



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

NOALA VICENSOTO MOREIRA MILHAN

**AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 EM CONTATO COM
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA**

2017

NOALA VICENSOTO MOREIRA MILHAN

**AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 EM CONTATO COM
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Milhan, Noala Vicensoto Moreira

Avaliação do peptídeo LL-37 em contato com células-tronco da polpa dentária / Noala Vicensoto Moreira Milhan. - São José dos Campos : [s.n.], 2017. 68 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Samira Esteves Afonso Camargo.

1. LL-37. 2. Peptídeo antimicrobiano. 3. Biocompatibilidade. 4. Células-tronco. 5. Polpa dentária. I. Camargo, Samira Esteves Afonso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mônica Ghislaine Oliveira Alves

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Cacio de Moura Netto

Universidade Paulista (UNIP)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de Campinas

São José dos Campos, 16 de Janeiro de 2017

DEDICATÓRIA

Ao meu marido

À minha mãe

Ao meu padrasto

Aos meus irmãos

Aos meus avós

... Amo vocês !!!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por ter me dado a vida, uma família maravilhosa, saúde e determinação para correr atrás dos meus objetivos...

Ao meu marido, **Anderson**, por ser o melhor marido e pai de gatos (do Nico e do Gale) de todos os tempos. O seu amor, compreensão, incentivo e ajuda são essenciais na minha vida. Obrigada por tudo Bubu!

À minha mãe, **Tânia**, por ter me ensinado o que sei de mais importante, princípios que você não aprende na escola ou na faculdade, e obviamente por todo amor e apoio incondicionais de toda uma vida. Você foi, é e com certeza sempre será a melhor mãe do mundo para mim. Muito obrigada, mãe!

Ao meu PAIdrasto, **Luis**, por ter entrado na minha vida quando eu tinha 2 anos de idade, e ter ajudado minha mãe a cuidar de mim, sempre dando o melhor de si. Por sempre ter sido um exemplo de pessoa honesta e de bom coração. E é claro, por ter me ensinado a ser corintiana. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãozinhos, **Pedro Henrique e Luis**, por existirem e terem trazido tanta alegria e agitação (literalmente) à nossa família. Obrigada ferinhas!

Aos meus Avós, **Waldermar** (*in memorian*) e **Celina**, por terem recebido a mim e a minha mãe tantos anos na casa deles e terem contribuído de forma tão relevante em minha educação. O carinho e apoio de vocês foram fundamentais para eu ter me tornado quem sou hoje, e vocês estão nas melhores lembranças da minha infância. Muito obrigada por tudo!

Aos meus tios, **Rose, Wagner, Dino e Suad**, e também aos meus primos, **Arthur, Douglas, Henrique e Heitor**, por todo carinho e incentivo. Para mim, os melhores momentos do ano são aqueles em que posso estar com todos vocês. Obrigada por tudo!

À professora Adj. **Samira Esteves Afonso Camargo**, minha orientadora, por ter me orientado no mestrado e também no doutorado. Eu aprendi bastante nesses 5 anos, agradeço por ter me apresentado ao mundo das células, pela confiança, pelo bom humor e perspectiva positiva, mesmo quando tudo estava dando errado, e por sempre ter me tratado muitíssimo bem. E é claro que depois de todo esse tempo de orientação, não tem

mais jeito, você vai continuar sendo minha orientadora, mesmo quando não estivermos trabalhando juntas. Saiba que você pode e poderá sempre contar comigo para o que precisar. Muito Obrigada!

À professora Tit. **Yasmin Rodarte Carvalho**, que me introduziu ao mundo científico na iniciação científica, e com quem muito aprendi durante todo o período de pós-graduação, principalmente no que diz respeito a minha área, que é a Patologia. Obrigada pelos ensinamentos e por ser um grande exemplo para todos nós!

À professora Dra. **Ana Lia Anbinder**, com quem pude conviver e aprender bastante, principalmente no período do meu doutorado. Agradeço por todas as dicas, pelas horas divertidas vendo lâminas (eu adoro isso!), e por ter me indicado para ir passar um período nos EUA, com o Professor Ioannis G. Koutlas. Eu admiro o seu grande comprometimento com o trabalho, e ao mesmo tempo seu perfil visionário, e acredito que você ainda vai contribuir muito para o Programa de Pós-Graduação. Muito obrigada por tudo Ana, espero que ainda possamos trabalhar bastante juntas.

Ao Professor **Ioannis G. Koutlas**, da Universidade de Minnesota, que me recebeu muito bem e pôde compartilhar um pouco do que sabe de Diagnóstico comigo, no período de um mês que fiquei lá. Foi uma experiência muito engrandecedora. Obrigada!

Ao professor Adj. **Carlos Henrique Ribeiro Camargo** e a professora Tit. **Marcia Carneiro Valera Garakis** pela solicitude de sempre. Obrigada!

Às professoras, Profa. Adj. **Luciane Dias de Oliveira**, Profa. Dra. **Luana Marotta Reis de Vasconcelos** e Profa. Dra. **Renata Falchete do Prado** pela atenção e disponibilidade em ajudar, sempre que necessário, em minha trajetória de Pós-graduação. Obrigada!

Aos professores, Profa. Dra. **Cristina Pacheco Soares**, Prof. Dr. **Cacio de Moura Netto**, Profa. Dra. **Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, e Profa. Dra. **Mônica Ghislaine Oliveira Alves** (minha primeira e mais legal dupla da rotina!) por terem aceitado o convite para a minha banca de Doutorado. Tenho certeza que as considerações de vocês contribuirão muito para a versão final do trabalho.

A todos os professores da graduação e pós-graduação que puderam em aulas, parcerias, ou até mesmo em conversas informais, contribuir de alguma forma para a minha formação.

À minha professora de inglês **Elba Ioli Souto Ottoni de Andrade**, pela ajuda e incentivo. Obrigada!

À aluna de pós-doutorado **Patricia Pimentel**, que me ajudou muito nessa reta final do Doutorado com a parte de Biologia Molecular. Obrigada pela disponibilidade e dedicação!

Ao aluno de doutorado, e colega de pós-graduação, **Felipe de Oliveira**, pela ajuda em parte dos experimentos deste trabalho. Obrigada!

Ao meu grande amigo e companheiro oficial de refeições da pós-graduação, **Victor**, por todos os momentos compartilhados, pelos conselhos, e acima de tudo pelo vínculo de amizade criado, que com certeza vai muito além da Pós-graduação. Obrigada por tudo Vic!

À minha amiga **Elis**, pelo companheirismo e cumplicidade nos bons e maus momentos vivenciados na Pós-Graduação. Obrigada por tudo!

À minha amiga **Isabel**, pela nossa parceria científica e também pela amizade. Você foi uma das pessoas mais legais que conheci na pós-graduação. Obrigada Bel!

A todos os colegas de pós-graduação, da Patologia e da Microbiologia, inclusive aos que já terminaram seus cursos, por terem compartilhado parte dessa experiência comigo. Vocês foram importantes, cada um a sua maneira, na minha trajetória. Obrigada!

Aos meus amigos de graduação, **Natássia**, **Laura**, **Juliana**, e especialmente **Alice**, **Leonardo** e **Janaína**, por terem vivido anos tão valiosos e divertidos ao meu lado. Obrigada por tudo pessoal! É sempre muito bom reencontrar vocês.

Às minhas grandes amigas **Kamyla**, **Natália** e **Mariana**, pelos mais de 12 anos de amizade. A vida fez com que cada uma fosse para um lugar diferente, mas nem o tempo e nem a distância mudou ou mudará nossa amizade. Muito Obrigada "Ss" por terem compartilhado

comigo anos tão importantes, que com certeza serviram de base para tudo que veio depois.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no processo 2015/13231-6 (Auxílio de Pesquisa), que propiciou a execução deste trabalho. E ainda, à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

A todos os funcionários do ICT/UNESP, que puderam mesmo que indiretamente contribuir para a minha formação.

"Uma nuvem não sabe porque se move em tal direção. Sente um impulso... É para este lugar que devo ir agora. Mas o céu sabe os motivos e desenhos por trás de todas as nuvens, e você também saberá, quando se erguer o suficiente para ver além dos horizontes"
(Richard Bach)

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Cultivo celular.....	25
3.2 Diluição do Peptídeo LL-37.....	25
3.3 Ensaio de citotoxicidade.....	26
3.4 Ensaio de genotoxicidade.....	27
3.5 Quantificação de óxido nítrico.....	30
3.6 Ciclo celular	30
3.7 Análise da expressão gênica.....	31
3.8 Conteúdo de proteína total	35
3.9 Atividade de fosfatase alcalina.....	36
3.10 Ensaio imunoenzimático ELISA.....	37
4 RESULTADO	38
4.1 Ensaio de citotoxicidade	38
4.2 Ensaio de genotoxicidade.....	40
4.3 Quantificação de óxido nítrico.....	42
4.4 Ciclo celular	43
4.5 Análise da expressão gênica	45
4.6 Conteúdo de proteína total	47
4.7 Atividade de fosfatase alcalina.....	49
4.8 Ensaio imunoenzimático ELISA	51
5 DISCUSSÃO	53

6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

Milhan NVM. Avaliação do peptídeo LL-37 em contato com células-tronco da polpa dentária [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O peptídeo LL-37 (catelicidina derivada de humano), é liberado por algumas células humanas e capaz de neutralizar os tecidos com lipopolissacarídeo (LPS), além de atrair células da polpa, e induzir a angiogênese, características que o tornam um possível adjunto para a regeneração do complexo dentino-pulpar. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a biocompatibilidade do peptídeo LL-37 nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, e sua possível atuação na diferenciação de células-tronco da polpa dentária (DPSC) para *odontoblastos-like*. Com esse propósito, foram avaliados: (a) a citotoxicidade, pelo teste MTT; (b) a genotoxicidade, através do ensaio do micronúcleo; (c) a produção e quantificação de óxido nítrico; (d) as fases do ciclo celular, por citometria; (e) a expressão de alguns genes associados à formação de tecido mineralizado, através do teste qRT-PCR; (f) o conteúdo de proteína total; (g) a atividade de fosfatase alcalina (ALP); e (h) a produção de sialofosfoproteína dentinária (DSPP), pelo ensaio imunoenzimático ELISA. Foi observado que as concentrações de 5 e 10 µg/mL de LL-37 não foram citotóxicas e ainda aumentaram, em geral, a viabilidade celular ($p < 0,05$), sendo que os maiores valores de absorvância foram observados no 3º dia de contato. As concentrações testadas também não induziram genotoxicidade, após 7 dias de contato, tendo sido genotóxico apenas o grupo controle positivo (EMS) ($p < 0,05$). Ainda, não foi observado diferença estatisticamente significativa na produção de nitrito, pelas células expostas ao LL-37 após 7 dias, em ambas as concentrações. A análise do ciclo celular, evidenciou maior porcentual de células na fase G0/G1, em todos os grupos ($p < 0,05$). Quando estes foram comparados, foi observado maior quantidade de células na fase G0/G1 na concentração de 10 µg/mL de LL-37 comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo controle exibiu mais células na fase G2 e em mitose (M) que os grupos tratados com 5 e 10 µg/mL de LL-37 ($p < 0,05$), e mais células na interfase (S) que o grupo tratado com 10 µg/mL de LL-37 ($p < 0,05$). A análise da expressão gênica demonstrou que não houve aumento de expressão dos genes fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e Runx2 após tratamento com ambas as concentrações do peptídeo, no 3º dia. Além disso, não foi observado diferença estatisticamente significativa na ALP nos grupos tratados e controle, após 3 e 14 dias, enquanto o conteúdo de proteína total foi maior aos 14 dias nos grupos tratados com LL-37 ($p < 0,05$).

