



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

FLÁVIA MARTINS LEAL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS, EXPRESSÃO
GÊNICA E ANÁLISE FUNCIONAL DE CÉLULAS SHED
EXPOSTAS AO LTA BACTERIANO**

2015

FLÁVIA MARTINS LEAL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS, EXPRESSÃO GÊNICA
E ANÁLISE FUNCIONAL DE CÉLULAS SHED EXPOSTAS AO LTA
BACTERIANO**

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

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo
Coorientador: Prof. Assist. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

São José dos Campos
2015

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.

Leal, Flávia Martins

Avaliação da produção de citocinas, expressão gênica e análise funcional de células SHED expostas ao LTA bacteriano / Flávia Martins Leal. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.
75 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, 2015.

Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Co-orientador: Bruno das Neves Cavalcanti.

1. Células-tronco. 2. Citocinas. 3. Diferenciação celular. 4. Polpa dentária. 5. Proliferação de células. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro, orient. II. Cavalcanti, Bruno das Neves, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. 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, 10 de abril de 2015

E-mail: flavia.leal@unesp.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

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

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis

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

Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho

Faculdade de Odontologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Câmpus de Araçatuba

São José dos Campos, 10 de abril de 2015.

DEDICATÓRIA

A meus pais e minha irmã, que sempre apoiaram minhas decisões e torceram por mim. Sempre presentes em minha vida, mesmo à distância. Seja para vibrar com minhas conquistas ou para me ajudar a levantar quando algo não dá certo. Não há palavras suficientes para descrever meu amor. Então não dedico somente este trabalho a vocês, dedico minha vida. Tudo que faço, faço pensando em vocês.

AGRADECIMENTOS

À UNESP – Universidade Estadual Paulista e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora pela formação de excelência.

Ao meu orientador, Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, por toda ajuda e por confiar em meu trabalho. Admiro muito sua carreira, e sua influência foi decisiva nesse mestrado desde o início. Agradeço as orientações desde a iniciação científica até agora.

Ao meu coorientador, Prof. Bruno das Neves Cavalcanti, que foi fundamental em todas as etapas não só deste trabalho, mas como de todo mestrado. Não tenho como agradecer por toda ajuda e paciência. Há pessoas que nos servem de exemplo, e fico feliz em ter tido a oportunidade de aprender com um.

À Marcia Sampaio Campos por sempre estar disposta a ajudar e ensinar. Tenho muita admiração não só profissionalmente, e desejo a toda família tudo de melhor.

A todos os professores desta Universidade pelo conhecimento transmitido, dedicação e responsabilidade, durante minha graduação e pós-graduação. Em especial aos professores da disciplina de Endodontia e os que participaram dos créditos, com os quais tive mais contato durante esses últimos anos.

À Prof. Tit. Márcia Carneiro Valera Garakis, pelo conhecimento e dedicação. Sua participação e análise minuciosa nos créditos contribuíram muito para que eu chegasse até aqui. E obrigada por aceitar o convite de participar da banca examinadora.

Ao Prof. Assist. Dr. Frederico Canato Martinho por ter participado da banca do Exame Geral de Qualificação com considerações importantes ao trabalho. E por todo conhecimento compartilhado e entusiasmo com a profissão.

Ao Prof. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho e à Prof. Adj. Ana Paula Martins Gomes pelo conhecimento e companhia durante as clínicas.

À Prof. Assist. Dr. Luciane Dias de Oliveira e à Prof. Assist. Dr. Samira Esteves Afonso Camargo por ceder materiais e permitir a utilização de equipamento no L/EIC essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge por ter aceitado participar da banca do Exame Geral de Qualificação e dispendido tempo para análise deste trabalho.

Ao Prof. Assist. Dr. Ivan Balducci pela ajuda com as análises estatísticas realizadas nos trabalhos durante iniciação científica e mestrado.

A todos os funcionários da UNESP pela disposição e simpatia.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite em participar e dispendido tempo para análise deste trabalho.

Ao Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por aceitar o convite prontamente e se dispor a viajar para participar da banca examinadora.

À University of the Pacific – Arthur A. Dugoni School of Dentistry por aceitar meu estágio por 6 meses. E a todos professores e funcionários com os quais tive contato nesse período, que me auxiliaram e me acolheram.

Ao Prof. Benjamin D. Zeitlin por tornar esse estágio possível, sempre com muita simpatia e disponibilidade. Sua ajuda mudou minha visão da pesquisa e fez parte do meu crescimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Aos meus colegas do mestrado, Luciana, Monique, Flávia Teixeira, Rose, Emanuel, e do doutorado, Rafaela, Rafael, Cláudia, Camila, Ivany, Nadia, Heleine, Tereza, Gleyce, Flávia Cardoso, Aletéia, Ana Cláudia, pela companhia nesses dois últimos anos, pelas ajudas, por compartilhar as vitórias e também os problemas. Meu mestrado não seria o mesmo sem vocês, conquistei amizades que quero levar para a vida toda.

À Luciana pela amizade e companhia no laboratório. O medo inicial de fazer esse trabalho com alguém que nem conhecia foi substituído por amizade. Foi ótimo ter alguém para comemorar quando dava certo e ficar preocupada quando não dava, ou para conversar enquanto esperava um teste.

À Rafaela pela amizade e companhia no sanduíche. Foi muito bom ter com quem dividir essa experiência, e nossa amizade não para por aqui.

A todos amigos e familiares, que sempre torceram pelo meu sucesso e acompanham minha carreira. O carinho e amor de vocês é o mais importante em todos os quesitos. Vocês são o apoio quando mais preciso, são minha alegria, meu orgulho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, meu carinho e MUITO OBRIGADA!

"As ondulações da vida nos colocam em momentos únicos que não podem ser repetidos, mas o que emana daqueles que se gosta permanece, apesar da distância."

Autor desconhecido

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 SHED	20
2.2 Estímulo celular	22
2.3 Produção de citocinas	25
2.4 Diferenciação odontoblástica	28
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Cultivo das células	31
4.1.1 Descongelamento	33
4.1.2 Troca de meio	34
4.1.3 Subcultivo	34
4.1.4 Plaqueamento	35
4.2 Grupos experimentais	37
4.3 Ensaio XTT	38
4.4 Ensaio SRB	39
4.5 Atividade da Fosfatase Alcalina	40
4.6 Análise da deposição de cálcio (Ensaio de Alizarin Vermelho)	42
4.7 Reações de PCR	43
4.7.1 Extração do RNA	44
4.7.2 RT PCR (Obtenção dos cDNAs)	45
4.7.3 Amplificação por PCR	45
4.8 ELISA	48

4.9 Análise Estatística	49
5 RESULTADO	50
5.1 Ensaio XTT	50
5.2 Ensaio SRB	51
5.3 Atividade da Fosfatase Alcalina	54
5.4 Análise da deposição de cálcio (Ensaio de Alizarin Vermelho)	56
5.5 Reações de PCR	58
5.6 ELISA	59
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS	70
ANEXO	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	= Fosfatase Alcalina
ARS	= Alizarin Vermelho
BMM	= Células da medula precursoras de osteoclastos
BMSSC	= Células-tronco do estroma da medula óssea
bp	= Pares de base
°C	= Grau Celsius
cDNA	= DNA complementar
cm ²	= Centímetros quadrados
COX	= Ciclooxygenase
CO ₂	= Dióxido de carbono
DEPC	= Pirocarbonato de dietila
DFC	= Células do folículo dental
Dlx3	= <i>Distal-less Homeobox 3</i>
DMP-1	= <i>Dentin Matrix Protein-1</i>
DNA	= Ácido Desoxirribonucleico
DPSC	= <i>Dental Pulp Stem Cells</i>
DSP	= <i>Dentin Sialoprotein</i>
DSPP	= <i>Dentin Sialophosphoprotein</i>
EDTA	= Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	= <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
g	= Grama
G	= Força G
h	= hora
ICE	= Enzima convertora de IL-1 β
IL	= Interleucina
IL-1 β	= Interleucina-1Beta

IL-1ra	= Receptor Antagonista de IL-1
IL-6	= Interleucina-6
l	= Litro
LPS	= Lipopolissacarídeo
LTA	= Ácido Lipoteicóico
MEPE	= <i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>
min	= Minutos
ml	= Mililitro
MSC	= Células-tronco mesenquimais
Nes	= <i>Nestin</i>
ng	= Nanograma
nm	= Nanometro
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	= Reação em cadeia polimerase
PGE ₂	= Prostaglandina E ₂
pNPP	= <i>p-Nitrophenylphosphate</i>
RNA	= Ácido Ribonucleico
RNAm	= RNA mensageiro
rpm	= Rotação por minuto
SHED	= <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous</i>
SIBLINGS	= <i>Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins</i>
SRB	= <i>Sulforhodamine B</i>
TGF-β1	= Fator de Transformação do Crescimento-Beta1
TLR	= Receptor de membrana
TNF-α	= Fator de Necrose Tumoral-Alfa
VEGF	= Fator de Crescimento Endotelial Vascular
XTT	= <i>2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>
μg	= Micrograma
μl	= Microlitro

Leal FM. Avaliação da produção de citocinas, expressão gênica e análise funcional de células SHED expostas ao LTA bacteriano [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Células-tronco da polpa dentária humana são promissoras no tratamento endodôntico, porém antes de utilizá-las clinicamente, deve-se entender suas propriedades biológicas em resposta a estímulos, como o ácido lipoteicóico (LTA) bacteriano. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de células SHED (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) após exposição ao LTA bacteriano, verificando os efeitos na proliferação e metabolismo celular, atividade da fosfatase alcalina, deposição de cálcio, expressão de genes associados à mineralização, e liberação de citocinas. Foram utilizadas células SHED tratadas com LTA em diferentes concentrações, sem e com indutores da mineralização (IM). O metabolismo e a proliferação celular foram avaliados pelos ensaios de XTT e SRB. As células foram submetidas a um ensaio enzimático da atividade de fosfatase alcalina, para observação da ativação de processos de mineralização. E foi analisada qualitativamente a presença de deposição de cálcio pelas células pelo ensaio de alizarin vermelho (ARS). A expressão dos genes DSPP (Dentin Sialophosphoprotein) e DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) foi avaliada pela técnica do PCR (Polymerase Chain Reaction). O teste ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foi realizado para detectar e quantificar as citocinas IL-1 β (Interleucina-1 β), IL-6 (Interleucina-6), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α). Os dados obtidos nos ensaios quantitativos foram analisados estatisticamente por ANOVA complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi observado um aumento no metabolismo e proliferação celular com o tempo, não havendo diferenças entre os grupos testados em cada período. Nos grupos sem IM, observou-se um aumento da atividade da fosfatase alcalina das células expostas ao LTA comparados ao controle. Os grupos com indutores de mineralização apresentaram maiores quantidades de calcificações, comparados aos grupos sem IM. Após 3 dias, as células tratadas com LTA bacteriano apresentaram mais zonas de calcificação em relação ao controle, e após os períodos de 7 e 14 dias, foram semelhantes. Todos os grupos testados expressaram os genes DSPP e DMP-1, sendo maior nos grupos com IM. A expressão de IL-1 β e TNF- α pelas células dos grupos testados foi semelhante, já a concentração de IL-6 foi expressiva, havendo diferenças entre grupos e períodos. De acordo com a metodologia e análise

empregadas neste estudo, conclui-se que as células SHED quando expostas ao LTA bacteriano não sofreram interferências na proliferação e metabolismo celular, na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , e na diferenciação odontoblástica. Porém, em curto prazo, o LTA estimulou funcionalmente as células, havendo maior deposição de cálcio e atividade da fosfatase alcalina.

Palavras-chave: Células-tronco. Citocinas. Diferenciação celular. Expressão gênica. Fosfatase alcalina. Polpa dentária. Proliferação de células.

Leal FM. Evaluation of cytokines production, gene expression and functional analysis of SHED cells exposed to LTA [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Dental pulp stem cells are promising in endodontics, but before clinical treatment it should be studied to understand its biological properties in response to stimuli such as lipoteichoic acid (LTA). The aim of this study was to evaluate the behavior of Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED) exposed to LTA, analyzing cell proliferation and metabolism, alkaline phosphatase activity, calcium deposition, gene expression, cytokines production. SHED cells were treated with LTA, in different concentrations, without and with mineralization induction (MI). Cell metabolism and proliferation were evaluated by XTT and SRB. Alkaline phosphatase activity was performed to indicate mineralization process. Also, calcium deposition was observed qualitatively by alizarin red. Gene expression of DSPP (Dentin Sialophosphoprotein) and DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) was evaluated by PCR (Polymerase Chain Reaction). Cytokines IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 (Interleukin-6), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) were detected and quantified by ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Statistical analysis of quantitative tests were performed by ANOVA and Tukey test ($p < 0,05$). Metabolism and cell proliferation increased with time and no differences were observed between groups in each period. In groups without MI, there was an increase in alkaline phosphatase activity of cells exposed to LTA compared to control. Groups with mineralization induction showed more calcium deposition, compared to the groups without MI. After 3 days, cells treated with LTA showed more areas of calcification compared to control, and after periods of 7 and 14 days were similar. All groups tested expressed genes DSPP and DMP-1, being slightly higher in groups with MI. The expression of IL-1 β and TNF- α by cells of the tested groups were similar, and IL-6 concentration was expressive, with differences between groups and time periods. According to the methodology and analysis employed in this study, the conclusion is that SHED cells did not suffer interference of bacterial LTA in cell metabolism and proliferation, expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and odontoblast differentiation. However, in short term, LTA stimulated cells functionally, with higher calcium deposition and alkaline phosphatase activity.

Keywords: Alkaline Phosphatase. Cell Differentiation. Cell Proliferation. Cytokines. Dental pulp. Gene Expression. Stem cells.

1 INTRODUÇÃO

A inflamação da polpa dentária é uma reação do organismo frente a uma agressão de etiologia física, química ou biológica ao complexo dentino-pulpar, com intuito de eliminar a causa e permitir o reparo (Chang et al., 2006; Silva et al., 2009). O conhecimento desse processo é essencial para o correto diagnóstico e escolha do tratamento apropriado.

Após dano ou destruição de odontoblastos, células-tronco da polpa dentária migram para o local da agressão, onde podem se diferenciar e participar do processo de reparo ou regeneração (He et al., 2013). Células-tronco da polpa dentária humana são células mesenquimais indiferenciadas do tecido pulpar, e com um estímulo apropriado, essas células podem diferenciar em odontoblastos e formar dentina reparadora devido à reação defensiva da polpa. A dentinogênese é um processo celular regulado por fatores de crescimento e citocinas, e modulado por alterações no ambiente extracelular (Yang X et al., 2012).

Quando há comprometimento da polpa e esta é removida, seguida de desinfecção do canal radicular e posterior preenchimento com material artificial, pode haver grande perda de dentina deixando o dente não-vital e enfraquecido, principalmente em dentes imaturos (Demarco et al., 2011; Iglesias-Linares et al., 2013). Assim, a engenharia tecidual tem sido apresentada como um campo emergente, com resultados promissores quando células-tronco são associadas a arcabouços e moléculas (Demarco et al., 2011; Rosa et al., 2012; Steindorff et al., 2014).

As células-tronco da polpa dentária humana podem ser *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous* (SHED), quando

encontradas em dentes decíduos, e *Dental Pulp Stem Cells* (DPSC), em dentes permanentes. Essas células são promissoras para regeneração do complexo dentino-pulpar, pois oferecem menores chances de rejeição imunológica, além de apresentar acessibilidade na obtenção. A exfoliação de dentes decíduos, terceiros molares inclusos e dentes supranumerários indicados para extração ou dentes fraturados com exposição pulpar que necessitam de tratamento endodôntico, são opções para obtenção de células-tronco (Brar, Toor, 2012; Lee et al., 2011).

Dentes decíduos em exfoliação apresentam remanescentes da polpa dentária viva, que são fontes de células SHED. A grande vantagem é que nessa condição o procedimento é não-invasivo, com isso, há menor preocupação ética e legal. (Brar, Toor, 2012; Cordeiro et al., 2008; Lee et al., 2011; Nakamura et al., 2009).

As células SHED apresentaram maior índice de proliferação e capacidade de diferenciação, comparadas a DPSC *in vitro* (Lee et al., 2011; Miura et al., 2003; Nakamura et al., 2009; Wang X et al., 2012). E os resultados de Wang X et al. (2012) *in vivo*, em camundongos, sugerem maior capacidade de mineralização dessas células. Assim, as células SHED representam uma alternativa potencial para tratamento regenerativo.

