPSC induzidas) pelo cultivo das DPSCs em meio indutor de mineralização durante 14 dias. A avaliação da diferenciação odontogênica foi realizada pela detecção da expressão de marcadores de superfície de células tronco STRO-1 e CD146 pela citometria de fluxo, pela mineralização *in vitro*, realizada pelo ensaio de Vermelho de Alizarina e pela análise da expressão dos níveis de DSPP e DMP-1 através da transcrição reversa de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR). Depois disso, o MTA em tubos de teflon foi aplicado aos DPSCs induzidos e à células não induzidas. As células expostas em tubos vazios foram utilizadas como controle negativo. O RNA total foi extraído das células tratadas e não tratadas com MTA 1 e 3 dias após a aplicação do tubo e avaliado por meio de análise de *microarray*. Também foi realizada uma análise de enriquecimento de genes (GSEA). Os principais resultados foram confirmados pelo RT-PCR. Na análise de *microarray*, embora os níveis de expressão de 460 genes tenham mudado mais do que 2 vezes nas células não induzidas tratadas com MTA após 1 dia, apenas 39 genes

foram alterados em células DPSCs induzidas tratadas com MTA. Nestas, o valor de correlação foi de 0,993 em 1 dia e 0,986 no dia 3º dia, em comparação com 0,970 em 1 dia e 0,975, em 3 dias nas células tratadas com MTA não induzidas. Análise de enriquecimento de genes revelou que o MTA regulou significativamente o conjunto de genes envolvidos na migração celular, a resposta para transformar o fator de crescimento b1, e a via da inflamação nas DPSCs não induzidas, enquanto que nas DPSCs induzidas apenas regulou os genes envolvidos na migração de células após 1 dia. Este resultado mostrou que MTA estimulou a diferenciação odontogênica de DPSCs e os efeitos de MTA foram drasticamente aumentados em células pulpares não induzidas em comparação com células odontogênicas diferenciadas.

Martin et al. (2014) testaram o efeito de várias concentrações de NaOCl sobre a sobrevivência das células troco da papila apical (SCAPS) e sobre a expressão da sialofosfoproteína da dentina (DSPP). Canais radiculares padronizados foram criados em dentes humanos extraídos e irrigados com hipoclorito de sódio - NaOCl (0,5%, 1,5%, 3% ou 6%) seguido pela irrigação de EDTA 17% ou de solução salina estéril. SCAPS foram semeadas em scaffolds à base de ácido hialurônico dentro dos canais e cultivadas por 7 dias. A seguir, as células viáveis foram quantificadas usando um ensaio de luminescência, e a expressão de DSPP foi avaliada utilizando a reação da polimerase em cadeia em tempo real quantitativa. Houve uma significativa redução na sobrevivência e na expressão de DSPP no grupo tratado com NaOCl a 6% em comparação com o grupo controle sem tratamento. Sobrevida comparável foi observada nos grupos tratados com as concentrações mais baixas de NaOCl, mas a maior expressão de DSPP foi observada no grupo NaOCl a 1,5%. Além disso, EDTA 17% resultou em aumento da sobrevida e na expressão de DSPP revertendo parcialmente os efeitos deletérios do NaOCl. Em conjunto, os resultados sugerem que a dentina condicionada com altas concentrações de hipoclorito de sódio teve um efeito negativo

sobre a sobrevivência e diferenciação das SCAPS. No entanto, esse efeito pode ser prevenido com a utilização do NaOCl a 1,5%, seguido por EDTA 17%.

Kim et al. (2013) constataram que a Canforoquinona (CQ) pode provocar a inflamação pulpar através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e prejudicar a diferenciação odontogênica das células pulpares, por meio de ensaios de viabilidade celular, secreção de citocinas e diferenciação odontogênica de células primárias da polpa (DPSCs). As células foram expostas à 250 e 500 mmol/L de CQ por um período de 3 dias, para então serem submetidas aos ensaios. O MTT mostrou uma redução na proliferação celular. Esta redução foi associada ao aumento da expressão de anticorpos p53, p21^{WAF1}, e p16^{INK4A}, obtidos no ensaio de Western blotting. Principalmente à p21^{WAF1}, que foi significativamente induzida a 250 mmol/L de CQ comparada a p53 e p16^{INK4A}. A p21^{WAF1} é uma potente quinase inibidora ciclina-dependente que inibe a progressão do ciclo celular na fase G1 e detém a divisão celular. No ensaio de ELISA para secreção de citocinas, constataram um aumento nos níveis de IL-6, IL-8 e MMP-3, dados esses confirmados pelo RT-PCR. O potencial de diferenciação e mineralização foi avaliado pela atividade de fosfatase alcalina e coloração de vermelho de Alizarina respectivamente e ambos demonstraram uma redução de sua atividade. Para testar se os efeitos da CQ na mineralização também ocorrem em outros tipos de células, foi utilizada uma linha de células osteoblásticas de rato, as células MC3T3-E1, e encontrou resultados semelhantes.

De acordo com Yun et al. (2012) o agregado de trióxido mineral (MTA) tem sido amplamente utilizado em apicificação e apicigênese clínica. No entanto, os efeitos do MTA sobre as células tronco da papila apical (SCAPs) e o mecanismo preciso de apicigênese até então não foram elucidados detalhadamente. Várias células-tronco derivadas de colônias foram isoladas a partir da papila apical, e os efeitos do MTA sobre a proliferação e diferenciação das SCAPs foram investigadas tanto

in vitro como in vivo. A ativação da via do fator nuclear kappa B (NFkB) nas SCAPs tratadas com MTA foi analisada por imunofluorescência e Western blot. O MTA na concentração de 2 mg / mL não afetou a proliferação dos SCAPs. No entanto, a 2 mg / mL as SCAPs tratadas com MTA apresentaram alterações ultra-estruturais, aumento na atividade da fosfatase alcalina, na deposição de cálcio, na expressão de marcadores de odontoblastos (sialoproteína da dentina e sialofosfoproteína da dentina) e marcadores de odonto / osteoblastos (Runx-2 e osteocalcina), sugerindo que o MTA aumentou a diferenciação odonto / osteoblástica das SCAPs in vitro. Os resultados in vivo confirmaram que MTA pode promover a dentinogênese regular das SCAPs. Além disso, scaps tratados com MTA exibiu um aumento citoplasmático do phos-IkBa e phos-P65, realçou P65 nuclear e aumentou a translocação nuclear do P65. Quando co-tratados com BMS345541 (o inibidor específico de NFkB), a diferenciação odonto / osteoblástica mediada por MTA foi significativamente atenuada. MTA na concentração de 2 mg / mL pode melhorar a capacidade odonto / osteogênica das SCAPs através da ativação da via NFkB.

O efeito de biomateriais - MTA e mistura enriquecida em cálcio (MEC) - sobre a diferenciação odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana (DPSCs) foi avaliado por Asgary et al. (2014). Foi realizada a citometria de fluxo com marcadores de células-tronco para a confirmação de suas características e homogeneidade. DPSCs isoladas foram semeadas em discos preparados de MTA, MEC, meio de diferenciação (MD) e meio de crescimento (MC) e incubadas por até 14 dias. Concentrações de fator de crescimento transformador-b1, proteína morfogenética de osso BMP2, BMP4, e fator de crescimento de fibroblastos 4 foram medidos em cada intervalo pelo ensaio ELISA. A expressão gênica de sialofosfoproteína de dentina (DSPP), proteína da matriz de dentina 1 (DMP-1) e as citocinas foram avaliadas por RT-PCR. Para avaliar a morfologia das células, foi realizado tomadas de

microscopia eletrônica de varredura (MEV); o potencial de mineralização foi avaliado pela coloração de vermelho de Alizarina S. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as DPSCs propagaram / aderiram / proliferaram de forma semelhante para o MTA e MEC. No dia 14, a coloração de vermelho de alizarina S confirmou que a mineralização ocorreu em todos grupos, exceto no MC. Expressões dos genes DMP-1 e DSPP foram similares nos grupos MEC, MTA e MD; eles foram significativamente mais elevados em comparação com o MC ($p < 0,05$). Uma maior quantidade do gene fator de crescimento transformador- $\beta 1$ foi expresso no MTA em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Já a expressão dos genes fator de crescimento de fibroblastos 4 e BMP2 foi significativamente maior no MEC ($p < 0,05$). Em todos os grupos testados, a expressão de BMP4 estava menor que no MC ($p < 0,01$); no entanto, os grupos MEC e MD foram semelhantes, mas maiores do que o MTA ($p < 0,05$). As concentrações dos produtos de proteínas detectadas usando o ensaio ELISA confirmaram as expressões desses genes. Concluiu-se que o MTA e o MEC podem induzir a diferenciação de fenótipos semelhantes aos osteo / odontogênicos de DPSC humanos e eles estimular a expressão de diferentes genes e a liberação do fator de crescimento.

Pang et al. (2014) avaliaram o efeito do EDTA sobre a fixação e a diferenciação de células-tronco da polpa dentária (DPSCs). Foi investigado se as mudanças de comportamento das DPSCs poderiam ser causadas pelos componentes bioquímicos liberados pela dentina tratada com EDTA. As células foram obtidas a partir de terceiros molares humanos e a natureza das células progenitoras foi investigada pela análise de citometria de fluxo. As DPSCs foram semeadas sobre discos de dentina tratados e não tratados com EDTA. Após 3 dias de cultura, a fixação celular foi avaliada pela densidade das células, o nível de expressão do gene fibronectina 1 (FN-1) através da reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 21 dias de cultura, a expressão de genes de diferenciação

(DMP-1, DSPP, ALP e OCN) foi investigada pelo RT-PCR e calcificação foi observada utilizando a coloração vermelho de alizarina S. Para investigar a liberação do fator de crescimento pelo EDTA induzido, as DPSCs foram cultivadas com ou sem contato direto com a superfície dentinária tratada com EDTA. Após 3 dias de cultivo, tanto a densidade celular como o nível de expressão da fibronectina foram significativamente mais elevados no grupo de dentina tratada com EDTA. Após 3 semanas, as DPSCs nas superfícies dentinárias tratadas com EDTA apresentaram níveis de expressão mais elevados de DSPP e de DMP-1, enquanto que as DPSCs cultivadas sem contato direto com as superfícies de dentina tratadas com EDTA não apresentaram estes resultados. Os resultados mostraram que o EDTA induziu a fixação das células e a diferenciação odontoblástica/osteoblástica, a qual foi observada somente no grupo onde as DPSCs foram colocadas em contato direto com as superfícies de dentina tratadas com EDTA. Estes resultados sugerem que o EDTA é benéfico para alcançar resultados de sucesso em endodontia regenerativa.

Uma combinação de 3 antibióticos (3 mix – ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) tem sido amplamente utilizada em endodontia regenerativa. Estudos recentes recomendam que uma concentração segura de 3 mix é na gama de 0,39 mg / ml e 1 mg / ml, pois altas concentrações podem limitar a regeneração do tecido. Com o objetivo de determinar a capacidade regenerativa das células da polpa dental humana (DPCs) e da papila apical humana (APCs), após um tratamento de 7 dias com doses selecionadas do 3 mix, Phumpatrakom e Srisuwan (2014) dividiram as células DPCs / APCs primárias de terceira passagem em grupos controle e experimental. No grupo controle, as células foram cultivadas em meio completo regular. No grupo experimental, as células foram cultivadas em meio completo contendo 0,39 mg / mL ou 1 mg / mL de 3 mix durante 7 dias. Após o período de tratamento, os meios foram alterados, e as células ainda foram testadas quanto ao potencial de

proliferação e diferenciação. Para a proliferação celular, foi usada uma qualificação colorimétrica de MTT nos dias 1, 3, 5, e 7. Para o potencial de diferenciação, um meio de diferenciação dentinogênico foi adicionado nas células tratadas e cultivadas durante 7, 14 e 21 dias. Os resultados foram analisados utilizando-se coloração de vermelho de Alizarina S RT-PCR em tempo real quantitativo. Após 7 dias de tratamento, foi descoberto morte celular em 100% do grupo com 1 mg/mL de 3mix. A capacidade proliferativa das DPCs e APCs tratadas com 0,39 mg / mL de 3mix foi significativamente menor do que a de células não tratadas em todos os tempos ($p < 0,05$). A formação de nódulos mineralizados foi encontrada tanto nos grupos tratados com 3mix como nos grupos controle, mas foi significativamente menor nos grupos tratados com 3mix aos 7, 14, e 21 dias ($p < 0,01$). RT-PCR em tempo real quantitativo não mostrou diferença estatisticamente significativa (intervalo de confiança de 95%) em sialoproteína óssea, ALP e expressão gênica de DMP-1 em quaisquer DPCs ou APCs tratadas com 3 mix comparados com os grupos controle. Concluiu-se que 1 mg/mL de 3 mix teve forte toxicidade para DPCs / APCs quando aplicado durante 7 dias, enquanto que 0,39 mg / mL de 3 mix mostraram nenhuma toxicidade, mas ainda afeta a proliferação celular e o potencial de mineralização. No entanto, nenhuma diferença na expressão de genes dentinogênicos foi observada entre os grupos tratados com 3 mix e os grupos não tratados.