Ainda, aos 3 dias, a produção da proteína DSPP foi maior no grupo tratado com 10 µg/mL de LL-37 ($p < 0,05$). Com base nesses resultados, pode-se concluir que o LL-37 é biocompatível nas concentrações testadas nesse trabalho, e ainda aumenta o número de células viáveis, principalmente em período inicial. Além disso, aos 3 dias, na concentração de 10 µg/mL, ele retarda o ciclo celular e aumenta a expressão da proteína DSPP, além de aumentar a síntese proteica aos 14 dias, o que indica que esse peptídeo pode desempenhar algum tipo de função na diferenciação odontoblástica.

Palavras-chave: LL-37. Peptídeo antimicrobiano. Biocompatibilidade. Diferenciação. Células-tronco. Polpa dentária.

Milhan NVM. *Evaluation of LL-37 Peptide in contact with stem cells from dental pulp [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

The LL-37 peptide (human derived cathelicidin) is released by some human cells and able of neutralizing the tissues that present lipopolysaccharide (LPS), as well as, attracts pulp cells and induces angiogenesis; characteristics that makes it a possible adjunct for regeneration of the dentin-pulp complex. The aim of this study was evaluate in vitro the biocompatibility of LL-37 in the concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and its possible performance in the differentiation of dental pulp stem cells (DPSC) into odontoblasts-like cells. For this purpose, it was evaluated: (a) the cytotoxicity by MTT assay; (b) the genotoxicity by the micronucleus test; (c) the production and quantification of nitric oxide; (d) the cell cycle, by flow cytometry; (e) the expression of genes associated with the mineralization by qRT-PCR; (f) the total protein content; (g) the alkaline phosphatase activity (ALP); and (h) the production of dentine sialofosfoprotein (DSPP) by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It was observed that the concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LL-37 were not cytotoxic, in addition to they increased, in general, the cell viability ($p < 0,05$). Moreover, higher absorbance values were observed on 3rd day of contact. After 7 days, the tested concentrations also did not induce genotoxicity, ($p < 0,05$); only the positive control group (EMS) was genotoxic ($p < 0.05$). Furthermore, there was not statistical significance in the nitrite production by the cells exposed to LL-37 for 7 days, in both concentrations. The cell cycle test showed higher percentage of cells in the phase G0/G1 in all groups ($p < 0.05$). When they were compared, it was noticed that concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LL-37 arrested the cells in G0/G1 compared to the control group ($p < 0.05$). On the other hand, the control group, exhibited higher amount of cells in G2 and mitosis (M) than the others ($p < 0.05$) and also higher number of cells in interfase (S) than the group treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LL-37 ($p < 0.05$). On the 3rd day, the analysis of gene expression demonstrated no increase in the expression of the genes alkaline phosphatase, osteocalcin, osteopontin and Runx2, after treatment with both peptide concentrations. Furthermore, it was not observed statistical significance in the ALP in the treated and control groups after 3 and 14 days, while total protein content was higher in the groups treated with LL-37, at 14 days ($p < 0.05$). On the 3rd day, the production of DSPP protein was higher in the group treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LL-37 ($p < 0.05$). Based on these results, it can be concluded that LL-37 is biocompatible at these concentrations and increases the number of

viable cells, especially in the initial period. Moreover, on the 3rd day, the concentration of 10 µg/mL arrests the cell cycle, and increases the expression of DSPP protein, in addition to raising the protein content at 14 days, which indicates that this peptide may present some kind of function in the odontoblastic differentiation.

Keywords: LL-37. Antimicrobial peptide. Biocompatibility. Differentiation. Stem cells. Dental pulp.

1 INTRODUÇÃO

Na polpa infectada, bactérias Gram-negativas são frequentes e o lipopolissacarídeo (LPS), principal componente de suas membranas (Leonardo et al., 2004) está associado com a gênese e manutenção do processo inflamatório e de doenças periapicais (Hosoya, Matsushima, 1997; Leonardo et al., 2004). Isso ocorre devido a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo LPS (Hosoya et al., 1996), que continua presente nos tecidos dentários mesmo após a eliminação de bactérias patogênicas com antibióticos (Morsczeck et al., 2012), e que pode suprimir a função dos odontoblastos (Nomiyama et al., 2007).

Quando uma inflamação torna-se sustentada, devido a manutenção da produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorre a necrose tecidual e conseqüentemente o comprometimento das células diferenciadas e mesenquimais indiferenciadas da polpa, estabelecendo-se uma barreira para o reparo do complexo dentino-pulpar (Colombo et al., 2014). Dessa forma, o desenvolvimento das raízes dos dentes permanentes imaturos é interrompido, tornando-os mais susceptíveis à fraturas (Hargreaves et al., 2013). Assim, a regeneração desses tecidos seria de extrema importância para tais dentes, após a descontaminação do canal radicular, uma vez que daria continuidade ao desenvolvimento dos mesmos.

A técnica de revascularização, que se baseia na indução de sangramento pela laceração da papila apical, visa a formação de um coágulo que contém células mesenquimais indiferenciadas, e por meio delas a regeneração do complexo dentino-pulpar. Essa técnica tem sido utilizada com alguns resultados positivos (Banchs, Trope, 2004; Bose et al., 2009). Entretanto, o simples passo de lacerar a papila apical e proporcionar uma concentração local elevada de células mesenquimais indiferenciadas no canal não parece ser o suficiente para

guiar a completa regeneração tecidual das partes perdidas (Hargreaves et al., 2013; Albuquerque et al., 2014).

Procedimentos de revascularização são responsáveis por uma ampla variedade de protocolos clínicos, que são caracterizados por uma associação de hipoclorito de sódio (NaOCl) e medicação intracanal, envolvendo uma mistura de antibióticos; e têm sido propostos para atingir a máxima eliminação de bactérias nos dentes imaturos após necrose pulpar (Banchs, Trope, 2004; Bose *et al.*, 2009). No entanto, tem sido sugerido que a utilização de hipoclorito de sódio degrada proteínas, como por exemplo, a proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2), importante na diferenciação odontoblástica de células tronco mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária (Casagrande et al., 2010).

Ainda, foi demonstrado que pastas antibióticas em concentrações clinicamente preconizadas podem afetar a capacidade de sobrevivência de células mesenquimais indiferenciadas da papila dental (SCAPs) (Ruparel et al., 2012). Dessa forma, uma estratégia de desinfecção que seja mais biocompatível tem sido proposta com a criação de *scaffolds*, contendo concentrações testadas de antibióticos, que visam atuar como um sistema de entrega de drogas para eliminar a infecção do canal radicular (Bottino et al., 2013; Palasuk et al., 2014). Além disso, fatores de crescimento têm sido considerados importantes adjuvantes para a regeneração do complexo dentino-pulpar, quando em presença de células mesenquimais indiferenciadas e *scaffolds*, pois auxiliam no processo regenerativo (Hargreaves et al., 2013).

Em 2014, Albuquerque et al. propuseram um protocolo regenerativo para dentes permanentes imaturos que inclui a descontaminação radicular com soluções irrigantes, seguida da inserção de um *scaffold* bioativo e biocompatível que contenha substâncias antimicrobianas. Uma vez que um ambiente livre de bactérias e propício para a regeneração tecidual tenha sido estabelecido, *scaffolds* contendo fatores de crescimento e/ou células mesenquimais

indiferenciadas seriam colocados para induzir o desenvolvimento de um novo tecido de pulpar. Dessa forma, ocorreria a diferenciação de odontoblastos, com consequente formação de dentina e aumento da espessura das paredes dentinárias, o que restabeleceria a função do dente na cavidade oral.

Assim, diferentes materiais e técnicas têm sido investigados para confecção de *scaffolds*, que auxiliem no sistema de entrega de drogas, visando a descontaminação do canal radicular, e a regeneração desse complexo (Albuquerque et al., 2014). Dentre os *scaffolds* utilizados para este fim, pode-se destacar aqueles que pertencem a classe dos polímeros naturais, polímeros sintéticos, dos hidrogéis e das biocerâmicas (Galler et al., 2011).

Moléculas bioativas, como fatores de crescimento, têm sido incorporadas em hidrogéis, visando sua liberação gradual e localizada (Ishimatsu et al., 2009; Nagy et al., 2014). Em 2013, Cavalcanti et al. demonstraram que células-tronco da polpa dentária sobrevivem e proliferaram em hidrogéis. Além disso, em outro estudo, a adição do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) dentro de hidrogéis propiciou a neovascularização e regeneração de tecidos pertencentes ao complexo dentino-pulpar (Ishimatsu et al., 2009).

Ainda, superfícies de nanofibras, confeccionadas pela técnica de eletrofiação via solução polimérica, têm sido química e fisicamente modificadas com moléculas bioativas e ligantes celulares reconhecidos, o que subsequentemente proporciona um microambiente favorável para o contato de células e tecidos. Uma variedade de moléculas bioativas, como fármacos anticancerígenos, antibióticos, proteínas, fatores de crescimento, e polissacarídeos, têm sido utilizados para realizar liberação tópica controlada dentro de um período de tempo definido (Yoo et al., 2009).

O único gene catalecidina (CAMP) identificado em humanos, codifica o peptídeo LL-37 (Kościuczuk et al., 2012), que é formado a partir dos últimos 37 resíduos de aminoácidos da extremidade C-terminal do peptídeo

antimicrobiano catiônico humano 18, o qual apresenta uma estrutura linear, sem uma ponte dissulfureto (Larrick et al., 1995). É também conhecido como hCAP-18, FALL-39 ou CAMP - peptídeo antimicrobiano catiônico humano (Kościuczuk et al., 2012) e amplamente expresso por células epiteliais e vários tipos de leucócitos, tais como neutrófilos (Bals et al., 1998; Frohm Nilsson et al., 1999; Agerberth et al., 2000).

Esse peptídeo inibe a atividade do LPS (Larrick et al., 1995), inibe o aumento da produção de citocinas em células dendríticas (Kandler et al., 2006), apresenta atividade antimicrobiana (Frohm et al., 1997; Bals et al., 1998), induz a migração de células humanas da polpa para os sítios onde está localizado (Kajiya et al., 2010) e ainda a migração células de mesenquimais indiferenciadas de ratos, auxiliando na reparação óssea (Kittaka et al., 2013a). Além disso, tem sido associado a indução da angiogênese (Ramos et al., 2011; Kittaka et al., 2013b; Khung et al., 2015). Por apresentar essas propriedades, acredita-se que o LL-37 possa contribuir para a regeneração do complexo dentino-pulpar (Kajiya et al., 2010), especialmente se incorporado em *scaffolds*.

As linhagens de células obtidas da polpa dentária humana podem ser classificadas em DPSC (Dental Pulp Stem Cells), quando obtidas de dentes permanentes, e SHED (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous), provenientes de dentes decíduos. Essas células são promissoras para regeneração do complexo dentino-pulpar, pois oferecem poucas chances de rejeição imunológica e de transmissão de patógenos, além de apresentar acessibilidade na sua obtenção. A exfoliação de dentes decíduos, terceiros molares inclusos indicados para extração ou dentes fraturados com exposição pulpar que necessitam de tratamento endodôntico, são opções para obtenção de células-tronco (Brar, Toor, 2012).

A biocompatibilidade de materiais pode ser avaliada pelos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. A verificação da citotoxicidade *in vitro* pode

ser realizada por diferentes métodos, entre eles pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), o qual reflete não somente o número de células de uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, porque é baseado na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presente apenas em células viáveis (Mosmann, 1983).

Para avaliação da genotoxicidade *in vitro*, ou seja para detecção de dano genético nas células, o teste do micronúcleo tem sido utilizado (Miller et al., 1998; Ribeiro et al., 2006). Este ensaio baseia-se na perda de cromossomos ou dos seus fragmentos durante a mitose celular. Cromossomos inteiros ou fragmentos deles, que não são reincorporados pelo núcleo após a divisão celular, levam a formação de micronúcleos (Miller et al., 1998).

Em respostas pró-inflamatórias mediadas por citocinas, grande quantidade de óxido nítrico (NO) é produzido e tem um efeito inibidor significativo de proliferação e diferenciação celular, suprimindo a formação de osso. Em contato com osteoblastos, doses baixas de NO têm sido relacionadas com a sua proliferação, enquanto doses altas e de liberação rápida têm sido associadas ao aumento da apoptose, e também a diferentes condições patológicas (Saura et al., 2010). Na polpa, foi demonstrado que o óxido nítrico suprime o crescimento e acelera a mineralização e a apoptose das células (Yasuhara et al., 2007).