A presença de bactérias e suas toxinas na polpa dentária é uma agressão que pode estimular processos celulares e interferir na diferenciação das células SHED. Bactérias Gram-positivas são frequentemente encontradas em infecções endodônticas, e em túbulos dentinários de dentes com lesões profundas de cárie e dentes com pulpite irreversível (Soden et al., 2009). O ácido lipoteicóico (LTA) é um componente da parede celular dessas bactérias (Kayaoglu, Ørstavik, 2004; Mo et al., 2008; Tian et al., 2013; Wang PL et al., 2001), que induz a expressão de diversos mediadores inflamatórios (Yang J et al., 2009), e ativa o sistema imune (Hahn, Liewehr, 2007).

Contudo, em células-tronco da polpa dentária humana, a resposta inflamatória a um estímulo como o LTA não está bem elucidada. Mas sabe-se que a presença de uma agressão pode levar a alterações celulares, modificando a expressão gênica, expressão de moléculas e a função celular. Em células pulpares, essas alterações podem levar à diferenciação celular em odontoblastos, por isso, geralmente estão associadas ao processo de mineralização.

Os processos celulares e possíveis alterações podem ser avaliados pela expressão gênica (Pääkkönen et al., 2007). Os genes *Dentin Sialophosphoprotein* (DSPP) e *Dentin Matrix Protein-1* (DMP-1) são essenciais para o desenvolvimento de tecidos duros (Gibson et al., 2013; Zhu et al., 2012), podendo demonstrar a diferenciação odontoblástica (Casagrande et al., 2010). Estão localizados próximos um ao outro no DNA e tem estruturas similares, mas o gene DSPP afeta a mineralização da dentina mais profundamente que o DMP-1 (Suzuki et al., 2012).

Os genes para ALP, DSPP e DMP-1 são marcadores específicos da diferenciação celular para detectar o potencial odontogênico das células-tronco da polpa dentária (Li et al., 2012). A fosfatase alcalina (ALP) é uma importante enzima na formação de tecidos mineralizados, cuja atividade é aumentada no início da resposta inflamatória (Spoto et al., 2001).

No tecido pulpar infectado, as bactérias e suas toxinas estimulam a produção e liberação de citocinas. Essas moléculas estão envolvidas no recrutamento de células inflamatórias e imunológicas (Yang X et al., 2012). As citocinas, como as interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), são importantes no processo de inflamação pulpar (Cavalcanti et al., 2011; Chang et al., 2006; Lertchirakarn et al., 1998; Lu et al., 2002; Silva et al., 2009; Yang X et al., 2012).

As células-tronco da polpa dentária humana tem excelente potencial de reparo e regeneração. Com estímulo adequado, há diferenciação dessas células, processo regulado por citocinas, entre outros mediadores e condições celulares. Porém, pouco se sabe sobre o efeito da infecção bacteriana sobre as células-tronco e se este é um fator determinante na limitação do reparo tecidual. Assim, antes de utilizar essas células em tratamento clínico, deve-se entender suas propriedades biológicas em resposta a um estímulo intrínseco ou extrínseco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SHED

As células-tronco da polpa dentária humana de dentes decíduos são candidatas potenciais ao uso na terapia regenerativa, pois são de fácil acesso e apresentam capacidade de regeneração (Wang X et al., 2012). Por isso, suas características biológicas e aplicações devem ser extensivamente estudadas.

Em 2003, Miura et al. encontraram em dentes decíduos, células-tronco multipotentes (SHED). As células SHED foram identificadas como altamente proliferativas e com capacidade de diferenciação em células neuronais, adipócitos e odontoblastos, e indução de formação óssea, apesar de não diferenciar diretamente em osteoblastos. Quando comparadas a células-tronco do estroma da medula óssea (BMSSCs) e células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs), SHED mostraram maior índice de proliferação. No experimento *in vitro*, houve formação de nódulos minerais e aumento na produção de marcadores de mineralização. E em camundongos, a dentina regenerada expressou DSPP. Esses dados indicam que SHED tem capacidade de diferenciação em odontoblastos tanto *in vitro* como *in vivo*.

O estudo de Nakamura et al. (2009) avaliou as células SHED, DPSCs e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs). E observaram que todas as células exibiram características de células-tronco, incluindo morfologia fibroblástica e expressão de marcadores celulares. Mas as SHED apresentaram

proliferação significativamente maior quando comparadas a DPSCs e BMSCs, havendo, assim, maior expressão de genes que participam de proliferação celular e matriz extracelular, incluindo diversas citocinas.

Lee et al. (2011) compararam células DPSCs de dentes supranumerários e SHED. O índice de proliferação de SHED foi maior. E o índice de crescimento após armazenamento (congelamento) em longo prazo, foi constante nas células SHED, já DPSCs foram afetadas. DPSCs e SHED foram similares quanto ao potencial de diferenciação adipogênica e condrogênica, e demonstraram atividade da fosfatase alcalina, mas não houve estímulo de diferenciação osteogênica. Também foi realizada análise citogenética, na qual ambos os tipos celulares apresentaram-se normais. Para avaliar a cicatrização *in vitro*, foi aplicado um choque elétrico e observou-se que as células SHED migraram mais rapidamente para a ferida.

O estudo de Wang X et al. (2012) também comparou SHED e DPSCs, avaliando proliferação e diferenciação *in vitro*, e em camundongos *in vivo*. As células foram implantadas com osso bovino no subcutâneo de camundongos imunocomprometidos, e após 8 semanas foram avaliadas. Os resultados *in vivo* sugerem que SHED tem maior capacidade de mineralização que DPSCs. E SHED também apresentou maior proliferação e capacidade de diferenciação que DPSCs *in vitro*.

Cordeiro et al. (2008) utilizaram SHED em fatias de dentes com *scaffolds* (arcabouço) para implantação subcutânea em camundongos com imunodeficiência. E observaram que após 14-28 dias, houve formação de um tecido pulpar com características morfológicas similares à polpa dentária normal. Houve aumento de microvasos, maior número de células na pré-dentina, e além das características morfológicas, a expressão de *Dentin Sialoprotein* (DSP) sugerem diferenciação celular em odontoblastos. DSP não é um marcador específico para odontoblastos, já que também pode ser expresso em

osteoblastos, porém sua expressão em dentina é muito maior que em osso.

O estudo de Sakai et al. (2010) também utilizou SHED em fatias de dentes com *scaffolds* (arcabouço) para avaliação *in vitro* e *in vivo* (transplantados em subcutâneo de camundongos imunocomprometidos) da diferenciação em odontoblastos e células endoteliais. As células SHED diferenciaram em odontoblastos funcionais, que produziram dentina tubular. Também houve diferenciação em células endoteliais vasculares, com expressão de marcadores do endotélio e organização em estruturas capilares.

As células-tronco são promissoras na regeneração do complexo dentino-pulpar, porém são necessários estudos para melhor conhecer suas propriedades frente a um estímulo intrínseco ou extrínseco. Pouco se sabe sobre o efeito da infecção bacteriana sobre essas células, e se este é um fator determinante na limitação do reparo e regeneração tecidual. Na infecção estão presentes diversas bactérias e suas toxinas. Entre seus componentes celulares estão ácido lipoteicóico (LTA) e lipopolissacarídeo (LPS), de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Porém há poucos estudos utilizando LTA em culturas celulares, principalmente em células-tronco da polpa dentária.

2.2 Estímulo celular

LTA é uma molécula anfifílica consistindo de um poliglicerolfosfato agrupado a um complexo do grupo glicolípídeo (Hogg et al., 1997; Kayaoglu, Ørstavik, 2004; Wicken, Knox, 1975). Fica ancorado por forças hidrofóbicas à parede celular de bactérias Gram-positivas. O LTA é produzido em grandes quantidades em bactérias cariogênicas na presença de açúcares, e pode ser liberado extracelularmente durante o

crescimento bacteriano em baixo pH. Quando o LTA é liberado, pode haver difusão na polpa dentária e provocar respostas imunes (Hahn, Liewehr, 2007).

Já o lipopolissacarídeo (LPS), componente celular de bactérias Gram-negativas frequentemente presentes em canais radiculares infectados (He et al., 2013; Mo et al., 2008; Morsczech et al., 2012), apresenta mais estudos de seus efeitos em culturas celulares. Leva à destruição de tecidos e, assim como o LTA, induz reações inflamatórias e imunopatológicas no hospedeiro (Hosoya, Matsushima, 1997). LTA e LPS ativam o sistema imune por mecanismos similares. Após ativação de receptores de membrana (TLR), há liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Mo et al. (2008) utilizaram LTA de *Streptococcus pyogenes* e LPS de *Escherichia coli* em diferentes concentrações, para investigar a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs). Ambos componentes bacterianos não induziram proliferação celular, e em curto prazo (3 dias), não tiveram efeito significativo na atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio. Já em longo prazo (10 e 14 dias), maiores doses utilizadas de LPS (1 e 10 µg/ml) levaram a um aumento na atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio, comparado aos controles não-tratados. O LTA não teve efeito significativo na diferenciação, porém aumentou a expressão do receptor de membrana TLR4 no dia 12, enquanto o LPS reduziu a expressão de TLR4 e TLR2.

O estudo de Durand et al. (2006) avaliou a resposta de odontoblastos da polpa dentária humana expostos a 1 µg/ml de LTA de *Bacillus subtilis*. O LTA aumentou a expressão gênica para os receptores de membrana TLR2, TLR3, TLR5 e TLR9. A ativação de TLR aumentou a síntese de quimiocinas, mediadores da inflamação. E diminuiu a expressão de alguns genes, como o DSPP, que tem importante papel na mineralização da pré-dentina. Esses resultados sugerem que quando

expostos ao LTA, odontoblastos diminuíram suas funções e aumentaram a expressão de moléculas relacionadas à resposta imune.

Em 2010, Park et al. caracterizaram a expressão de receptores de membrana em fibroblastos da polpa dentária humana expostos a LTA e LPS. Os receptores TLR estão envolvidos no reconhecimento de microrganismos pela célula, induzindo a resposta inflamatória. Foram detectados TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, sendo TLR2 de maior expressão para LTA e TLR4 para LPS.

Essa maior expressão de TLR2 frente ao LTA também foi demonstrada por Soden et al. (2009). LTA de *Streptococcus sanguis* na concentração 80 µg/ml foi utilizado em diferentes células: odontoblastos MDPC-23, células indiferenciadas da polpa OD-21, macrófagos, fibroblastos gengivais. Observou-se que o LTA induziu a expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em células pulpares. E com a inibição de TLR2, houve inibição de VEGF. Concluindo que a produção de VEGF em células pulpares é mediada por receptores TLR2.

O estudo de Wang PL et al. (2001) avaliou a citotoxicidade do LTA de *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações, em células da polpa dentária humana. O LTA foi citotóxico de maneira dose-dependente e tempo-dependente. E também causou apoptose, o que é importante para início e progressão de uma pulpíte.

Em 2013, Tian et al. utilizaram LTA de *Enterococcus faecalis* em diferentes concentrações, em osteoblastos MG63. E observaram que a proliferação celular foi inibida pelo LTA de forma dose-dependente. O LTA também induziu apoptose.

2.3 Produção de citocinas

Yang J et al. (2009) obtiveram células da medula precursoras de osteoclasto (BMM) de camundongos com deficiência do receptor TLR2 ou MyD88 (envolvida na via de sinalização de receptor de membrana). O LTA aumentou a produção da citocina TNF- α de maneira dose-dependente. E inibiu a diferenciação osteoclástica e a capacidade de reabsorção óssea. Essa inibição não ocorreu nas células obtidas de camundongos com deficiência do receptor TLR2, mostrando que o efeito do LTA está associado a TLR2.

Silva et al. (2009) avaliaram a localização, distribuição e concentração das citocinas IL-1 β e IL-8 em polpas dentárias sadias e inflamadas. Por imunohistoquímica, polpas inflamadas foram fortemente coradas para ambas interleucinas, e o teste ELISA confirmou suas presenças em grande quantidade. Fibroblastos da polpa foram expostos a 10 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*, e houve maior produção dessas citocinas.

No estudo de Aulock et al. (2006), LTA de *Staphylococcus aureus* e LPS de *Salmonella abortus* foram usados em amostras de sangue de voluntários, e observou-se a produção de citocinas (incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6) por monócitos e leucócitos. A resposta das células sanguíneas ao LTA foi mais variável que ao LPS. Também foi observada maior secreção de citocinas em homens, comparados a mulheres, as quais apresentaram maior variação.

Em 2013, He et al. observaram que em células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs), o LPS aumentou a produção de IL-8, processo que envolve o receptor de membrana TLR4, MyD88 (envolvida na via de sinalização de TLR4), NF-KappaB (fator de transcrição para resposta inflamatória e imune) e MAPK (importante na sinalização de TLR4).

Em 2002, Lu et al. avaliaram a produção de IL-1 β em células da polpa dentária humana após exposição ao LPS de *Fusobacterium nucleatum* em diferentes concentrações. E investigaram o efeito do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) nestas. Os resultados obtidos mostraram produção de IL-1 β com um aumento dose-dependente em relação ao LPS. O IL-1ra reduziu a síntese de IL-1 β , assim, é um fator molecular que pode contribuir para a diminuição da resposta inflamatória.

Hosoya e Matsushima (1997) determinaram a concentração de IL-1 β produzida e a atividade da enzima conversora de IL-1 β (ICE) em células da polpa dentária humana expostas ao LPS de *Porphyromonas endodontalis* em diferentes concentrações. A liberação de IL-1 β também foi dose-dependente, e tempo-dependente. Já a atividade da ICE não aumentou com a presença do LPS.

Ferreira et al. (2009) avaliaram a expressão de IL-1 β e IL-8 em fibroblastos da polpa de dentes decíduos, comparando materiais usados na pulpotomia e, como controle positivo foi usado 10 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*. O LPS apresentou altos níveis de produção dessas interleucinas.

No estudo de Hosoya et al. (1996), foi determinada a produção de IL-1 β e IL-6 por células da polpa dentária humana frente ao LPS de *Porphyromonas endodontalis* em diferentes concentrações. O LPS estimulou as células a produzir essas interleucinas de maneira dose-dependente. A produção de IL-6 foi independente da produção de IL-1 β .

Em 2012, o estudo de Morsczech et al. comparou o efeito do LPS das bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*, ambos na concentração 1 μ g/ml, em células do folículo dental (DFCs). O LPS de *E. coli* aumentou a produção de todas as citocinas estudadas (IL-1 β , IL-6, IL-8). Enquanto o LPS de *P. gingivalis* induziu somente a expressão de IL-8, sendo essa expressão significativamente menor que da outra bactéria. A atividade da fosfatase alcalina também foi maior com a administração

do LPS de *E. coli*, porém, a mineralização foi inibida pelo LPS de ambas espécies. Portanto, o LPS prejudicou a diferenciação dessas células.

Chang et al. (2006) avaliaram se a expressão de IL-1 β e TNF- α em células pulpares humanas estimulam a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e a expressão gênica da ciclooxygenase (COX). Durante o processo inflamatório e reparador, a PGE₂ é um importante fator na regulação das funções das células pulpares. E a COX é responsável pela formação de importantes mediadores biológicos, entre eles, a PGE₂. Esses pesquisadores observaram que IL-1 β e TNF- α estimulam a produção de PGE₂, e IL-1 β estimula expressão de RNAm da COX-2, mas não da COX-1. Também foi observado que a PGE₂ estimulou a mobilização de cálcio.

No estudo de Lertchirakarn et al. (1998), a IL-1 β inibiu a proliferação de fibroblastos da polpa, mas na presença de indometacina essa inibição foi menor. Indometacina é um antiinflamatório não esteróide, que age inibindo a produção de prostaglandina. Assim, sugere-se que a IL-1 β é um mediador da síntese de prostaglandina e a proliferação celular depende dessas substâncias. A IL-1 β também estimulou a síntese de colágeno tipo I, sugerindo que esta citocina atue no processo de reparo.

Pääkkönen et al., em 2007, estudaram os efeitos do Fator de Transformação do Crescimento-Beta1 (TGF- β 1) no tecido pulpar e em odontoblastos, com interesse nas citocinas pró-inflamatórias. Após o tratamento com TGF- β 1, foi induzida a liberação de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8. Podendo concluir que TGF- β 1 é um potente regulador de respostas pró-inflamatórias e defensivas do complexo dentino-pulpar.