2.3 Reações das células da polpa frente à inflamação pulpar

Após a exposição do tecido pulpar, as citocinas são produzidas, o que regula a resposta inflamatória da polpa. Ferreira et al. (2009) verificaram a participação de fibroblastos da polpa de dentes

decíduos humanos nesse processo inflamatório, no que se refere a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8) a partir destas células. Agentes da pulpotomia foram aplicados como meios condicionados no cultivo de células com os seguintes grupos: (1) controle negativo; (2) controle positivo (lipopolissacarídeo - LPS); (3) de hidróxido de cálcio (pó); (4) agregado de trióxido mineral (MTA); (5) resina adesiva e (6) formocresol. Após 24 horas em contato com as células, os meios condicionados foram removidos, as proteínas foram extraídas das células e IL-1 β e IL-8 foram quantificadas pelo ensaio ELISA. Observou-se que o hidróxido de cálcio estimulou a produção de IL-1 β sem estimular a IL-8. Por outro lado, a resina adesiva e o formocresol estimularam a produção de IL-8, e não estimulou a IL-1 β . O MTA estimulou ambas as citocinas em um nível intermediário, quando comparado com os outros materiais. Dessa forma, o estudo concluiu que os fibroblastos de dentes decíduos podem responder imunologicamente e que diferentes materiais de capeamento pulpar podem ajudar neste processo.

Abd-Elmeguid et al. (2012), investigaram a presença de DMP-1 em polpas inflamadas e em polpas normais de dentes impactados, coletadas em clínica endodôntica. Células pulpares dos dentes impactados foram explantadas para testar o efeito do DMP-1 sobre a produção de interleucina-6 (IL-6) e IL-8 através do ensaio ELISA. Utilizando imunohistoquímica, o DMP-1 foi localizado nas polpas inflamadas, mas estava ausente nas polpas dos dentes impactados. Onde quer que encontrados, áreas de calcificação foram coradas positivamente contra DMP-1, sugerindo seu possível envolvimento na inflamação da polpa e na calcificação patológica. Para testar esta hipótese, fibroblastos de polpa humanos primários foram cultivados e identificados com base na sua morfologia, imuno-reatividade contra vimentina e colágeno a1 por imunofluorescência, coloração negativa para CD45, CD34, e citoqueratina por citometria de fluxo. O DMP-1 (10 ng / ml) estimulou a produção de IL-6 e IL-8 a partir dos fibroblastos da polpa e demonstrou um efeito aditivo

ao do lipopolissacarídeo na produção de IL-6 e IL-8. A inibição da via proteína quinase mitógeno-ativado p38 bloqueou o efeito pró-inflamatório do DMP-1 sobre os fibroblastos da polpa. Concluíram que o DMP-1 pode participar no desenvolvimento de alterações inflamatórias na polpa dentária e sua inibição pode ser uma nova estratégia terapêutica para atingir a inflamação da polpa e calcificação patológica.

EiSalhy et al. (2012) mediram e compararam os níveis de expressão das citocinas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sangue pulpar de pulpíte irreversível, na exposição pulpar por cárie assintomática e polpas normais. O sangue foi obtido a partir de locais com exposição pulpar usando bolinhas de algodão. Vinte e cinco amostras foram obtidas a partir de dentes normais, 40 de exposições pulpares por cárie assintomáticas e 43 polpas de dentes com pulpíte irreversível. Os níveis de citocina foram determinados pelo ensaio ELISA. Níveis significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram detectados em polpas expostas por cáries e pulpíte irreversível, em comparação com os dentes normais. Os níveis de IL-2 e IL-10 foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em polpas expostas por cáries, em comparação com a pulpíte irreversível, enquanto a IL-8 foi significativamente maior ($p < 0,001$) em pulpíte irreversível em relação às polpas expostas por cáries. O mais interessante, as proporções IL-6/IL-10 e IL-8/IL-10 foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na pulpíte irreversível em comparação a ambas as polpas expostas por cáries e dentes normais. Níveis de IL-8 e a proporção de IL-6/IL-10 e IL-8/IL-10 têm o potencial de serem indicadores de inflamação pulpar em casos de polpas expostas por cáries.

Para investigar a correlação entre diferentes aspectos de sinais e sintomas clínicos e radiográficos de acordo com os níveis de interleucina IL-1 β , fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) e suas correlações (network) produzidas por macrófagos estimulados por conteúdo endodôntico coletado de infecção

endodôntica primária com periodontite apical (IEPPA). Martinho et al. (2012) coletaram amostras de 21 canais radiculares com IEPPA usando cones de papel. A presença de exsudato (EX), dor à palpação (DP), sensibilidade à percussão (SP), e o tamanho da lesão radiográfica (TLR) foram registrados. Reação da polimerase em cadeia (16S rDNA) foi utilizada para a detecção bacteriana e o ensaio *limulus ameobocyte lysate* (LAL) para a medição da endotoxina. Macrófagos Raw 264.7 foram estimulados com conteúdo bacteriano durante 24 horas. As quantidades de IL-1b, TNF-a, IL-6, IL-10 e de PGE2 foram medidas pelo ensaio ELISA. As bactérias e endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras. IL-6 e TNF-a foram correlacionados positivamente com a TLR e EX, respectivamente ($p < 0,05$). Sinais e sintomas clínicos e achados radiográficos foram definidos como variáveis dependentes para correlações de EX-positiva entre PGE2, IL-1b, e TNF-a ($p < 0,05$), enquanto que a IL-6 e de PGE2 foram correlacionados positivamente uns com os outros em DP, mas correlacionados negativamente na TLR ($p < 0,05$). Quando DP e SP-DP foram definidos como variáveis dependentes, diferentes correlações de citocinas foram encontradas. Os resultados sugeriram papéis diferentes para cada citocina no desenvolvimento de periodontite apical, cujos efeitos de redes sobrepostas dependem dos sinais e sintomas e características radiográficas encontradas na infecção endodôntica.

Para entender os mecanismos relacionados com o envelhecimento da polpa que podem influenciar o processo de reparação pulpar, Lee et al. (2013) cultivaram células pulpares dentais humanas (HDPCs) e estimularam seu envelhecimento prematuro por estresse através da exposição à 150 mmol/L H_2O_2 . O estado de senescência foi caracterizado pela coloração *in situ* dos testes enzimáticos SA β -galactosidase e ONPG e pela avaliação do nível de espécies de oxigênio reativo (ROS), através de uma sonda fluorescente sensível a oxidação,

seguido pela citometria de fluxo. A expressão alterada de moléculas da inflamação crônica e relacionadas com o envelhecimento foi avaliada pelo Western blotting e as funções da dentinogênese comprometidas pela senescência foram avaliadas pelo Western blotting, RT-PCR, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e coloração vermelho de Alizarina S. A senescência replicativa das células e a senescência prematura induzida por estresse foram comparadas. As primeiras apresentaram um aumento na expressão das moléculas de adesão intracelular-1(ICAM-1) e molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) e redução gradativa de moléculas inflamatórias crônicas como receptor ativado de proliferador de peroxissoma-gama (PPAR- γ) e moléculas heme oxigenase-1(HO-1). Também mostraram alta expressão de moléculas p53, p21, quinase fosforilada regulada por sinal extracelular (p-ERK1/2) e c-myb. As células com senescência prematura induzida por estresse apresentaram resultados semelhantes às primeiras. Além disso, ambas as HDPCs reduziram os marcadores odontogênicos como a sialofótoproteína da dentina (DSPP) e a matriz de dentina-1(DMP-1) e os marcadores osteogênicos de proteína morfogenética óssea-2 e 7 (BMP-2 e 7), Runx-2, osteopontina (OPN), ALP e formação de nódulos mineralizados. Numa comparação entre células envelhecidas e células mais jovens, aquelas exibiram baixa atividade de fosfatase alcalina e redução da mineralização.

2.4 Reações de diferentes células dentais frente à exposição ao LPS

A polpa dental, como qualquer outro tecido conjuntivo, responde a agressão com o processo de inflamação, a fim de eliminar os patógenos e permitir o reparo (Silva et al., 2009).

O lipopolissacarídeo (LPS) – endotoxina liberada após lise das paredes celulares de bactérias Gram-negativas, tem seu envolvimento no processo inflamatório por meio da promoção de respostas biológicas (Schein, Schilder, 1975; Watanabe et al., 2013).

Segundo Nakane et al. (1995), células da polpa dental humana foram tratadas com 1, 10 e 100 µg / mL de lipopolissacarídeo (LPS). Os efeitos do tratamento foram examinados através da medição do teor de DNA, teor de proteína, e atividade da fosfatase alcalina das células. Amostras de LPS foram purificados de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de canais radiculares e o LPS de *Escherichia coli* 0111: B4 foi utilizada como um controle positivo. A uma concentração de 1 µg / mL, nenhum dos LPS causou qualquer alteração na produção de DNA ou de proteína, enquanto que a quantidade de DNA foi aumentada a 10 µg / mL e inibida a 100 µg / mL. A síntese proteica foi diminuída por LPS em ambas 10 e 100 µg / mL. A atividade de fosfatase alcalina não foi alterada em qualquer concentração de LPS testados.

O papel do LPS nas reabsorções ósseas periapicais foi investigado por Hong et al. (2004). Polimixina B (PMB), um inibidor específico do LPS, foi avaliado para tratar a lesão apical. O LPS isolado de dois patógenos endodônticos comuns, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis*, estimulou macrófagos de rato (J774) a liberar Interleucina-1α (IL-1α) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) em determinado período de tempo. A combinação de LPS reforçou o estímulo. Entretanto, o PMB inibiu seus efeitos significativamente. O LPS também estimulou a expressão do gene MMP-1 nas células J774, enquanto que os anticorpos anti-IL-1α e anti-TNF-α, assim como o PMB, reduziram seu efeito. Um modelo de infecção da lesão periapical foi estabelecida nos ratos Wistar. A administração de PMB reduziu a extensão das lesões associadas à reabsorção óssea de 76% a 80%

aproximadamente e reduziu simultaneamente o número de MMP-1 produzidos por macrófagos. Os autores sugerem que o LPS proveniente de canais radiculares infectados promove a síntese de IL-1 α e TNF- α de macrófagos. Essas citocinas pró-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos para estimular a reabsorção óssea periapical.

Nomiyama et al. (2007) estabeleceram a proliferação das linhas de células progenitoras da polpa de células da papila dental dos incisivos de ratos. Essas linhagens apresentaram altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), expressão de Runx2 e sialofosfoproteínas da dentina (DSPP) e formação extracelular de nódulos mineralizados. Usando a linha de células com elevado nível de expressão de DSPP e a deposição mineral proeminente, examinou-se se o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) teve efeitos sobre as respectivas propriedades odontoblastos e descobriu que a atividade de ALP, a expressão de DSPP e Runx2, e a formação de nódulos mineralizados foram suprimidas de acordo com a concentração do LPS. Estes resultados sugerem que a infecção bacteriana gram-negativa pode regular negativamente a função dos odontoblastos.

Kishimoto et al. (2012) investigaram os efeitos de PGNs gram-negativas e gram-positivas sobre a reabsorção óssea e osteoclastogênese na presença ou na ausência de LPS. Foram injetados PGN de *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* com ou sem LPS na gengiva de rato, e avaliadas histopatologicamente a reabsorção do osso alveolar por coloração da fosfatase ácida resistente ao tartarato. Também estimulou-se os precursores de osteoclastos de macrófagos da medula óssea de rato com estas PGNs *in vitro* e avaliou-se a osteoclastogênese. As células também foram estimuladas com os ligantes sintéticos para NOD1; c-D-glutamyl-meso-DAP NOD2; muramyl dipeptide ou TLR2; Pam3CSK4 com ou sem LPS para analisar a sinalização cross-talk. PGN de *S. aureus*, mas não PGN de *E. coli*, induziram a reabsorção do osso alveolar, assim como LPS. No entanto, ambas as fontes de PGN

aumentaram significativamente a reabsorção óssea nos ratos com LPS co-injectados. Ambos os tipos de PGNs induziram a osteoclastogênese e aceleraram a osteoclastogênese quando as células foram co-estimuladas com LPS in vitro. Todos os ligantes sintéticos induziram sinergicamente a osteoclastogênese por co-estimulação com LPS. Concluiu-se então que PGN gram-positivas ou gram-negativas trabalharam em sinergia com o LPS para induzir a reabsorção óssea e osteoclastogênese, possivelmente pela coordenação dos efeitos do TLR2, NOD1, NOD2 e sinalização do TLR4.