Estudos prévios comprovaram que, assim como osteoblastos, células pulpares expressam marcadores ósseos, tais como fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina (Kuo et al., 1992; Tsukamoto et al., 1992; Nakashima et al., 1994; Shiba et al., 1998). A similaridade de expressão gênica entre DPSCs e células-tronco do osso (BMSSCs), também já foi demonstrada (Gronthos et al., 2000).

Foi observado ainda que a expressão de genes necessários para a diferenciação de osteoblastos ou odontoblastos é regulada pelo gene Runx2

(fator de transcrição relacionado ao gene runt 2). Esse marcador pode suprimir ou ativar a expressão do gene DSPP, responsável por codificar a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), sendo de interesse em estudos que visam avaliar formação de tecido mineralizado (Chen et al., 2005).

A proteína DSPP é expressa durante o desenvolvimento dos dentes, e após sua clivagem leva a formação das proteínas DPP (fosfoproteína dentinária) e DSP (sialoproteína dentinária). Tanto a DPP quanto a DSP são fundamentais na dentinogênese (Suzuki et al., 2009, 2012; Guo et al., 2014).

Frente ao exposto, existe uma busca por *scaffolds* que liberem moléculas com características antimicrobianas e/ou que auxiliem na regeneração do complexo dentino-pulpar de dentes permanentes imaturos, após necrose. Com esse propósito, este estudo avaliou *in vitro* o peptídeo LL-37 nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, quanto sua biocompatibilidade e possível atuação na diferenciação de células-tronco da polpa para *odontoblastos-like*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a biocompatibilidade do peptídeo LL-37 nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, por meio dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, quantificação de óxido nítrico; e uma possível atuação desse peptídeo na diferenciação de células tronco da polpa (DPSC) para *odontoblastos-like*, através da análise do ciclo celular, pela expressão de genes associados à formação de tecido mineralizado, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e produção de sialofosfoproteína dentinária (DSPP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

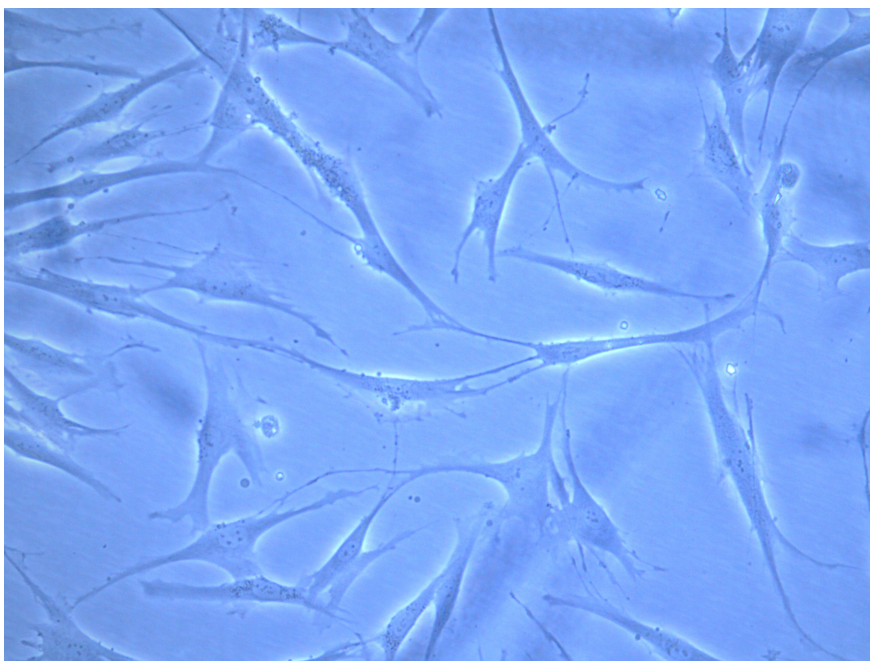
3.1 Cultivo celular

As células DPSC (Lonza, Walkersville, USA), foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Cultilab, Curitiba, Brasil) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF; Cultilab), penicilina (100 U/mL) (Cultilab) e estreptomicina (100 µg/mL) (Cultilab), e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Foram utilizados frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm². O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e o desenvolvimento das células (Figura 1) foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany). Células da segunda até sexta passagem foram utilizadas nos experimentos descritos abaixo.

3.2 Diluição do Peptídeo LL-37

O peptídeo LL-37 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi diluído em meio de cultivo celular DMEM. A concentração inicial (1000 µg/mL) foi diluída para 100 µg/mL e subsequentemente para 10 e 5 µg/mL, que são as concentrações de interesse deste estudo.

Figura 1 – Fotomicrografia das células DPSC cultivadas em frascos para cultura celular e meio de cultivo DMEM (Ampliação original de 200 X)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade foram utilizadas placas de 24 poços, onde foram plaqueadas 20.000 células por poço em 6 poços, em dois experimentos independentes (n=12). Após 24 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o meio antigo foi removido e o meios condicionados pelo peptídeo a 5 e 10 µg/mL (grupos experimentais), meio puro (grupo controle), e meio com 10% de DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Sigma-Aldrich) (grupo controle positivo) foram colocados em contato com as culturas celulares, e deixados por mais 3 e 7 dias, sob as mesmas condições. Então, o conteúdo dos poços foi removido, e o reagente MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio; Sigma) foi colocado em contato com as células por 60 minutos. Posteriormente, o reagente MTT foi removido, DMSO

foi acrescentado aos poços, e as placas foram mantidas sob agitação por 10 minutos. A leitura da densidade óptica resultante da solução foi mensurada em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 570 nm. Os dados de absorbância foram normalizados pelo grupo controle (=100%) e submetidos à análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

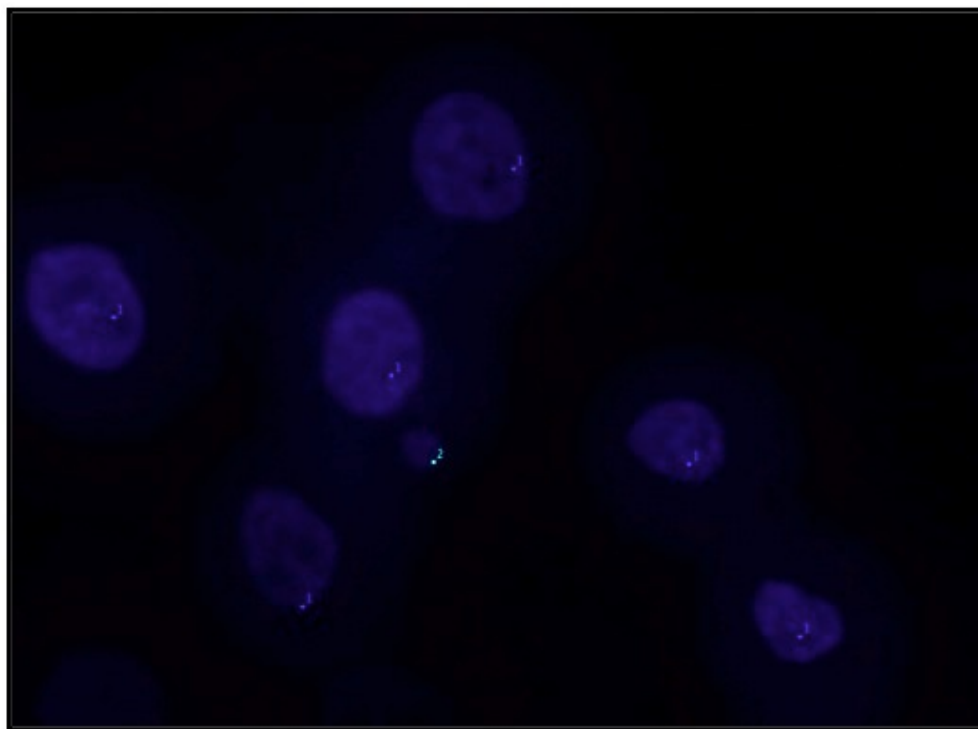
3.4 Ensaio de genotoxicidade

Para análise da genotoxicidade foram utilizadas placas de 24 poços, onde foram plaqueadas 20.000 células por poço em dois poços, em dois experimentos independentes ($n=4$). Após 24 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o meio antigo foi removido e os meios condicionados pelo peptídeo a 5 e 10 µg/mL (grupos experimentais), meio puro (grupo controle), e meio com EMS (Etil metanossulfonato; Sigma-Aldrich) a 5 mM (grupo controle positivo) foram colocados em contato com as culturas celulares, e deixados por mais 7 dias, sob as mesmas condições.

Após esse período, as células foram fixadas em formaldeído a 4%. Então, solução salina de tampão de fosfato (PBS, Cultilab) e solução Fluoroshield com DAPI (Sigma-Aldrich) foram adicionadas aos poços, os quais foram fotografados com câmara digital (Sony F828 digital, CyberShot, 8,0 megapixéis) acoplada a microscópio de luz invertido. Pelo menos 10 fotos por poço foram realizadas e o número de micronúcleos foi determinado em 1000 células/poço, com auxílio do programa Image J. Foram identificados como micronúcleos, estruturas de DNA contidas no citoplasma separadas do núcleo principal, com uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal (Figura 2).

Células em mitose e que exibiram fragmentação nuclear por apoptose não foram consideradas na contagem (Figura 3). Os dados obtidos na contagem de micronúcleos foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

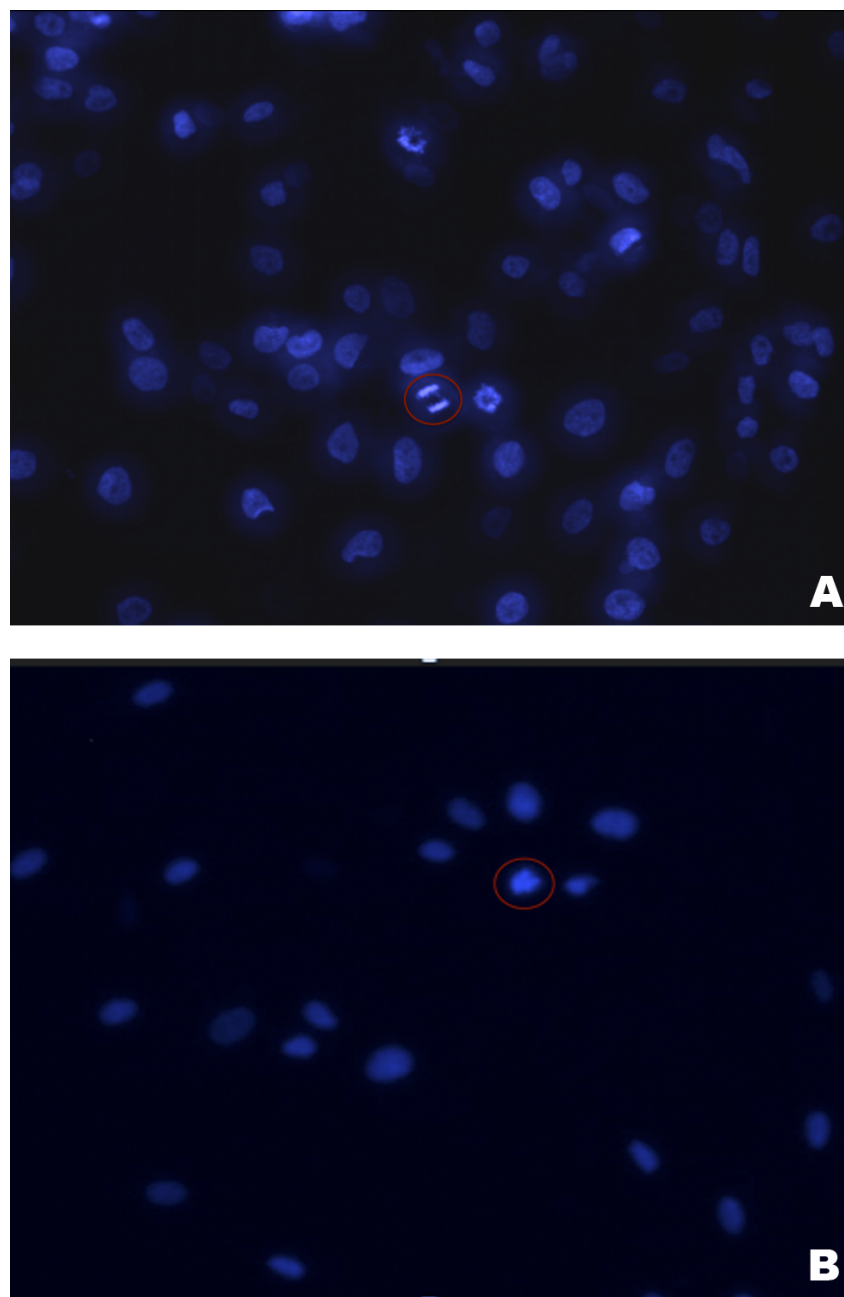
Figura 2 – Fotomicrografia dos núcleos e micronúcleo, completamente separado e exibindo área menor que 1/3 da área do núcleo principal (Teste do micronúcleo, Fluorocromo DAPI, Ampliação original de 200 ×)