Em 2012, Yang X et al. trataram células-tronco da polpa dentária humana (DPSCs) com IL-1, TNF ou os dois, por diferentes períodos. Foram avaliadas proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina e expressão de genes envolvidos na mineralização (incluindo ALP, DSPP, DMP-1). Após 3 dias de tratamento com citocinas, os complexos célula-arca-bouço (*cell-scaffold*) foram implantados no

subcutâneo de camundongos por 8 semanas. E foi observado que o tratamento de 3 dias induziu diferenciação odontogênica em DPSCs. A análise histológica demonstrou que houve formação de tecido mineralizado, especialmente quando ambas citocinas foram aplicadas.

2.4 Diferenciação odontoblástica

Casagrande et al. (2010) mostraram que as células SHED expressam os marcadores de diferenciação DSPP, DMP-1 e *Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein* (MEPE) quando cultivadas em fatias de dentes com *scaffolds* (arcabouço) *in vitro* e *in vivo* com implantação subcutânea em camundongos com imunodeficiência.

Em revisão de literatura, Suzuki et al. (2012) estudaram os genes DSPP (*Dentin Sialophosphoprotein*) e DMP-1 (*Dentin Matrix Protein-1*). Estes são proteínas altamente fosforiladas que pertencem à família das *Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins* (SIBLINGS), e são essenciais ao desenvolvimento adequado de tecidos duros, como dentes e ossos. Estão localizados próximos um ao outro no DNA, e apresentam estruturas gênicas e protéicas similares. Entretanto, DSPP afeta a mineralização da dentina mais profundamente que DMP-1. Já o DMP-1 afeta a mineralização óssea e controla níveis de fosfato sérico, enquanto o DSPP não possui efeito sistêmico.

Em 2013, Gibson et al. realizaram um estudo *in vivo*, em camundongos, e os resultados obtidos mostram que o gene DMP-1 regula a expressão de DSPP no desenvolvimento do dente e osso alveolar. Mas também sugerem que outras moléculas podem estar envolvidas nessa regulação, como Dlx3.

Li et al. (2012) avaliaram o efeito do gene Dlx3 na proliferação e diferenciação odontoblástica de células da polpa dentária

humana. O aumento da expressão de Dlx3 diminuiu a proliferação celular, mas aumentou a diferenciação, promovendo formação de nódulos minerais, aumento da atividade da fosfatase alcalina e da expressão de genes relacionados à mineralização (DSPP, DMP-1, ALP, Nes).

Spoto et al. (2001) estudaram a atividade da fosfatase alcalina em polpas normais, com pulpite reversível e pulpite irreversível. Na polpa normal, houve pequena atividade da fosfatase alcalina na pré-dentina. Já na polpa com pulpite reversível, a atividade foi difusa no estroma, e não houve atividade da enzima na camada odontoblástica. E na pulpite irreversível, a polpa apresentou um infiltrado inflamatório, com muitos macrófagos e neutrófilos positivos para fosfatase alcalina. A diferença entre os grupos foi significativa, sendo a atividade da fosfatase alcalina na pulpite reversível quase oito vezes o valor em polpas normais. Assim, a fosfatase alcalina tem papel na resposta inicial da polpa à agressão.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de células-tronco SHED após exposição ao LTA bacteriano, verificando os efeitos na proliferação e metabolismo celular, atividade da fosfatase alcalina, deposição de cálcio, expressão dos genes DSPP e DMP-1, e liberação das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α .

4 MATERIAL E MÉTODOS

As células-tronco utilizadas no presente estudo (SHED) foram obtidas do banco de células da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. As culturas foram previamente estabelecidas e caracterizadas, em estudo já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (Parecer 46420) (ANEXO).

4.1 Cultivo das células

Foram utilizadas células SHED entre a 5ª e 9ª passagem (Figura 1). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial, variação alfa (α -MEM, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) inativado por calor, 100 μ M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1% de solução antibiótica-antimicótica (Penicilina-Estreptomicina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), mostrados na Figura 2A. E foram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific Inc, Marietta, OH, EUA) a 37 °C, numa atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células foram cultivadas até atingir subconfluência (80% de ocupação do frasco/placa), quando foram tripsinizadas e subcultivadas. Todas as etapas estão descritas a seguir.

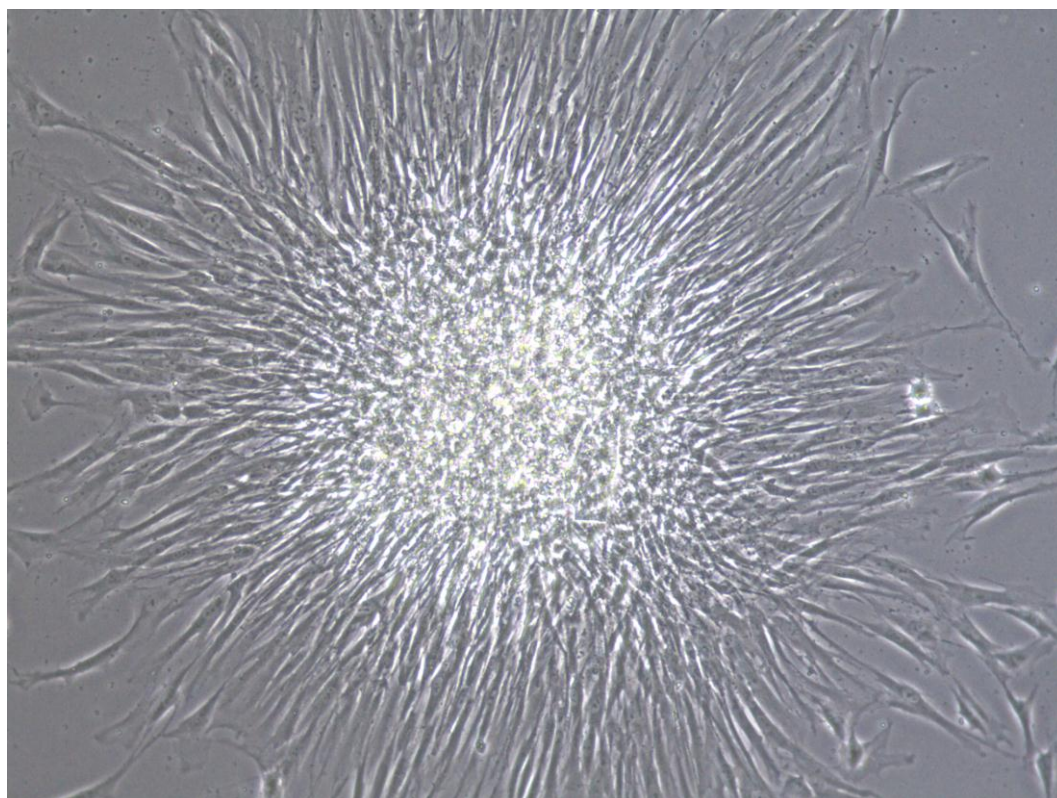


Figura 1 – Microscopia de fase (20x). Células SHED em 5ª passagem.

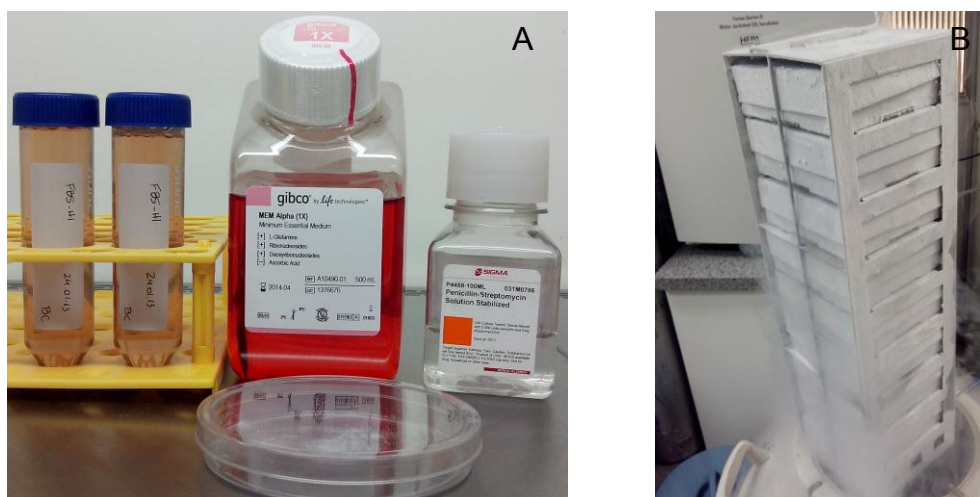


Figura 2 – Cultivo das células. A) Meio mínimo essencial, variação alfa, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 μ M de ácido ascórbico e 1% de solução de penicilina-estreptomicina; B) Tambor de nitrogênio líquido contendo tubos criogênicos com células congeladas.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil). Em um frasco para cultura de células (garrafa 75 cm² – 270 ml, TPP, Trasadingen, Suíça), foram acrescentados 14 ml de meio alfa-MEM. Um tubo criogênico contendo as células foi selecionado, e após sua remoção do tambor de nitrogênio líquido (Thermo Fisher Scientific Inc, Marietta, OH, EUA) (Figura 2B), levado imediatamente para o banho-maria (Petrodidática, Guarulhos, SP, Brasil) para descongelamento. As células foram removidas do tubo e levadas ao frasco com meio. A observação em microscópio invertido de fase (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) foi realizada para confirmar a presença de células (Figura 3A). O frasco foi mantido em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Figura 3B).

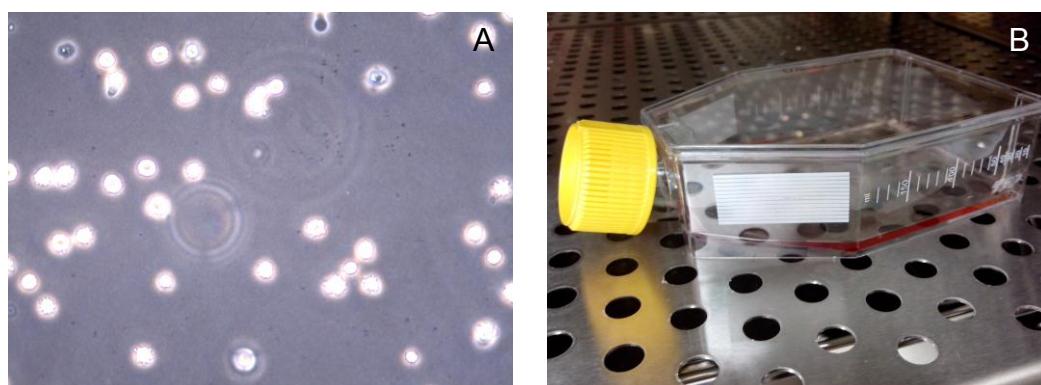


Figura 3 – Descongelamento de SHED. A) Microscopia de fase (20x). Confirmação da presença de células no frasco antes da incubação em estufa para o crescimento celular; B) Frasco contendo células SHED em meio alfa-MEM incubados em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida de 5% de CO₂.

4.1.2 Troca de meio

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Para isso, todo meio foi removido do frasco e as células foram lavadas com solução salina tamponada - PBS (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, 15 ml de meio novo foram adicionados ao frasco e novamente levado à estufa.

4.1.3 Subcultivo

Quando as células cultivadas atingiram 80% de ocupação do frasco (Figura 4A), foi realizado o procedimento de subcultivo. Desta forma, as células foram passadas de um frasco para dois ou mais.

O meio de cultura presente no frasco foi removido e as células foram lavadas com PBS. Foram acrescentados 2,5 ml de tripsina-Edta 0,25% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), deixando 5 min em estufa, para destacar as células do fundo do frasco. Em seguida, 2,5 ml de meio foram adicionados sobre a tripsina para neutralização. O volume total foi levado em tubo Falcon (TPP, Trasadingen, Suíça) para centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) durante 5 min a 500 G. Assim, foi obtido um sedimento de células (*pellet*) no fundo do tubo (Figura 4B), e o sobrenadante foi desprezado. As células foram suspensas em 1 ml de meio para cada novo frasco. E em cada novo frasco foram acrescentados 14 ml de meio novo e 1 ml de células. Os frascos foram mantidos em estufa.

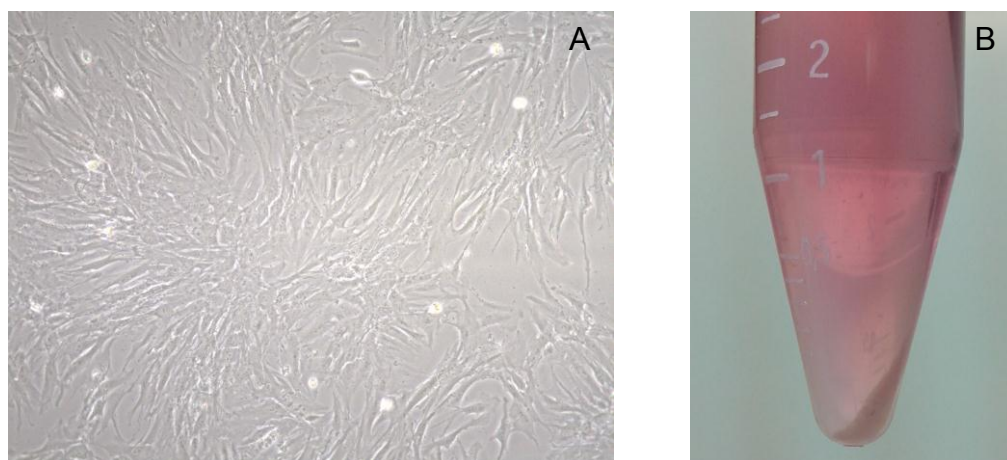


Figura 4 – Subcultivo. A) Microscopia de fase (20x). Subconfluência – 80% de ocupação das células SHED no frasco; B) *Pellet* de células SHED no fundo de tubo Falcon, obtido após centrifugação durante o procedimento de subcultivo celular.

4.1.4 Plaqueamento

Após atingirem subconfluência no frasco, foi realizado o plaqueamento das células em placas de 96 e de 24 poços de acordo com cada ensaio. Para isso, foram realizados os mesmos passos do subcultivo até obtenção do *pellet*.

Assim, o meio de cultura presente no frasco foi removido e as células foram lavadas com PBS. Foram acrescentados 2,5 ml de tripsina-Edta 0,25%, deixando 5 min em estufa, para destacar as células do fundo do frasco. Em seguida, 2,5 ml de meio foram adicionados sobre a tripsina para neutralização. O volume total foi levado em tubo Falcon para centrífuga durante 5 min a 500 G. Dessa forma, foi obtido um *pellet* no fundo do tubo, e o sobrenadante foi desprezado.

Para placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), o *pellet* foi ressuspenso em meio de cultivo no volume total a ser utilizado na placa, já que as células foram observadas nos poços até atingirem subconfluência. E 400 μ l foram adicionados a cada poço (Figura 5).

Para placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), o *pellet* foi ressuspensão em 5 ml de meio e seguiu-se a contagem das células. Em câmara de Neubauer (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) (Figura 6A), observando no microscópio invertido de fase, foram contadas as células nos quadriláteros periféricos. Para obtenção da quantidade de células por ml de meio de cultivo, foi utilizada a fórmula:

$$C \times 10^4 = n^{\circ} \text{ células/ml}$$

Onde C corresponde à média da quantidade de células encontradas nos quadriláteros periféricos. Assim, foi padronizada a quantidade de 5000 células por poço. Foram adicionados 100 μ l em cada poço da placa (Figura 6B).

Após o plaqueamento, SHED foram mantidas em estufa.



Figura 5 – Cultivo de células SHED em placa de 24 poços.

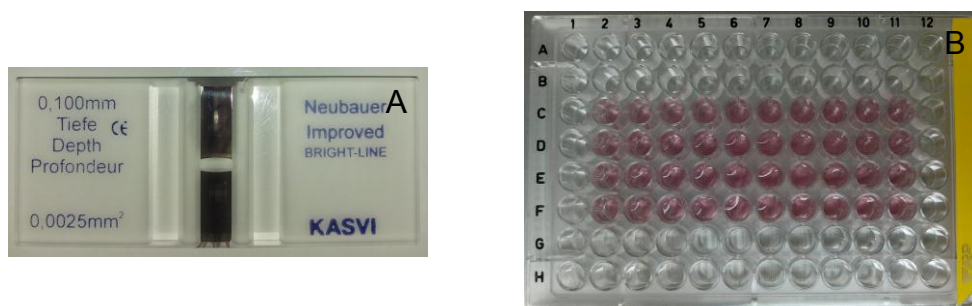


Figura 6 – Plaqueamento. A) Câmara de Neubauer, utilizada para contagem de células; B) Cultivo de células SHED em placa de 96 poços.