Considerando a importância das citocinas, interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-8 (IL-8) frente ao processo inflamatório, Silva et al. (2009) analisaram a localização, distribuição e concentração dessas citocinas em polpas saudáveis e inflamadas. Utilizaram para o estudo vinte polpas, obtidas a partir de terceiros molares saudáveis (n = 10) e de pulpectomias (n = 10), com a metade de cada grupo utilizado para imunohistoquímica e metade para ensaios de extração de proteínas e ELISA. Os fibroblastos obtidos a partir de polpas saudáveis, estimulados ou não por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), a fim de simular a agressão nas culturas de células, foram analisados por ELISA para IL-1 β e IL-8 como informação complementar. Os dados obtidos a partir da imunohistoquímica foram analisados qualitativamente. Os dados obtidos a partir de ensaios de ELISA (de tecidos e células) foram tratados estatisticamente pelo teste t ($p < 0,05$). Na análise imunohistoquímica, observaram que as polpas inflamadas foram fortemente coradas para ambas as citocinas nas células inflamatórias, enquanto que as polpas saudáveis não foram marcadas. O ELISA dos tecidos confirmou quantitativamente a presença elevada de ambas citocinas. Além disso, os fibroblastos da polpa cultivados e estimulados por LPS também produziram mais citocinas do que as células de controle. Assim, concluíram que as polpas inflamadas apresentam valores mais elevados

de IL-1b e IL-8 do que as polpas saudáveis e que os fibroblastos de polpa estimulados por LPS bacteriano produzem níveis mais elevados de IL-1b e IL-8 do que o grupo controle.

Células do folículo dental (CFDs) como células precursoras periodontais são a fonte natural para terapias celulares para periodontite. A periodontite é iniciada após a infecção do periodonto com agentes patogênicos orais, tais como as bactérias Gram-negativas *Porphyromonas gingivalis*. O lipopolissacárido (LPS) é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. Morsczeck et al. (2012) investigaram a administração de LPS às CFDs. Foram avaliados a proliferação celular (ensaio WST1), expressão de citocinas IL-1B, IL-8 e IL-6 (RT-PCR tempo real) e a diferenciação osteogênica de CFDs (atividade de fosfatase alcalina – ALP - e coloração com vermelho de alizarina) na presença de LPS de *P. gingivalis* e LPS de *Escherichia coli*. Todas as citocinas pró-inflamatórias testadas foram altamente aumentadas após o tratamento com LPS de *E. coli*. O LPS de *P. gingivalis* induziu somente a expressão de IL-8, mas esta expressão foi significativamente mais baixa do que após a administração de LPS de *E. coli*. A atividade de ALP foi significativamente superior em CFDs após a administração de LPS de *E. coli* do que após a administração de LPS de *P. gingivalis* ou sob condições normais de diferenciação celular. No entanto, a mineralização foi inibida com LPS de ambas as espécies bacterianas. Concluiu-se que o LPS altera a diferenciação osteogênica em CFDs. Além disso, a falta de indução de citocinas pró-inflamatórias nas CFDs após a administração de LPS de *P. gingivalis* difere grandemente dos fibroblastos de LPD. Estas propriedades imunológicas de CFDs tem que ser consideradas para terapias celulares de periodontite com CFDs.

O estudo de Oliveira e Santos (2012) foi realizado para avaliar o mecanismo envolvido na expressão do fator de células-tronco (SCF) e

produção por lipopolissacarídeo (LPS) estimulados por células semelhantes aos odontoblastos (ODs-like) e para investigar a via do sinal de transdução ativada nesse processo. Células ODs-like (MDPC-23) foram estimuladas com diferentes concentrações de LPS por 1, 6 e 24 horas. A expressão do SCF nas células ODs-like foi analisada pelo RT-PCR, e a produção de SCF foi avaliada por ensaio imunoenzimático ELISA. Num outro conjunto de experimentos, as células ODs-like foram pré tratadas com dexametasona (DEX), MK886 (MK), inibidor de p42/44 (PD 98059 [PD]), inibidores de p38 (SB 202190 [SB]), ou um inibidor de PI3K (wortmannin [Wort]) durante 30 minutos seguido do estímulo com LPS (0,1 mg / mL) para 1 hora. As células ODs-like estimuladas com LPS (0,1 mg / mL) durante 1 hora expressaram SCF, mas a produção de SCF diminuiu com as concentrações crescentes de LPS (1, 10, e 100 mg / mL). DEX e MK foram capazes de inibir a expressão do mRNA do SCF. PD, SB, e Wort inibiram a expressão do mRNA do SCF. Concluiu-se que o LPS induziu a expressão de mRNA do SCF e a produção em células ODs-like ocorre através da produção de leucotrienos ou de citocinas e / ou formação de quimiocinas, ativando a p42/44, p38, e as vias PI3K. Os dados sugerem que o SCF liberado pelas células ODs-like podem agir como moduladores da resposta imune.

Com o objetivo de comparar os níveis de endotoxinas (lipopolissacarídeos [LPSs]) encontrados em infecções endodônticas primária e secundária com periodontite apical, correlacionando o teor de LPS com os achados clínicos e radiográficos. Além de investigar a presença de bactérias alvo anaeróbias gram-negativas, Gomes et al. (2012) colheram amostras a partir de 15 canais radiculares com infecções primárias e 15 com infecções secundárias, usando cones de papel. O ensaio limulus amoebocyte lysate (LAL) foi usado para quantificar endotoxinas e a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR [16S rDNA]) foi utilizada para a detecção de bactérias. Endotoxinas foram

detectadas em 100% das amostras coletadas de canais radiculares com infecções primárias (15/15) e infecções secundárias (15/15), com valores médios de 7,49 EU / ml e 3,96 EU / ml, respectivamente ($p < 0,05$). O valor da mediana de endotoxinas encontrado na presença de sintomas clínicos foi significativamente mais elevado do que em dentes assintomáticos com infecções primárias ($p < 0,05$). Foi encontrada uma correlação positiva entre o conteúdo de endotoxina e um tamanho maior da área radiolúcida (> 3 mm) ($p < 0,05$). *Prevotella nigrescens* (10/15, 4/15), *Fusobacterium nucleatum* (5/15, 1/15), *Treponema denticola* (3/15, 1/15) e *Treponema socranskii* (5/15, 1/15) foram detectados nos dentes com infecções primárias e secundárias, respectivamente. *P. endodontalis* estava presente apenas em dentes com infecções primárias (15/5). Os dentes com infecções endodônticas primárias tiveram maiores teores de endotoxinas e uma comunidade bacteriana gram-negativa mais complexa do que os dentes com infecções secundárias. Além disso, os níveis de endotoxinas foram relacionados com a gravidade da destruição óssea nos tecidos periapicais bem como o desenvolvimento de características clínicas em dentes com infecções primárias.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (*E. coli*), sobre células progenitoras da polpa dentária. Estes efeitos foram observados sobre ensaios funcionais (produção de nódulos mineralizados pelo ensaio de alizarin vermelho e atividade enzimática da fosfatase alcalina), expressão de citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α (ELISA) e na expressão gênica de marcadores de diferenciação odontoblástica (DMP-1 e DSPP). Adicionalmente, o potencial de impedir o processo de mineralização já iniciado será avaliado nos mesmos parâmetros (funcionais e de expressão gênica), tendo como base as mesmas células progenitoras induzidas por meio osteogênico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo celular

As células utilizadas nesse estudo foram cultivadas em meio mínimo essencial, variação alfa (alfa-MEM, GIBCO/Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO/Life Technologies) inativado por calor, 0,01g (100 μ M) de ácido ascórbico (SIGMA ALDRICH, St Louis, MO, USA) e 1% de solução antimicótica-antibiótica (penicilina e estreptomicina [SIGMA ALDRICH, St Louis, MO, USA]) (Figura 1a) e mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific Inc, United States). As células foram cultivadas em frascos próprios para cultivo de 75 cm³ – 270 ml (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) (Figura 1b) - sempre até atingirem subconfluência (80% de ocupação do frasco/placa), quando foram tripsinizadas e subcultivadas numa relação de área de 1:4.

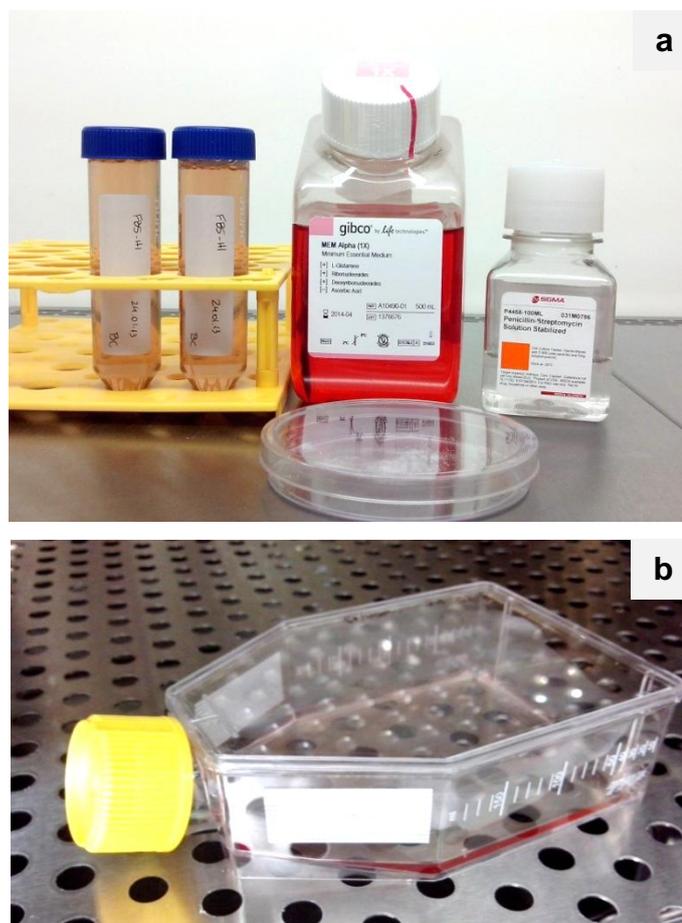


Figura 1 – a) meio de cultura (α -MEM), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 0,01g (100 μ M) de ácido ascórbico e 1% de solução antimicótica-antibiótica (penicilina e estreptomicina); b) frasco para cultivo de 75 cm³, contendo 15 ml de meio de cultura celular.

4.2 Isolamento das células progenitoras

Apesar de não ser objeto do presente trabalho, optamos por colocar a descrição a seguir, de modo a viabilizar a compreensão dos métodos de obtenção de células progenitoras. Estas células foram obtidas em estudo anterior, devidamente aprovada em comitê de ética (parecer 46420, Anexo- A) e arquivadas em nitrogênio líquido no banco de células

do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT-SJC. De forma geral, um molar decíduo esfoliado naturalmente foi clivado e seu tecido pulpar coletado de forma asséptica, fragmentado com lâmina de bisturi e digerido enzimaticamente conforme descrito por Gronthos et al. (2000), utilizando-se uma solução contendo 3 mg/ml de colagenase tipo I e 4 mg/ml de dispase por 1 hora a 37 °C.

A solução (1 ml) obtida após a digestão dos fragmentos foi filtrada em “cell strainers” com poros de 70 µm (Ref. 352350, BD Biosciences, EUA), de modo a obter suspensão contendo células isoladas. Essa suspensão foi diluída em meio de cultura em 10x e dividida em 10 poços de placas de 6 poços. Após 24 horas, os poços foram lavados com PBS e observados cuidadosamente em microscopia de fase para busca de células isoladas aderidas, as quais foram marcadas (com marcador na tampa da placa). Essas células marcadas foram então observadas diariamente para confirmar sua capacidade clonogênica, uma vez que células diferenciadas dificilmente sobrevivem na ausência de contato com outras células. Ressalta-se que foram selecionadas somente células de poços que apresentassem somente colônias formadas a partir de uma única célula, descartando-se os outros poços. Confirmada a formação da colônia, as células foram tripsinizadas e levadas a frascos de cultura para expansão. O potencial progenitor das células isoladas foi confirmado pela execução dos ensaios descritos no Quadro 1 (abaixo).

Quadro 1- Potencial progenitor das células utilizadas no estudo

Ensaio	Indução	Positivo
Diferenciação adipogênica (Óleo vermelho)	insulina recombinante humana, L-glutamina, dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina e indometacina	Sim
Diferenciação condrogênica (Azul alciano)	dexametasona, ascorbato, piruvato de sódio, prolina, L-glutamina e 10ng/ml de TGF β -3	Sim
Diferenciação osteogênica (Alizarin vermelho)	dexametasona, L-glutamina, ascorbato e β -glicerolfosfato	Sim
Expressão de CD73 (Western blotting)	---	Sim
Expressão de CD90 (Western blotting)	---	Sim
Expressão de CD105 (Western blotting)	---	Sim
Expressão de CD34 (Western blotting)	---	Não
Expressão de CD 45 (Western blotting)	---	Não

4.3 Grupos experimentais

Foram estabelecidos 8 grupos experimentais para os ensaios de atividade de fosfatase alcalina (ALP), utilizando-se um total de 4 concentrações diferentes de LPS sobre as células. Para os ensaios de expressão gênica e de mineralização (formação de nódulos), utilizou-se somente as concentrações mais baixas que apresentaram efeito visível na atividade de fosfatase alcalina. De modo geral, o LPS (*E. coli*, L4391, SIGMA ALDRICH, St. Louis, EUA) foi aplicado às culturas nas concentrações citadas (Quadro 2), sendo que metade dos grupos teve o estímulo pelo meio de cultura osteogênico, suplementado por

hidrocortisona-21-hemisuccinato e beta-glicerolfosfato (CC-4194, Lonza, Walkersville, EUA). A outra metade recebeu suporte pelo meio de cultura alfa-MEM suplementado conforme descrito anteriormente (item 4.1). Ressalta-se que as concentrações foram definidas após estudo piloto em ensaios de viabilidade celular, onde valores de até 10 µg/ml foram aplicados sobre o mesmo tipo celular, e de atividade de fosfatase alcalina, onde valores são descritos no Quadro 2. Os limites a serem testados foram estabelecidos como o mínimo para se observar mudanças na atividade de fosfatase alcalina (20 ng/ml) e máximo para se evitar efeitos de morte celular (20000 ng/ml). Todos os ensaios descritos abaixo foram realizados em triplicatas para assegurar a reprodutibilidade dos mesmos.