Legenda: (1) Núcleos; (2) Micronúcleo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Fotomicrografia exibindo no interior dos círculos núcleos em mitose e em apoptose, os quais foram desconsiderados na contagem (Teste do micronúcleo, Fluorocromo DAPI, Ampliação original de 100 ×)



Legenda: (A) Mitose; (B) Apoptose.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Quantificação de óxido nítrico

Para avaliação da produção de óxido nítrico foram utilizadas placas de 24 poços, onde foram plaqueadas 20.000 células por poço em 6 poços, em dois experimentos independentes (n=12). Após 24 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o meio antigo foi removido e o meios condicionados pelo peptídeo a 5 e 10 µg/mL (grupos experimentais) e meio puro (grupo controle), foram adicionados aos poços, e as placas deixadas por mais 7 dias, sob as mesmas condições.

Após esse período, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados, e a quantificação de óxido nítrico foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess (Sigma-Aldrich). Para tal, 100 µL dos sobrenadantes foram acrescentados aos poços de uma placa de 96 poços e posteriormente o mesmo volume do reagente de Griess foi adicionado. Após 10 minutos, a leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas com comprimento de onda em 570 nm. Para o cálculo da concentração de nitrito em cada poço, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 100 µM a 0,781 µM, com as quais foi elaborada uma curva-padrão, a partir da qual a concentração de nitrito em cada poço foi estabelecida. Esses valores (µM) foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

3.6 Ciclo celular

Para avaliação do ciclo celular, foi realizada citometria de fluxo. Este ensaio determina a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular

(G0/G1, S, G2/M) e pode ser utilizado como um teste complementar aos ensaios de expressão gênica e de viabilidade celular, de forma a se observar possível alteração do ciclo celular após o tratamento.

Para esse teste foram plaqueadas 100.000 células por poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio DMEM, em dois experimentos independentes (n=12). Essas células foram mantidas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Então, o meio foi substituído por meio contendo LL-37 em ambas as concentrações. Após 3 dias, as células foram lavadas com PBS, fixadas em etanol 70% e mantidas *overnight* a -20 °C. Então, foram novamente lavadas com PBS, ressuspensas em solução aquosa de Iodeto de Propídio (Sigma) e incubadas na ausência de luz por 30 minutos a 4°C. O ciclo celular foi analisado por software específico do equipamento de citometria (Tali Image-based Cytometer, Invitrogen), e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

3.7 Análise da expressão gênica

Para análise da expressão dos genes OCN, ALP, OPN, e Runx2 foram plaqueadas 100.000 células por poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio DMEM, em três experimentos independentes (n=9). Após 24 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o meio antigo foi removido e os meios contendo o peptídeo (grupos experimentais) e meio puro (grupo controle) foram colocados em contato com as culturas celulares, e deixados por mais 3 dias, sob as mesmas condições.

O RNA das amostras foi extraído utilizando o protocolo do RNAeasy microarray tissue mini kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para tal, foi adicionado aos tubos 200 µL de clorofórmio e as amostras foram

agitadas e mantidas durante 3 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 xg, durante 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi coletada, e então foi realizada lavagem com etanol 70%. O conteúdo foi transferido para colunas de RNAeasy mini spin, as quais foram centrifugadas a 8.000 xg por 15 segundos à temperatura ambiente por duas vezes. Então foi adicionado 700 µL do buffer RW1 e o conteúdo foi centrifugado por 15 s a 8.000 xg. O procedimento foi repetido duas vezes com adição de 500 µL do buffer RPE e a última centrifugação foi realizada por 2 minutos. As colunas foram então transferidas para tubos de coleta de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 30 µL de água ultra pura e livre de nucleases, seguido de centrifugação por 1 minutos a 8.000 xg. A quantidade de RNA obtida foi verificada por meio de leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640). A leitura da absorbância foi realizada e a produtividade da reação calculada pela fórmula:

OD x diluição x 40/1000

Todos os RNAs utilizados apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0 e foram tratados com DNase.

A referência dos *primers* dos genes utilizados neste trabalho, está descrita no Quadro 1. A sequência nucleotídica, especificidade e a temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer* foram confirmadas no programa BLAST e PRIMER BLAST/ NCBI/ GENE BANK. Nesse trabalho foram testados três genes de referência (GAPDH, TUBB e Beta-actina) em todos os grupos experimentais. Os resultados obtidos foram analisados no software RefFinder e o gene de referência escolhido foi o GAPDH (Figura 4).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit RT2 HT First Strand (Qiagen). Inicialmente foi removido o DNA genômico utilizando o DNA

elimination mix, nas proporções de 0,5 µg de RNA, 2 µL de Buffer GE e água livre de RNase, resultando em um volume final de 10 µL. A solução resultante foi incubada a 42°C por 5 minutos e então imediatamente colocada no gelo por 1 minuto. A solução para transcrição reversa foi preparada na proporção de 4 µL de 5x Buffer BC3, 1 µL de Control P2, 2 µL de RE3 Reverse Transcriptase Mix, 3 µL de água livre de RNase e 10 µL da solução resultante da remoção do DNA genômico, agitando-se por inversão. O tubo foi então incubado por 42°C por exatos 15 minutos, após os quais foram incubados imediatamente a 95°C por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 91 µL de água livre de RNase a cada tubo, agitando-se por inversão. As amostras foram então armazenadas a -20°C para posterior utilização.

O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG - Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) na seguinte reação: em um placa de 96 poços, foi colocado 12,5 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 300 nM de primer forward, 300 nM de primer reverse, 3,4 µL solução de cDNA (diluída 1:5) e 2,1 µL água DEPEC (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) para o volume final de 20 µL. Para o controle negativo da reação adicionou-se todos os reagentes, exceto cDNA, nos últimos poços da placa, que foi vedada com o adesivo óptico (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Para o controle negativo da etapa de transcrição reversa colocou-se o RNA total tratado com DNase. Posteriormente, a placa foi colocada no aparelho StepOnePlus™ System (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (Melt), conferindo-se a

ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação, analisadas a cada 0,1°C. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo que os dados obtidos foram analisados no Software do equipamento de PCR em tempo real e posteriormente submetidos à análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

Quadro 1 – Genes que foram avaliados no presente trabalho

GENES	Primers sense; antisense
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT TGGGATTTCCATTGATGAAC
TUBB	TGCTCGAGATGTTGATGA TCCCCTGTTGACTGGTCATT
Beta-actina	AAACTGGAACGGTGAAGGTG GTGGACTTGGGAGAGGACTG
Osteocalcina	AGCAGAGCGACACCCTAGAC GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG
Fosfatase Alcalina	CCACGTCTTCACATTTGGTG AGACTGCGCCTGGTAGTTGT
Osteopontina	AGACACATATGATGGCCGAGG GGCCTTGTATGCACCATTCAA
Runx2	GAACTGGGCCCTTTTTCAGA CACTCTGGCTTTGGGAAGAG

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Genes de referência, GAPDH, TUBB e Beta-actina que foram testados em todos os grupos experimentais. Os resultados obtidos foram analisados no software RefFinder e o gene de referência escolhido foi o GAPDH, como ilustrado abaixo



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8 Conteúdo de proteína total

Para o teste de proteína total as células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 20.000 células/poço. Foram utilizados seis poços para cada material e grupo controle, em dois experimentos independentes (n=12). As células foram mantidas em meio DMEM a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas ao meio contendo o peptídeo em ambas as concentrações e mantidas em estufa por períodos de 3 e 14 dias.

Após esses períodos o conteúdo de proteína total foi avaliado de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). As proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1%. Após 30 minutos, 1 mL da solução de cada poço foi misturada a 1 mL da solução de Lowry e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de Folin e Ciocalteau por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) a 680 nm e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva padrão determinada pela albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

3.9 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total. Dessa maneira, também foram avaliados os períodos de 3 e 14 dias. A atividade da fosfatase alcalina foi mensurada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Fosfatase alcalina 50-100 Labtest). Inicialmente, 50 μL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 minutos a 37°C. Foi então acrescentada à solução uma alíquota de 50 μL de lisados obtidos de cada poço, sendo que o conjunto permaneceu por 10 minutos a 37°C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 minutos, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade da

fosfatase alcalina foi calculada seguindo os procedimentos de cálculos preconizados na bula do Kit comercial (Fosfatase alcalina 50-100 Labtest). Os dados obtidos foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total e os valores foram apresentados em μmol de timolftaleína/h/mg de proteína/mL e analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$).

3.10 Ensaio imunoenzimático ELISA

Para o ensaio imunoenzimático ELISA, foram plaqueadas 100.000 células por poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio DMEM em dois experimentos independentes ($n=12$). Após 24 horas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , o meio antigo foi removido e o meios contendo o peptídeo (grupos experimentais) e meio puro (grupo controle) foram colocados em contato com as culturas celulares, e deixados por mais 3 dias, sob as mesmas condições. Então os sobrenadantes foram coletados para a detecção e quantificação da proteína DSPP (Fine test, Lab Research, Miami, EUA), pelo método imunoenzimático ELISA. Para isso, placas de microtitulação de 96 poços já sensibilizadas, foram utilizadas seguindo o protocolo de recomendação do fabricante.

Em seguida, as placas foram levadas ao leitor de microplacas, com comprimento de onda de 450 nm. Após a obtenção das densidades ópticas, foi realizada a curva padrão e então foram determinados os níveis de DSPP presente nas amostras, em $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$)

4 RESULTADO

4.1 Ensaio de citotoxicidade

Os resultados do ensaio de citotoxicidade, após 3 e 7 dias de contato do peptídeo LL-37 com as células, foram normalizados pelo grupo controle (=100%) e submetidos à análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$). Na tabela 1 podem ser observados as médias e desvio padrão (em porcentagem) para cada grupo. O DMSO, utilizado como controle positivo, foi citotóxico aos 3 e 7 dias ($p < 0,0001$), exibindo valores abaixo de 40% em ambos os períodos (Figura 5).

Foi observado que o LL-37 nas concentrações testadas não foi citotóxico, e ainda aumentou a viabilidade celular. A análise estatística demonstrou que os valores obtidos na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 foram estatisticamente diferentes daqueles observados no grupo controle tanto no período de 3 ($p = 0,0006$) quanto no de 7 dias ($p < 0,0001$), com maiores médias no grupo tratado. Já os valores obtidos na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 foram estatisticamente diferentes do grupo controle apenas aos 3 dias ($p = 0,012$), embora a média tenha sido superior a 100% também no 7^o de contato ($p = 0,95$) (Figura 5).