4.2 Grupos experimentais

Nos experimentos, as culturas celulares foram submetidas a todos os ensaios. E cada experimento constituído por um grupo controle negativo, no qual as células não receberam tratamento, um grupo de controle positivo, no qual as células foram tratadas com os indutores de mineralização (IM) suplemento de dexametasona e β -glicerolfosfato (Lonza, Walkersville, MD, EUA), e grupos com células tratadas por ácido lipoteicóico (LTA) da bactéria *Enterococcus faecalis* (L4015, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em ambas as situações (com e sem suplementos de mineralização). A divisão dos grupos experimentais pode ser visualizada no Quadro 1.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Sem indutores de mineralização	Com indutores de mineralização
Sem LTA (Controles)	Negativo	Positivo
Com LTA	LTA	LTA + IM

O LTA bacteriano foi aplicado sobre as células no meio de cultura. Os meios foram renovados a cada 2 dias. Após os períodos experimentais, as células foram coletadas e processadas conforme os protocolos descritos a seguir. Todas as reações foram realizadas em duplicata em dias diferentes para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

4.3 Ensaio XTT

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento para padronização de 5000 células por poço. As células cultivadas em placas de 96 poços foram tratadas com LTA nas diferentes concentrações: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml e 1 µg/ml. Assim, foram avaliados 5 grupos no total, incluindo grupo controle (células sem tratamento). As células foram cultivadas por períodos de 24, 48 e 72 h.

A solução de XTT (*2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide*) foi preparada seguindo a proporção: 158 µl de PBS, 40 µl de XTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) preparado e 2 µl de menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Após os períodos, cada poço foi lavado com 200 µl de PBS, e adicionado 200 µl da solução de XTT. A placa foi embalada em papel alumínio para não ser exposta à luz, e incubada em estufa de 5% de CO₂ a 37 °C durante 3 h. Em seguida, foi realizada leitura da absorbância (Figura 7) em espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT, EUA) a 490 nm.

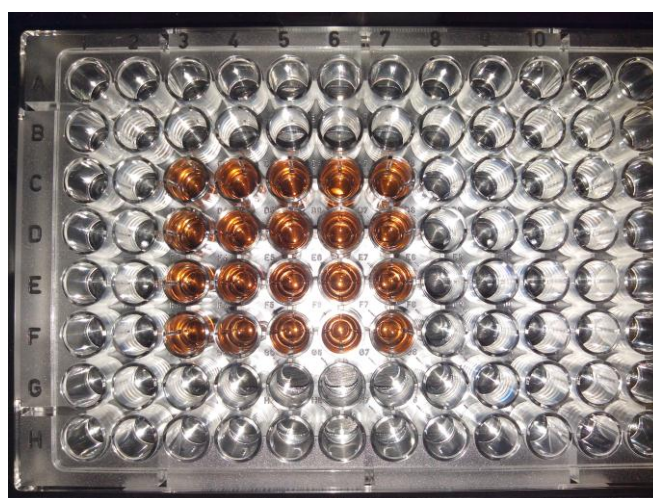


Figura 7 – Placa contendo solução de XTT, para leitura da absorbância.

4.4 Ensaio SRB

Assim como no ensaio XTT, a contagem de células foi realizada antes do plaqueamento para padronização de 5000 células por poço. As células cultivadas em placas de 96 poços foram tratadas com LTA em diferentes concentrações: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml e 1 µg/ml. Sendo avaliados 5 grupos no total, incluindo grupo controle (células sem tratamento). As células foram cultivadas por períodos de 24, 48 e 72 h.

Após os períodos, cada poço foi lavado com 100 µl de PBS, as células fixadas com ácido tricloroacético 10% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, SP, Brasil) e mantidas em geladeira a 4 °C durante 1 h. Em seguida, a placa foi lavada em água corrente e totalmente seca em estufa.

A marcação das proteínas celulares foi realizada com 50 µl da solução de SRB 0,4% (*sulforhodamida B*) em ácido acético 1% por poço (Figura 8A). Após homogeneizar em agitador, as placas foram mantidas por 1 h em temperatura ambiente.

Os poços foram lavados com ácido acético 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para remover o corante não ligado, e novamente secos em estufa. As células foram observadas em microscópio invertido de fase. A solubilização do SRB ligado foi feita com 100 µl de Tris-base 10 mM em cada poço e homogeneizado no agitador de placas (Figura 8B). Por fim, a leitura da absorbância (Figura 8C) foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

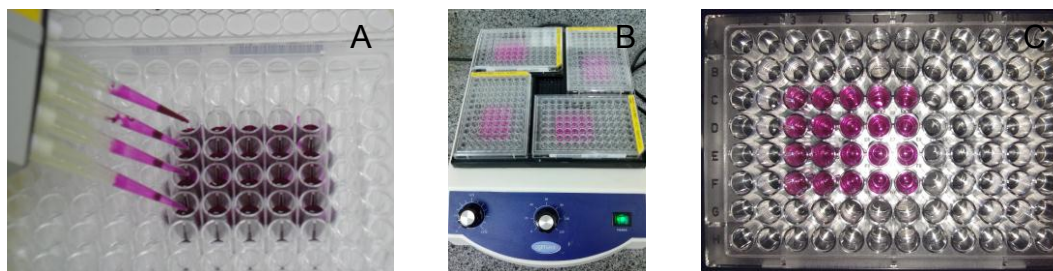


Figura 8 – Ensaio SRB. A) Marcação das proteínas celulares de SHED com solução de SRB 0,4%; B) Solubilização do SRB com Tris-base 10 mM em agitador de placas; C) Placa contendo SRB para leitura da absorbância.

4.5 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento para padronização de 5000 células por poço. Devido aos resultados apresentados pelos testes anteriores, as células cultivadas em placas de 96 poços foram tratadas com LTA em maiores concentrações: 20 ng/ml, 200 ng/ml, 2 µg/ml e 20 µg/ml. Cada grupo foi tratado sem e com indutores de mineralização. Assim, foram avaliados 10 grupos no total (Figura 9), incluindo controle negativo (células sem tratamento) e positivo (células sem tratamento, com IM). As células foram cultivadas pelo período de 3 dias.

Após o período de incubação das células em contato com o LTA, a atividade da fosfatase alcalina foi mensurada de acordo com o protocolo do fabricante do kit (Abcam, Cambridge, MA, EUA). Primeiramente as células foram lavadas com PBS. Em seguida adicionados 80 µl da solução tampão de ALP em cada poço e realizada raspagem da monocamada.

Foi preparada uma solução 5 mM de pNPP (*p-Nitrophenyl-phosphate*), onde 2 tabletes de pNPP foram dissolvidos em um tubo Falcon contendo 5,4 ml da solução tampão de ALP. Essa mistura

foi realizada e mantida em gelo. Cada poço contendo as amostras recebeu 40 μ l da solução preparada de pNPP.

A placa foi embalada em papel alumínio para não ser exposta à luz, e incubada a 25°C durante 60 min. Após esse período, foram adicionados 20 μ l da solução de parada (stop solution 1X 10ml) em cada poço. Durante a incubação, a solução de pNPP reagiu com a ALP liberada pelas células. E a reação foi lida em espectrofotômetro a 405nm (Figura 10).

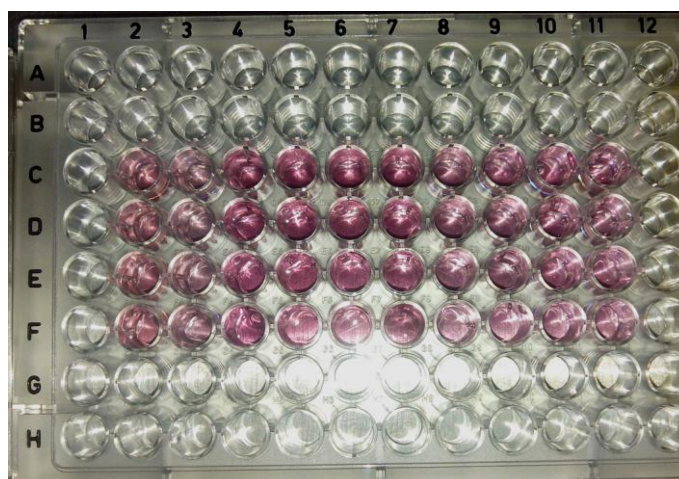


Figura 9 – Células SHED cultivadas em placa de 96 poços, sendo cada coluna ($n = 4$ poços) utilizada para um grupo.



Figura 10 – Placa para leitura da absorbância da atividade da fosfatase alcalina.

4.6 Análise da deposição de cálcio (Ensaio de Alizarin Vermelho)

As células foram cultivadas em placas de 24 poços e após atingirem subconfluência, foram tratadas com LTA na concentração 200 ng/ml, sem e com indutores de mineralização (Figura 11). Com os resultados dos testes anteriores, foi selecionada somente uma concentração de LTA. O controle negativo consistiu em células sem tratamento e o positivo, células sem tratamento, mas com IM. As células foram cultivadas pelos períodos de 3, 7 e 14 dias.

A análise visual de zonas de mineralização na monocamada de células foi realizada por meio do corante de alizarin vermelho. Para isso, o meio de cultivo de cada poço foi aspirado, com o cuidado de não aspirar as células. A lavagem foi realizada cuidadosamente com 200 µl de PBS. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em temperatura ambiente durante 60 min (Figura 12A). Em seguida, as células fixadas foram lavadas duas vezes seguidas, com 200 µl água deionizada por poço, a fim de retirar a substância fixadora anterior.

Após remover a água, a monocamada foi recoberta com 200 µl de solução de alizarin vermelho em cada poço (Figura 12B). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 20 a 30 min. Em seguida, o excesso de corante foi removido e os poços lavados com água deionizada até a retirada de todo corante não ligado. Finalmente, foram adicionados 200 µl de água deionizada em cada poço para prevenir a desidratação celular (Figura 12C), e as células foram observadas e fotografadas em microscópio invertido de fase.

A avaliação das células contendo zonas de deposição de cálcio coradas pela solução do corante de alizarin vermelho foi realizada qualitativamente.



Figura 11 - Células SHED cultivadas em placa de 24 poços, sendo cada coluna ($n = 2$ poços) utilizada para um grupo.



Figura 12 – Ensaio de Alizarin Vermelho. A) Fixação das células em paraformaldeído 4% em temperatura ambiente durante 60 min; B) Monocamada recoberta com solução de alizarin vermelho, e mantida em temperatura ambiente por 20-30 min; C) Após lavagem dos poços com água deionizada, a placa pôde ser observada em microscópio invertido de fase.

4.7 Reações de PCR

As células foram cultivadas em placas de 24 poços e após atingirem subconfluência, foram tratadas com LTA na concentração 200 ng/ml, sem e com indutores de mineralização. O controle negativo consistiu em células sem tratamento e o positivo, células sem tratamento, mas com IM. As células foram cultivadas pelos períodos de 3, 7 e 14 dias.

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas para avaliar a expressão dos genes DSPP e DMP-1 (Quadro 2), seguindo o protocolo abaixo.

4.7.1 Extração do RNA

As células foram lavadas com PBS e foi adicionado a cada poço trizol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Com um raspador de células, todo o conteúdo foi misturado e levado a um eppendorf. Em seguida, foi realizado o armazenamento em trizol, em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Fisher Scientific Inc, Marietta, OH, EUA).

Após breve homogeneização, foram adicionados 250 μl de clorofórmio para cada 1 ml de trizol utilizado, os tubos agitados em vórtex e mantidos durante 3 min a temperatura ambiente. Os tubos foram levados à centrífuga (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 10.000 G, durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a fase aquosa (Figura 13A) foi coletada. Esta fase aquosa foi levada para outro tubo e foi acrescentado 250 μl de isopropanol, homogeneizado e mantido durante 10 min a temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 10.000 G durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado (Figura 13B) lavado com 500 μl de álcool etílico 75% (Reagentes Analíticos ECIBRA, Campinas, SP, Brasil), e então centrifugado a 5.000 G durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após remoção do álcool, os tubos permaneceram abertos por 2-3 min para secagem. Então foram acrescentados 20 μl de água DEPC (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), todo o conteúdo homogeneizado, e os tubos foram armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A quantidade de RNA obtida foi verificada através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). Para a calibragem do aparelho, foi inserido 0,5 μl de água DEPC, em seguida 0,5 μl das amostras de RNA para a quantificação. Buscou-se nesta fase, RNA suficiente e valores de $A_{260/280} \sim 2.0$ (pureza da amostra).

As amostras foram tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico antes da retrotranscrição.

Para isso, foi utilizado o kit DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Para cada amostra foram inseridos 1 µg do RNA, 1 µl de DNase reaction buffer e 1 µl de DNase amplification grade, e água DEPC até completar 10 µl de volume total. Após 15 min em temperatura ambiente, foi acrescentado 1 µl de EDTA 25 mM para inativar a reação. Os tubos foram levados ao termociclador (Life Pro Thermal Cycler, Bioer, Bianjing, Hangzhou, China) por 10 min a 65 °C. E os tubos foram novamente armazenados em freezer a -80 °C.

4.7.2 RT PCR (Obtenção dos cDNAs)

Para a obtenção de cDNA (DNA complementar) pela técnica do RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia polimerase) foi utilizado o kit de enzima Superscript III, First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Assim, foram adicionados: 10 µl de RT Reaction mix, 2 µl de RT Enzyme Mix, 3 µl de água DEPC e 5 µl de RNA. Os tubos foram levados ao termociclador, a 25 °C por 10 min, seguido de 50 °C por 30 min e 85 °C por 5 min (Figura 13C). Em seguida, foram levados ao gelo, acrescentado 1 µl de *E. coli* RNase H a cada tubo e incubado a 37 °C por 20 min. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer a -20 °C.

4.7.3 Amplificação por PCR

Os cDNAs foram amplificados pela técnica de PCR através de iniciadores específicos para os diferentes genes estudados. Os iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Gene

Tool 1.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá). As reações foram realizadas com 1 µl de cDNA, iniciadores senso e anti-senso, buffer e água destilada/autoclavada (H₂O_{dd}) perfazendo um total de 25 µl por reação. A ciclagem térmica foi realizada usando um protocolo com 35-40 ciclos, com temperaturas e tempos apropriados para denaturação, anelamento e extensão. Para cada reação de PCR, foi utilizado 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 corados com SYBR safe DNA gel stain e analisados em gel de agarose 2% (Figura 14) sob luz ultravioleta em transiluminador (E-gel Imager, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Quadro 2 – Sequência dos primers utilizados no ensaio de PCR

Gene	Senso	Antisenso	bp	GenBank Reference
DSPP	5'-cacaagggagaagggaatgg-3'	5'-tgccattgctgtgatgttt-3'	181	NM_014208
DMP-1	5'-caggagcacaggaaaaggag-3'	5'-ctgggtgatcttgggcact-3'	213	NM_004407
GAPDH	5'-gacccttcattgacctcaact-3'	5'-caccaccttctgatgtcatc-3'	684	M33197

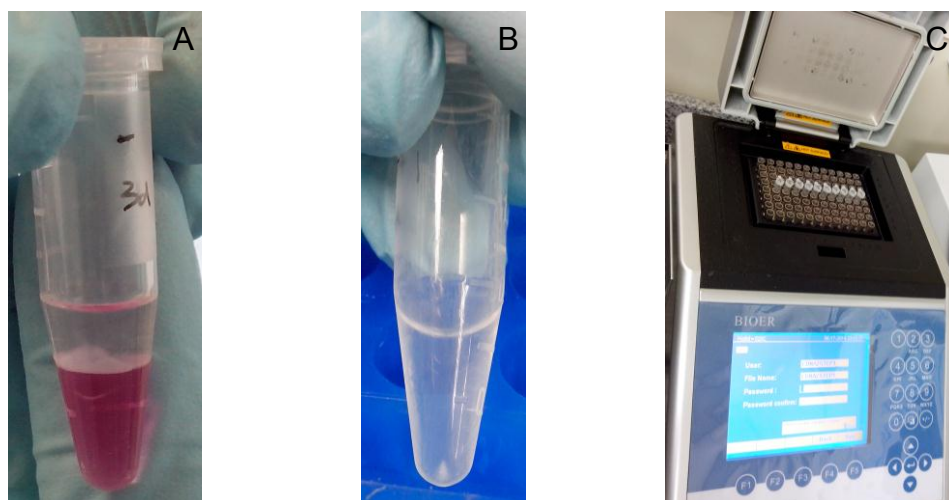


Figura 13 – Reações de PCR. A) Separação de fases após centrifugação para coleta da fase aquosa; B) Precipitado de RNA obtido após centrifugação; C) Tubos levados ao termociclador para obtenção de cDNA.