Quadro 2- Grupos experimentais

Concentração de LPS	Alfa-MEM	Meio osteogênico
Controle (sem LPS)	-	+
20 ng/ml	20	20IM
200 ng/ml	200	200IM
2000 ng/ml	2000	2000IM
20000 ng/ml	20000	20000IM

4.4 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina

Para verificar o potencial de mineralização das células, foi realizado o ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP), seguindo as instruções do fabricante (83369, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Foi utilizada uma placa de 96 poços, onde foram plaqueadas 5×10^3 células em 200 µL de

meio em cada poço, num total de 4 amostras para cada grupo experimental. Logo após, a placa foi levada à estufa a 37 °C onde permaneceu por 24 horas.

Em seguida, a placa teve o meio removido e foram adicionados novos meios contendo as diluições do LPS de acordo com o item 4.3. A placa foi incubada novamente na estufa por 3 dias. Depois desse período, os meios foram removidos para, em seguida, ser adicionado aos poços 80 µL de Buffer (solução tampão) (Figura 3a), para a lise e homogeneização das células. Foi preparado uma solução de pNPP (fosfato de p-nitrofenila), contendo dois tablets de pNPP (Figura 3b) e 5,4 mL de buffer, agitados manualmente e mantidos no gelo até o momento de sua utilização. Foram adicionados em cada poço da placa 40 µL da solução de pNPP. A placa foi envolvida em papel alumínio (Figura 3c) para a proteção da luz e levada novamente ao agitador por 30 segundos e então foi mantida em temperatura ambiente (25 °C) pelo período de uma hora. Transcorrido esse período, foi acrescentado 20 µL de solução de parada (Figura 3d) em cada poço. Mais uma vez, a placa foi levada ao agitador por 30 segundos e, em seguida, levada para leitura em espectrofotômetro (Figura 3e) a um comprimento de onda de 405 nm.

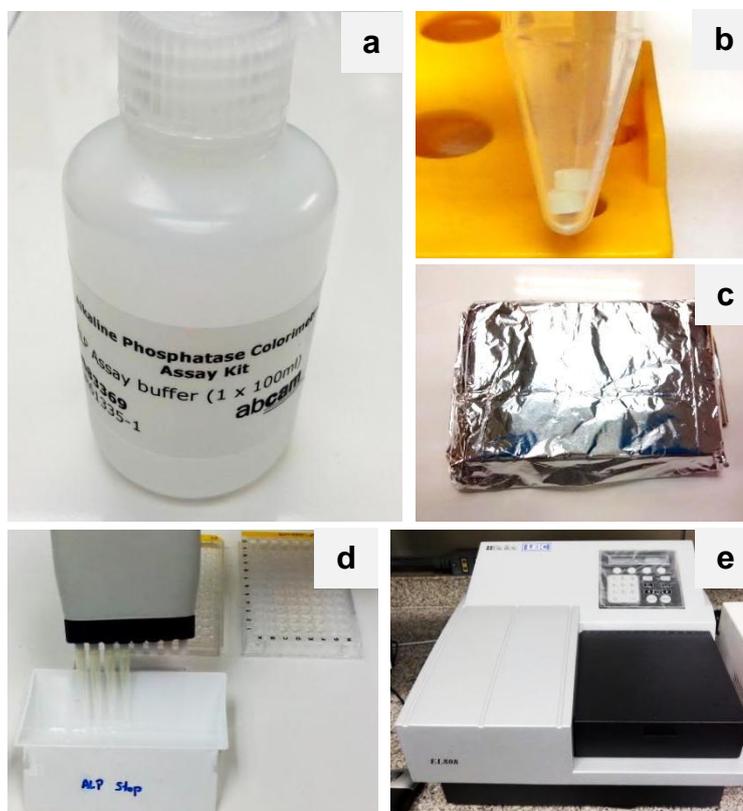


Figura 3 – a) solução tampão; b) tabletes de pNPP; c) placa envolvida em papel alumínio para proteção da luz; d) colocação da solução de parada; e) espectrofotômetro.

4.5 Ensaio de formação de nódulos minerais

As células foram plaqueadas em placa de 24 poços com 400 μL de meio em cada poço. Após 24 horas em estufa, o meio de cultura foi substituído pelos meios contendo o LPS a uma concentração de 200 ng/ml. Os meios foram substituídos por meio fresco a cada 2-3 dias até cumprirem o prazo de 3, 7 e 14 dias, quando foram processadas para observação dos depósitos de cálcio.

Para o ensaio, os meios foram removidos e as células lavadas com o PBS. A seguir, elas foram fixadas em formalina 10% (pH 7.4) e

permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora, para depois serem lavadas por 2 vezes com água deionizada. A monocamada de células foi coberta com 200 μ L do corante Alizarin vermelho e foram incubadas por 20 minutos (Figura 4). Foram realizadas sucessivas lavagens com água deionizada até a total remoção de corante não ligado. Após lavagens, foi adicionada água deionizada nos poços para a observação em microscópio de fase para detecção dos nódulos mineralizados e fotografias para comparação qualitativa entre os grupos.

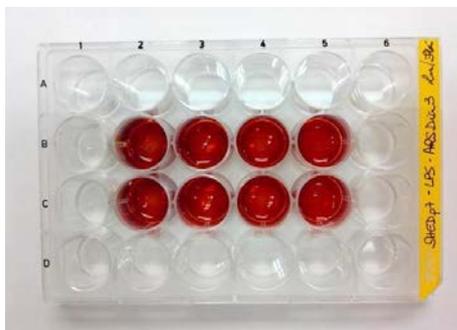


Figura 4 - Monocamada de células coberta com 200 μ L do corante Alizarin vermelho.

4.6 Ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para a quantificação das citocinas, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços com 400 μ L de meio em cada poço. Após 24 horas em estufa, o meio de cultura foi substituído pelos meios contendo o LPS a uma concentração de 200 ng/ml. Os meios foram substituídos por meio fresco a cada 2-3 dias até cumprirem o prazo de 3, 7 e 14 dias, quando o sobrenadante dos poços foram removidos e congelados em -80 °C

No dia anterior ao ensaio – até no máximo 18 horas antes – foi realizado a sensibilização das placas de 96 poços, específicas para ELISA (Global Plast, Global Trade Technology, Monte Alto, SP) (Figura

5), com os anticorpos de captura da IL-1 β e TNF- α . Para este procedimento, foi colocado em uma placa de Petri 10 ml de PBS, do qual foram removidos 55,56 μ L e acrescentados 55,56 μ L do anticorpo de captura IL-1 β (para ficar com um volume total de 10 ml), o mesmo foi realizado para a TNF- α . Esta quantidade foi calculada para uma placa de 96 poços. Foi aplicado 100 μ L dessa solução em cada poço da placa. Em seguida, cobriu-se a placa com filme de PVC e a mesma permaneceu sobre a bancada até a manhã do dia seguinte.



Figura 5 – Placa de 96 poços específica para o ensaio ELISA.

Na manhã seguinte os poços foram lavados 3 vezes com 300 μ L de solução tampão (20 ml de wash buffer diluído em 980 ml de água deionizada) com uma multicanal. Logo após, a solução tampão foi removida e o excesso foi retirado com batidas da placa contra uma camada de papel absorvente, com força, até ficar seco (Figura 6).



Figura 6 – Secagem da placa com batidas sobre camada de papel absorvente.

Após a remoção do excesso da solução tampão, acrescentou-se 300 μ l da solução de bloqueio (ou reagente diluente) em cada poço, constituído por 100 ml PBS mais 1 g BSA (agitados para dissolver), o qual permaneceu nos poços por uma hora. Nesta etapa, é importante anotar o horário para cada placa, para que os poços comecem a ser lavados na etapa seguinte sem acréscimos de minutos. Enquanto aguardou-se o tempo, foi preparada a curva padrão. Para esta, foram preparadas 7 amostras em duplicata (Figura 7). Foi colocado 600 μ L de reagente diluente no primeiro eppendorf e 300 μ L nos demais 6 eppendorfs. Em seguida, foi colocado o anticorpo de captura no primeiro eppendorf de cada grupo. A quantidade foi calculada de acordo com o manual, no entanto, foram 1,67 μ l de IL-1 β e 1,62 μ l de TNF- α . Foi feita a diluição, passando-se 300 μ l do primeiro eppendorf para o segundo e assim sucessivamente, sempre homogeneizando e trocando a ponteira a cada eppendorf.

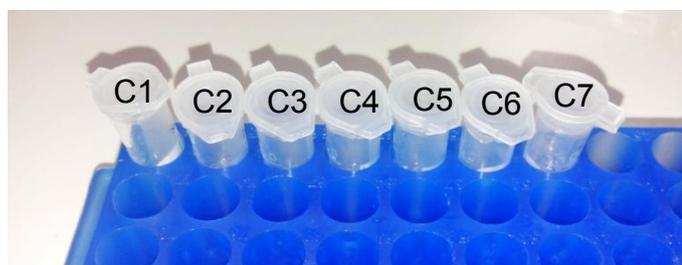


Figura 7 – Grupo com 7 amostras para a curva padrão.

Transcorrido o período de uma hora, a solução de bloqueio foi removida da placa de 96 poços e os mesmos foram lavados 3 vezes com a solução tampão. Após lavagem e secagem, foi colocado 100 μ l das amostras em cada poço da placa de 96 poços, pulando as 2 primeiras colunas (destinadas para a curva padrão). Colocou-se nos poços de cima para baixo, sempre homogeneizando antes. A duplicata foi colocada na mesma placa. Logo após, 100 μ l da curva padrão foi colocada em cada

poço das primeiras duas colunas da placa, de baixo para cima, do mais concentrado para o menos concentrado. Na Fileira A foi colocado só com agente diluente (AD) (Figura 8).

	Curva padrão		3 dias	7 dias	14 dias	6	7	8	9	10	11	12
	1	2	3	4	5							
A	AD	AD	C-	C-	C-							
B	C7	C7	C-	C-	C-							
C	C6	C6	C+	C+	C+							
D	C5	C5	C+	C+	C+							
E	C4	C4	200	200	200							
F	C3	C3	200	200	200							
G	C2	C2	200+IM	200+IM	200+IM							
H	C1	C1	200+IM	200+IM	200+IM							

Figura 8 – Disposição dos grupos de estudo na placa de 96 poços.

Tampou-se a placa e aguardou-se por 2 horas sobre a bancada. Transcorrido esse tempo, lavou-se os poços 3 vezes com 300 μ l de solução tampão. Após a secagem, acrescentou-se 100 μ l da solução de anticorpo de detecção – constituído de 10 ml menos 55,56 μ l de água deionizada, acrescida de 55,56 μ l de anticorpo de detecção. Após aguardar por 2 horas, lavou-se os poços com 300 μ l de solução tampão e procedeu-se a secagem. Em seguida, acrescentou-se 100 μ l de solução de streptavidina (Figura 9a) em cada poço, composta por 85 μ l de streptavidina e 17 ml PBS (sempre mantida sob a proteção da luz). Protegeu-se a placa da luz com papel alumínio e aguardou-se por 20 minutos. Realizou-se depois a lavagem dos poços 3 vezes com 300 μ l de

solução tampão e a secagem dos mesmos, para então acrescentar aos poços 100 μ l da solução reagente A + B em quantidades iguais (Figura 9b). Mais uma vez, protegeu-se a placa da luz com o papel alumínio e aguardou-se por 20 minutos. Após esse período, essa solução deve apresentar coloração azul (Figura 9c). Se as amostras apresentarem uma tonalidade mais forte que as apresentadas pelo padrão, deve-se diluir essas amostras com o agente diluente – em nova placa, coloca-se 75 μ l do diluente em cada poço. Depois, passa-se a solução da placa “velha” para a nova. O resultado obtido posteriormente deve ser multiplicado por 2.

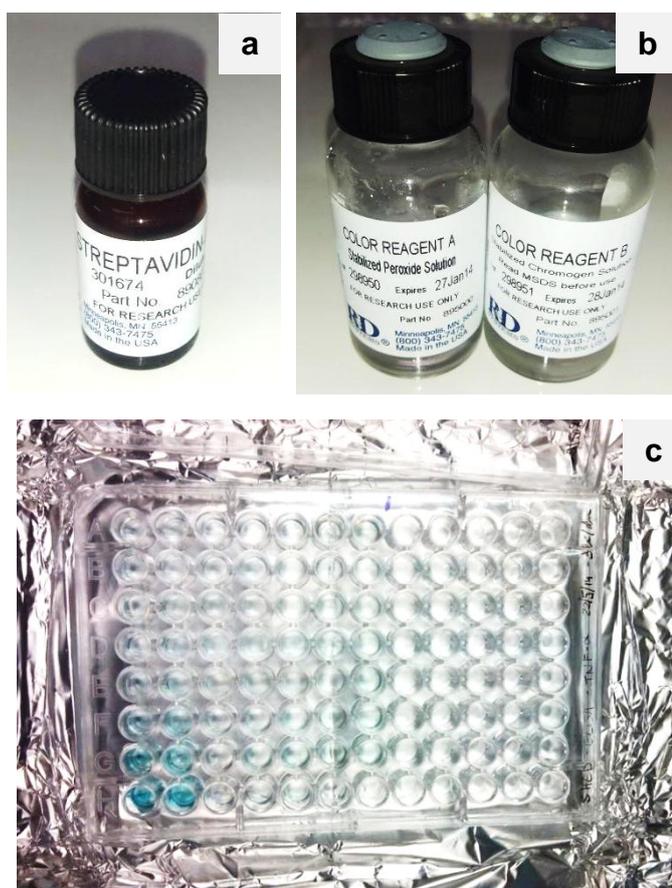


Figura 9 – a) solução de streptavidina; b) solução reagente A + B; c) reação após contato com solução reagente A+B, com a coloração azul.

Após o período de 20 minutos, acrescentou-se 50 μ l de stop (ácido sulfúrico 2N) em cada poço. Neste momento, a solução do poço torna-se amarela imediatamente (Figura 10). E para finalizar, realiza-se a leitura da placa em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm.

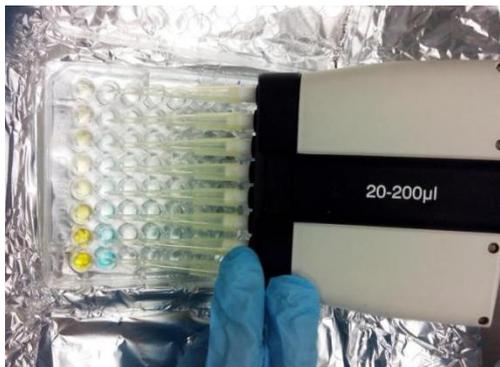


Figura 10 – Reação após acréscimo da solução stop (ácido sulfúrico 2N).

4.7 Ensaios de RT-PCR para detecção de RNAm para DSPP e DMP-1

As células foram plaqueadas em placa de 6 poços com 2000 μ L de meio em cada poço. Após 24 horas em estufa, o meio de cultura foi substituído pelos meios contendo o LPS (a uma concentração de 200 ng/ml, exceto controles negativo e positivo) (Figura 11). Os meios foram substituídos por meio fresco a cada 2-3 dias até cumprirem o prazo de 7 dias.

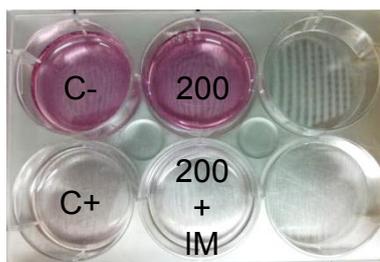


Figura 11 – Placa de 6 poços contendo células tratadas.

Após o tratamento das células nas condições propostas, as culturas foram coletadas em Trizol (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) e processadas para análise da expressão de genes em gel de agarose conforme descrito abaixo:

4.7.1 Extração do RNA

A extração foi obtida por meio da lise celular promovida pelo Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. 500 µl de Trizol foram utilizados por poço, após lavagem com PBS. O RNA total foi armazenado a -80°C para posterior utilização.

As células armazenadas em Trizol foram descongeladas (Figura 12a), brevemente homogeneizadas e mantidas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para cada ml de Trizol utilizado foram adicionados 250 µl de clorofórmio, então homogeneizou-se por 15 segundos (Figura 12b) e incubou-se em temperatura ambiente durante 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 11.000 g, durante 15 minutos a 2 °C (Figura 12c) e a fase aquosa obtida (Figuras 12d e 12e) foi coletada e passada para outro eppendorf. A ela foram adicionados 250 µl de isopropanol, homogeneizados e deixados por 10 minutos na temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 11000 g durante 10 minutos a 2 °C, obteve-se um precipitado (pellet) (Figura 12f), cujo sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com 500 µl de etanol 75%, homogeneizado no vórtex e então centrifugado a 7.000 g durante 5 minutos a 2 °C. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se o pellet secar ao ar livre por 10 minutos. Finalmente o precipitado foi ressuspenso em 15 µl de água DEPC e a quantidade de RNA obtida verificada através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE 19810, USA) (Figura 12g). A leitura da absorbância foi

procedida e a produtividade da reação calculada pela fórmula: $OD \times \text{diluição} \times 40/1000$. Todos os RNAs utilizados devem apresentar pureza entre 1,8 e 2,0

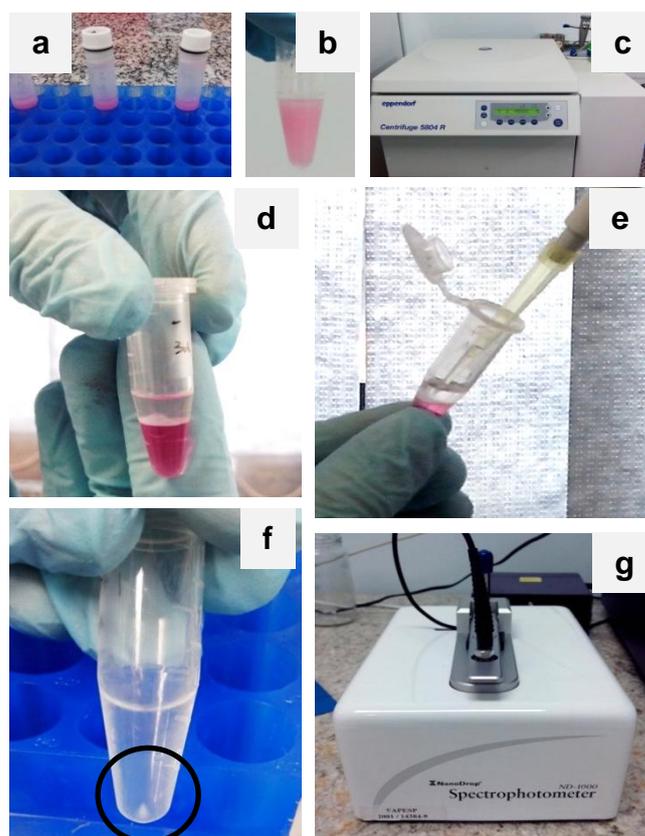


Figura 12 – a) células armazenadas em Trizol, descongeladas; b) células em Trizol, acrescidas de clorofórmio, homogeneizadas; c) centrifugação a 11.000 g, por 15 minutos a 2 °C; d) fase aquosa obtida após centrifugação; e) coleta da fase aquosa; f) pellet formado após nova centrifugação; g) espectrofotômetro para leitura da pureza do RNA.

4.7.2 RT PCR (Obtenção dos cDNAs)

As amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA)

(Figura 13a) conforme recomendações do fabricante, seguido da termociclagem por 10 minutos a 65°C. Após esse procedimento, seguiu-se a produção de cDNA pela técnica do qRT-PCR utilizando o kit de enzima Superscript III (Invitrogen) (Figuras 13b, 13c e 13d) na qual foram adicionados 5 µg de RNA extraído das linhagens em cultura de células perfazendo um volume final de 20 µl. Os tubos foram incubados a 25 °C por 10 minutos, depois incubados a 50 °C por 30 minutos, aquecidos a 85 °C por 5 minutos e então resfriados no gelo. Os cDNAs (DNAs complementares) obtidos foram armazenados em freezer – 20 °C para posterior utilização.

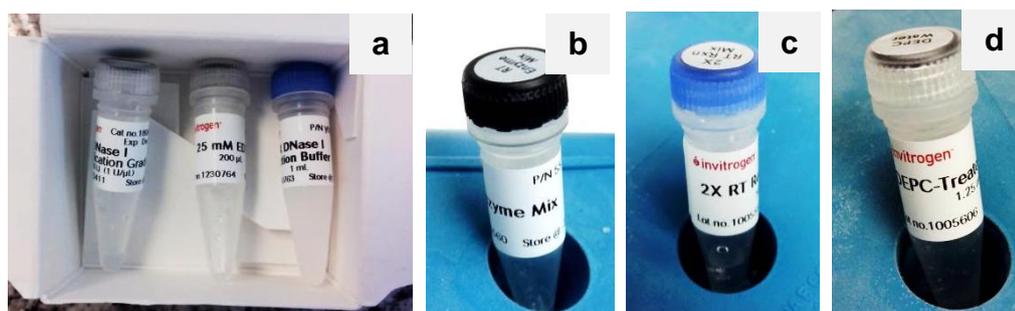


Figura 13 – a) kit DNase I; b) RT Enzyme Mix (Kit de enzima Superscript III); c) 2X RT Reaction Mix (Kit de enzima Superscript III); d) DEPC - treated water (Kit de enzima Superscript III).

4.7.3. Amplificação por PCR

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR através de iniciadores específicos (primers) para os diferentes genes estudados (Figura 14a a 14c). Os iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Gene Tool 1.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá), e descritos conforme o Quadro 3. As reações foram realizadas com 1 µl produto de RT-PCR (cDNA), iniciadores senso e anti-senso, 12,5 µl de Buffer (*Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX*,

Invitrogen) e água destilada/autoclavada (H₂O_{dd}) perfazendo um total de 25 µl por reação. A ciclagem térmica foi realizada usando um protocolo “hot start” (50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos, 95 °C por 1 minutos e 95 °C por 15 segundos, em termocicladora (Figura 14d). Para cada reação de PCR, foram utilizados, ainda, 1 controle negativo (omissão do cDNA) além da amplificação com o gene constitutivo GAPDH, a fim de confirmar a possibilidade de amplificação dos cDNAs utilizados. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 2% corado com SYBRsafe (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (Figura 14e). sob luz azul em transiluminador (E-gel Imager, Lyfe Technologies)(Figura 14f). Nesta análise, os produtos do PCR foram introduzidos em orifícios do gel de agarose e foram submetidos a uma corrente elétrica que é aplicada sobre a solução tampão presente no cassete, que contém o gel. O que ocorre em seguida é a migração dos produtos do PCR de acordo com o seu tamanho em direção ao pólo positivo da corrente elétrica. Nessa migração, produtos “maiores” correm uma distância curta no gel. Todas as reações foram realizadas em triplicata em dias diferentes para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Quadro 3- Primers utilizados para o ensaio de RT-PCR

Gene	Sense	Antisense	bp	GenBank
DSPP	5'- cacaagggagaagggaa tgg-3'	5'- tgccattgctgtgatggtt- 3'	181	NM_014208
DMP-1	5'- caggagcacaggaaaag gag-3'	5'- ctggtggtatcttgggca ct-3'	213	NM_004407
GAPDH	5'- gacccttcattgacctcaa ct-3'	5'- caccaccttctgatgtca tc-3'	684	M33197

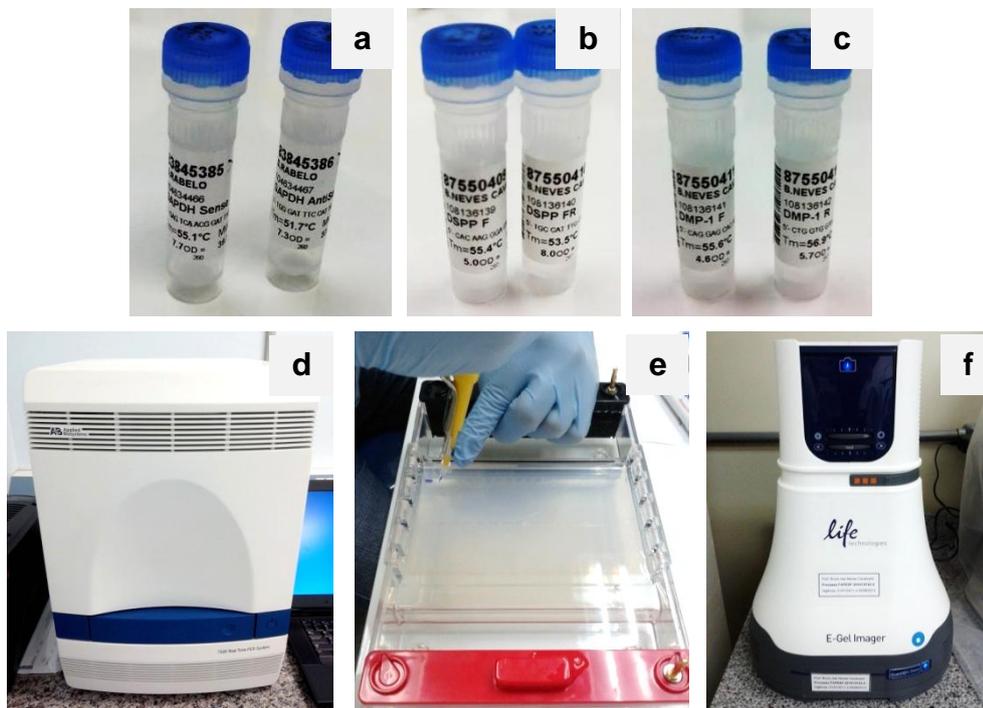


Figura 14 – a) primers senso e anti-senso GAPDH; b) primers senso e anti-senso DSPP; c) primers senso e anti-senso DMP-1; d) Termocicladora; e) aplicação dos produtos do PCR em gel de agarose para análise; f) transluminador.

4.8 Análise Estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina

Os resultados obtidos pela atividade de fosfatase alcalina (ALP) sob os efeitos do LPS sobre dois tipos de meio de cultura - α -MEM e meio indutor da mineralização (IM) - foram demonstrados na Figura 16, onde os grupos tratados com α -MEM apresentaram melhores resultados na atividade de ALP comparados aos grupos tratados com IM. Houve diferença na atividade entre o grupo controle, tratado com α -MEM e os demais grupos tratados com o mesmo meio, os quais apresentaram dois picos de aumento, seguidos de ligeira redução da atividade. Os grupos tratados com IM não apresentaram diferença com o grupo controle, mostrando baixa atividade com ligeira progressão ao longo do aumento das concentrações de LPS.

Os resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3 correspondem aos valores médios e desvio padrão da atividade de fosfatase alcalina após o tratamento das células as com quatro concentrações diferentes de LPS.

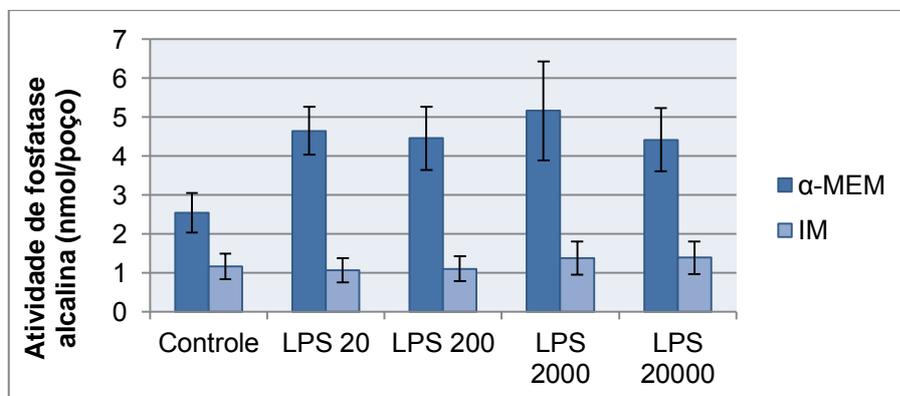


Figura 16 – Gráfico da atividade de fosfatase alcalina.

Tabela 2- Média \pm desvio padrão dos valores obtidos nos grupos experimentais do ensaio de ALP, com o meio α -MEM

α -MEM	Tratamento	Concentração (ng/ml)					(média \pm dp)
		UT	20	200	2000	20000	
	LPS	2.54 \pm 0.51	4.64 \pm 0.62	4.45 \pm 0.81	5.16 \pm 1.27	4.42 \pm 0.81	4.24 \pm 0.80

Tabela 3- Média \pm desvio padrão dos valores obtidos nos grupos experimentais do ensaio de ALP, com o meio IM

IM	Tratamento	Concentração (ng/ml)					(média \pm dp)
		UT	20	200	2000	20000	
	LPS	1.15 \pm 0.33	1.07 \pm 0.31	1.09 \pm 0.32	1.38 \pm 0.43	1.38 \pm 0.42	1.21 \pm 0.36

5.2 Ensaio de formação de nódulos minerais

Para analisar o potencial de mineralização das células tronco de dentes decíduos humanos esfoliados, foi realizada a coloração com vermelho de alizarina (ARS). Através de uma análise qualitativa, observou-se que o LPS inibiu a formação dos nódulos minerais ao longo do tempo. Após 3 dias, observa-se pequena formação de nódulos mineralizados nos grupos C+, 200 e 200 + IM (Figuras 17a, 17b, 17c e 17d). Houve uma maior formação de nódulos mineralizados depois de 7 dias, comparada com o período de 3 dias (Figuras 18a, 18b, 18c e 18d). Depois de 14 dias, a quantidade de nódulos minerais aumentou com relação ao dia 3 e ao dia 7, com evidente formação de nódulos (áreas avermelhadas) consistentes somente nos grupos induzidos sem o LPS. Em todos os tempos, o controle negativo demonstrou baixa atividade nesse processo.

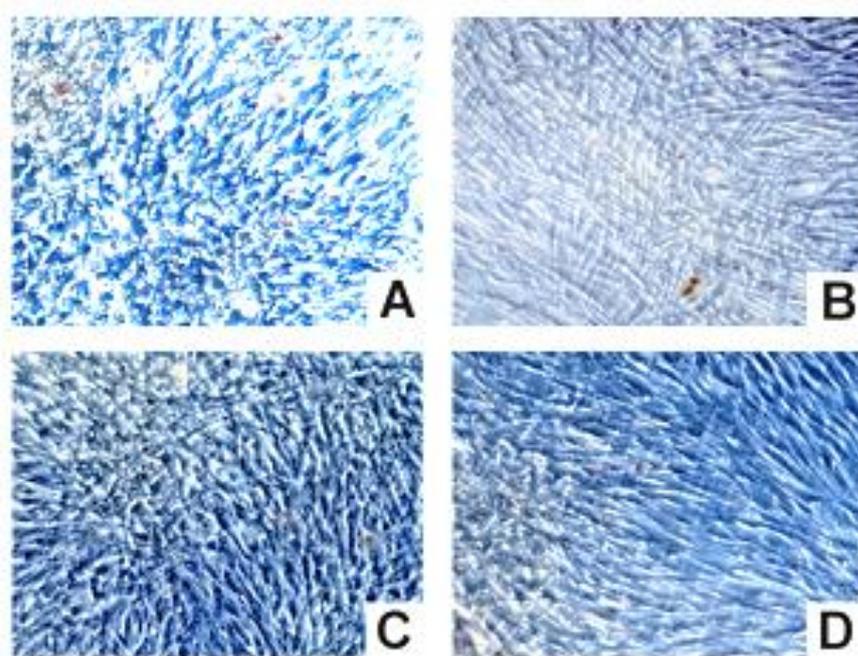


Figura 17 – Ensaio de ARS após 3 dias. a) controle negativo; b) controle positivo; c) LPS 200ng + α -MEM; d) LPS 200ng + IM.

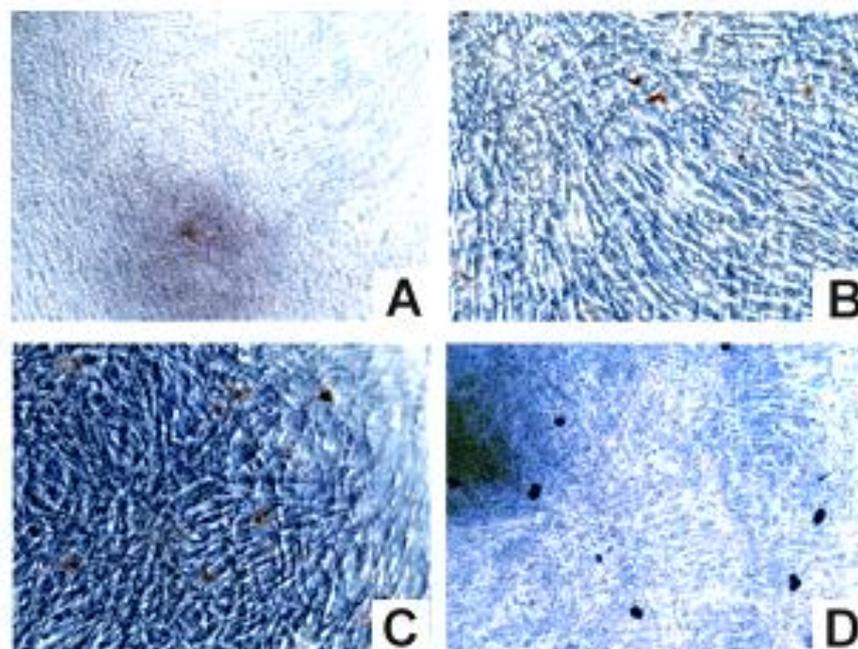


Figura 18 – Ensaio de ARS após 7 dias. a) controle negativo; b) controle positivo; c) LPS 200ng + α -MEM; d) LPS 200ng + IM.

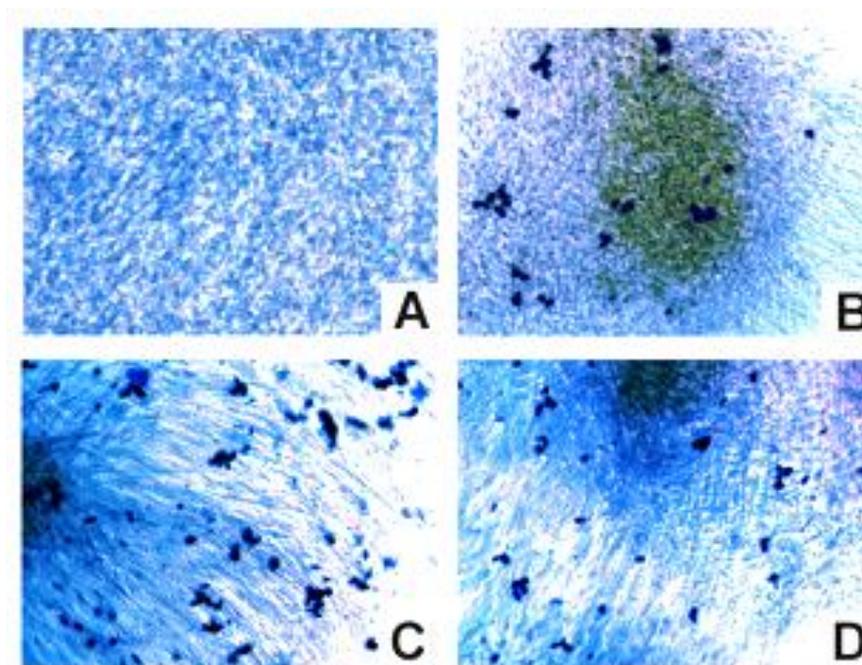


Figura 19 – Ensaio de ARS após 14 dias. a) controle negativo; b) controle positivo; c) LPS 200 ng + α -MEM; d) LPS 200 ng + IM.

5.3 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

5.3.1. IL-1 β

A expressão de IL-1 β após contato com 200 ng de LPS durante 3, 7 e 14 dias pode ser observada na Figura 20. Em 7 dias, a produção de IL-1 β foi maior para o grupo LPS 200 + IM. Os demais grupos não apresentaram diferenças na expressão da IL-1 β em todos os tempos, permanecendo semelhantes aos controles positivo e negativo.

Os resultados mostrados na Tabela 4 correspondem aos valores médios e desvio padrão obtidos no ensaio ELISA após o tratamento das células com 200ng de LPS durante 3, 7 e 14 dias.

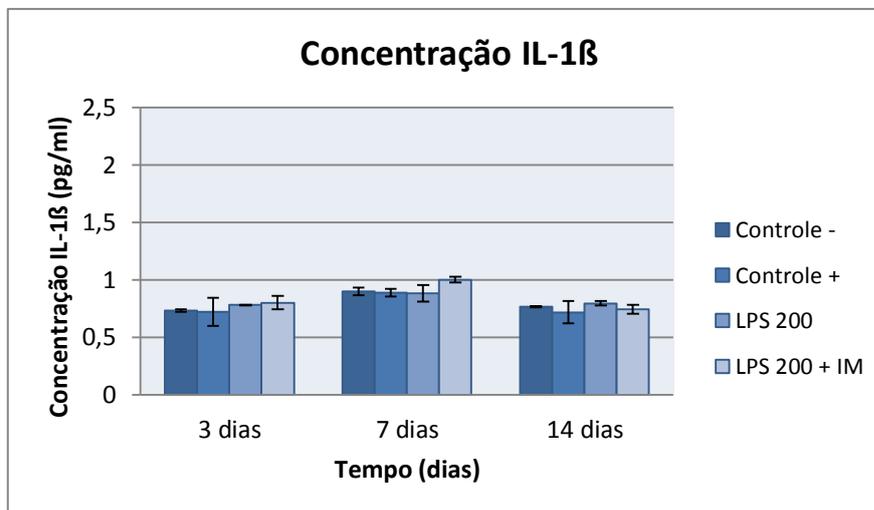


Figura 20 – Média da expressão IL-1 β após 3, 7 e 14 dias.

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão dos valores obtidos nos grupos experimentais do ensaio ELISA, nos períodos: 3 dias; 7 dias; 14 dias

Período	Tratamento	Concentração (ng/ml)				(média \pm dp)
		Controle -	Controle +	LPS 200	LPS 200+IM	
3 dias		0.73 \pm 0.01	0.72 \pm 0.12	0.78 \pm 0.00	0.80 \pm 0.06	0.76 \pm 0.05
7 dias	IL-1 β	0.90 \pm 0.03	0.89 \pm 0.03	0.88 \pm 0.07	1.00 \pm 0.02	0.92 \pm 0.04
14 dias		0.77 \pm 0.01	0.72 \pm 0.10	0.80 \pm 0.02	0.75 \pm 0.04	0.76 \pm 0.04

5.3.2 TNF- α

A análise da produção de TNF- α foi demonstrada na Figura 21. A análise ANOVA mostrou nenhuma diferença na expressão da TNF- α entre os tempos testados.

Os resultados mostrados na Tabela 5 correspondem aos valores médios e desvio padrão obtidos no ensaio ELISA após o tratamento das células com 200 ng de LPS durante 3, 7 e 14 dias.

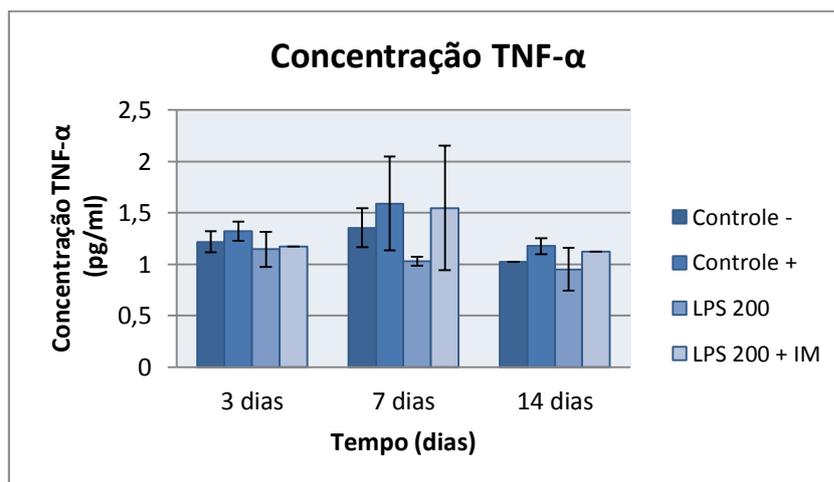


Figura 21 – Média da expressão TNF- α após 3, 7 e 14 dias.

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão dos valores obtidos nos grupos experimentais do ensaio ELISA, nos períodos: 3 dias; 7 dias; 14 dias

Período	Tratamento	Concentração (ng/ml)				(média \pm dp)
		Controle -	Controle +	LPS 200	LPS 200+IM	
3 dias		1.22 \pm 0.10	1.32 \pm 0.09	1.15 \pm 0.17	1.17 \pm 0.00	1.21 \pm 0.09
7 dias	TNF- α	1.35 \pm 0.19	1.59 \pm 0.46	1.03 \pm 0.04	1.55 \pm 0.60	1.38 \pm 0.32
14 dias		1.02 \pm 0.00	1.18 \pm 0.08	0.95 \pm 0.21	1.12 \pm 0.00	1.07 \pm 0.07

5.4 Ensaios de PCR para detecção de RNAm para DSPP, DMP-1

No ensaio de PCR, após as etapas que levam a amplificação do DNA, foi realizada a análise de seus produtos em gel de agarose, na

qual o corante aplicado sobre as amostras se intercala entre as bases dos ácidos nucléicos e, durante a transiluminação de luz azul, fluoresce, permitindo sua visualização em fotografia. A intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra. Nas figuras 22a, 22b e 22c observa-se as bandas de DNA obtidas após a corrida em gel, mostrando uma maior expressão gênica nos grupos tratados com meio indutor da mineralização para o gene DMP-1 e os grupos tratados com LPS apresentaram bandas mais expressivas que os grupos controle. O gene GAPDH foi utilizado como controle e confirmou a possibilidade de amplificação dos cDNAs utilizados.

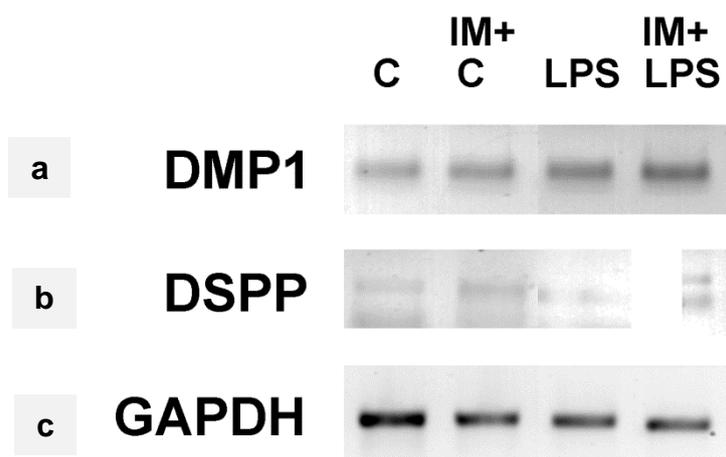


Figura 22 – Produtos da amplificação do DNA. a) DMP-1; b) DSPP; c) GAPDH.

6 DISCUSSÃO

As paredes extracelulares de microrganismos gram-negativos presentes na polpa dental infectada e no periápice contém endotoxinas, que são lipopolissacarídeos complexos (LPS) (Schein, Schilder, 1975). Estas são liberadas durante a multiplicação ou após lise das paredes celulares dessas bactérias e têm seu envolvimento no processo inflamatório por meio da promoção de respostas biológicas (Schein, Schilder, 1975; Watanabe, Inoue, 2013; Sousa et al., 2014) - acumulam-se nas lesões periapicais, aumentam a permeabilidade vascular, reúnem leucócitos e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. (Maltos et al., 2004; Watanabe, Inoue, 2013).

A influência do LPS sobre essas respostas biológicas tem sido relatada na literatura. Schein e Schilder, 1975, Martinho et al., 2012, Gomes et al., 2012 e Sousa et al., 2014 mediram os níveis de LPS em canais radiculares infectados, relacionando-os com a severidade de destruições ósseas periapicais (exceto Sousa et al., 2014), a expressão de citocinas (Martinho et al., 2012) e a eficácia do preparo biomecânico (Sousa et al., 2014).

Outros autores avaliaram os efeitos do LPS sobre a resposta inflamatória através da expressão de citocinas de polpas inflamadas, expressão de marcadores inflamatórios em ratos e análise das vias de sinalização de receptores da membrana e mediadores inflamatórios em ratos (Silva et al., 2009; Liu et al., 2008; Kishimoto et al., 2012 respectivamente).

Também foram estudados as ações do LPS sobre as atividades funcionais, a expressão de citocinas e expressão gênica de

diversos marcadores das células da polpa, células do folículo dental, células da papila dental de ratos, macrófagos de ratos e células semelhantes a odontoblastos (Nakane et al., 1995; Morsczeck et al., 2012; Nomiya et al., 2007; Hong et al., 2004; Oliveira, Santos, 2012).

Além disso, diversos gêneros de LPS foram utilizados em parte dos trabalhos supracitados. Provenientes de *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Silva et al., 2009; Liu et al., 2008; Kishimoto et al., 2012; Nakane et al., 1995; Nomiya et al., 2007), muitas vezes apresentando efeitos diferentes sobre as células.

Neste estudo foram avaliados os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (*E. coli*), sobre o processo de reparo mediado por células progenitoras da polpa dentária de dentes decíduos.

Os dentes decíduos são uma rica fonte de células progenitoras (Demarco et al., 2011), constituindo um recurso acessível de células tronco (SHED) (Miura et al., 2003; Nakamura et al., 2009; Rosa et al., 2012). Essas células foram identificadas como clonogênicas, altamente proliferativas, capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo células neurais, células endoteliais, adipócitos e odontoblastos (Miura et al., 2003; Nakamura et al., 2009; Sakai et al., 2010).

Miura et al., 2003 e Sakai et al., 2010 observaram que as SHED são capazes de induzir a formação óssea e gerar dentina.

As células progenitoras utilizadas foram obtidas do banco de células do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT-SJC. Elas foram previamente isoladas num estudo anterior e arquivadas em nitrogênio líquido. E então, foram cultivadas conforme descrito no item 4.1 do capítulo 4.

Para o ensaio de fosfatase alcalina (ALP), Nakane et al., 1995 utilizaram LPS de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de canais radiculares e *Escherichia coli* 0111:B4 para o grupo controle nas concentrações 1, 10, e 100 µg/ml por 3,7,10 e 14 dias sobre células da polpa dental humana. Já Morsczech et al., 2012 utilizaram 1 µg /ml LPS *E. coli* e 1 µg /ml LPS *P. gingivalis* por 7 e 14 dias sobre células do folículo dental. Nomiya et al., 2007 estudaram a ação de 10 e 20 µg/mL de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 por 1, 3, 5 e 7 dias sobre células da papila dental de incisivos de ratos.

As concentrações utilizadas neste estudo foram estabelecidas após ensaio piloto de viabilidade celular SRB (sulforodamina B), no qual se observou que concentrações de 1 a 10000 ng/ml de LPS não interferiram na proliferação celular após 24, 48 e 72 horas. Supôs-se que, mesmo dobrando estas concentrações para a realização deste trabalho, obteríamos resultados significativos sem que ocorresse morte celular durante os ensaios.

Nos resultados obtidos, os grupos tratados somente com LPS apresentaram maiores resultados na atividade de ALP comparados aos grupos tratados com IM. Houve diferença na atividade entre o grupo controle (sem LPS), tratado com α -MEM e os demais grupos tratados com o mesmo meio. Os grupos tratados com IM não apresentaram diferença entre os grupos, mostrando baixa atividade ao longo do aumento das concentrações de LPS comparados com os grupos tratados com α -MEM.

Em concordância com os resultados obtidos, Nakane et al., 1995 e Nomiya et al., 2007 descobriram que o LPS não afetou a ALP em nenhuma concentração durante o período experimental.

Porém, no estudo de Nomiya et al., 2007 após 7 dias, a ALP foi ligeiramente suprimida nas maiores concentrações de LPS.

Morsczeck et al., 2012, também utilizaram meio osteogênico em seus grupos, entretanto seus resultados foram diferentes deste trabalho. Comparando os grupos controle negativo (com meio de cultura padrão – DMEM) e positivo (com meio osteogênico) aos grupos contendo 1 µg /ml de LPS E. coli, os autores observaram um aumento da atividade da fosfatase alcalina no controle positivo e no grupo contendo LPS de E. coli no dia 7. E após 14 dias, a ALP no controle positivo reduziu enquanto no grupo com LPS E. coli aumentou. O controle negativo apresentou baixa atividade de ALP. Enquanto que no presente trabalho, o controle positivo teve baixa atividade comparado com o negativo após 3 dias.

Segundo Nakane et al., 1995, altos valores de fosfatase alcalina são encontrados em odontoblastos da polpa quando as células estão ativas na calcificação e quando a polpa está inflamada. Embora o meio indutor de mineralização seja muito utilizado para estimular a osteogênese de células progenitoras (La Noce et al., 2014). Laino et al., 2005 demonstraram que células tronco da polpa dental (DPSCs) CD34+CD117+ podem se diferenciar em osteoblastos com meio de cultura padrão, suplementado com 20% de soro fetal bovino e sem indutores osteogênicos. É importante ressaltar que, dadas as variações dos tempos experimentais entre os estudos, é difícil traçar paralelos entre eles. No entanto, nosso estudo demonstra claramente que, quando utilizando células progenitoras e num prazo curto de avaliação, a atividade de ALP é aumentada, podendo sugerir que estas células têm papel fundamental na produção de dentina reacional.

Para observar a produção de nódulos mineralizados foi realizado através da coloração com vermelho de alizarina (ARS), no qual foi constatado que o LPS inibiu a formação dos nódulos minerais ao longo do tempo. De modo que em 7 e 14 dias, observa-se atividade de mineralização somente nos grupos tratados com o indutor e sem LPS.

Morsczeck et al., 2012 realizaram o ensaio de vermelho de Alizarina após 21 dias de diferenciação e constataram que o grupo controle negativo (com DMEM) não apresentou nódulos enquanto que o grupo controle positivo (com meio osteogênico) apresentou muitos depósitos minerais, assim como neste estudo. Em contrapartida, no grupo com LPS houve formação de nódulos, mas numa quantidade expressivamente menor, fato, de certa forma, também observado neste estudo. Com isso, nossa hipótese inicial foi parcialmente aceita, de modo que, a longo prazo, o LPS realmente atuou limitando o processo de mineralização. A parte da hipótese rejeitada, já foi discutida pois, num momento inicial (3 dias) a atividade da ALP foi bastante aumentada com o LPS, indicando a possibilidade de uma reação imediata pelas células progenitoras, mas que não se mantém no decorrer dos dias.

Também foram analisadas a expressão das citocinas inflamatórias – interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelo ensaio imunoenzimático ELISA.

A produção das citocinas pode ser utilizada para analisar o potencial inflamatório de diferentes materiais e substâncias. Estudos tem revelado que o LPS estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Hong et al., 2004) como a IL-1 β e a TNF- α . A IL-1 β atua nas respostas inflamatórias e pode ser produzida e liberada por diferentes tipos celulares (Silva et al., 2009), e modula a inflamação e o reparo (Ferreira et al., 2009), além de ter sido correlacionada aos sinais e sintomas clínicos e maior reabsorção óssea (Martinho et al., 2012). A TNF- α é um mediador inflamatório que estimula, dentre outras reações, a proliferação celular (El Salhy et al., 2013).

A expressão de IL-1 β após 7 dias foi maior para o grupo LPS 200+IM. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si no decorrer de 3, 7 e 14 dias, permanecendo semelhantes aos controles positivo e negativo.

A análise da produção de TNF- α demonstrou nenhuma diferença na sua expressão entre os tempos testados.

Já foi descrito que odontoblastos podem responder às agressões externas com a expressão de genes IL-1b e TNF- α quando estimulados por LPS (Veerayutthwilai et al., 2007).

Os resultados obtidos se assemelham aos encontrados em investigações prévias. Martinho et al., 2012 detectaram a presença de IL-1b e TNF- α nos meios de cultura estimulados por conteúdo endodôntico. Enquanto no estudo de Silva et al., 2009, altos níveis de IL-1b foram encontrados em polpas inflamadas. Em contrapartida, Hong et al., 2004, utilizando LPS de duas bactérias, *F. nucleatum* e *P. endodontalis*, detectaram a síntese de TNF- α , mas a síntese de IL-1b foi inconclusiva.

A expressão da IL-1 β e TNF- α confirmam o potencial inflamatório do LPS sobre as células progenitoras da polpa.

E finalmente, foi analisada a expressão gênica de marcadores de diferenciação odontoblástica (DMP-1 e DSPP).

A sialofosfoproteína da dentina (DSPP) é uma proteína não colagenosa presente na dentina e presente no processo de diferenciação e juntamente com proteína da matriz de dentina 1 (DMP-1) são essenciais para a formação da dentina (Gibson et al., 2013). A DSPP é controlada pela DMP-1, um indicador da diferenciação osteogênica/odontoblástica de células pulpares (Abd-Elmeguid et al., 2012; Yun et al., 2012; Gibson et al., 2013).

Após análise dos produtos obtidos no ensaio de PCR, observou-se uma maior expressão gênica nos grupos tratados com meio indutor da mineralização para o gene DMP-1 e os grupos tratados com LPS apresentaram bandas mais expressivas que os grupos controle. A expressão dos genes DSPP foi consideravelmente baixa. O gene GAPDH

foi utilizado como controle e confirmou a possibilidade de amplificação dos cDNAs utilizados.

Em estudo anterior, Nomiya et al., 2007 relataram que o LPS foi capaz de reduzir as funções dos odontoblastos através de significativa supressão da expressão da DSPP. Abd-Elmeguid et al., 2012 avaliaram a presença e o papel da DMP-1 nas polpas inflamadas e constataram que a DMP-1 estava presente nas polpas inflamadas mas não em polpas normais e que sua presença pode aumentar a liberação de mediadores pro-inflamatórios. Também constataram que a presença da DMP-1 em áreas de fibrose e calcificação sugere sua função na iniciação da calcificação da polpa.

Desta forma, a supressão da DSPP obtida neste estudo deve estar relacionada com a ação do LPS sobre as células progenitoras.

Já a expressão dos genes DMP-1 confirmam, juntamente às citocinas IL-1 β e TNF- α , o potencial inflamatório do LPS sobre as células progenitoras da polpa, além de contribuírem para o processo de mineralização.

A presença do LPS não impediu o processo de diferenciação celular e o meio indutor de mineralização não a estimulou, comparado ao meio sem indutor.

Como já mencionado anteriormente, a reação inflamatória participa do processo de reparação pulpar (Sloan, Smith, 2007; Goldberg et al., 2008; Silva et al., 2009, Cavalcanti et al., 2011; Simon et al., 2011). Neste trabalho fica evidente, a interação de mediadores que, trabalhando sinergicamente, podem contribuir para o processo de reparação, reforçando a ideia de que a inflamação é um pré-requisito para o reparo pulpar (Goldberg et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

Rechaçando nossa hipótese inicial, observou-se que o LPS incrementou a atividade de fosfatase alcalina em curto prazo (3 dias), fato que não se manteve no decorrer do tempo (7 e 14 dias) como observado pelo ensaio de mineralização (Alizarin vermelho).

Ocorreu a expressão de IL-1 β em todos os grupos nos tempos estudados (3, 7 e 14 dias), com destaque para o grupo tratado com 200ng de LPS com o meio osteogênico após 7 dias.

A expressão de TNF- α também ocorreu para todos os grupos nos tempos estudados (3, 7 e 14 dias), mas sem diferenças entre os mesmos.

Houve expressão dos genes marcadores de diferenciação odontoblástica DMP-1, mas inexpressiva expressão dos genes DSPP.

Esses achados sugerem que o potencial inflamatório do LPS sobre as células progenitoras da polpa contribui para o processo de mineralização precoce. No longo prazo, este processo não é sustentável, uma vez que o LPS o detém.

8 REFERÊNCIAS*

Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2012 Jan;38(1):75-80.

Anderson LM, Dumsha TC, McDonald NJ, Spitznagel JK Jr. Evaluating IL-2 levels in human pulp tissue. *J Endod.* 2002;28(9):651-5.

Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod.* 2014;40(3):387-92.

Bodem O, Blumenshine S, Zeh D, Koch MJ. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate in a primary molar: a case report. *Int J Paediatr Dent.* 2004 Sep;14(5):376-9.

Cavalcanti BN, Rode Sde M, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. *Braz Oral Res.* 2011 Jan-Feb;25(1):13-8.

Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res.* 2005 Nov;84(11):994-8.

Cho SY, Seo DG, Lee SJ, Lee J, Lee SJ, Jung IY. Prognostic factors for clinical outcomes according to time after direct pulp capping. *J Endod.* 2013;39(3):327-31.

Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da polpa.* Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 1079p.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010 Sep; 38(9):687-97.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] EEIDisponível em: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. 2011;22(1):3-13.
- Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*. 2011;37(8):1074–80.
- El Salhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):573-80.
- Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. *J Dent Child*. 2009 Sep-Dec;76(3):194-8.
- Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004 Nov 7;28(3):109-23.
- Gibson MP, Zhu Q, Wang S, Liu Q, Liu Y, Wang X, et al. The rescue of dentin matrix protein 1 (DMP1)-deficient tooth defects by the transgenic expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) indicates that DSPP is a downstream effector molecule of DMP1 in dentinogenesis. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7204-14.
- Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):137–47.
- Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27.
- Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod*. 2012;38(8):1082–6.
- Gronthos_S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
- He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NFkappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2013 Feb;46(2):128-36.
- Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(3):162-9.

Hoyer KK, Doods H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:19-28.

Huang GTJ, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(1):83-8.

Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1823-33.

Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int Endod J.* 2014; 47, 687–97..

Kim RH, Williams DW, Bae S, Lee RS, Oh JE, Mehrazarin S, et al. Camphorquinone inhibits odontogenic differentiation of dental pulp cells and triggers release of inflammatory cytokines. *J Endod.* 2013;39(1):57–61.

Kishimoto T, Kaneko T, Ukai T, Yokoyama M, Ayon Haro R, Yoshinaga Y, et al. Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis. *J Periodontal Res.* 2012;47(4):446–54.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: an useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005(8);20:1394–400.

La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent.* 2014 Jul;42(7):761-8.

Lee SK, Min KS, Youngbo-Kim, Jeong GS, Lee SH, Lee HJ, et al. Mechanical stress activates proinflammatory cytokines and antioxidant defense enzymes in human dental pulp cells. *J Endod.* 2008;34(11):1364–9.

Lee YH, Kim GE, Cho HJ, Yu MK, Bhattarai G, Lee NH, et al. Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis. *J Endod.* 2013;39(3):340–5.

Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2008. 1491 p.

Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(2):131-7.

Liu R, Desta T, Raptis M, Darveau RP, Graves DT. *P. gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008 Jul;79(7):1241-7.

Maltos KL, Menezes GB, Caliari MV, Rocha OA, Santos JM, Alves DL, et al. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2004 Jun;49(6):443-50.

Martin DE, de Almeida JFA, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod.* 2014;40(1):51–5.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JAC, Gomes BPF. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38(6):740–5.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807–12.

Miyashita H, Worthington HV, Qualtrough A, Plasschaert A. Pulp management for caries in adults: maintaining pulp vitality. *Cochrane Database Syst Rev* 2007(2):CD004484.

Morsczeck CO, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 2012 Dec;57(12):1595-601.

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:205-18.

Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod.* 2009;35(11):1536–42.

Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. *J Endod.* 1995;21(3):128–30.

Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, et al. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp– derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod.* 2007;33(10):1187–91.

Oliveira SHP, Santos VAC. Lipopolysaccharide-induced stem cell factor messenger RNA expression and production in odontoblast-like cells. *J Endod.* 2012;38(5):623–7.

Pang NS, Lee SJ, Kim E, Shin MS, Cho SW, Park W, et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2014;40:811–7.

Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod.* 2010;36(6):1042–47.

Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S466-7.

Phumpatrakom P, Srisuwan T. Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3-antibiotic mixture. *J Endod.* 2014;40(3):399–405.

Rosa V, Bona AD, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: From research to dental clinics. *Dent Mat.* 2012;28(4):341-8.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado M, Shi S, et al.. SHED differentiate into functional odontoblast and endothelium. *J Dent Res.* 2010;89(8):791–6.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975 Jan;1(1):19-21.

Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod.* 2013;39:242–8.

Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(5):527-32.

Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3):340-5.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007 Mar;13(2):151-7.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):177-81.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):250-6.

Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):5-13.

Watanabe S, Inoue J. Intracellular delivery of lipopolysaccharide induces effective th1-immune responses independent of IL-12. *PLoS One*. 2013 Jul 17;8(7):1-8.

Wu MY, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, Yu J, et al. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa b signaling pathway. *J Endod*. 2014;40(5):640-7.

Yun YR, Jeon E, Lee S, Kang W, Kim SG, Kim HW, et al. Expression, purification, and characterization of a dentin phosphoprotein produced by *Escherichia coli*, and its odontoblastic differentiation effects on human dental pulp cells. *Protein J*. 2012 Aug;31(6):504-10.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco de dentes permanentes e deciduos

Área Temática:

Pesquisador: Bruno das Neves Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

CAAE: 02210312.1.0000.0077

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46420

Data da Relatoria: 26/06/2012

Apresentação do Projeto:

Com o advento da engenharia tecidual e busca de novas alternativas no que diz respeito ao tratamento e regeneração de tecidos perdidos, o uso de células-tronco tem ganhado espaço na ciência em geral. Mais precisamente na Odontologia, são de interesse os estudos envolvendo células-tronco adultas obtidas a partir de dentes humanos, sejam esses deciduos ou permanentes. Nesse contexto, de forma a garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade entre nosso grupo e grupos de pesquisas Internacionais, o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células. Para isso, tecido pulpar humano obtido a partir de um terceiro molar extraído por razões terapêuticas serão processados para obtenção de fibroblastos por explante (grupo controle). Outros 3 tecidos pulpares obtidos da mesma forma serão processados para obtenção das células-tronco (DPSC) por digestão enzimática. E finalmente, 3 tecidos pulpares humanos serão obtidos a partir da raspagem de molares deciduos exfoliados naturalmente e processados também por digestão enzimática para o isolamento das células-tronco (SHED). As células obtidas (fibroblastos, DPSC e SHED) serão submetidas a ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica com o uso de suplementos específicos em seus meios de cultivo, bem como estimuladas a diferenciação dentinogênica com o uso de BMP-2, de modo a serem caracterizadas como células-tronco. Dessa forma, espera-se constituir um banco validado de células-tronco pulpares para a execução de futuros experimentos na área de engenharia tecidual.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células para garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade frente os grupos de pesquisas Internacionais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes. Os dentes selecionados são dentes que seriam exfoliados/extraídos, tendo em vista os períodos de troca dentária (dentes deciduos) ou a necessidade terapêutica (terceiros molares inclusos). Os benefícios poderão ser observados na Independência da Instituição de Pesquisa a qual o projeto está vinculado, de modo que de receptora de doações de linhagens, passaremos a doadores, técnica