A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 exibiu maior média que a concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ nos períodos de 3 e 7 dias. Entretanto, quando as concentrações foram estatisticamente comparadas, verificou-se que essa diferença foi significativa apenas no 7^o dia ($p = 0,001$). Por outro lado, quando os valores de cada concentração foram comparados entre si em períodos diferentes, foi observado que ambas as concentrações de LL-37 apresentaram valores estatisticamente diferentes entre os períodos de 3 e 7 dias ($p < 0,0001$), sendo que

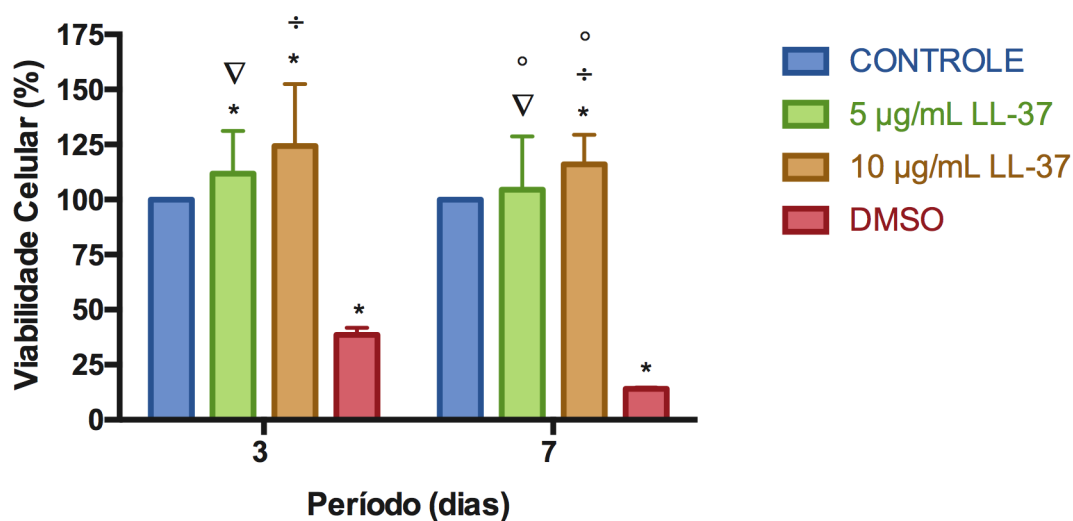
os maiores foram observados no 3^o dia (Figura 5).

Tabela 1 – Valores de média e desvio padrão (%), dos dados obtidos no teste MTT, após exposição das células a 5 e 10 µg/mL de LL-37 por 3 e 7 dias

Grupos	Média (%)		Desvio Padrão (%)	
	3 dias	7 dias	3 dias	7 dias
Controle	100	100		
5 µg/mL LL-37	111,77	104,43	19,35	24,22
10 µg/mL LL-37	124,28	116,05	28,24	13,34
DMSO	38,56	14,03	3,28	0,56

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Gráfico representativo das médias, obtidas no teste MTT, após exposição das células a 5 e 10 µg/mL de LL-37 por 3 e 7 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística para o grupo controle (=100%); (°) indica diferença estatística entre as concentrações de LL-37 no mesmo período; (∇ e †) indicam diferenças estatísticas entre as mesmas concentrações de LL-37 em períodos diferentes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ensaio de genotoxicidade

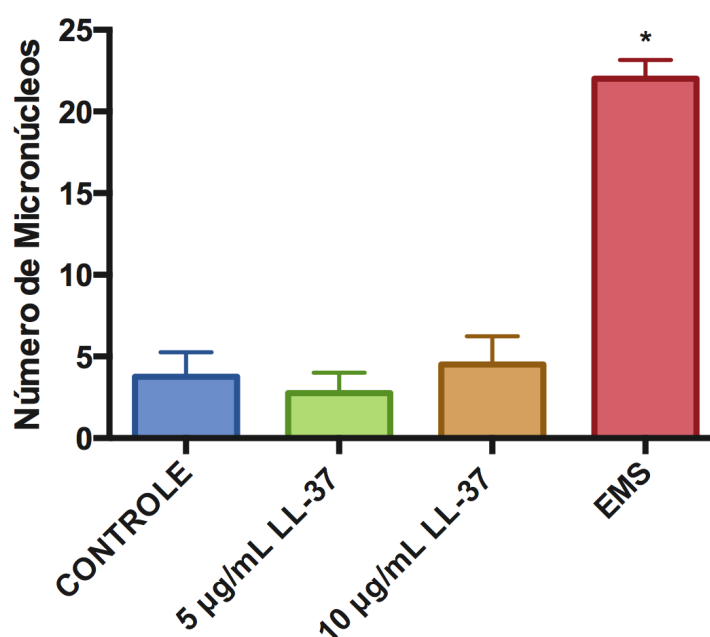
A média e desvio padrão dos dados obtidos na contagem de micronúcleos podem ser observados na tabela 2. A análise estatística, pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$), indicou que o número de micronúcleos apresentados pelo grupo EMS, utilizado como controle positivo, foi estatisticamente diferente do número apresentado pelo grupo controle ($p=0,028$), sendo que um número muito maior estava presente no grupo EMS. Por outro lado, o número de micronúcleos contabilizados nas células expostas a 5 e 10 µg/mL de LL-37 não foi estatisticamente diferente daquele apresentado pelo grupo controle ($p=0,48$ e $0,51$; respectivamente), e igualmente, não foi estatisticamente diferente entre ambas as concentrações de LL-37 ($p=0,31$), não tendo sido essas concentrações genotóxicas para as células (Figura 6).

Tabela 2 – Valores médios de micronúcleos e desvio padrão, obtidos no ensaio de genotoxicidade, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 7 dias

Grupos	Média do número de micronúcleos	Desvio Padrão
Controle	3,75	1,5
5 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	2,75	1,25
10 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	4,5	1,73
EMS	22	1,15

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Gráfico representativo do número médio de micronúcleos, obtidos no ensaio de genotoxicidade, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 7 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística para o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Quantificação de óxido nítrico

Os resultados em absorbância da quantificação de óxido nítrico, foram convertidos para concentração de nitrito (μM) a partir da curva-padrão elaborada por concentrações estabelecidas do mesmo. A média e desvio padrão das concentrações de nitrito podem ser observados na tabela 3.

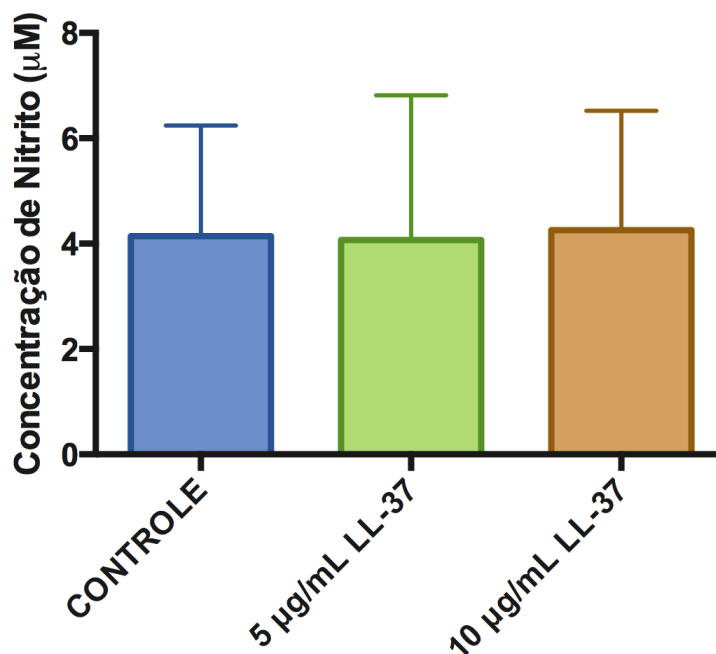
A análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$), indicou que as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 não foram estatisticamente diferentes das concentrações apresentadas pelo grupo controle ($p=0,83$ e $p=0,93$, respectivamente). Ainda, não houve diferença estatística de produção de óxido nítrico pelas células expostas a 5 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 quando comparadas àquelas expostas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 ($p=0,54$) (Figura 7).

Tabela 3 – Concentração média e desvio padrão da concentração de nitrito (μM), obtidos no teste de quantificação de óxido nítrico, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 7 dias

Grupos	Concentração média de nitrito (μM)	Desvio Padrão (μM)
Controle	4,14	2,16
5 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	4,06	2,82
10 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	4,25	2,29

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Gráfico representativo das concentrações médias de nitrito (μM), obtidas no teste de quantificação de óxido nítrico, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LL-37 por 7 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Ciclo celular

Os resultados do ciclo celular indicaram que houve diferença estatística entre todas as fases do ciclo celular dentro dos três grupos ($p < 0,05$), sendo que a maior parte das células estavam na fase G0/G1, em todos os grupos.

Quando as fases do ciclo celular foram comparadas entre os grupos foi observado que a quantidade de células na fase G0/G1 na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LL-37 foi estatisticamente diferente daquela observada no grupo controle ($p = 0,0064$), com maior número de células em G0/G1 no grupo tratado. Adicionalmente, houve diferença estatística entre o número de células em G2/M no grupo controle comparado ao apresentado pelos grupos tratados com 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LL-37 ($p = 0,032$ e $p = 0,0021$, respectivamente), com mais

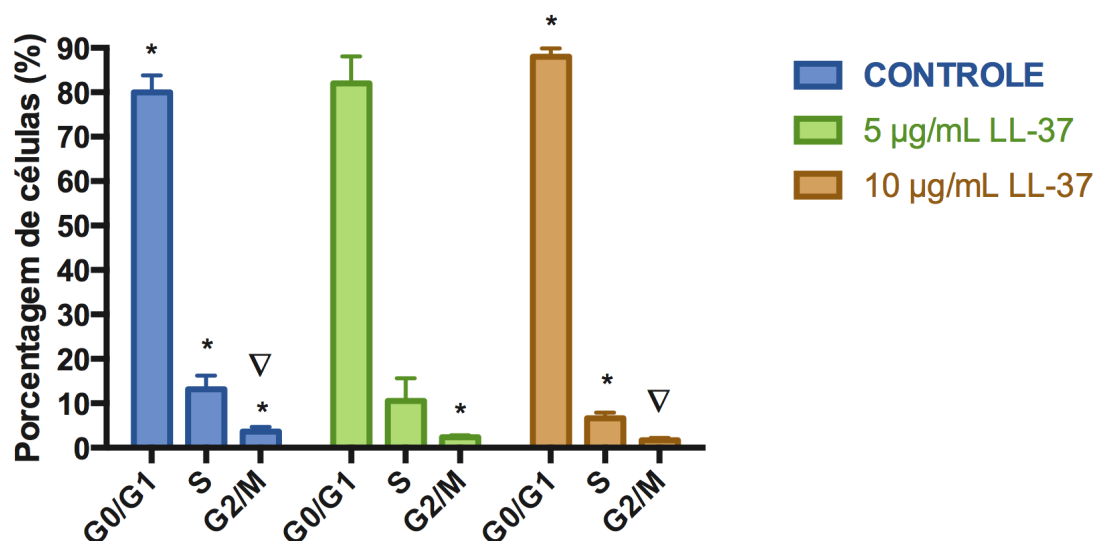
células em G2/M no grupo controle, que também exibiu mais células na interfase (S), que o grupo tratado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 ($p=0,0064$). A média e desvio padrão dos dados obtidos no teste do ciclo celular, e ainda a diferença estatística entre os grupos podem ser observados na tabela 4 e figura 8, respectivamente.

Tabela 4 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos dados obtidos no teste de ciclo celular, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 dias

Grupos	G0/G1		S		G2/M	
	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	80	3,84	13,16	3,06	3,66	1,03
5 $\mu\text{g/mL}$	82	6,06	10,5	5,16	2,33	0,52
10 $\mu\text{g/mL}$	88	1,89	6,66	1,21	1,66	0,51

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Gráfico representativo dos resultados obtidos no teste de ciclo celular após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LL-37 por 3 dias



Legenda: (* e ▽) indicam diferença estatística das mesmas fases do ciclo celular entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Análise da expressão de gênica

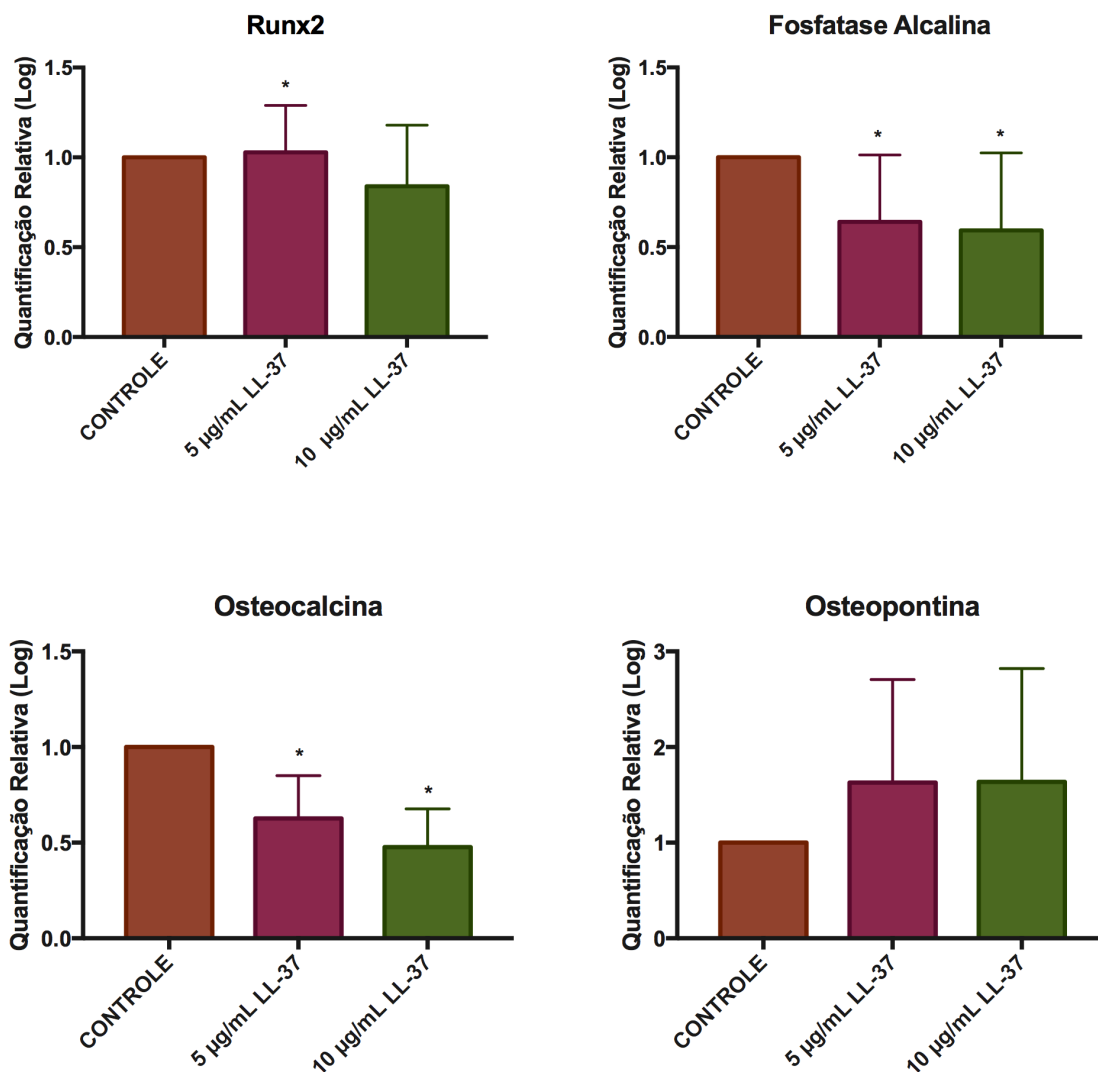
Os resultados da expressão gênica indicaram que o peptídeo LL-37 tanto na concentração de 5 quanto na de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não aumentou a expressão dos genes osteocalcina, fosfatase alcalina e Runx2, os quais foram igualmente ou mais expressos pelo grupo controle. Foi observado maior expressão do gene osteopontina pelos grupos tratados com LL-37, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando os grupos tratados pelo LL-37 foram comparados, não houve diferença entre as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para nenhum dos genes avaliados. A média e desvio padrão dos resultados obtidos no qRT-PCR, e ainda a diferença estatística entre os grupos, podem ser observados na tabela 5 e figura 9, respectivamente.

Tabela 5 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos dados obtidos na avaliação da expressão gênica, por qRT-PCR, após exposição das células a 5 e 10 µg/mL de LL-37 por 3 dias

Grupos	Runx2		Fosfatase Alcalina		Osteocalcina		Osteopontina	
	M	DV	M	DV	M	DV	M	DV
5 µg/mL	1,02	0,26	0,64	0,37	0,62	0,22	1,62	1,07
10 µg/mL	0,83	0,33	0,59	0,43	0,47	0,20	1,63	1,18

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Gráfico representativo dos resultados obtidos na avaliação da expressão gênica, por qRT-PCR, após exposição das células a 5 e 10 µg/mL de LL-37 por 3 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística para o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Conteúdo de proteína total

Os dados obtidos no conteúdo de proteína total indicaram que houve diferença estatística entre os períodos ($p < 0,001$), com aumento de produção de

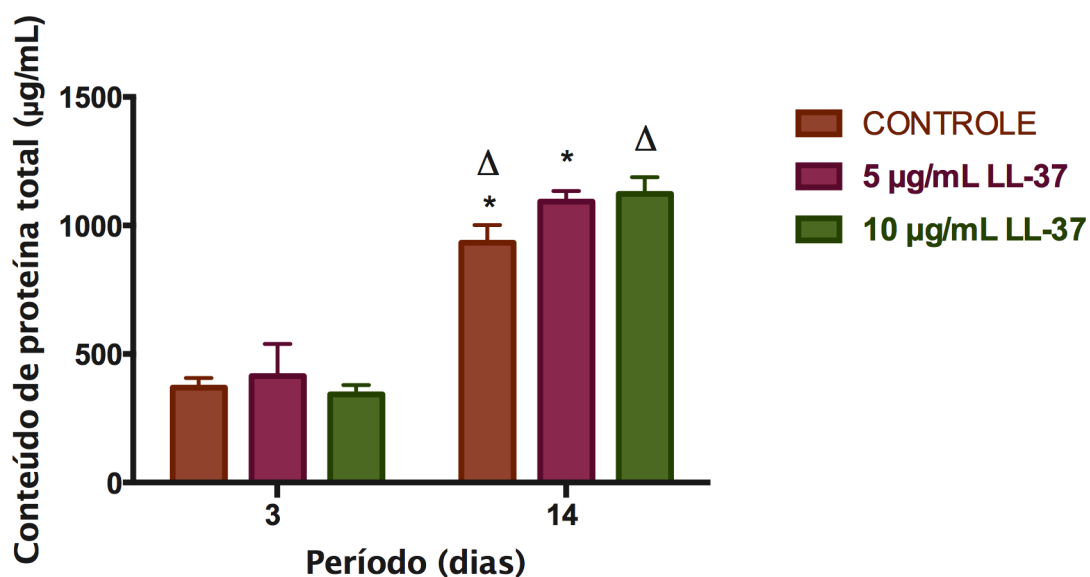
proteínas no 14^o dia em todos os grupos. Aos 3 dias, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, enquanto no 14^o dia houve diferença estatística entre os grupos tratados e o controle, sendo que o LL-37 tanto na concentração de 5 quanto na de 10 µg/mL induziu maior conteúdo de proteína total. Quando as concentrações de 5 e 10 µg/mL de LL-37 foram comparadas, no 14^o dia, não houve diferença entre elas (p=0,506). A média e desvio padrão dos resultados obtidos no conteúdo de proteína total, e ainda a diferença estatística entre os grupos, podem ser observados na tabela 6 e figura 10, respectivamente.

Tabela 6 – Média (M) e desvio padrão (DP) do conteúdo de proteína total (µg/mL) após exposição das células a 5 e 10 µg/mL de LL-37 por 3 e 14 dias

Grupos	Média do Conteúdo de Proteína Total (µg/mL)		Desvio Padrão (µg/mL)	
	3 dias	14 dias	3 dias	14 dias
Controle	369	932	37,84	69,09
5 µg/mL LL-37	414	1092	124,80	41,25
10 µg/mL LL-37	342	1123	36,66	64,55

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Gráfico representativo do conteúdo de proteína total após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 e 14 dias



Legenda: (* e Δ) indicam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

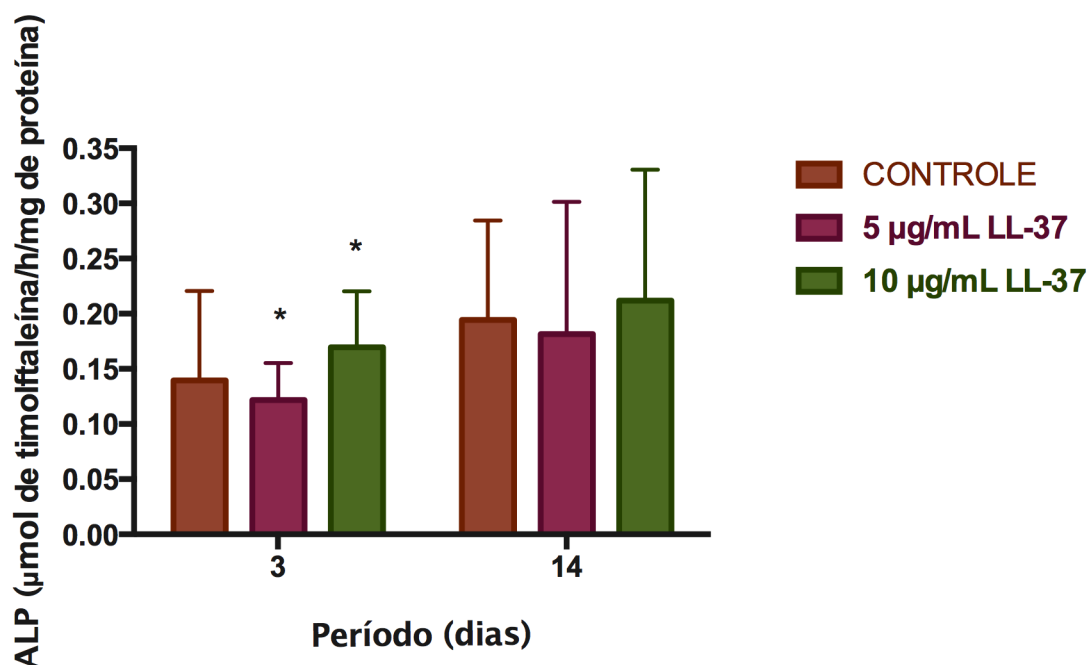
Os dados obtidos nesse teste indicaram que no período de 3 dias, a ALP no grupo tratado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 foi estatisticamente diferente daquela apresentada no grupo tratado com 5 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo ($p=0,02$), entretanto nenhum dos grupos tratados se diferiu do grupo controle. No período de 14 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos. Ainda, não foi observado diferença estatística entre os mesmos grupos em períodos diferentes. A média e desvio padrão dos resultados obtidos na ALP, e ainda a diferença estatística entre os grupos, podem ser observados na tabela 7 e figura 11, respectivamente.