Figura 14 - Produtos do PCR corados para análise em gel de agarose 2%.

4.8 ELISA

As células foram cultivadas em placas de 24 poços e após atingirem subconfluência, foram tratadas com LTA na concentração 200 ng/ml, sem e com indutores de mineralização. O controle negativo consistiu em células sem tratamento e o positivo, células sem tratamento, mas com IM. As células foram cultivadas pelos períodos de 3, 7 e 14 dias.

Após os períodos de incubação das células, foi detectada e quantificada a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α . Primeiramente o sobrenadante das células foi coletado e armazenado em microtubos, conservados a -80 °C.

Os testes ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foram executados de acordo com o protocolo do fabricante dos kits das citocinas (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Inicialmente, as placas de 96 poços (Global Plast, São Paulo, SP, Brasil) foram sensibilizadas. Em recipiente acrescentou-se 55,56 μ l do anticorpo de captura e PBS, totalizando 10 ml, e em cada poço foi acrescentado 100 μ l. A placa foi deixada na bancada até o dia seguinte.

No segundo dia, foi feita lavagem dos poços com 300 μ l de solução tampão (980 ml água destilada + 20 ml Wash Buffer), 3 vezes seguidas. Após remoção do excesso da solução, foram acrescentados 300 μ l da solução de bloqueio (100 ml PBS + 1g BSA) em cada poço, e aguardou-se 1 h. Em seguida, foi realizada nova lavagem dos poços com 300 μ l de solução tampão, 3 vezes seguidas. E 100 μ l das amostras foram acrescentados em cada poço, em duplicata para cada grupo (Figura 15A). A curva padrão foi realizada nas duas primeiras colunas da placa.

Após um período de 2 h, foi realizada nova lavagem dos poços com 300 μ l de solução tampão, 3 vezes seguidas. Em recipiente acrescentou-se 55,56 μ l do anticorpo de detecção e PBS, totalizando 10

ml, e 100 μ l foi acrescentado em cada poço. Após 2 h, foi realizada nova lavagem dos poços com 300 μ l de solução tampão, 3 vezes. Em seguida, 100 μ l de streptavidina foram acrescentados a cada poço e a placa encoberta com papel alumínio para não ser exposta à luz, e aguardou-se um período de 20 min. Nova lavagem dos poços foi realizada com 300 μ l de solução tampão, 3 vezes seguidas. Foram acrescentados 100 μ l da solução A + B, e a placa novamente protegida com papel alumínio por 20 min. Foram acrescentados 50 μ l de *stop* (ácido sulfúrico 2N) em cada poço (Figura 15B). Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

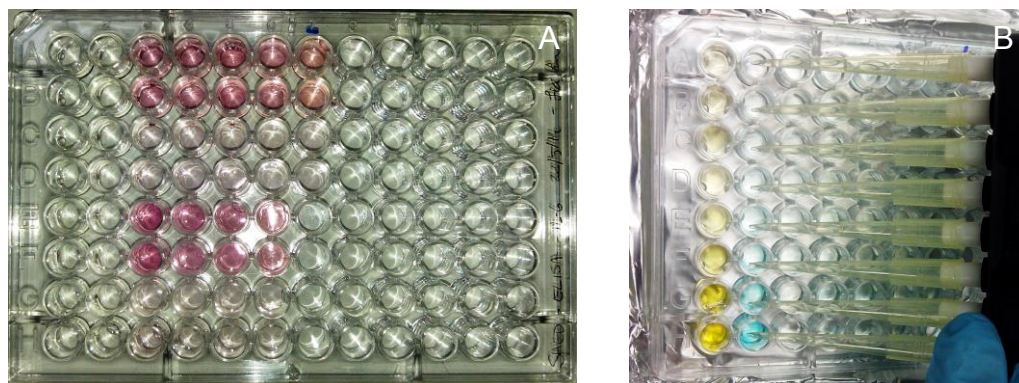


Figura 15 – ELISA. A) Amostras em duplicata na placa para ELISA, e curva padrão nas duas primeiras fileiras da placa; B) Adição do *stop* para parar a reação, com mudança de cor, e realizar a leitura em espectrofotômetro.

4.9 Análise Estatística

Os dados obtidos nos testes XTT, SRB, atividade da fosfatase alcalina e ELISA foram submetidos à análise estatística por ANOVA – Análise de Variância (2 fatores) complementada pelo teste de Tukey a nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

5.1 Ensaio XTT

Os dados obtidos no ensaio XTT foram normalizados, suas médias e desvio padrão (dp) estão representados na Tabela 1. Foi observado um aumento no metabolismo celular com o tempo, como pode ser observado na Figura 16. No período de 24 h, o grupo do LTA 1 ng/ml apresentou metabolismo estatisticamente maior que os demais grupos, incluindo o grupo controle.

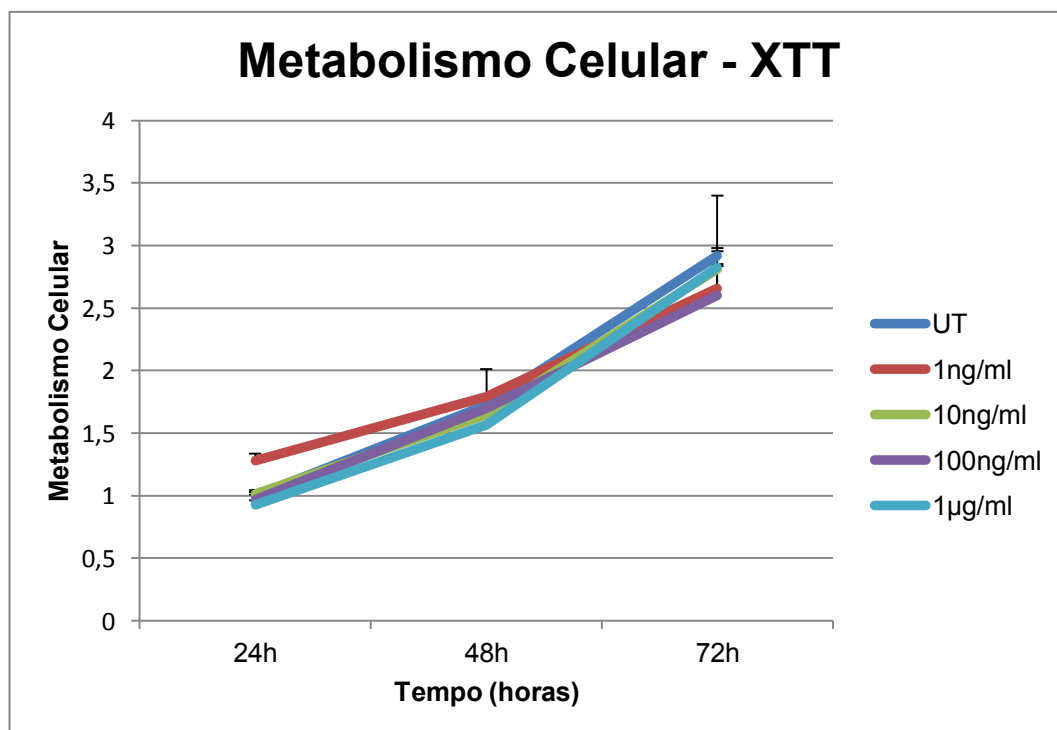


Figura 16 – Curva do metabolismo celular das células SHED nos diferentes períodos experimentais.

Tabela 1 - Média (\pm desvio padrão) dos dados normalizados obtidos no ensaio XTT

Tempo	Concentração (ng/ml)					linha (média \pm dp)
	Controle	1	10	100	1000	
24 h	1 \pm 0,03	1,28 \pm 0,05	1,02 \pm 0,03	0,97 \pm 0,04	0,93 \pm 0,04	1,04 \pm 0,14
48 h	1,73 \pm 0,06	1,79 \pm 0,22	1,65 \pm 0,05	1,70 \pm 0,07	1,56 \pm 0,10	1,69 \pm 0,09
72 h	2,92 \pm 0,48	2,66 \pm 0,20	2,81 \pm 0,14	2,60 \pm 0,23	2,83 \pm 0,15	2,76 \pm 0,13

5.2 Ensaio SRB

Os dados obtidos no ensaio SRB foram normalizados, suas médias e desvio padrão estão representados na Tabela 2. Foi observado um aumento na proliferação celular com o tempo, como ilustrado na Figura 17. Esse crescimento também pode ser visualizado pelas imagens obtidas no microscópio invertido de fase, após aplicação do corante SRB, como observado nas Figuras 18, 19 e 20.

Em todos os períodos do experimento, não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados.

Tabela 2 - Média (\pm desvio padrão) dos dados normalizados obtidos no ensaio SRB

Tempo	Concentração (ng/ml)					linha (média \pm dp)
	Controle	1	10	100	1000	
24 h	1 \pm 0,28	0,81 \pm 0,16	0,80 \pm 0,12	0,71 \pm 0,12	0,62 \pm 0,08	0,79 \pm 0,14
48 h	1,21 \pm 0,14	1,49 \pm 0,22	1,57 \pm 0,03	1,46 \pm 0,19	1,34 \pm 0,06	1,41 \pm 0,14
72 h	2,55 \pm 0,22	2,54 \pm 0,33	2,49 \pm 0,16	2,32 \pm 0,17	2,29 \pm 0,37	2,46 \pm 0,10

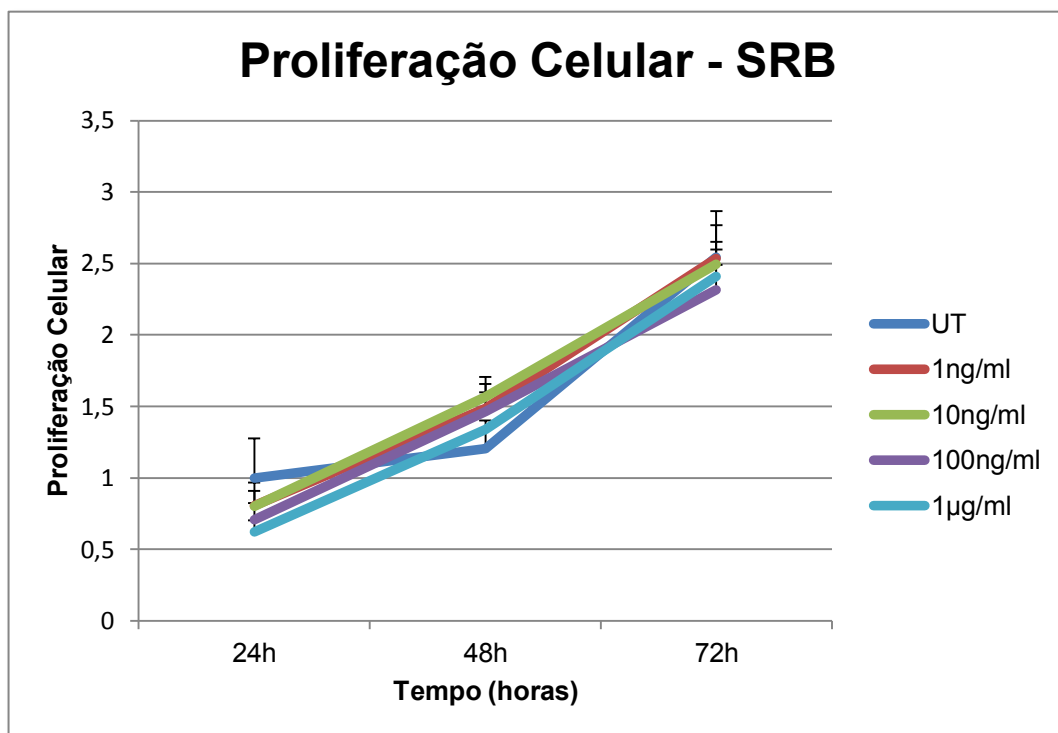


Figura 17 – Curva da proliferação celular das células SHED nos diferentes períodos experimentais.

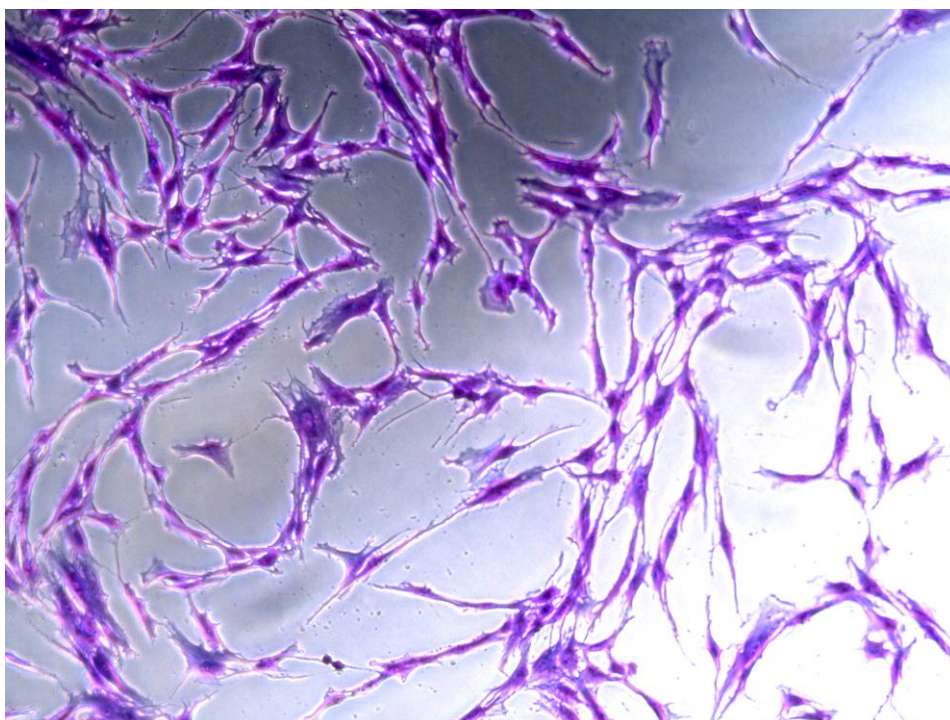


Figura 18 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do grupo controle coradas com SRB, do período de 24 h.

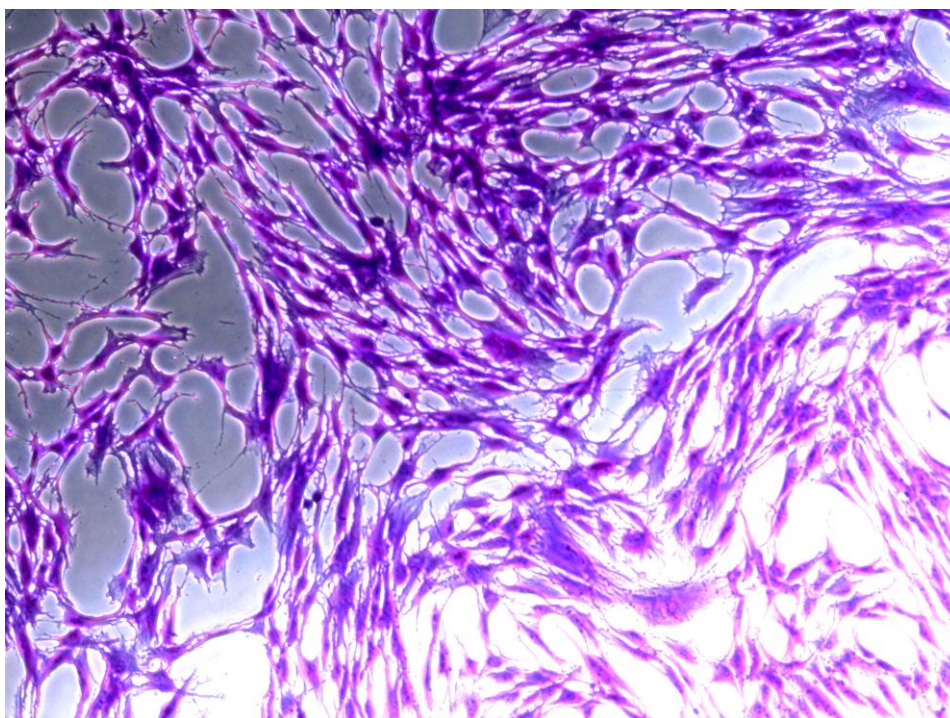


Figura 19 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do grupo controle coradas com SRB, do período de 48 h.