Tabela 7 – Média (M) e desvio padrão (DP) da ALP (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína) após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 e 14 dias

Grupos	Média da ALP (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína)		Desvio Padrão (μmol de timolftaleína/h/mg de proteína)	
	3 dias	14 dias	3 dias	14 dias
Controle	0,13	0,19	0,08	0,09
5 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	0,12	0,18	0,03	0,12
10 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	0,16	0,21	0,05	0,11

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Gráfico representativo da ALP após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 e 14 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Ensaio imunoenzimático ELISA

Os resultados em absorbância do dados obtidos nesse teste, foram convertidos para concentração de DSPP ($\mu\text{g/mL}$) a partir da curva-padrão estabelecida por concentrações conhecidas dessa proteína, fornecidas pelo fabricante. A média e desvio padrão dos resultados obtidos no ensaio imunoenzimático ELISA podem ser observados na tabela 8. Foi observado que os valores de DSPP produzido por todos os grupos, estavam dentro da curva padrão.

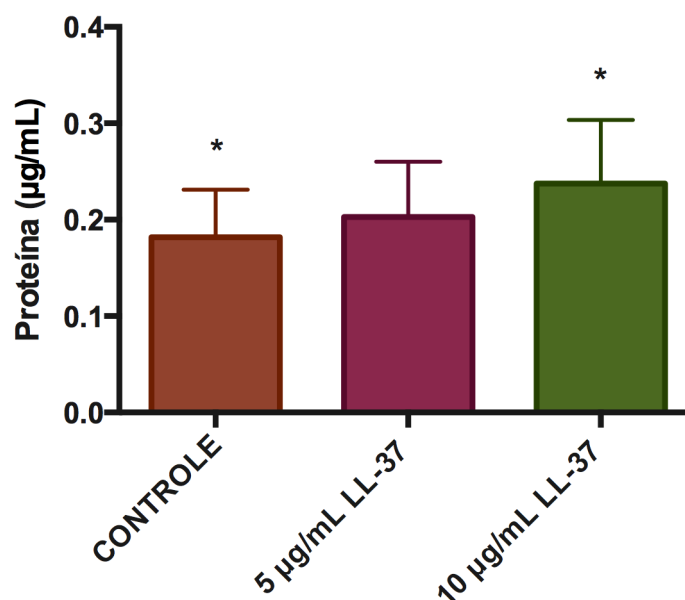
A análise estatística pelo teste Mann-Whitney U ($p \leq 0,05$) dos dados obtidos nesse ensaio indicaram que a concentração de DSPP ($\mu\text{g/mL}$) no grupo tratado com $5 \mu\text{g/mL}$ de LL-37 não é diferente daquela apresentada pelo grupo controle, enquanto o grupo tratado com $10 \mu\text{g/mL}$ de LL-37 apresenta diferença estatística para o grupo controle ($p=0,02$), exibindo maior quantidade dessa proteína. Quando os grupos tratados com o peptídeo foram comparados entre si, não foi observado diferença estatisticamente significativa. A média, desvio padrão e a diferença estatística entre os grupos, podem ser observados na figura 12.

Tabela 8 – Média (M) e desvio padrão (DP) da concentração de DSPP ($\mu\text{g/mL}$), obtida no ensaio imunoenzimático ELISA, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 dias

Grupos	Concentração média de DSSP ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g/mL}$)
Controle	0,18	0,04
5 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	0,20	0,05
10 $\mu\text{g/mL}$ LL-37	0,23	0,06

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Gráfico representativo da concentração de DSPP, obtida no ensaio imunoenzimático ELISA, após exposição das células a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 por 3 dias



Legenda: (*) indica diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Existe uma busca por *scaffolds* que liberem moléculas que apresentem função antimicrobiana e/ou que possam auxiliar na regeneração do complexo dentino-pulpar de dentes permanentes imaturos, após necrose da polpa, contribuindo para diferenciação de células DPSC em odontoblastos (Albuquerque et al., 2014). Assim, um grande número de moléculas bioativas têm sido investigadas, para administração controlada (Yoo et al., 2009).

Recentemente, foi demonstrado que o ácido hialurônico induz a diferenciação de células DPSC em odontoblastos, via ativação do marcador CD-44, o qual é fortemente expresso por células submetidas à mineralização (Umemura et al., 2016). No presente estudo, o peptídeo LL-37 foi investigado quanto a sua biocompatibilidade, em determinadas concentrações, e capacidade de contribuir para diferenciação de células DPSC em *odontoblastos-like*, uma vez que alguns estudos sugeriram que o LL-37 poderia ser utilizado como um adjunto para regeneração do complexo dentino-pulpar (Ramos et al., 2011; Khung et al., 2015).

Em estudos prévios, diferentes concentrações de LL-37 foram testadas, dentre elas as concentrações de 5 e 10 µg/mL (Ramos et al., 2011; Kittaka et al., 2013a; Khung et al., 2015). Em 2015, Khung et al. demonstraram que o LL-37 eleva a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células pulpare e que este aumento é dose dependente, com melhores resultados na concentração de 10 µg/mL. Adicionalmente, Kittaka et al. (2013a) comprovaram significativa proliferação de células-tronco mesenquimais (MSCs) de calvária de ratos após contato com 10 µg/mL de LL-37 por 24 horas. Devido a esses resultados, foi estabelecido que as concentrações de 5 e 10 µg/mL de LL-37 seriam testadas no presente trabalho.

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que esse peptídeo nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não é citotóxico e nem genotóxico para as células DPSC. Um trabalho prévio avaliou a citotoxicidade do LL-37 após 24 horas de contato com células endoteliais e os autores também concluíram que o LL-37 não é citotóxico nas concentrações de 5 ng/mL a 10 $\mu\text{g/mL}$. Ainda, foi observado que o LL-37 aumentou levemente a viabilidade celular nas concentrações de 50 e 500 ng/mL (Ramos et al., 2011). Em 2005, Shaykhiev et al. observaram que o LL-37 estimula a proliferação de linhagem celular derivada de carcinoma mucoepidermóide brônquico (NCI-H292), de uma maneira dose dependente, e que é citotóxico para essas células a partir da concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$.

No presente trabalho, além de não ter sido citotóxico em ambas as concentrações, o LL-37 aumentou a viabilidade celular indicando que pode ter estimulado a proliferação das células DPSC, principalmente na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, assim como foi observado no estudo de Kittaka et al. (2013a), após 24 horas de contato. Ainda, esse aumento foi mais evidente após 3 dias de contato com as células, o que sugere que o LL-37 favorece a proliferação em estágios iniciais de contato.

Um estudo prévio demonstrou que o fator de necrose tumoral (TNF- α), uma importante citocina liberada durante o processo inflamatório, induz a proliferação de células DPSC e que esse processo é influenciado pelo estímulo do ciclo celular por aumento de expressão de ciclina D1 (Qin et al., 2015), a qual é conhecida por desempenhar um papel chave na regulação da transição da fase G1 para a fase S (Pestell, 2013).

No presente trabalho, foi observado maior número de células na fase G0/G1, assim como em estudos prévios que também avaliaram o ciclo celular em células DPSC, em períodos de até 3 dias (Umemura et al., 2016; Wang et al., 2016). A proliferação de DPSCs, proporciona um número apropriado de

células para a diferenciação celular (Qin et al., 2015). Em um trabalho prévio, a ATP (Adenosina 50–trifosfato) promoveu a proliferação celular em baixas concentrações, porém em altas concentrações inibiu a proliferação das células ao retê-las no estágio G0/G1 do ciclo celular, favorecendo a diferenciação odontoblástica e a mineralização (Wang et al., 2016).

No presente estudo, observou-se maior número de células nas fase G0/G1, e menor número de células nas fases S e em G2/M, no grupo tratado com 10 µg/mL de LL-37, em comparação com o grupo controle. Esses resultados indicam que o LL-37 na maior concentração retardou o ciclo celular, fenômeno que pode estar relacionado com a indução de diferenciação, uma vez que maior número de células viáveis estavam presentes no grupo tratado com 10 µg/mL de LL-37, após 3 dias de tratamento. Por esse motivo, os testes adicionais para avaliação de diferenciação, que incluíram avaliação da expressão gênica, atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e ensaio imunenzimático ELISA foram realizados nesse período.

Para avaliação da genotoxicidade, ou seja para detecção de dano genético nas células, foi realizado o teste do micronúcleo. Nenhum trabalho prévio avaliou o potencial genotóxico do LL-37 embora um estudo tenha revisado o papel desse peptídeo na carcinogênese. Esses autores observaram que a super-expressão do LL-37 promove o desenvolvimento e progressão do câncer de ovário, pulmão e mama; e por outro lado a supressão da tumorigênese no câncer de cólon e gástrico (Piktel et al., 2016). No presente trabalho, as concentrações de 5 e 10 µg/mL desse peptídeo não exibiram nenhum potencial genotóxico para as células.

Como o LL-37 é produzido por várias células, principalmente por neutrófilos, em condições inflamatórias (Bals et al., 1998; Frohm Nilsson et al., 1999; Agerberth et al., 2000) e a produção de óxido nítrico, também ocorre nessas condições (Yasuhara et al., 2007), uma possível relação entre esse

componentes foi averiguada nesse trabalho. O óxido nítrico é produzido em grandes quantidades em resposta à infecção e estímulos inflamatórios em vários tecidos, incluindo a polpa dentária. Além disso, um estímulo mecânico, causado na preparação dente, também pode induzir a produção desse óxido. Em 2007, Yasuhara et al. sugeriram que o óxido nítrico pode desempenhar um papel na diferenciação odontoblástica e subsequente formação de dentina reparativa, ao mesmo tempo em que suprime o crescimento e acelera a apoptose, de uma maneira dose dependente. Nesse trabalho não foi possível estabelecer esse tipo de relação uma vez que as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de LL-37 não influenciaram na produção de óxido nítrico pelas células DPSC.

O fenótipo de odontoblastos primário pode ser definido pela morfologia das células e da matriz que secreta, bem como pelo seu padrão de expressão gênica, conduzindo à síntese e secreção de proteínas características da matriz dentinária. Uma variedade de moléculas contribui na cascata de sinalização resultando na diferenciação de *odontoblastos-like* (Goldberg, Smith, 2004).

A expressão de DMP-1 e DSPP em odontoblastos funcionais em estágios iniciais da odontogênese é consistente com a hipótese de que tanto o gene DMP-1 quanto o DSPP desempenham papel importante na mineralização da dentina (D'souza et al., 1997). O DMP-1 é inicialmente expresso na diferenciação de odontoblastos e osteoblastos e facilita a expressão de outros marcadores expressos por essas células. Dessa forma, a expressão desse gene é necessária em estágios precoces e tardios da odontogênese. Já o gene DSPP, é principalmente expresso em odontoblastos e, em menor grau, em osteoblastos. A conversão de pré-dentina em dentina é prejudicada pela falta desse gene, sendo que muitas mutações pontuais no DSPP têm sido relacionadas à dentinogênese imperfeita (DGI) e à displasia dentinária (DD), que são as duas doenças hereditárias mais comuns que afetam a dentina (Suzuki et al., 2012).

A sialofosfoproteína dentinária (DSPP), uma proteína de matriz não

colagenosa de odontoblastos, é codificada pelo gene DSPP e proteoliticamente clivada em sialoproteína da dentina (DSP) e fosfoproteína da dentina (DPP) (Guo et al., 2014). Tanto a proteína DPP quanto a DSP estão envolvidas na mineralização dentinária, sendo que a primeira parece desempenhar papel importante no início da mineralização, e a última tem sido relacionada a maturação da dentina (Suzuki et al., 2009).

Alguns estudos têm comprovado aumento da expressão dos genes DSPP e DMP-1, (Han et al., 2014; Soares et al., 2016) e proteína DSP (Han et al., 2014) após tratamento específico associado ao uso de meio osteogênico (Han et al., 2014; Soares et al., 2016). Em 2016, Soares et al. observaram que a biomembrana composta por quitosan/matriz de colágeno incorporada com micropartículas de aluminato de cálcio, leva ao aumento da expressão desse genes em células DPSC, após 28 dias. Por outro lado, estudos prévios também demonstraram que, dependendo do estímulo, células DPSC podem apresentar aumento de expressão dos genes DSPP e DMP-1, mesmo sem o uso de agente indutor de mineralização (Umemura et al., 2016; Wang et al., 2016), metodologia adotada no presente trabalho. Em 2016, Wang et al. observaram que a expressão dos genes DSPP e DMP-1 aumentou após tratamento com ATP por 24 e 48 horas, enquanto Umerura et al. (2016) observaram aumento de expressão desses genes e das proteínas DSPP e DMP-1 após 24 horas de tratamento com ácido hialurônico, ambos sem utilização de meio osteogênico. Esses resultados sugerem que, sob condições favoráveis, esse marcadores e proteínas importantes na dentinogênese podem ser expressos em períodos precoces, mesmo na ausência de meio indutor de mineralização.

Nesse trabalho as células tratadas com 10 µg/mL do peptídeo induziram maior produção da proteína DSPP, o que sugere que o LL-37 pode desempenhar um papel na diferenciação de células-tronco para odontoblastos, de uma maneira dose dependente.

Ao avaliarem culturas de DPSC e BMSC, após indução de mineralização, Gronthos et al. (2000) observaram um padrão semelhante de marcação para ambos os tipos celulares, para uma variedade de marcadores associados ao endotélio, músculo liso e osso. Dentre os marcadores ósseos, a fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteonectina, osteopontina e osteocalcina, demonstraram padrão semelhante de marcação nos dois tipos celulares enquanto a sialofosfoproteína óssea (BSP) estava ausente em culturas de DPSC e presente em baixos níveis em culturas de BMSC.

Em um trabalho prévio Han et al. (2014) demonstraram maior expressão dos genes DSPP, DMP-1, ALP, BSP and OCN em células pulpare e sugeriram que a B-Catenina induz a diferenciação odontoblástica dessas células, pela ativação do gene Runx2. Outro autores porém, sugeriram que o gene Runx2 pode ativar ou suprimir a expressão do gene DSPP, como consequência fisiológica (Chen et al., 2005), e que a expressão do Runx2 deve ser inibida com intuito de se manter a diferenciação odontoblástica e a dentinogênese (Li et al., 2011).

Interessantemente, trabalhos prévios demonstraram que certas substâncias podem induzir a diferenciação odontogênica e inibir a osteogênica (Umemura et al., 2016), e vice-versa (Xie et al., 2017). Assim, a diferenciação de células-tronco em linhagens osteoblásticas ou odontogênicas não pode ser considerada um processo independente, e os eventos que governam um destino celular podem inibir os mecanismos que levam à diferenciação para outra linhagem (Xie et al., 2017).

Previamente, Kittaka et al. (2013a) demonstraram que os genes Runx2, Smad7, Spp1, ALP, BMP-2 e OCN, todos relacionados a osteogênese, não são afetados pela estimulação com 10 µg/mL de LL-37, em células MSCs da calvária de ratos. De maneira semelhante, nesse trabalho o tratamento com LL-37, em ambas as concentrações, não levou ao aumento da expressão dos

marcadores osteogênicos ALP, OCN, OPN e Runx2, sendo que a maior parte deles foi sub-expresso no grupo tratado, em comparação com o controle.

Em 2017, Xie et al. investigaram o potencial do grafeno (Gp) para indução de diferenciação odontoblástica e osteogênica em células DPSC. Eles observaram que o Gp regula negativamente a expressão dos genes odontoblásticos MSX-1, PAX and DMP e positivamente tanto a expressão dos genes, como das proteínas Runx2 e OCN, sem o uso de indutores químicos para osteogênese. Dessa forma, concluíram que esse material induz a diferenciação osteogênica, porém não induz a odontoblástica. No presente trabalho, embora os genes DSPP e DMP-1 não tenham sido avaliados, os resultados de maior produção da proteína DSPP no grupo tratado pelo LL-37 na concentração de 10 µg/mL, associados aos resultados de expressão gênica dos marcadores ósseos, indicam uma situação contrária.

De maneira coerente com os resultados do PCR, a atividade de fosfatase alcalina não aumentou em relação ao controle, nos grupos tratados pelo LL-37, aos 3 dias. Adicionalmente, o período de 14 dias também foi avaliado, demonstrando que mesmo em estágio tardio o LL-37 não induziu aumento da ALP, e portanto não parece ser importante para a diferenciação osteogênica, em células DPSC, assim como foi demonstrado previamente em células MSCs de calvária de ratos (Kittaka et al., 2013a).

Por outro lado, aos 14 dias foi observado aumento do conteúdo de proteína total após tratamento com ambas as concentrações de LL-37, o que indica que esse peptídeo induz a síntese proteica não relacionada a osteogênese, em períodos tardios. Como houve aumento da proteína DSPP aos 3 dias, após tratamento com 10 µg/mL de LL37 e a diferenciação odontogênica pode levar a inibição da diferenciação osteogênica (Umemura et al., 2016), a qual foi evidenciada nesse trabalho, pode ser que o LL-37 desempenhe um papel importante na diferenciação de células DPSC para *odontoblastos-like*, pelo

aumento de produção da proteína DSPP. Isso poderia ser ainda mais evidente após um período maior de contato das células com o peptídeo, onde foi observado maior conteúdo de proteína total, ou até mesmo em concentrações superiores de LL-37, já que foi demonstrado nesse estudo que a concentração de 10 µg/mL desse peptídeo é melhor para as células DPSC que a de 5 µg/mL .

Em conjunto, os resultados desse trabalho indicam que o LL-37 na concentração de 10 µg/mL de LL-37 aumenta o número de células viáveis, possivelmente induzindo a proliferação celular em estágios iniciais de contato. No 3º dia, esse peptídeo promoveu um retardamento do ciclo celular no grupo tratado com 10 µg/mL de LL-37, fenômeno que pode estar relacionado com início de diferenciação precoce no grupo que até então havia se proliferado mais. Ainda, também aos 3 dias, foi observado aumento de produção da proteína DSPP, nesse mesmo grupo, o que pode indicar um processo de diferenciação para uma linhagem odontoblástica.

Outros estudos que incluam a expressão dos genes DSPP e DMP-1, e suas respectivas proteínas, em períodos iniciais e tardios de contato das células DPSC com o LL-37, são necessários, a fim de se avaliar a diferenciação dessas células para *odontoblastos-like* após contato com esse peptídeo.

6 CONCLUSÃO

O LL-37 tanto nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ quanto na 10 $\mu\text{g/mL}$ é biocompatível, aumenta o número de células viáveis e ainda parece desempenhar algum tipo de função na diferenciação odontoblástica de uma maneira dose dependente.

REFERÊNCIAS*

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.

Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2014;93(12):1222-31. doi: 10.1177/0022034514549809.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9541-6.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30(4):196-200. doi: 10.1097/00004770-200404000-00003.

Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*. 2009;35(10):1343-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.021.

Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2013;92(11):963-9. doi: 10.1177/0022034513505770.

Brar GS, Toor RS. Dental stem cells: dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian J Dent Res*. 2012;23(3):393-7. doi: 10.4103/0970-9290.102239.

Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*. 2010;89(6):603-8. doi: 10.1177/0022034510364487.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater*. 2013;29(1):97-102. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.002.

Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluhak-Heinrich J, et al. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29717-27. doi: 10.1074/jbc.M502929200.

Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S6-12. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.019.

D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12(12):2040-9. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.12.2040.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15258-63. doi: 10.1074/jbc.272.24.15258.

Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun*. 1999;67(5):2561-6.

Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):333-9. doi: 10.1177/0022034511405326.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27. doi: 10.1177/154411130401500103.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797.

Guo S, Lim D, Dong Z, Saunders TL, Ma PX, Marcelo CL, et al. Dentin sialophosphoprotein: a regulatory protein for dental pulp stem cell identity and fate. *Stem Cells Dev.* 2014;23(23):2883-94. doi: 10.1089/scd.2014.0066.

Han N, Zheng Y, Li R, Li X, Zhou M, Niu Y, et al. β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS One.* 2014;9(2):e88890. doi: 10.1371/journal.pone.0088890.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2013;39(3 Suppl):S30-43. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.025.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* 1997;23(1):39-42. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80205-1.

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

Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK, et al. Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. *J Endod.* 2009;35(6):858-65. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.049.

Kajiya M, Shiba H, Komatsuzawa H, Ouhara K, Fujita T, Takeda K, et al. The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics. *J Endod.* 2010;36(6):1009-13. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.028.

Kandler K, Shaykhiev R, Kleemann P, Kleszcz F, Lohoff M, Vogelmeier C, et al. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *Int Immunol.* 2006;18(12):1729-36. doi: 10.1093/intimm/dxl107.

Khung R, Shiba H, Kajiya M, Kittaka M, Ouhara K, Takeda K, et al. LL37 induces VEGF expression in dental pulp cells through ERK signalling. *Int Endod J.* 2015;48(7):673-9. doi: 10.1111/iej.12365.

Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Fujita T, Iwata T, Rathvisal K, et al. The antimicrobial peptide LL37 promotes bone regeneration in a rat calvarial bone defect. *Peptides.* 2013a;46:136-42. doi: 10.1016/j.peptides.2013.06.001.

Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Ouhara K, Takeda K, Kanbara K, et al. Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2013b;48(2):228-34. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01524.x.

Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):10957-70. doi: 10.1007/s11033-012-1997-x.

Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.* 1992;37(11):945-52. doi:10.1016/0003-9969(92)90066-H.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995;63(4):1291-7.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):93-8.

Li S, Kong H, Yao N, Yu Q, Wang P, Lin Y, et al. The role of runt-related transcription factor 2 (Runx2) in the late stage of odontoblast differentiation and dentin formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(3):698-704. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.065.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. Mutat Res.* 1998;410(1):81-116.

Morsczeck CO, Drees J, 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;57(12):1595-601. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.016.

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

Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod*. 2014;40(2):192-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.027.

Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol*. 1994;162(1):18-28. doi: 10.1006/dbio.1994.1063.

Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, et al. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod*. 2007;33(10):1187-91. doi: 10.1016/j.joen.2007.05.015.

Palasuk J, Kamocki K, Hippenmeyer L, Platt JA, Spolnik KJ, Gregory RL, et al. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J Endod*. 2014;40(11):1879-84. doi: 10.1016/j.joen.2014.07.017.

Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013;183(1):3-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.03.001.

Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, et al. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(1):33-46. doi: 10.1007/s00005-015-0359-5.

Qin Z, Li Y, Liu G. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Proliferation of Dental Pulp Stem Cells via Akt/Glycogen Synthase Kinase-3 β /Cyclin D1 Signaling Pathway. *J Endod*. 2015;41(7):1066-72. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.020.

Ramos R, Silva JP, Rodrigues AC, Costa R, Guardão L, Schmitt F, et al. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides*. 2011;32(7):1469-76. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.005.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(2):258-61. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.02.080.

Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012;38(10):1372-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.018.

Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:624-32. doi: 10.1100/tsw.2010.58.

Shaykhiev R, Beisswenger C, Kändler K, Senske J, Püchner A, Damm T, et al. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(5):L842-8. doi: 10.1152/ajplung.00286.2004.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol.* 1998;174(2):194-205. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199802)174:2<194::AID-JCP7>3.0.CO;2-J.

Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CA. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e54. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0054.

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;57(9):1165-75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009;28(4):221-9. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.006.

Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992;37(12):1045-55.

Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M, Kikuchi H, Katayama T, Sakagami H. Hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via CD44. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):135. doi: 10.1186/s13287-016-0399-8.

Wang W, Yi X, Ren Y, Xie Q. Effects of Adenosine Triphosphate on Proliferation and Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2016;42(10):1483-9. doi: 10.1186/s13287-016-0399-8.

Xie H, Chua M, Islam I, Bentini R, Cao T, Viana-Gomes JC, et al. CVD-grown monolayer graphene induces osteogenic but not odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2017 Jan;33(1):e13-e21. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.030.

Yasuhara R, Suzawa T, Miyamoto Y, Wang X, Takami M, Yamada A, et al. Nitric oxide in pulp cell growth, differentiation, and mineralization. *J Dent Res.* 2007;86(2):163-8. doi: 10.1177/154405910708600211.

Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(12):1033-42. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.007.