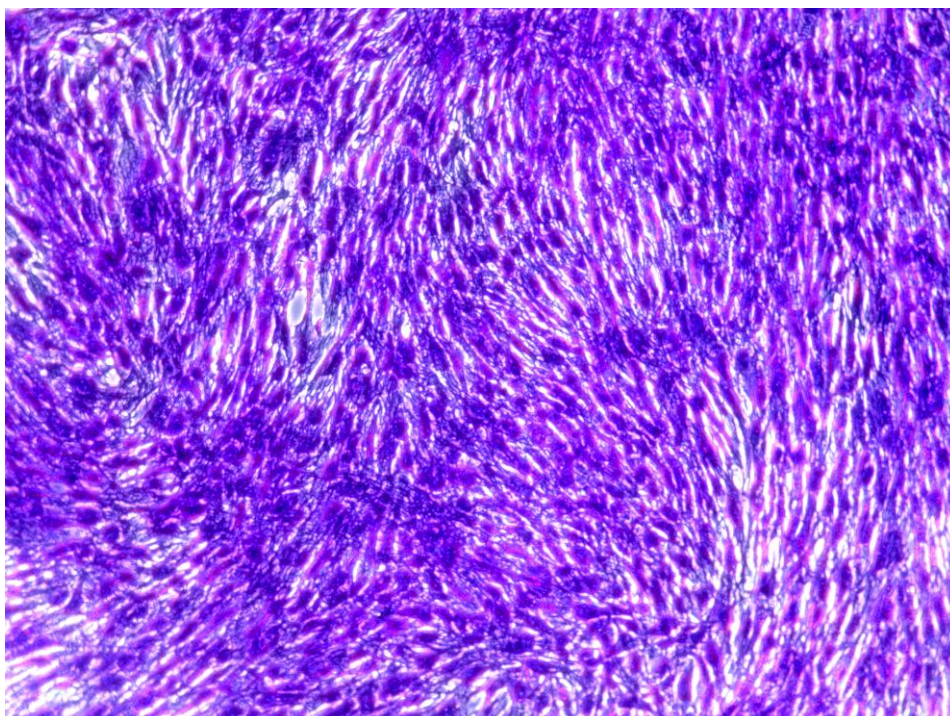


Figura 20 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do grupo controle coradas com SRB, do período de 72 h.

5.3 Atividade da fosfatase alcalina

Os resultados dos ensaios de proliferação celular não apresentaram diferenças significantes entre as diferentes concentrações de LTA. Assim, para o teste da atividade da fosfatase alcalina, foram utilizadas maiores concentrações de LTA.

Os dados obtidos no teste da atividade da fosfatase alcalina foram normalizados segundo uma curva padrão, representada na Figura 21. As médias e desvio padrão estão representados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 22.

Nos grupos sem indução da mineralização, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e os grupos LTA 20, LTA 200, LTA 2000 e LTA 20000, havendo aumento da atividade da fosfatase alcalina para estes.

Uma comparação feita entre os grupos sem e os com indução da mineralização, mostra que os primeiros apresentaram maior atividade da fosfatase alcalina. Já entre os grupos com indutores da mineralização, não houve diferença estatística significativa entre o controle positivo e os grupos expostos ao LTA.

Tabela 3 - Média (\pm desvio padrão) dos dados normalizados obtidos no teste da atividade da fosfatase alcalina

Meios	Concentração (ng/ml)				
	Controles	20	200	2000	20000
α -MEM	2,37 \pm 0,29	4,39 \pm 0,84	5,18 \pm 0,80	3,96 \pm 0,27	4,59 \pm 0,52
IM	2,01 \pm 0,98	1,39 \pm 0,54	2,22 \pm 0,65	1,85 \pm 0,69	1,81 \pm 1,25

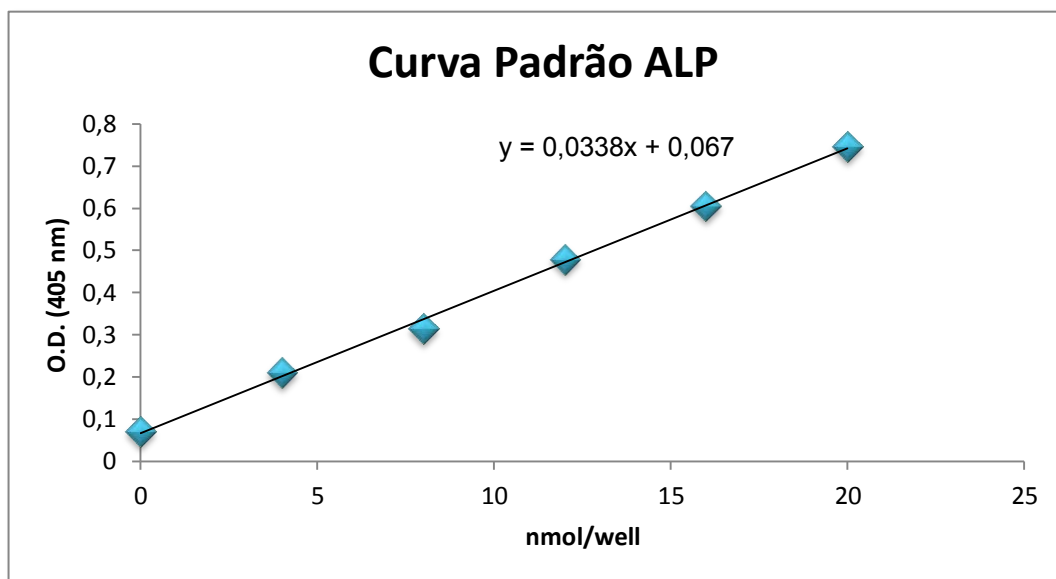


Figura 21 – Curva Padrão da atividade da fosfatase alcalina.

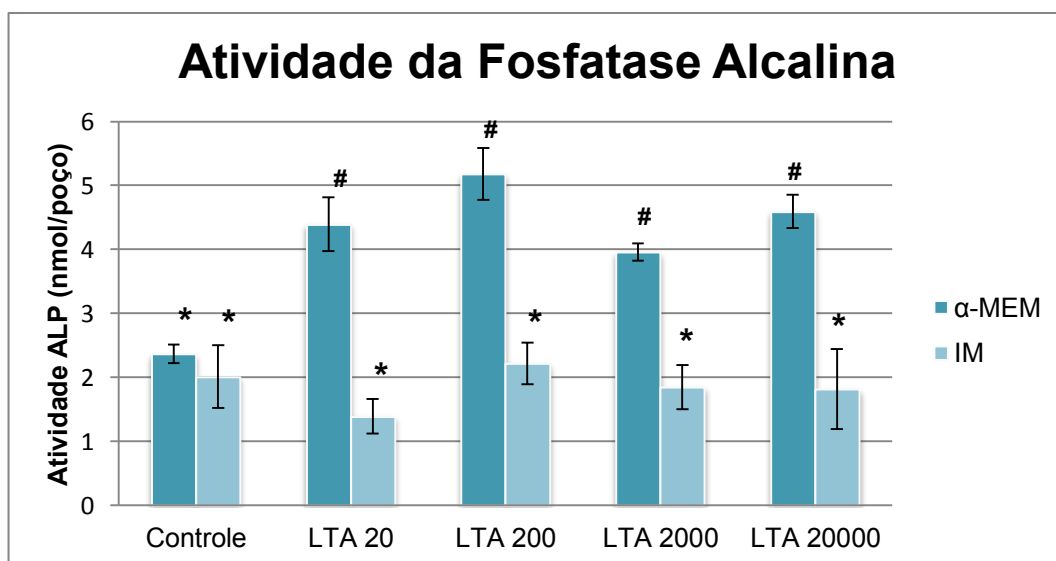


Figura 22 – Comparação da atividade da fosfatase alcalina dos grupos controle negativo (sem tratamento das células) e positivo (sem tratamento das células e com indutores da mineralização), e dos grupos experimentais (com exposição ao LTA bacteriano em diferentes concentrações) sem (α -MEM) e com indutores da mineralização (IM). Símbolos semelhantes indicam não haver diferenças estatísticas entre os grupos (*, #).

5.4 Análise da deposição de cálcio (Ensaio de Alizarin Vermelho)

As imagens obtidas das células de cada grupo e cada tempo experimental estão ilustradas nas Figuras 23 a 28. Os grupos com indutores de mineralização apresentaram mais deposição de cálcio, comparados aos grupos sem IM.

Após 3 dias de cultivo celular, os grupos tratados com LTA bacteriano apresentaram mais zonas de calcificação em relação aos grupos controle. E nos períodos de 7 e 14 dias, os grupos controle e grupos expostos ao LTA foram semelhantes, principalmente os controles positivos e os grupos LTA 200 + IM de cada período, ou os grupos tratados com LTA apresentaram menos deposição de cálcio em relação ao controle de mesmo meio, principalmente os controles negativos e os grupos LTA 200 de cada período.

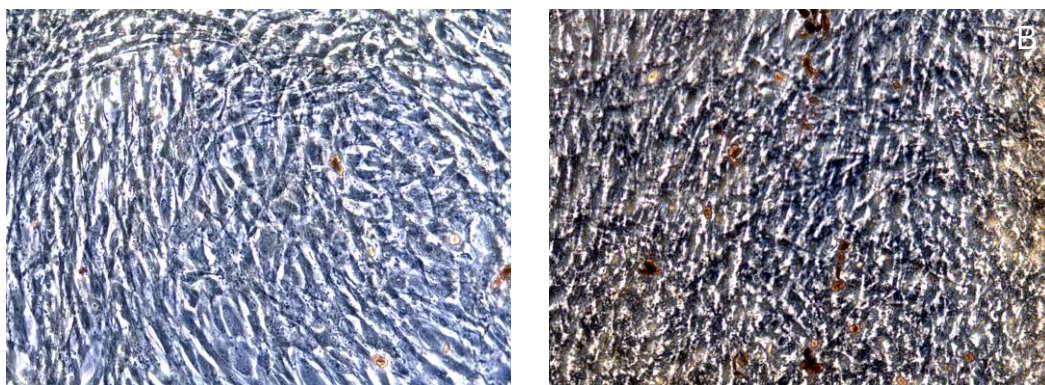


Figura 23 – Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 3 dias, coradas com alizarin vermelho. A) Controle negativo; B) controle positivo.

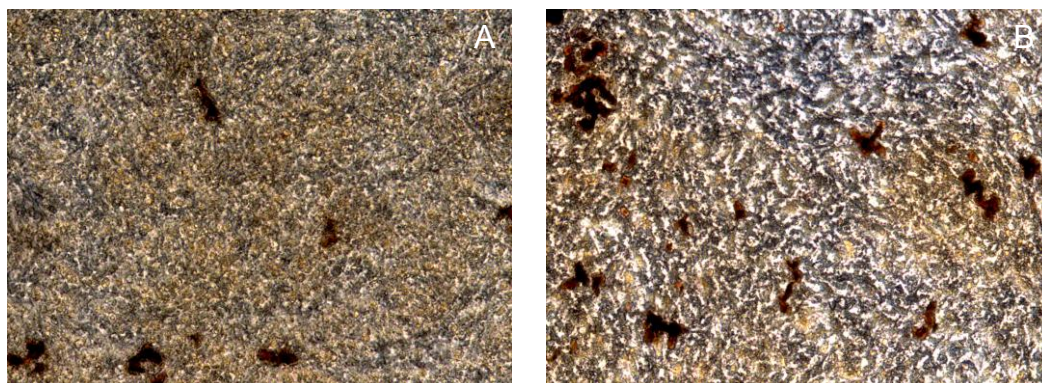


Figura 24 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 3 dias, coradas com alizarin vermelho. A) LTA 200 ng/ml; B) LTA 200 ng/ml + IM.

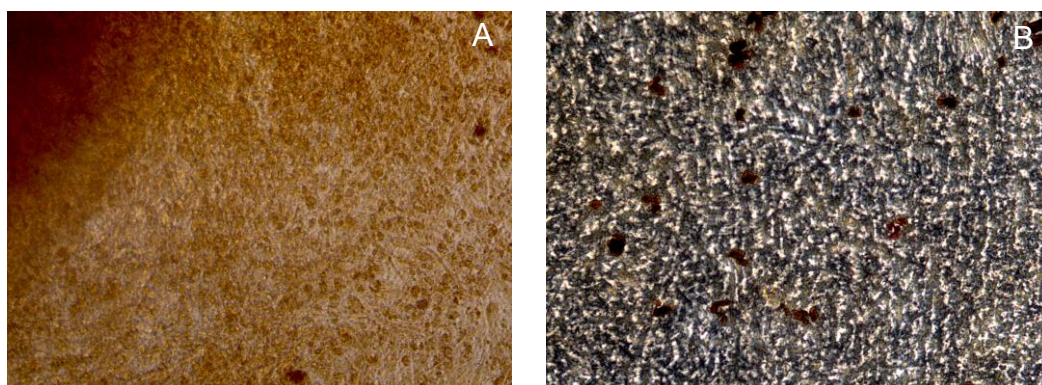


Figura 25 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 7 dias, coradas com alizarin vermelho. A) Controle negativo; B) controle positivo.

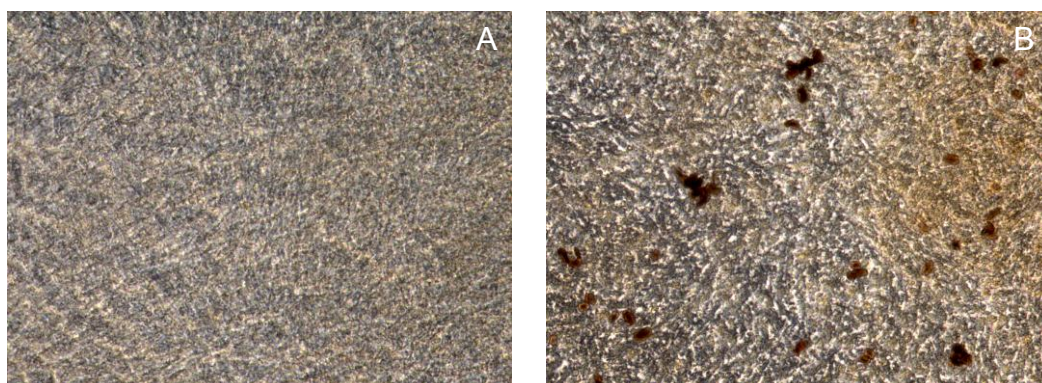


Figura 26 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 7 dias, coradas com alizarin vermelho. A) LTA 200 ng/ml; B) LTA 200 ng/ml + IM.

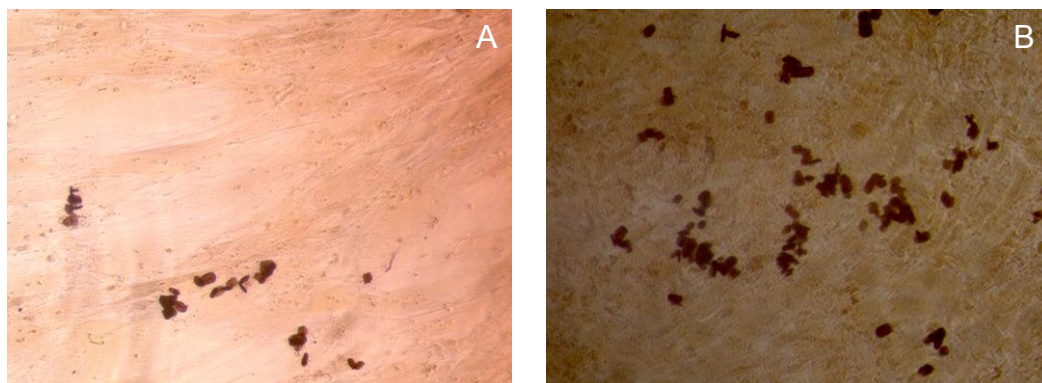


Figura 27 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 14 dias, coradas com alizarin vermelho. A) Controle negativo; B) controle positivo.

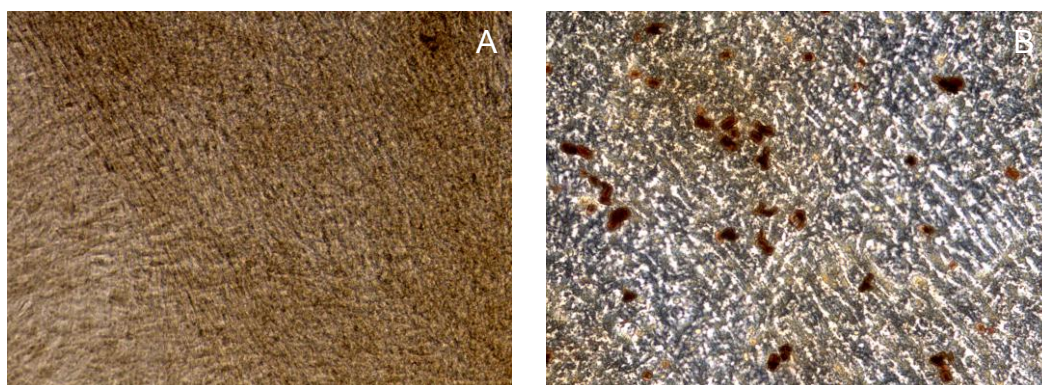


Figura 28 - Microscopia de fase (20x). Células SHED do período de 14 dias, coradas com alizarin vermelho. A) LTA 200 ng/ml; B) LTA 200 ng/ml + IM.

5.5 Reações de PCR

Os resultados das reações de PCR para os genes GAPDH, DSPP e DMP-1 estão representados na Figura 29. Todos os grupos testados expressaram o gene constitutivo GAPDH. Os grupos também apresentaram expressão dos genes DSPP e DMP-1, sendo um pouco maior a expressão de DMP-1 pelas células SHED. Também houve maior expressão dos genes nos grupos com indutores da mineralização.

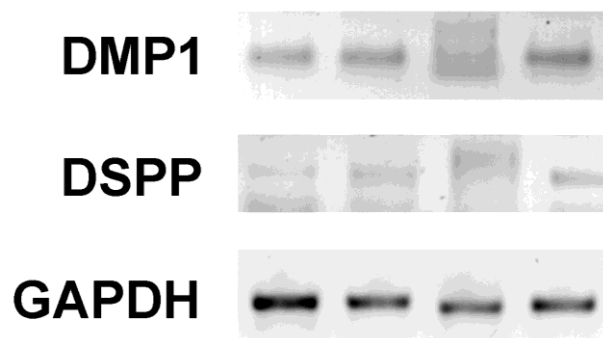


Figura 29 - PCR dos grupos do período de 14 dias: controle negativo (células sem tratamento), positivo (células tratadas com indutores da mineralização), LTA 200 e LTA 200 + IM, respectivamente, para os genes GAPDH, DSPP, DMP-1.

5.6 ELISA

A partir da curva padrão obtida para cada citocina, os dados foram normalizados e suas médias e desvio padrão podem ser observados na Tabela 4.

A curva padrão da IL-1 β pode ser observada na Figura 30. A expressão desta interleucina pelos diferentes grupos nos diferentes períodos experimentais é visualizada na Figura 31. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os controles e os grupos do LTA, sem e com indutores da mineralização. Os períodos também mostraram quantidades semelhantes de IL-1 β .

A Figura 32 mostra a curva padrão da IL-6, e a Figura 33 o gráfico da expressão desta pelos grupos nos três períodos experimentais. A concentração de IL-6 foi expressiva, havendo diferenças entre grupos e períodos.

Após 3 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem e com indução da mineralização. Assim, a expressão de IL-6 foi maior nos grupos controle negativo e LTA 200, sem diferença entre eles, e menor no controle positivo e LTA 200 + IM, sem diferença entre eles. Já no período de 7 dias, o grupo de células expostas ao LTA

sem indutores da mineralização, apresentou maior liberação de IL-6 comparado aos demais grupos. E em 14 dias, seguiu-se o padrão de diferenças do primeiro período, os grupos sem indução da mineralização apresentaram maior expressão da IL-6.

Na comparação entre os períodos testados, a expressão de IL-6 pelos grupos com indutores da mineralização foi similar, enquanto pelos grupos sem indutores diferiu. A maior liberação desta citocina pelo grupo controle negativo foi no período de 3 dias, seguido de uma redução nos outros períodos. O grupo LTA 200 também teve maiores resultados no período de 3 dias, já após 7 e 14 dias, não houve diferenças.

Para TNF- α , a curva padrão pode ser visualizada na Figura 34 e o gráfico de sua expressão pelos grupos na Figura 35. Assim como para IL-1 β , não houve diferença estatística entre os controles e os grupos do LTA, sem e com IM, e entre os períodos.

Tabela 4 - Média (\pm desvio padrão) dos dados normalizados obtidos no teste ELISA para as citocinas a) IL-1 β ; b) IL-6; c) TNF- α

a) IL-1 β

Tempo	Grupos			
	Controle -	Controle +	LTA 200	LTA 200 + IM
3 dias	0,73 \pm 0,01	0,72 \pm 0,12	0,89 \pm 0,08	0,85 \pm 0,05
7 dias	0,90 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,72 \pm 0,08	0,82 \pm 0,05
14 dias	0,77 \pm 0,01	0,72 \pm 0,10	0,86 \pm 0,09	0,81 \pm 0,01

b) IL-6

Tempo	Grupos			
	Controle -	Controle +	LTA 200	LTA 200 + IM
3 dias	3,11 \pm 0,17	1,12 \pm 0,01	3,39 \pm 0,33	1,10 \pm 0,01
7 dias	1,26 \pm 0,04	1,09 \pm 0	2,34 \pm 0,11	1,09 \pm 0,01
14 dias	2,42 \pm 0,06	1,14 \pm 0,02	2,18 \pm 0,16	1,09 \pm 0,01

c) TNF- α

Tempo	Grupos			
	Controle -	Controle +	LTA 200	LTA 200 + IM
3 dias	1,22 \pm 0,10	1,32 \pm 0,09	1,20 \pm 0,03	1,02 \pm 0,12
7 dias	1,35 \pm 0,19	1,59 \pm 0,46	1,01 \pm 0,03	1,30 \pm 0,06
14 dias	1,02 \pm 0	1,18 \pm 0,08	0,93 \pm 0,19	1,11 \pm 0,38

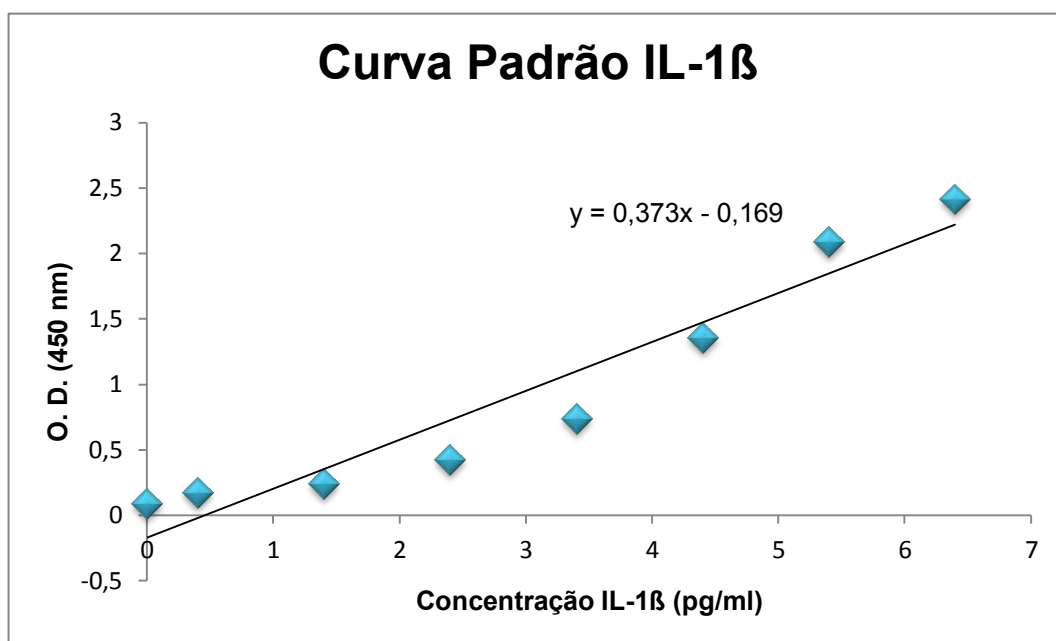


Figura 30 – Curva Padrão da IL-1 β .

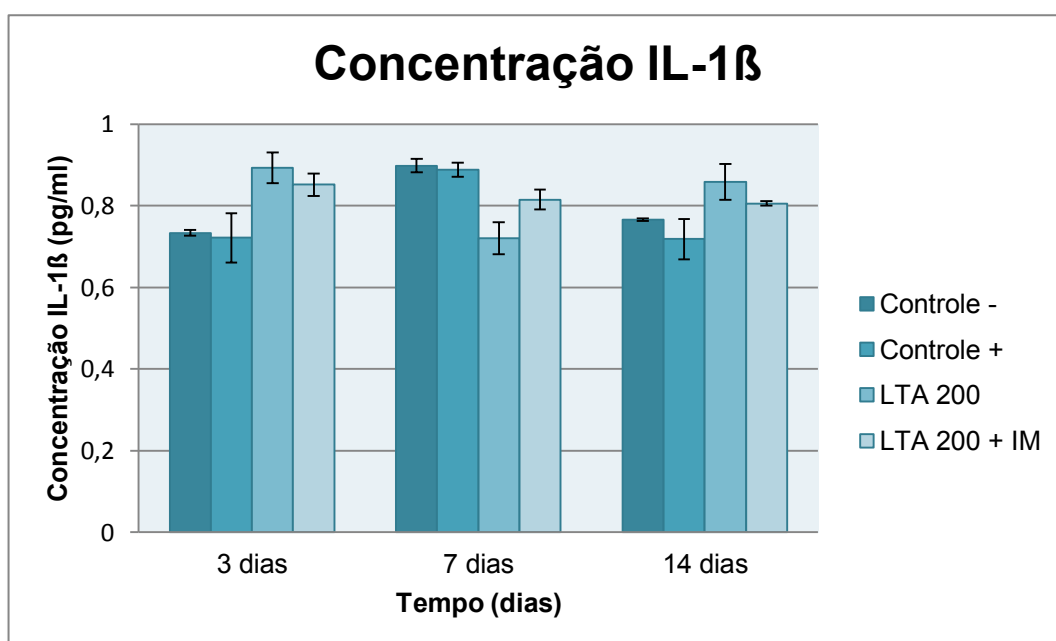


Figura 31 – Comparação da expressão de IL-1 β pelos grupos experimentais nos diferentes períodos.

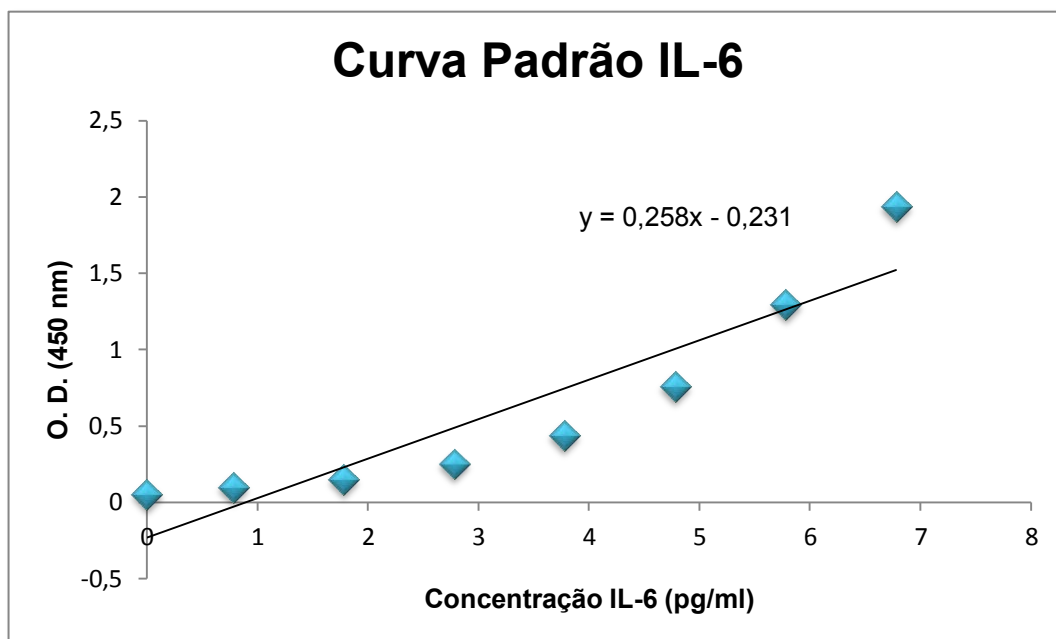


Figura 32 – Curva Padrão da IL-6.

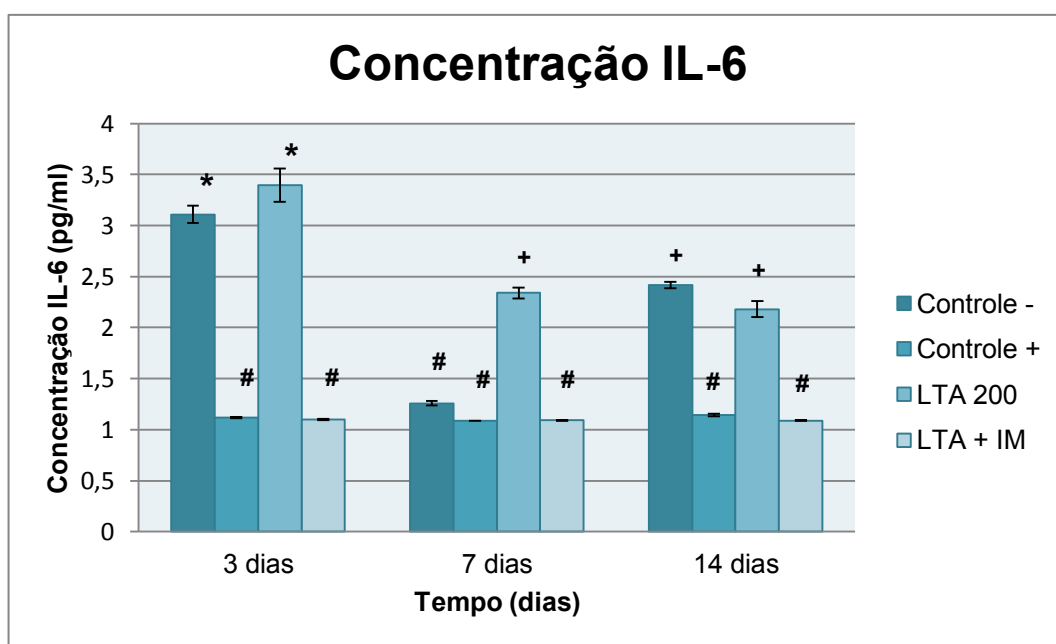


Figura 33 – Comparação da expressão de IL-6 pelos grupos experimentais nos diferentes períodos. Símbolos semelhantes indicam não haver diferenças estatísticas entre os grupos (*, #, +).

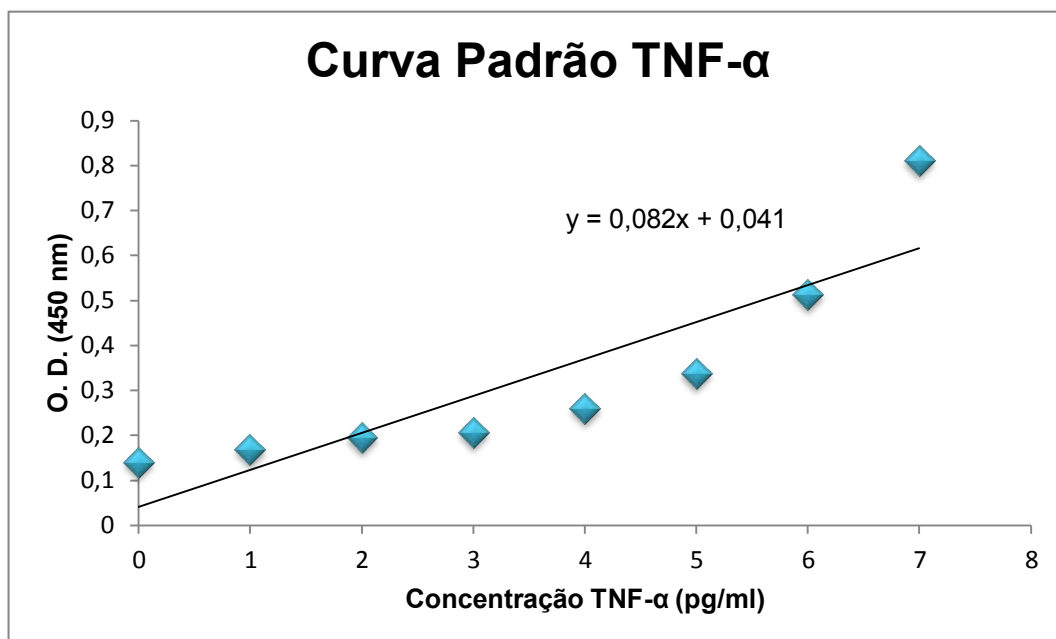


Figura 34 – Curva Padrão de TNF- α .

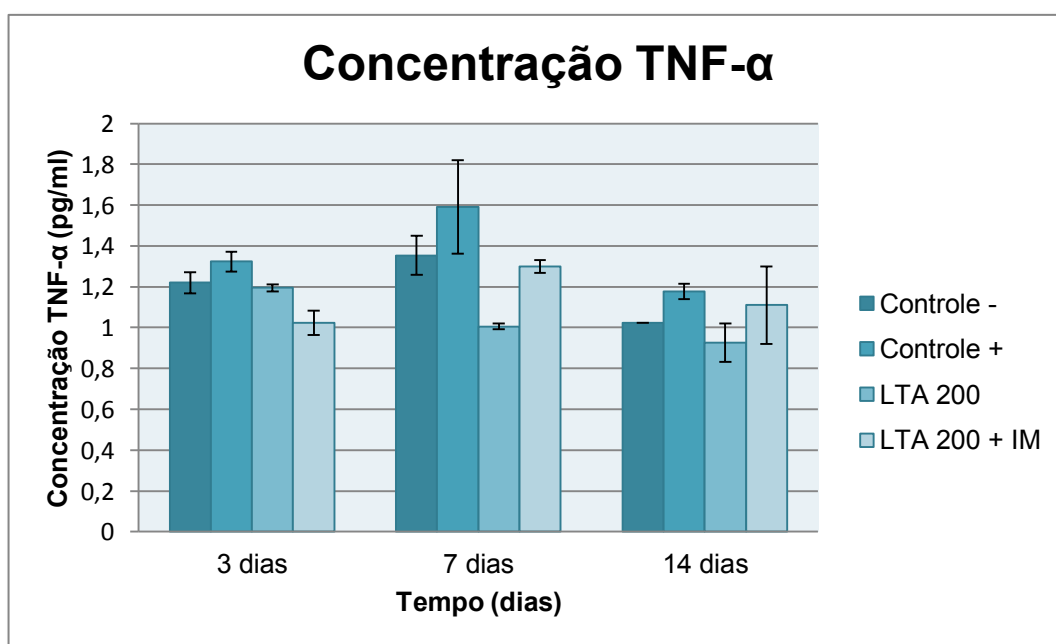


Figura 35 – Comparação da expressão de TNF- α pelos grupos experimentais nos diferentes períodos.

6 DISCUSSÃO

O ácido lipoteicóico é um fator de virulência de bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis* (Tian et al., 2013). Essa bactéria está presente em infecções endodônticas, invadindo túbulos dentinários de forma que pode não sofrer ação do preparo biomecânico do canal e da medicação utilizada (Sedgley et al., 2005). Assim, apresenta resistência a materiais usados no tratamento endodôntico, estando associada a casos de infecções persistentes e insucessos (Kayaoglu, Ørstavik, 2004).

LTA de *E. faecalis* estimula a liberação de diversos mediadores inflamatórios (Kayaoglu, Ørstavik, 2004), e está envolvido na formação de biofilme e na adesão à estrutura dentária (Tian et al., 2013). Porém pouco se sabe sobre o efeito deste componente bacteriano sobre uma terapia regenerativa da polpa. Para aplicação clínica de células-tronco da polpa dentária, é importante saber os efeitos do LTA na proliferação, expressão gênica, função e liberação de mediadores inflamatórios.

O crescimento das células SHED foi avaliado pelos testes XTT e SRB. O metabolismo celular foi mensurado pelo XTT, baseado na atividade mitocondrial de células metabolicamente ativas. E a proliferação celular também foi analisada pelo teste SRB, determinando os níveis de proteínas correlacionadas ao número de células.

As células tratadas com diferentes concentrações de LTA bacteriano não apresentaram diferenças no crescimento celular pelos testes usados. Somente a concentração de 1 ng/ml teve um pequeno aumento no metabolismo das células no período inicial.

Essa semelhança nos crescimentos celulares após exposição a diferentes concentrações de LTA também foi observada em células-tronco mesenquimais (MSCs) utilizando o teste XTT (Mo et al., 2008). Em células da medula precursoras de osteoclasto (BMM) expostas a LTA também não houve alteração na viabilidade celular (Yang J et al., 2009). Tian et al. (2013) observaram não haver diferenças na proliferação de osteoblastos MG63 quando expostos a baixas concentrações de LTA, porém doses elevadas deste (entre 20 e 100 µg/ml) causaram inibição do crescimento. O LTA bacteriano em altas doses (0,01 a 1 mg/ml) também inibiu a proliferação de células da polpa dentária humana (Wang PL et al., 2001). Porém, essas altas doses de componentes bacterianos não foram usadas nesse estudo.

O potencial de diferenciação das células SHED associado ao processo de mineralização foi avaliado pela expressão dos genes DSPP e DMP-1, e analisado funcionalmente pelo ensaio enzimático da atividade da fosfatase alcalina e pela deposição de cálcio no ensaio de alizarin vermelho.

A atividade da fosfatase alcalina é importante na formação de tecidos mineralizados (Spoto et al., 2001). As células SHED demonstram atividade desta enzima (Lee et al., 2011). E no presente estudo, essas células apresentaram atividade da fosfatase alcalina em todas as condições experimentais, sem e com indução da mineralização, e após exposição ao LTA bacteriano.

O período de tratamento das células escolhido foi de 3 dias, pois observa-se laboratorialmente que a atividade da fosfatase alcalina apresenta picos. Assim, o período não seria um fator determinante no estudo, já que poderia levar a uma falsa conclusão. Isso também pode explicar a diferença entre os grupos com e sem indutores da mineralização. Pois os grupos com indução podem ter apresentado o momento de menor atividade da enzima no experimento.

Nos grupos sem tratamento de indutores da mineralização, houve um aumento da atividade da fosfatase alcalina em células expostas ao LTA. Mo et al. (2008) avaliaram o efeito do LTA e LPS bacterianos em células-tronco mesenquimais, e somente as maiores doses de LPS usadas aumentaram a atividade enzimática, LTA não teve efeito significativo. O LPS também aumentou a atividade da fosfatase alcalina em células do folículo dental (DFCs) como demonstrado por Morsczech et al. (2012). Porém essas diferenças entre os estudos são justificadas pelos diferentes tipos de células e componentes bacterianos usados.

Houve deposição de cálcio pelas células SHED. Este resultado está em concordância com os estudos de Miura et al. (2003) e de Wang X et al. (2012), nos quais SHED foram tratadas com meio indutor da mineralização durante 4 semanas e 14 dias, respectivamente, apresentando calcificações coradas por alizarin vermelho.

A deposição de cálcio por células-tronco mesenquimais (MSCs) após indução da mineralização ou exposição a componentes celulares bacterianos por períodos de 3, 10 e 14 dias, mostrou que o LTA não teve efeito significativo em curto e longo prazo (Mo et al., 2008). Morsczech et al. (2012) utilizaram o ensaio de alizarin vermelho para células do folículo dental (DFCs), e após exposição a LPS houve inibição da mineralização.

O resultado apresentado pelo ensaio de alizarin vermelho mostrou mais deposição de cálcio nos grupos tratados com IM, comprovando o efeito de mineralização deste meio. Em curto prazo, as células expostas a LTA tiveram mais zonas de calcificação, o que concorda com os resultados da atividade da fosfatase alcalina. E em longo prazo, pelos períodos de 7 e 14 dias, as células tratadas com LTA foram semelhantes ou tiveram menos minerais, quando comparadas às células não tratadas. Assim, o LTA bacteriano na concentração utilizada, estimulou inicialmente a mineralização, porém esse efeito mineralizante

não foi sustentado com o tempo. Uma comparação com outros estudos torna-se difícil já que são usados diferentes tipos celulares e metodologias.

Houve expressão do gene constitutivo GAPDH, comprovando a eficácia das reações de PCR. E também houve expressão dos marcadores da diferenciação odontogênica DSPP e DMP-1. Em outros estudos, as células SHED foram imunoreativas ao DSPP (Miura et al., 2003), e quando cultivadas em *scaffolds* expressaram os genes DSPP e DMP-1 (Casagrande et al., 2010; Sakai et al., 2010).

Nesse teste, as células também mostraram maior expressão da mineralização quando tratadas com IM. Mas a exposição ao LTA bacteriano não interferiu na expressão gênica dos marcadores testados pelas SHED. A expressão de marcadores odontoblásticos pelas SHED sem tratamento com LTA ou com IM, indica que as células podem ter iniciado o processo de diferenciação.

Componentes celulares bacterianos podem alterar a produção e liberação de citocinas. Assim, foi avaliado o efeito do LTA em células SHED na liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , pelo teste ELISA.

A IL-1 β é responsável por diversas ações, a fim de mediar a resposta inflamatória (Lu et al., 2002). Pode ser produzida e liberada por diferentes tipos celulares, e é ativa em tecidos pulpare (Hosoya, Matsushima, 1997). Seu papel em baixas concentrações é mediar a inflamação local, já em altas concentrações tem efeito endócrino (Silva et al., 2009).

As células SHED foram semelhantes na liberação de IL-1 β em todos os grupos testados, sem e com exposição a LTA, e durante todos os períodos experimentais. Assim, o LTA não influenciou a expressão desta citocina. E as baixas concentrações apresentadas podem ter papel importante em uma inflamação local.

Em diferentes estudos, células da polpa expostas ao LPS bacteriano tiveram maior produção de IL-1 β (Hosoya, Matsushima, 1997;

Hosoya et al., 1996; Lu et al., 2002). Esse resultado também foi observado em fibroblastos da polpa (Ferreira et al., 2009; Silva et al., 2009), e em células do folículo dental (Morsczeck et al., 2012).

A IL-6 é uma citocina multi-funcional (Hosoya et al., 1996), importante na resposta imunológica (Pääkkönen et al., 2007). Sua produção pelas SHED foi mais expressiva, havendo diferenças entre os grupos experimentais. O tratamento com indutores da mineralização reduziu a liberação desta citocina.

Células da polpa expostas ao LPS bacteriano tiveram maior produção de IL-6 (Hosoya et al., 1996). Isso também foi observado em células do folículo dental (DFCs) por Morsczeck et al. (2012). Porém os estudos não mostram esses resultados para o LTA.

TNF- α é essencial na patogênese de inflamações pulpares (Chang et al., 2006). A liberação pelas células neste estudo não apresentou diferenças entre os grupos. De forma que o LTA também não influenciou a expressão de TNF- α pelas SHED.

Dessa forma, ainda são necessários mais estudos para entender a resposta das células-tronco da polpa de dentes decíduos a estímulos, como a infecção bacteriana e seus produtos tóxicos. Essas células apresentam diversas vantagens que as tornam candidatas potenciais ao uso na terapia regenerativa. Assim, devem ser extensivamente estudadas para o uso clínico com sucesso.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia e análise empregadas neste estudo, conclui-se que as células SHED quando expostas ao LTA bacteriano não sofreram interferências na proliferação e metabolismo celular, na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , e na diferenciação odontoblástica. Porém, em curto prazo, o LTA estimulou funcionalmente as células, havendo maior deposição de cálcio e atividade da fosfatase alcalina.

As células SHED tratadas com indutores da mineralização apresentaram maior diferenciação, tanto funcionalmente pela deposição de cálcio como pela expressão gênica de marcadores odontoblásticos.

8 REFERÊNCIAS*

Aulock SV, Deininger S, Draing C, Gueinzus K, Dehus O, Hermann C. Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Dec;26(12):887-92.

Brar GS, Toor RS. Dental stem cells: Dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian J Dent Res.* 2012 May-Jun;23(3):393-7.

Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res.* 2010 Jun;89(6):603-8.

Cavalcanti BN, Rode SM, 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 MC, Chen YJ, Tai TF, Tai MR, Li MY, Tsai YL, et al. Cytokine-induced prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression in dental pulp cells: downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor. *Int Endod J.* 2006 Oct;39(10):819-26.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008 Aug;34(8):962-9.

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011 22(1):3-13.

Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol.* 2006 Mar;176(5):2880-7.

Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. *J Dent Child (Chic).* 2009 Sep-Dec;76(3):194-8.

*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 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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 Mar;288(10):7204-14.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007 Mar;33(3):213-9.

He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2013 Feb;46(2):128-36.

Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol*. 1997 Jan;47(1):62-6.

Hosoya S, Matsushima K, Ohbayashi E, Yamazaki M, Shibata Y, Abiko Y. Stimulation of interleukin-1 β -independent interleukin-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Med*. 1996 Dec;59(2):138-43.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 β production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod*. 1997 Jan;23(1):39-42.

Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*. 2013 Mar;56(3):227-38.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Sep;15(5):308-20.

Lee S, An S, Kang TH, Kim KH, Chang NH, Kang S, et al. Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med*. 2011 Nov;6(6):689-99.

Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 β on human pulpal fibroblasts proliferation and collagen synthesis. *J Endod*. 1998 Jun;24(6):409-13.

Li X, Yang G, Fan M. Effects of homeobox gene *distal-less 3* on proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1504-10.

Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, Guo XM, Zhao SL, Wang HG, et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2002 Oct;35(10):807-11.

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 May;100(10):5807-12.

Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol*. 2008 Sep;9(52):1-12.

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.

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 Nov;35(11):1536-42.

Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L. Effects of TGF- β 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine*. 2007 Oct;40(1):44-51.

Park C, Lee SY, Kim HJ, Park K, Kim JS, Lee SJ. Synergy of TLR2 and H1R on Cox-2 activation in pulpal cells. *J Dent Res*. 2010 Feb;89(2):180-5.

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

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

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Feb;20(1):10-9.

Silva AC, 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 Sep-Oct;17(5):527-32.

Soden RI, Botero TM, Hanks CT, Nör JE. Angiogenic signaling triggered by cariogenic bacteria in pulp cells. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):835-40.

Spoto G, Fioroni M, Rubini C, Tripodi D, Di Stilio M, Piatelli A. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. *J Endod*. 2001 Mar;27(3):180-2.

Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M. Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch Oral Biol*. 2014 Feb;59(2):158-66.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1165-75.

Tian Y, Zhang X, Zhang K, Song Z, Wang R, Huang S, et al. Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. *J Endod*. 2013 May;39(5):632-7.

Wang PL, Shirasu S, Daito M, Ohura K. *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid-induced apoptosis in cultured dental pulp cells from human deciduous teeth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar;281(4):957-61.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1231-40.

Wicken AJ, Knox KW. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigens. *Science*. 1975 Mar;187(4182):1161-7.

Yang J, Ryu YH, Yun CH, Han SH. Impaired osteoclastogenesis by staphylococcal lipoteichoic acid through Toll-like receptor 2 with partial involvement of MyD88. *J Leukoc Biol*. 2009 Oct;86(4):823-31.

Yang X, Zhang S, Pang X, Fan M. Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. *J Cell Biochem*. 2012 Feb;113(2):669-77. Retraction in: Yang X, Zhang S, Pang X, Fan M. *J Cell Biochem*. 2012 Aug;113(8):2796.

Zhu Q, Gibson MP, Liu Q, Liu Y, Lu Y, Wang X, et al. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. *J Biol Chem*. 2012 Aug;287(36):30426-35.

ANEXO – Certificado 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: 45420

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

dominada por poucos centros no Brasil. Além disso, o potencial de pesquisas com estes tipos celulares é altamente promissor, fazendo com que a expansão e arquivamento das linhagens permita a geração de pesquisa de alto impacto no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e está adequada para realização

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi atendido a solicitação de mudança do tole

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as considerações anteriores, o projeto está aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA