



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

LARISSA DE SOUZA OLIVEIRA

**Efeito combinado de KR-12-a5 e EGCG sobre a viabilidade
e potencial de mineralização em células pulpare para
aplicabilidade endodôntica**

Araçatuba
2022

LARISSA DE SOUZA OLIVEIRA

**Efeito combinado de KR-12-a5 e EGCG sobre a viabilidade
e potencial de mineralização em células pulpares para
aplicabilidade endodôntica**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP para obtenção de título de
bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Associada Cristiane
Duque

Araçatuba
2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a realização do sonho de cursar uma Universidade Pública, por me guiar em toda a jornada com determinação, sabedoria para compreender os dias mais difíceis e fé para seguir em frente. Gratidão também a tantas graças e vitórias recebidas ao longo da graduação.

A minha querida mãe, Talita, que desde cedo assumiu a responsabilidade da maternidade, e se dedicou arduamente para proporcionar uma educação de excelência para mim, a todo o momento acreditando nos meus sonhos, me incentivando e segurando a minha mão nos momentos difíceis, gratidão por ser meu alicerce, minha melhor amiga e minha base. Ela sempre está no meu coração e é parte do que sou hoje.

Agradeço a minha família, meus avós Pedro e Aparecida, que sempre foram inspiração e modelo de honestidade, integridade e amor, sem eles nada seria possível, pois sempre fizeram questão de dar todo suporte emocional e financeiro necessário para a realização desse sonho, eles são minha maior riqueza. Também ao meu padrasto Tiago, que me acolheu desde pequena e que é como um pai, que cuida, apoia e faz tudo o que pode por mim. Ao meu irmão mais novo, Pedro, que esteve nos meus pensamentos e coração todos os dias, minha maior saudade nos anos de graduação e que é minha força e estímulo. Aos meus padrinhos Tatiana e Fábio que participam ativamente da minha vida e sempre me apoiam, à minha tia Taís e primos Hayane, Fábio e Ana Clara por torcerem por mim.

Ao meu namorado Gabriel que esteve presente em todos os momentos da minha graduação, com muita sensibilidade, escuta e carinho, fazendo o possível e o impossível para me ver feliz, e que sempre vibra e torce pelas minhas vitórias. Ele me motiva a ser cada vez melhor e me inspira por ser um exemplo por buscar fazer um trabalho de excelência na odontologia. Também aos meus sogros, Tereza e Marcos que são fonte de admiração na vida e profissão, por serem tão humanos e competentes profissionais, e por fazerem tanto por mim.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por toda formação e crescimento pessoal e profissional proporcionados, por tantas conquistas construídas nesse local querido, que chamo carinhosamente de lar, onde pude

conhecer tantas pessoas queridas. A todos os professores, funcionários e pacientes que contribuíram para a minha formação.

A professora Dra. Cristiane Duque e a pós doutoranda Karina Caiaffa por terem me proporcionado a chance de iniciar uma Iniciação Científica com bolsa FAPESP, onde pude aprender muito e me encantar pela pesquisa. Toda a minha admiração por elas, que sempre tiveram muita paciência e boa vontade em me ensinar. Gratidão pela ligação e carinho que construímos, que foi além da relação profissional, foram verdadeiras amigas, que sempre me aconselharam e me direcionaram na minha trajetória serei grata eternamente e estarão no meu coração como grande fonte de inspiração.

Aos alunos de pós-graduação da disciplina de Odontopediatria e Endodontia que me ensinaram tanto e acolheram muito bem, em especial a doutoranda Vanessa Rodrigues por ter aceito o convite de compor minha banca e por sempre acrescentar muito no meu aprendizado tanto na pesquisa quanto nas clínicas de Odontopediatria. Também ao doutorando Jesse Augusto por toda disponibilidade em me ensinar e ajudar durante a pesquisa.

Ao professor Dr. Leonardo Perez Faverani que esteve comigo no grupo PET e Cursinho D.A.C.A, com ele tive a oportunidade de aprender muito sobre organização e trabalho em equipe. Ele é um professor muito querido e humano, que entrega tudo que faz com amor e excelência. Tenho carinho e admiração imensa por ele.

Ao grupo PET e a todos os petianos e tutores que pude conviver, que foram para mim como uma família, construímos juntos muitas lembranças felizes e dias de muito aprendizado e trabalho em equipe.

Ao Cursinho Pré-Vestibular D.A.C.A e a todos os professores, secretários e alunos, do qual pude atuar como professora e fui muito feliz durante esses 5 anos, foram dias de muito aprendizado e que me fizeram ter a certeza da escolha para a minha vida de seguir a docência serei grata eternamente a esse grupo que foi uma família querida por tantos anos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2019/27317-0 e nº2022/02591-5, por me conceder a oportunidade de ter bolsa de iniciação científica.

As meninas que moraram comigo durante os primeiros anos da graduação, Ana Flávia Piqueira e Aretuza Bottós, elas foram fundamentais no início da graduação, me acolheram como família e sempre fizeram tudo que estava ao alcance delas para me ajudar, vivenciamos muitas histórias engraçadas e momentos felizes juntas, serei extremamente grata e levarei sempre no coração. Nos últimos anos, à Maria Paula que foi uma verdadeira irmã e companheira diária no nosso apartamento, sempre muito atenciosa e carinhosa, ela foi muito importante na minha caminhada.

Aos meus amigos, de modo especial, à Thais Cougo Gomes que foi meu braço direito em toda graduação, me estendendo a mão e me acolhendo em todos os momentos difíceis, com ela tive momentos inesquecíveis, de uma amizade que sempre quero ter por perto, também a minha querida amiga Tatiany Castro que sempre foi companheira de festa, conversas e minha dupla. Aos amigos Luis Fernando Alves e Dionatan de Oliveira por todos os dias de estudos que tivemos juntos e por nossa amizade. As amigas Amanda Dias e Yana Maia por sempre me acolherem e tratarem tão bem. As minhas duplas de clínica que sempre foram muito comprometidas e que acrescentaram muito ao meu aprendizado profissional e pessoal.

Aos demais amigos e colegas de turma, um carinho enorme por essa turma que esteve comigo durante toda a jornada, vivenciamos juntos muitos momentos de alegria, festa, comemoração e também momentos de agonia, de ansiedades em véspera de prova, de estudos, eles sempre me acolheram e apoiaram muito, foram essenciais na minha caminhada, e tenho a certeza de que juntos caminhamos mais longe.

“O homem nasceu para aprender,
aprender tanto quanto a vida lhe permita”

- João Guimarães Rosa

OLIVEIRA, L.S. **Efeito combinado de KR-12-a5 e EGCG sobre a viabilidade e potencial de mineralização em células pulpares para aplicabilidade endodôntica.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Um dos grandes desafios da Endodontia e da Odontopediatria é o tratamento de dentes permanentes imaturos que sofreram danos pulpares irreversíveis, pois além de tratar a infecção, deve permitir o fechamento natural do ápice e, muitas vezes estimular a reparo da lesão periapical. Em busca de compostos com ampla atividade terapêutica, peptídeos catiônicos antimicrobianos e derivados de plantas como os flavonoides, têm recebido destaque na literatura médica, mas ainda poucos estudos têm avaliado seus efeitos para aplicação em Odontologia. O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* a viabilidade celular e capacidade indutora de mineralização dentinária da combinação do peptídeo antimicrobiano KR-12-a5 e do flavonoide EGCG. Células pulpares indiferenciadas humanas (hDPC) foram expostas a concentrações pré-determinadas de EGCG e KR-12-a5, de forma isolada ou combinada, em comparação ao controle Hidróxido de cálcio (HC), sendo estes diluídos em meio osteogênico de forma contínua por 24h, 48h e 72h e determinada a viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico de resazurina. Imagens das células tratadas com os compostos por 48h foram obtidas em microscopia de fluorescência com a coloração DAPI(4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) e realizada a contagem das células coradas/área. Foram realizados ensaios de vermelho de alizarina evidenciando os depósitos de nódulos mineralizados e estes foram conduzidos em paralelo com a viabilidade celular nos períodos de 13 e 21 dias. Também foram realizados os ensaios de produção de proteína total e de fosfatase alcalina, assim, após o tratamento das células com as concentrações pré-estabelecidas dos compostos isolados e em combinação diluídos em meio osteogênico por 48 horas e realizadas trocas de meio osteogênico até completar 13 dias. Os valores dos dados apresentaram distribuição normal (homogeneidade) e as variáveis foram submetidas à ANOVA e em seguida pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$). Todas as análises foram realizadas com limite de significância de 5 %. Os resultados obtidos mostraram que em baixas concentrações, EGCG e KR-12-a5

isolados ou combinados não foram tóxicos para as células pulpares. EGCG isolado e combinado com KR-12-a5 foram capazes de induzir a mineralização no tempo de 21 dias e estimular a atividade da fosfatase e produção de proteína total no tempo de 13 dias. Conclui-se que a associação de KR-12-a5 e EGCG é benéfica, uma vez que em baixas concentrações não causaram citotoxicidade e induziram a expressão de marcadores de mineralização nas células pulpares, podendo ser considerados, dessa forma, uma alternativa natural promissora de princípio ativo para medicação intracanal.

Palavras-chave: Flavonoides. Peptídeos catônicos antimicrobianos. Células pulpares indiferenciadas

OLIVEIRA, L.S. **Combined effect of KR-12-a5 and EGCG on viability and mineralization potential in pulp cells for endodontic applicability.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduation in Dentistry) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

One of the challenges of Endodontics and Pediatric Dentistry is the treatment of immature permanent teeth, many irreversible pulp damages, as they will allow the natural closure of the apex of the lesion, sometimes simulating a periapical. In studies of broad therapeutic activity, antimicrobial cationic peptides and plant products such as flavonoids have been highlighted in the literature, but their effects for application in dentistry have yet to be evaluated. The objective of the study was invitro the cell viability and the dentinal mineralization inducing capacity of the antimicrobial peptide KR-12-a5 and the flavonoid EGCG. Human undifferentiated pulp cells (HC) oxides released in predetermined osteogenic medium of EGCG and KR-12-a5, alone or in combination, compared to the control Calcium hydroxide (HC), being diluted in osteogenic medium continuously by 24h, 48h and 72h and determined cell viability through the resazurin colorimetric assay. Images of the cells treated with the compounds for 48h were obtained in fluorescence microscopy with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich) staining and stained cells/area were counted. Cellular assays of red numbers at 1 days of probability and 21 days assays of cellular occurrences occurred in probability numbers were performed. Assays were also carried out for the production of total and alkaline phosphatase, protein, after the treatment of the cells with the pre-established compounds isolated and diluted in osteogenic medium for 48 hours and changes of osteogenic medium were carried out until completing 13 days. The data values showed normal distribution (homogeneity) and variables were submitted to ANOVA and then to the Tukey test ($p < 0.05$). All analyzes were performed with a significance limit of 5%. The results obtained showed that at low concentrations, EGCG and KR-12-a5 alone or in combination were not toxic to the pulp cells. EGCG alone and combined with KR-12-a5 was able to induce mineralization at 21 days and stimulate phosphatase activity and total protein production at 13 days. It is concluded that the association of KR-12-

a5 and EGCG is beneficial since in low concentrations they did not cause cytotoxicity and induced the expression of mineralization markers in pulp cells, and thus can be considered a promising natural alternative of active ingredient for intracanal medication.

Key-words: Flavonoids. Antimicrobial cationic peptides. Undifferentiated pulp cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da Endodontia e da Odontopediatria é o tratamento de dentes permanentes imaturos que sofreram danos pulpares irreversíveis, pois além de tratar a infecção, deve permitir o fechamento natural do ápice e, muitas vezes estimular a reparo da lesão periapical. Após a erupção completa do dente, ainda são necessários três a quatro anos para o desenvolvimento completo dos canais e o fechamento dos ápices radiculares. Diante de algum tipo de trauma ou infecção, esses processos podem ser interrompidos e o fechamento natural do ápice não ocorre. As paredes dentinárias finas e raízes curtas do dente imaturo dificultam a desinfecção e a execução dos procedimentos endodônticos convencionais, comprometendo o seu resultado a longo prazo^{27,53,68}.

Os materiais sintéticos mais indicados para o tratamento de dentes permanentes com comprometimento pulpar/periapical são o hidróxido de cálcio (HC) e agregado de trióxido mineral (MTA). Esses materiais apresentam biocompatibilidade e atividade antimicrobiana, além de estimularem a apicificação (ou seja, a formação de barreira apical e não a completa formação radicular) em dentes permanentes jovens^{10,51,53,56,59}. Entretanto, atualmente há uma corrente de pesquisadores estudando materiais biológicos que possam permitir a regeneração tecidual natural preservando a bainha epitelial de Hertwig e a formação completa das raízes e ápices^{13,27,32,62,63}. O contato da maioria dos materiais sintéticos utilizados para apicificação com o tecido vital residual causa toxicidade sobre as células da bainha epitelial de Hertwig, prejudicando sua capacidade de estimular as células estaminais da papila apical em se diferenciarem em odontoblastos⁴. Embora os tratamentos convencionais utilizados para dentes permanentes jovens frequentemente reduzam os sinais e sintomas causadas pelas infecções pulpares^{51,59}, eles não promovem a continuidade do desenvolvimento radicular, manutenção da nocicepção e defesa imune pulpar normal¹⁴.

Terapias biológicas denominadas de regeneração endodôntica (RE) vêm sendo estudadas com o intuito de recuperar as funções fisiológicas do complexo dentino-pulpar e permitir a formação radicular completa em dentes comprometidos endodonticamente^{20,44}. O primeiro conceito de RE foi preconizado por Banchs e Trope⁴ pela técnica de revascularização, por meio da mínima intervenção

química/mecânica, o uso de uma pasta triantibiótica e a indução do sangramento apical em dentes permanentes jovens com necrose pulpar. Essa técnica tem mostrado estimular o desenvolvimento contínuo da raiz, evidenciado não só pelo aumento do seu comprimento, mas também pelo espessamento das paredes do canal radicular¹⁴. A RE em dentes permanentes jovens apresenta um prognóstico favorável devido à ampla comunicação entre o canal radicular e os tecidos periapicais, via forame apical. Essa vascularização tem se mostrado capaz de manter a viabilidade das células remanescentes, incluindo as células-tronco, mesmo após danos aos tecidos pulpar e/ou periapicais⁶⁵.

As células-tronco ou mesenquimais indiferenciadas são células multipotentes⁸ que apresentam ampla capacidade de auto-renovação e diferenciação^{19,24,38,42}, além de um grande potencial em procedimentos de RE, uma vez que estão presentes na própria polpa dentária de dentes permanentes – DPSCs ou HDPCs¹⁹ ou de dentes decíduos – SHED⁴⁶, ou no ligamento periodontal – PDLSCs³¹ ou ainda na papila apical – SCAP²⁸. Mesmo na presença de processo inflamatório, células da polpa dentária e da região periapical, tem apresentado alta expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais^{1,43}. Atualmente, as novas técnicas de RE envolvem uma fonte celular de células indiferenciadas contidas em arcabouço (*scaffolds*) ou estruturas tridimensionais que permitem a proliferação e diferenciação celular, bem como o emprego de biomateriais ou moléculas de sinalização (superfamília TGF- β , por exemplo) que estimulem esses processos. Em engenharia endodôntica, o *scaffold* deve propiciar a formação de tecido que pode ser produzido em função da concentração das biomoléculas em um determinado tempo. Diversos *scaffolds* poliméricos têm sido usados com sucesso, entretanto, a otimização desses materiais como a liberação controlada de biomoléculas para a formação de tecidos ainda é um desafio²¹.

A busca por tratamentos capazes de promover uma desinfecção eficaz dos canais radiculares sem causar citotoxicidade^{4,32,50} e bioestimular células remanescentes em concentrações não tóxicas^{8,32,68}, ou ainda criar um arcabouço que permita a proliferação e diferenciação de células-tronco^{2,8,21} e ser um reservatório para biomoléculas^{4,32} tem sido alvo de diversos estudos no campo da RE. A análise de marcadores de diferenciação dentinogênica/osteogênica após determinado tratamento proposto em células indiferenciadas^{11,68}, ou ainda em

células diferenciadas que poderiam ser remanescentes à determinada injúria^{39,55,72} tem sido amplamente realizada em estudos que avaliam a capacidade bioestimulatória de diferentes materiais, visando induzir o processo de reparo. Dentre esses marcadores de mineralização estão a fosfatase alcalina (ALP) – enzima detectada nas fases iniciais do processo de mineralização da matriz dentinária ou óssea; cuja expressão ocorre em células envolvidas no processo de mineralização, como os odontoblastos e osteoblastos e as proteínas dentinárias: proteína da matriz dentinária (DMP-1) e sialofosfoproteína dentinária (DSPP) que são proteínas não- colagenosas que participam da mineralização tardia da dentina e maturação das fibras colágenas durante o processo de dentinogênese. Essas proteínas permanecem no interior do substrato dentinário, sendo liberadas em resposta às injúrias teciduais, para estimular odontoblastos primários a produzirem dentina terciária reacional, ou ainda para estimular a diferenciação de células pulpares em odontoblastos que irão produzir dentina terciária reparadora^{12,17}.

Compostos bioativos derivados de plantas como os flavonoides, têm recebido destaque na literatura devido à sua amplitude terapêutica^{58,64}. Estão presentes em pequenas quantidades em frutas e vegetais, geralmente como metabólitos secundários e apresentam papel importante para defesa das plantas contra agentes externos. Estudos tem apontados diversas propriedades farmacológicas dos polifenóis, como ação antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica^{15,52,53,54,58}. Eles apresentam uma estrutura comum (flavona), sendo constituídos por um núcleo 2-phenyl-1,4-benzopyrone consistindo de dois anéis benzênicos ou aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo com as variações no anel C, os flavonoides são divididos nas seguintes classes: flavonas, flavonóis, flavanonas (3-hidroxi-flavona), flavanonol (2,3- dihydroflavonol), flavanóis (ou catequinas), antocianidinas e chalconas.

Flavanóis ou catequinas são flavonoides abundantes na natureza e diversas pesquisas tem avaliado seu potencial farmacológico principalmente quando extraídos do chá verde, produzido da folha da planta *Camellia sinensis*^{26,49,55}. Seu principal flavonoide é o EGCG – *epigallocatechin gallate*^{49,54} que possui atividades biológicas com diversos efeitos benéficos já atribuídos ao chá verde²⁶. O EGCG tem sido apontado como um flavonoide promissor na prevenção e tratamento de câncer,

doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras²⁶. Além dessas aplicações, também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, tanto em células planctônicas como em biofilme, em baixas concentrações³⁶ e contra alguns periodontopatógenos⁵⁷. Com relação ao potencial de mineralização do EGCG, observou-se um efeito estimulatório de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana em osteoblastos, em células -tronco da polpa humana e em células-tronco da papila apical através do aumento da atividade da ALP, expressão de genes relacionados ao processo de dentinogênese e formação de nódulos de mineralização^{29,66,16,35}. Entretanto, em altas concentrações, o EGCG pode resultar em efeitos negativos em células derivadas do osso alveolar de humanos⁴³. O EGCG também é capaz de atuar como um modulador anti-inflamatório em polpas inflamadas, inibindo a expressão de VEGF e COX-2 em células da polpa dentária⁴⁷, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão⁴⁸.

Outros agentes biológicos, como os peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCAM) estão sendo avaliados como agentes desinfectantes em diversos estudos na área médica e atualmente, na odontológica^{18,20,50,71}. Dentre os PCAM, o peptídeo catiônico humano (hCAP-18) é a única catelicidina identificada em seres humanos isolada primeiramente em grânulos de neutrófilos. hCAP-18 é produzida também por células epiteliais do pulmão, intestino, cavidade bucal e trato urogenital, sendo encontrada no plasma seminal e plasma sanguíneo. Após a secreção, ocorre a quebra de hCAP-18 pela ação de proteases em pequenos fragmentos de peptídeos RK-31 e KS-30 e em um peptídeo ativo de cadeia longa LL-37, todos com ação antimicrobiana. Esse último fragmento do peptídeo hCAP-18, o LL-37, é um modulador multifuncional da imunidade inata, envolvendo a função antibacteriana, estímulo de angiogênese, cicatrização cutânea e quimiotaxia de células inflamatórias e do sistema imune. LL-37 atenua a produção de citocinas induzidas por LPS e a expressão de quimiocinas por fibroblastos³¹. A ação antimicrobiana de LL-37 está relacionada à formação de poros na membrana das bactérias e a lise celular, entretanto em altas concentrações (>13μM) pode ser tóxica para as células eucarióticas^{45,73}. KR-12 é o menor fragmento com a mesma atividade antimicrobiana do seu original LL-37⁶⁷. Análogos de KR-12 foram propostos por Jacob *et al.*²⁸ e apresentaram potente ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* metilicina-

resistentes e mantiveram a ação neutralizante contra LPS, sem causar toxicidade às células eucarióticas. Destes, o fragmento KR-12-a5 apresentou a maior atividade antiendotóxica, quase similar à do próprio LL-37. Além disso, o KR-12-a5 apresentou efeito antimicrobiano sobre microrganismos relacionados com infecções endodônticas como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces israelii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans*⁵. Assim, embora existam diversos estudos com peptídeos antimicrobianos e flavonoides, pouco se conhece sobre seus efeitos combinados e ainda mais sobre microrganismos e células de interesse odontológico, principalmente sobre células pulpares. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o efeito da combinação desses agentes sobre marcadores de mineralização em células pulpares indiferenciadas da polpa dentária.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* a viabilidade celular e capacidade indutora de mineralização dentinária da combinação do peptídeo antimicrobiano KR-12-a5 e o flavonoide EGCG em células indiferenciadas da polpa dentária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo – Flavonoides, peptídeos e controles

Neste projeto avaliou-se o seguinte flavonoide: EGCG (epigallocatechin galate #E4143) que foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO/ USA) e o seguinte peptídeo antimicrobiano: KR-12- a5 (KRIVKLILKWLR) que foi sintetizado e caracterizado no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, no IQ-Araraquara, UNESP. A escolha do flavonoide e do peptídeo foi baseada em estudos anteriores desenvolvidos pela equipe da orientadora Caiaffa *et al.*^{5,6} e Duque *et al.*¹⁶. Esses compostos demonstraram isoladamente ação antimicrobiana/antibiofilme (principalmente o KR-12-a5), baixa toxicidade e efeito indutor de mineralização em células odontoblastóides (principalmente o EGCG). Soluções estoques do flavonoide e do peptídeo foram preparadas em água deionizada estéril. Como controle positivo foi utilizado o hidróxido de cálcio PA (Biodinâmica, Ibiporã – PR/BR) dissolvido em água estéril (1mg/mL) diluído em água estéril. Todos os compostos foram esterilizados por filtração em filtro de membrana de 0,22 µm. O peptídeo/flavonoide foi testado individualmente ou em combinação, quanto à sua citotoxicidade e posteriormente analisadas suas propriedades indutoras de mineralização para futura intenção de aplicação em endodontia regenerativa. As concentrações que foram utilizadas seguem abaixo, e são referentes à 10X a Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtida em estudos anteriores desenvolvidos pela equipe da orientadora^{5,7}.

Grupos experimentais:

Hidróxido de cálcio - Diluições seriadas abaixo de 0,6mg/mL

EGCG - Diluições seriadas abaixo de 0,6 mg/mL

KR-12-a5 - Diluições seriadas abaixo de 0,6mg/mL

EGCG + KR-12-a5 – Foram combinadas as concentrações que obtiveram melhor desempenho nos ensaios de viabilidade celular.

Neste estudo foram realizados os seguintes ensaios experimentais: avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico da Rezasurina, viabilidade celular por microscopia de fluorescência DAPI, avaliação da produção de proteína total e fosfatase alcalina e avaliação da deposição de nódulos mineralizados, para elucidar foi feito uma

linha do tempo mostrando a ordem de todos os ensaios assim como os tempos realizados (**Figura 1**).

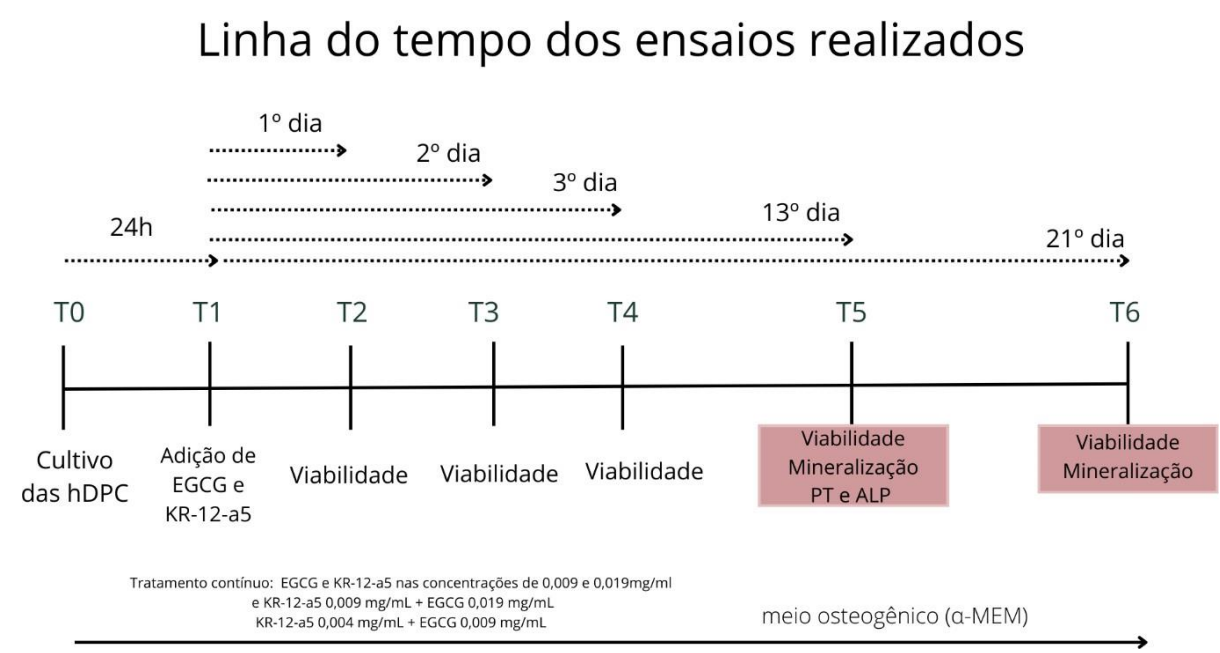


Figura 1. Linha do tempo dos ensaios realizados; em T0- cultivo das células hDPC por 24h; T1- Adição dos compostos EGCG e KR-12-a5 isolados e combinados; T2- viabilidade celular em 24h; T3- viabilidade celular em 48h; T4-viabilidade celular em 72h; T5- Avaliação da viabilidade celular, nódulos de mineralização, produção de proteína total e fosfatase alcalina; T6- Avaliação da viabilidade celular e deposição de nódulos de mineralização.

3.2 Caracterização das hDPC através de marcação por imunofluorescência para os marcadores STRO-1 e CD-146

Depois de atingir 80-90% de confluência, a cultura de hDPC foi expandida e as células na sexta passagem foram semeadas em placas de 24 poços (80% de confluência) e submetido a ensaio de imunofluorescência para os marcadores de células-tronco STRO-1 e CD-146. Em resumo, as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4%, então permeabilizado com Triton 0,1% (Sigma Chemical Co.), e bloqueado em 5% BSA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários (1:50; Santa Cruz Biotechnology) 4° C por 12h , seguido de incubação por 1h com anticorpo secundário conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína. 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) à temperatura ambiente. Depois disso, as células foram incubados com Hoechst (1: 5000; Invitrogen San Francisco, CA, EUA) para contra-fluorescência nuclear. As células foram analisadas no IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany), a porcentagem de células marcadas positivamente foi obtida por meio do Programa de software IN Cell Investigation (GE Healthcare Life Ciências)⁵⁸.

3.3 Avaliação da viabilidade celular

Ensaio de viabilidade celular (este ensaio foi realizado para selecionar as concentrações viáveis para serem utilizadas nos ensaios de indução de mineralização)

Os ensaios de cultura de células foram adaptados de Karanxha *et al.*³². Para o protocolo de obtenção das células de polpa dental humanas foram utilizados dentes hígidos recentemente extraídos, devido indicação profissional, de pacientes adultos livres de doenças sistêmicas. A doação dos dentes e a autorização foram feitas pelo paciente através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (CAAE 22670819.0.0000.5420). Os dentes foram transportados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e sob condições

assépticas, estes foram abertos para remoção da polpa dentária com auxílio de limas endodônticas (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). O tecido coletado foi fragmentado até que as amostras ficassem com aproximadamente 1 mm de espessura. Após a fragmentação foi realizada centrifugação a 200 xg/ 5 minutos em temperatura ambiente e os fragmentos foram ressuspensos, colocados em frascos para cultura de 25 cm² imersos em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 g/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomicina, 0,5 g/mL de anfotericina B – todos os reagentes provenientes da GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA – e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e umidade. As culturas foram mantidas neste primeiro frasco até que as células alcançassem a confluência com trocas de meio a cada 2-3 dias. Após atingir a confluência de aproximadamente 100% as células foram replicadas utilizando tripsina EDTA (SigmaAldrich, St Louis, Missouri, USA). A utilização das células para os ensaios ocorreu a partir da 4ª passagem. As células pulpares indiferenciadas humanas (hDPC) foram caracterizadas seguindo os protocolos utilizados por Soares *et al.* ⁵⁸

Para os ensaios subsequentes em cultura de hDPC foram avaliados os peptídeos/flavonoides isolados ou em combinação e como controle dos experimentos foram utilizados o meio de cultura contendo diluente dos compostos (água ou DMSO) e solução de hidróxido de cálcio (1mg/mL). As hDPC foram cultivadas em meio de cultura α - MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Gibco), 1% de solução de penicilina/estreptomicina (Gibco) e incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C, sendo subcultivadas a cada 2-3 dias. As células foram semeadas (1,5 X 10³ células/ por poço) e pré-incubadas por 24h. Em seguida, as células foram expostas a concentrações pré-determinadas dos peptídeos/flavonoides diluídos em meio osteogênico (α -MEM contendo 10% SFB, suplementado com 5nM de β -glicerofosfato e 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 180 μ L / 100 mL de KH₂PO₄) de forma contínua por 24h, 48h e 72h. O metabolismo celular foi avaliado pelo ensaio colorimétrico com resazurina (Sigma-Aldrich). Este método permite determinar a respiração celular (mitocondrial), considerando a taxa metabólica das células, permitindo monitoramento contínuo das culturas. Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 180 μ L de DMEM e 20 μ L de solução de resazurina (70 μ M) e as células foram incubadas a 37°C durante 4h. Após a incubação, 100 μ L do meio de cultura com

solução de resazurina foi transferido para uma nova placa de microtitulação para a leitura da fluorescência em uma absorbância de 570 e 600 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, USA), foi utilizado a resazurina pura como branco. Determinadas as concentrações não citotóxicas, os ensaios subsequentes serão realizados submetendo as células a não mais que duas concentrações de cada peptídeo/flavonoide ou combinação.

3.4 Microscopia de fluorescência (DAPI)

Para completar a análise de viabilidade celular, um ensaio de microscopia de fluorescência foi realizado com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich), um corante fluorescente que emite cor azul brilhante e apresenta afinidade pelo material genético, sendo absorvido por células vivas.

Como descrito previamente, as células foram expostas aos compostos isolados e nas combinações de KR 0,004 + EGCG 0,009 mg/mL e KR-12-a5 0,009 + EGCG 0,019 mg/mL. Em seguida, as células foram lavadas com 50µL de PBS, e então foram fixadas com 50µm de formaldeído a 3,7% em PBS 1x por 30 minutos, em estufa a 37 °C. Em seguida, foi realizada a aspiração do agente fixador, e as células foram coradas com 80µL de DAPI a 100µg/mL por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após esse período, o corante DAPI foi removido e as células lavadas com 50µL PBS, para análise posterior em microscópio de fluorescência. As células foram fotografadas e também foi quantificado o número de células coradas nas imagens obtidas/área. Cada imagem foi dividida em 4 áreas idênticas e foi contado o número de células/área.

3.5 Produção de proteína total (TP) e de fosfatase alcalina (ALP)

A produção de proteína total foi realizada em paralelo com o ensaio de fosfatase alcalina de acordo com Soares *et al.*⁵⁹. O peptídeo e o flavonoide, isolados e/ou combinados e controles com concentrações pré-determinadas foram inseridos diariamente em meio osteogênico (α -MEM com 10% de Soro fetal bovino, suplementado com 50 ug/mL ácido ascórbico e 10 nmol/L β - glicerofosfato; Sigma /AldrichCorp) até completar 13 dias. A produção de proteína total foi calculada a partir de uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA) em concentrações pré- determinadas e expressas em mg/mL. O ensaio de fosfatase

alcalina (ALP) foi realizado seguindo as instruções do fabricante do kit ALP (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) e absorbância foi medida a 590 nm com um espectofotômetro (Synergy H1). A atividade de ALP foi calculada através de uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de enzimas. Os dados finais de ALP foram normalizados pelos valores obtidos para proteína total, em U/mL proteína.

3.6 Indução de mineralização em células pulpares indiferenciadas (hDPC)

Formação de nódulos mineralizados 13 e 21 dias/ Viabilidade celular 13 e 21 dias

Os ensaios foram conduzidos com os compostos isolados e combinados até completar 13 e 21 dias onde a viabilidade celular foi monitorada pelo ensaio de resazurina e a mineralização foi avaliada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich), de acordo com Soares *et al.*⁵⁹. Em resumo, 40mmol/L de vermelho de alizarina S foi preparado em água destilada, ajustado à um pH de 4,2 com hidróxido de amônia, e, em seguida, aplicado às células durante 10 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. As células foram, em seguida, lavadas com água destilada e deixadas secando. Imagens da cultura corada com vermelho de alizarina S foram obtidas utilizando microscópio invertido e a intensidade da coloração foi analisada utilizando um programa de análise de imagem, o programa Image J 1.48 (NIH, Bethesda, MA, USA). Após obtenção das imagens, 10% de cloreto de cetilpiridínio em PBS foi adicionado aos poços (500 µL) e deixados sob agitação por 15 minutos. Três alíquotas de 100 µL de cada poço foram transferidas para um leitor de microplacas e avaliadas em um comprimento de onda de 562 nm. Os resultados foram considerados como valores absolutos.

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS (SPSS GmbH, Munich, Germany). Os valores dos dados apresentaram distribuição normal (homogeneidade) e as variáveis foram submetidas à análise de variância seguida pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$). Todas as análises foram realizadas com limite de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das hDPC através de marcação por imunofluorescência para os marcadores STRO-1 e CD-146

Imagens de imunofluorescência para os marcadores de células-tronco STRO-1 e CD-146 (x20) A Fluorescência verde (corante FITC) indica células coradas positivamente para os marcadores e a fluorescência azul indica os núcleos das células (corante Hoescht).

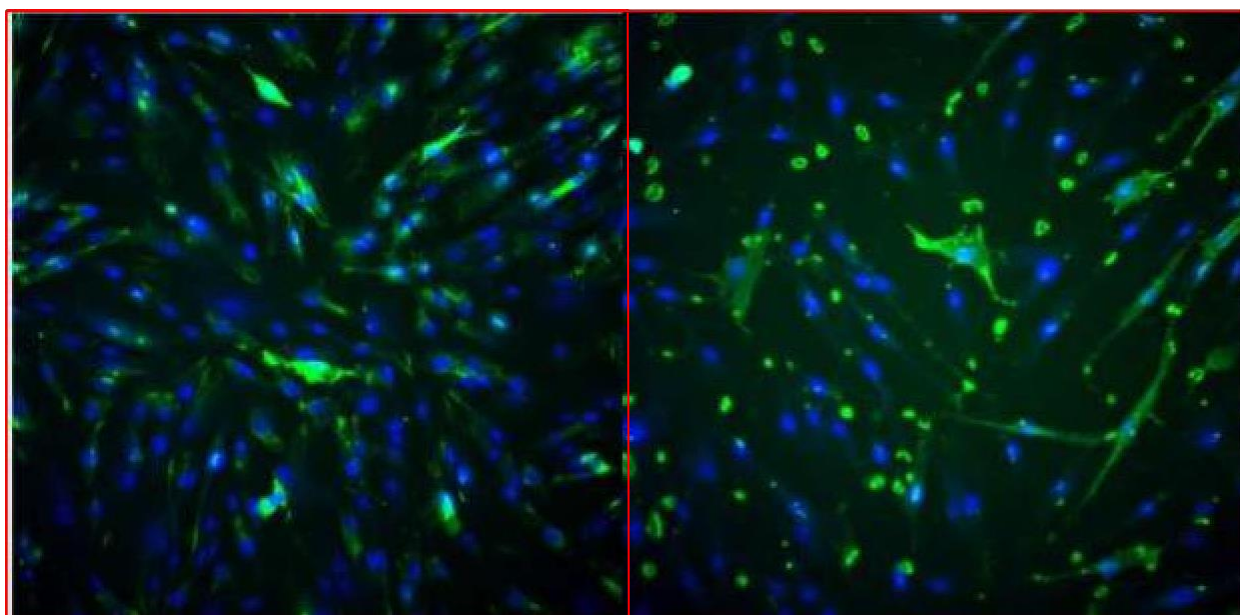


Imagem de hDPC com marcador STRO-1

Imagem de hDPC com marcador CD-146

4.2 Avaliação da viabilidade celular

Inicialmente, as células foram expostas aos compostos isolados EGCG, KR-12-a5 e hidróxido de cálcio (HC – material controle utilizado em Endodontia) em concentrações pré-determinadas para os períodos de 24, 48 e 72 horas e a avaliação foi realizada pelo método da resazurina. Os resultados são apresentados na figura 1. No período de 24 horas, as concentrações abaixo de 0,037 mg/mL promoveram uma viabilidade celular de mais de 80% para todos os compostos. Para o tratamento no período de 48 horas, todos os compostos isolados foram citocompatíveis em

concentrações abaixo de 0,018 mg/mL. Por fim, no período de 72 horas foi possível observar a viabilidade celular acima de 80% nos casos em que as concentrações se encontravam abaixo de 0,009 mg/mL e as concentrações mais altas apresentaram citotoxicidade nesse período.

A análise dos compostos combinados de EGCG + KR-12-a5 em concentrações pré-determinadas nos períodos de 24, 48, 72 horas também foi realizada e os resultados obtidos são apresentados na figura 2. Nas primeiras 24h é possível observar que apenas a combinação de KR-12-a5 de 0,037mg/mL + EGCG de 0,075mg/mL promoveu viabilidade celular de aproximadamente 70% e as demais combinações obtiveram resultados acima de 80% de viabilidade. Para o período de 48 e 72 h apenas as concentrações de KR-12-a5 0,004 mg/mL + EGCG 0,009 mg/mL e KR-12-a5 0,002 mg/mL + EGCG 0,004 mg/mL demonstraram citocompatibilidade sobre as células hDPC e as demais concentrações das substâncias combinadas apresentaram uma viabilidade abaixo de 80%. Diante dos resultados expostos, as concentrações de KR-12-a5 0,004 mg/mL + EGCG 0,009 mg/mL e de KR-12-a5 0,009 mg/mL + EGCG 0,018 mg/mL foram selecionadas para os demais experimentos de mineralização.

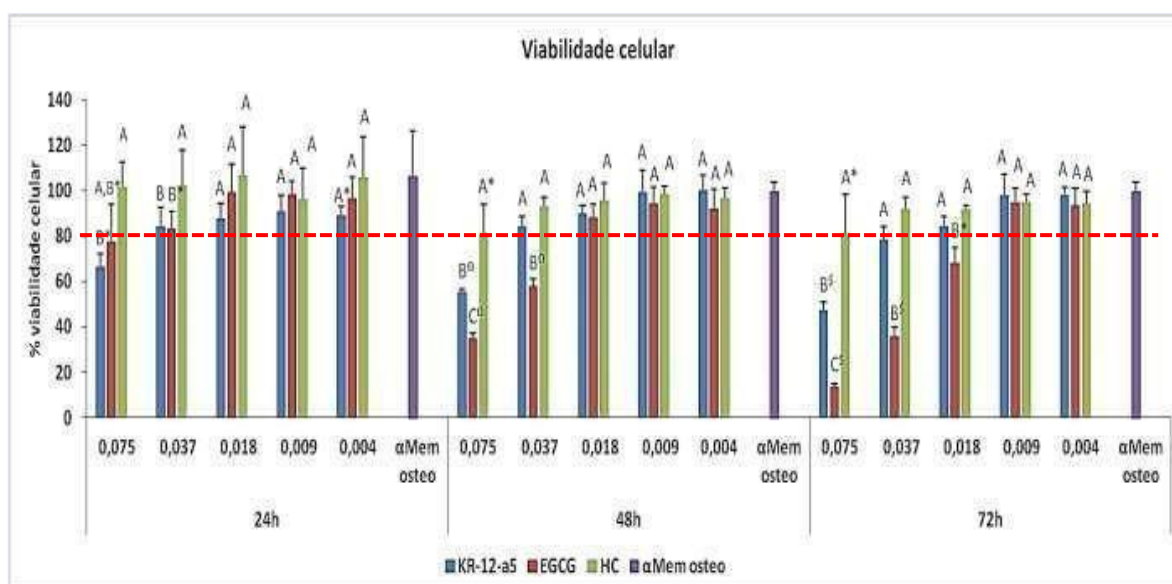


Figura 2. Média (DP) da porcentagem de células viáveis (hDPC) após 24h, 48h e 72h de exposição aos compostos isolados. Valores das concentrações dos compostos em mg/mL.

^A Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando o mesmo tempo, segundo ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Símbolos diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando o mesmo grupo, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

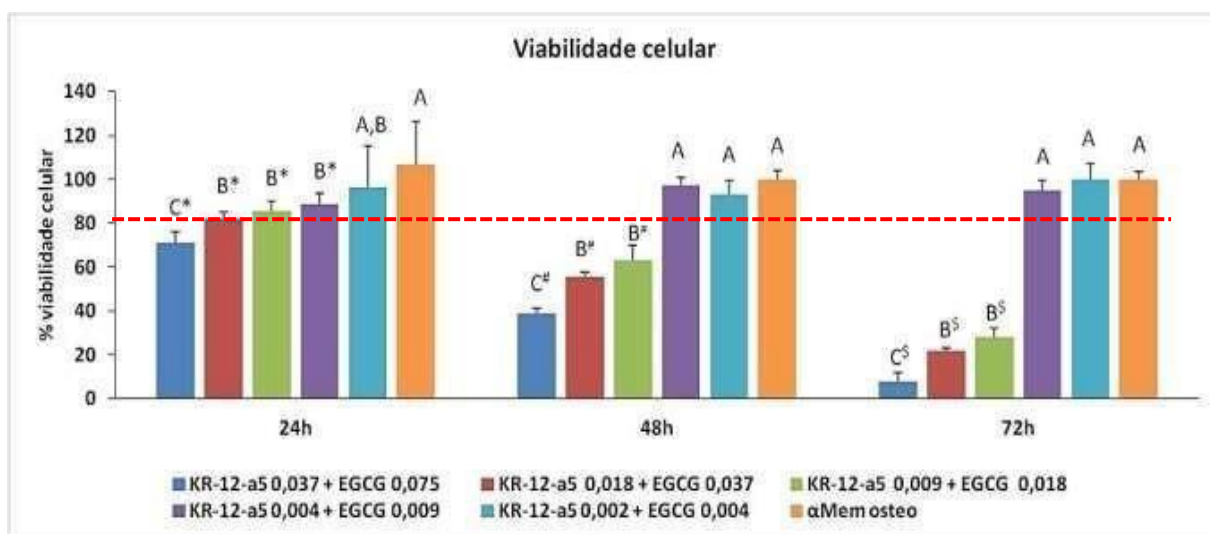


Figura 3. Média (DP) da porcentagem de células viáveis (hDPC) após 24h, 48h e 72h de exposição aos compostos combinados. Valores das concentrações dos compostos em mg/mL.

^A Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando o mesmo tempo, segundo ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Símbolos diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando o mesmo grupo, segundo ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Baseado nos resultados de viabilidade celular sobre hDPC, o tempo e as concentrações selecionadas para os demais ensaios de mineralização celular são mostrados na figura 4:

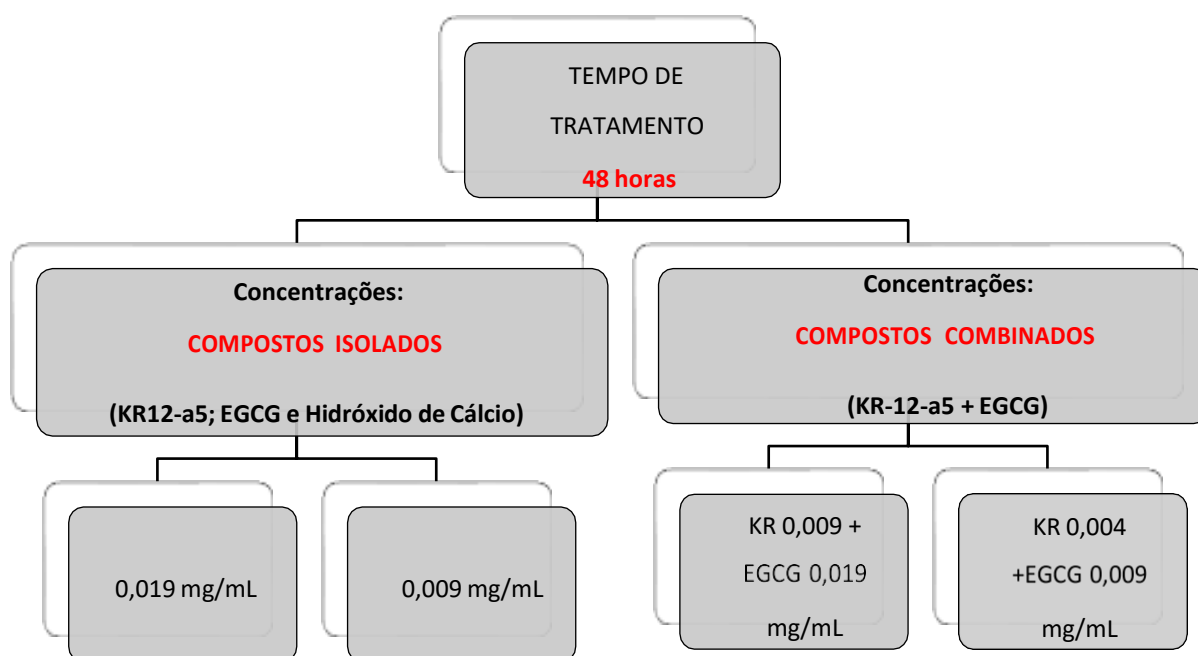


Figura 4. Tempo de tratamento e concentrações dos compostos isolados e combinados selecionados para os próximos ensaios.

4.3 Microscopia de fluorescência (DAPI)

Ensaio de microscopia de fluorescência foram realizados com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich), um corante fluorescente que emite cor azul brilhante e apresenta afinidade pelo material genético, sendo absorvido por células vivas e que permitem a visualização do núcleo das células, além disso o DAPI tem maior fotoestabilidade quando comparado aos demais corantes utilizados para viabilidade celular⁸. As células foram expostas aos compostos isolados e nas combinações de KR 0,004 + EGCG 0,009 mg/mL e KR-12-a5 0,009 + EGCG 0,019 mg/mL e foi realizada a análise complementar da viabilidade celular em microscópio de fluorescência. As células foram fotografadas e também foi quantificado o número de células coradas nas imagens obtidas.

Os compostos isolados de EGCG, KR-12-a5 e o controle de HC não foram capazes de interferir negativamente na viabilidade celular tanto nas concentrações de 0,009 mg/mL e 0,019 mg/mL, uma vez que o material genético das células foi capaz de absorver o corante azul fluorescente indicando a viabilidade celular **(figura 5)**. Quando realizada a quantificação das células que foram coradas, KR-12-a5 e o EGCG na concentração de 0,009 mg/mL foram capazes de expressar mais que 350 células coradas e na concentração de 0,019 mg/mL expressaram até 350 células coradas, o que demonstra que os compostos isolados estimularam a proliferação das hDPC. Para o hidróxido de cálcio, não houve diferença estatística do grupo controle positivo, apresentando aproximadamente 200 células coradas **(figura 6)**.

Para os compostos combinados de EGCG + KR-12-a5 nas concentrações de EGCG 0,004 + KR 0,009 mg/mL e EGCG 0,009 + KR 0,019 mg/mL também foi possível observar que não houve alteração negativa na viabilidade celular, uma vez que houve emissão do corante azul fluorescente pelas células analisadas, indicando mais uma vez, que estas estavam viáveis e foram capazes de absorver o corante **(Figura 7)**. Em relação a quantificação de células coradas, as combinações de EGCG 0,004 + KR 0,009 mg/mL apresentou em média 300 células coradas, para o EGCG 0,009 + KR 0,019 mg/mL a média da contagem foi de aproximadamente 250 células coradas, ambos os grupos apresentaram diferença do controle, demonstrando mais uma vez, citocompatibilidade entre os compostos combinados e as células hDPC e que houve estímulo na proliferação celular **(Figura 8)**.

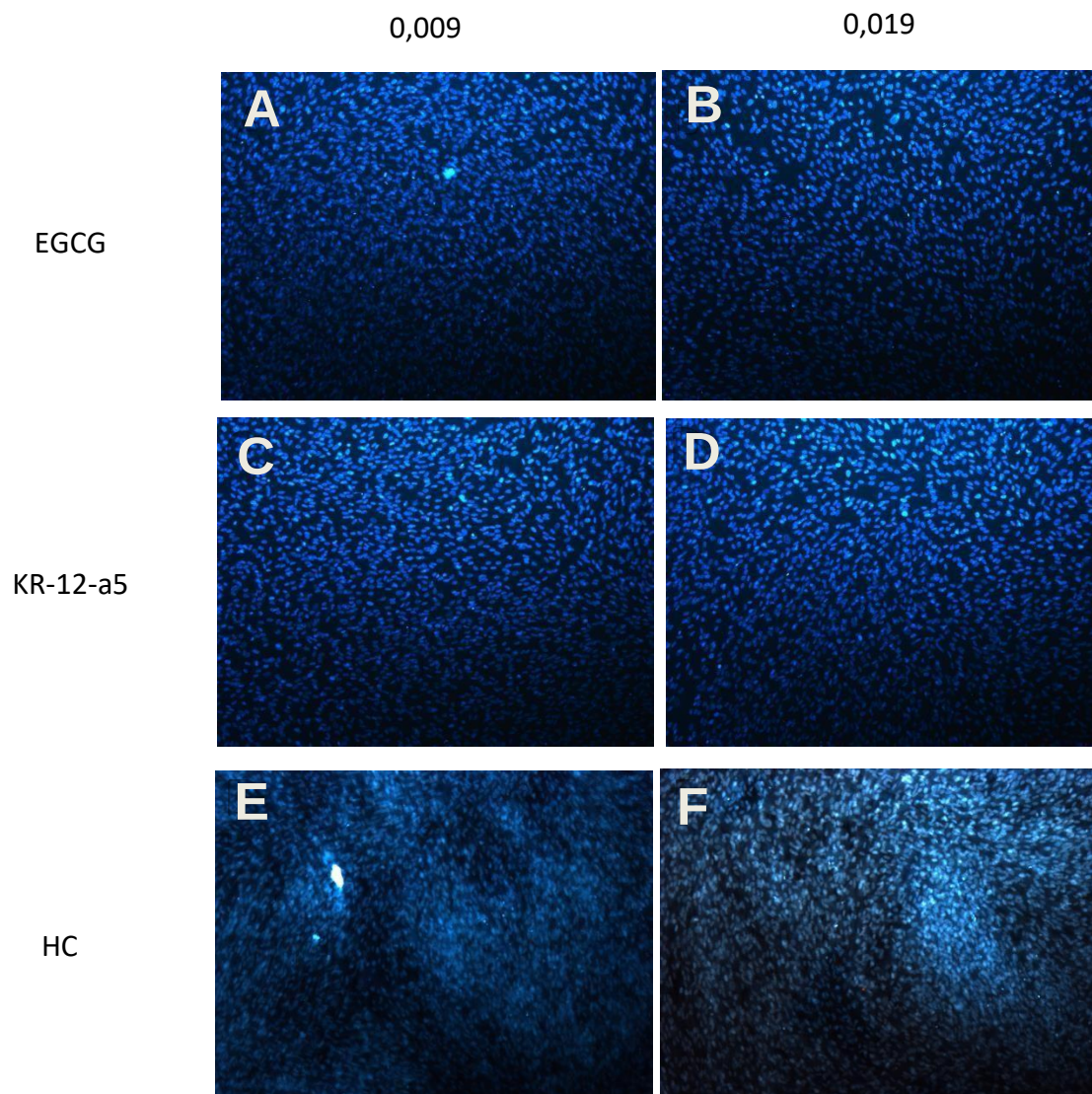


Figura 5. Imagens representativas de microscopia de fluorescência com o corante DAPI mostrando a viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos isolados. Em **A-** EGCG 0,009 mg/mL; **B-** EGCG 0,019 mg/mL; **C-** KR 0,009 mg/mL; **D-** KR 0,019 mg/mL; **E-** HC 0,009 mg/mL e **F-** HC 0,019 mg/L.

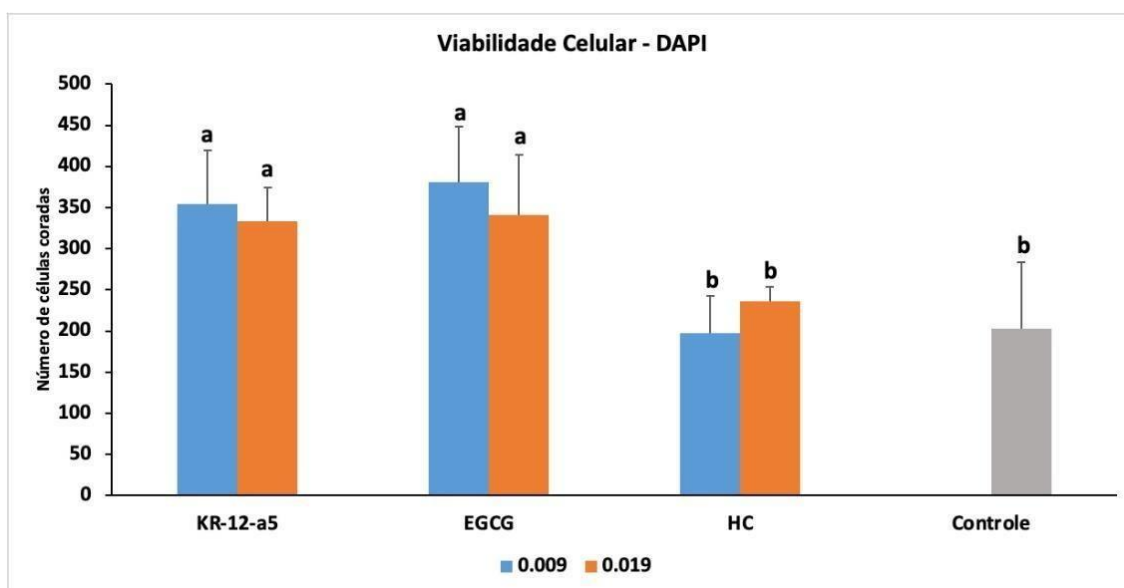


Figura 6. Quantificação de células coradas por DAPI para analisar a viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos isolados. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Houve estímulo na proliferação celular pelos compostos EGCG e KR-12-a5.

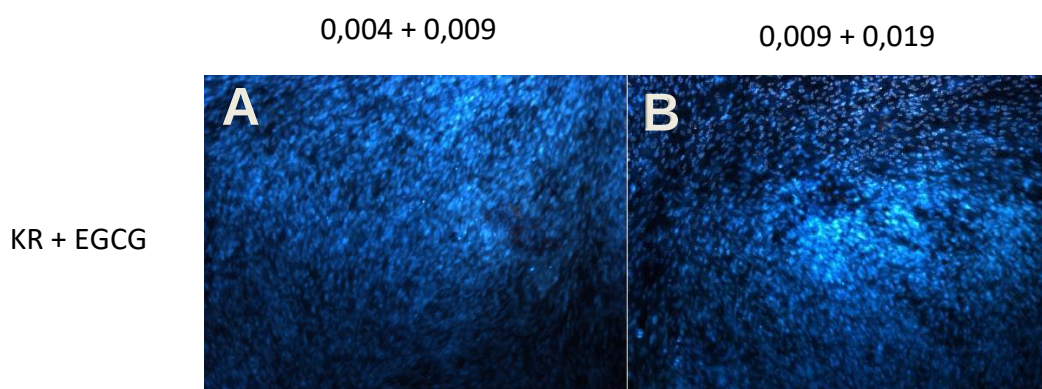


Figura 7. Imagens representativa de microscopia de fluorescência com corante DAPI mostrando a viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos combinados. Em **A**- KR 0,004 + EGCG 0,009 mg/mL; em **B**- KR 0,009 + 0,019 mg/mL.

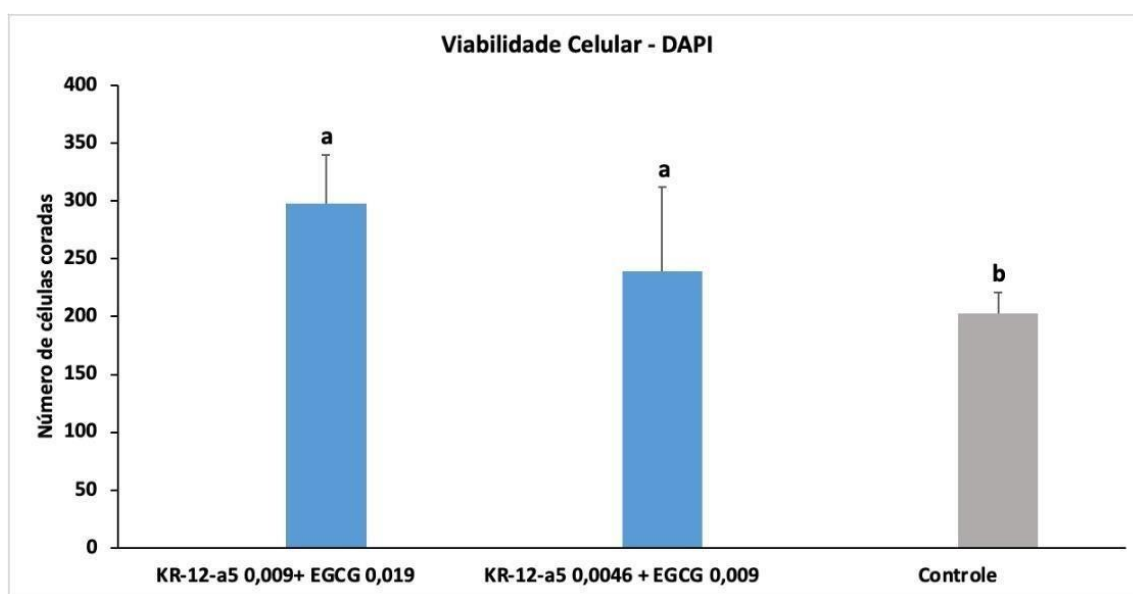


Figura 8. Quantificação de células coradas por DAPI mostrando a viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos combinados. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Houve estímulo na proliferação celular pelos compostos combinados.

4.4 Produção de proteína total (PT) e de fosfatase alcalina (ALP)

A produção de proteína total (PT) e de fosfatase alcalina (ALP) das células hDPC foi analisada no período de 13 dias para os compostos isolados e combinados de EGCG, KR-12-a5 e hidróxido de cálcio (HC) e o gráfico apresentado em %ALP/%PT, já que PT foi utilizada para normalizar os dados de ALP. Para os compostos isolados (**figura 9**), os compostos que foram capazes de expressar maior atividade de fosfatase alcalina foram o controle positivo de HC em ambas as concentrações de 0,019 e 0,009 mg/mL e EGCG a 0,019 mg/mL, que diferiram positivamente do grupo controle meio osteogênico. Para KR-12-a5 na concentração de 0,019mg/mL e EGCG na concentração de 0,009 mg/mL, a expressão da fosfatase alcalina foi semelhante ao grupo controle, pois não houve diferença estatística entre os grupos. Como representado na **figura 10**, ambos os compostos combinados de KR-12-a5 0,009 + EGCG 0,019mg/mL e KR-12-a5 0,0046 + EGCG 0,009mg/mL, foram capazes de expressar maior atividade de fosfatase alcalina quando comparado ao controle de meio osteogênico, demonstrando diferença estatística significativa.

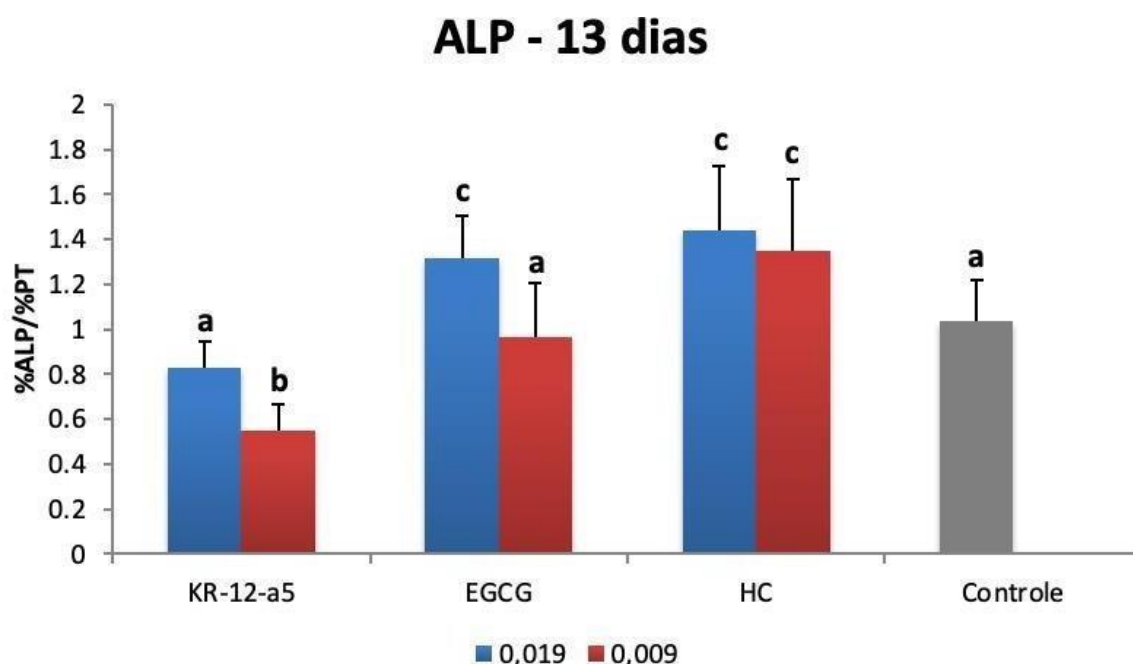


Figura 9. Atividade da fosfatase alcalina das células hDPC após tratamento com os compostos isolados por 48h e avaliação após 13 dias. Os dados foram normalizados pela produção de proteína total (PT) sendo apresentados em %ALP/%PT. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada

composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). * diferença estatística quando comparada ao controle (meio osteogênico), segundo ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$.

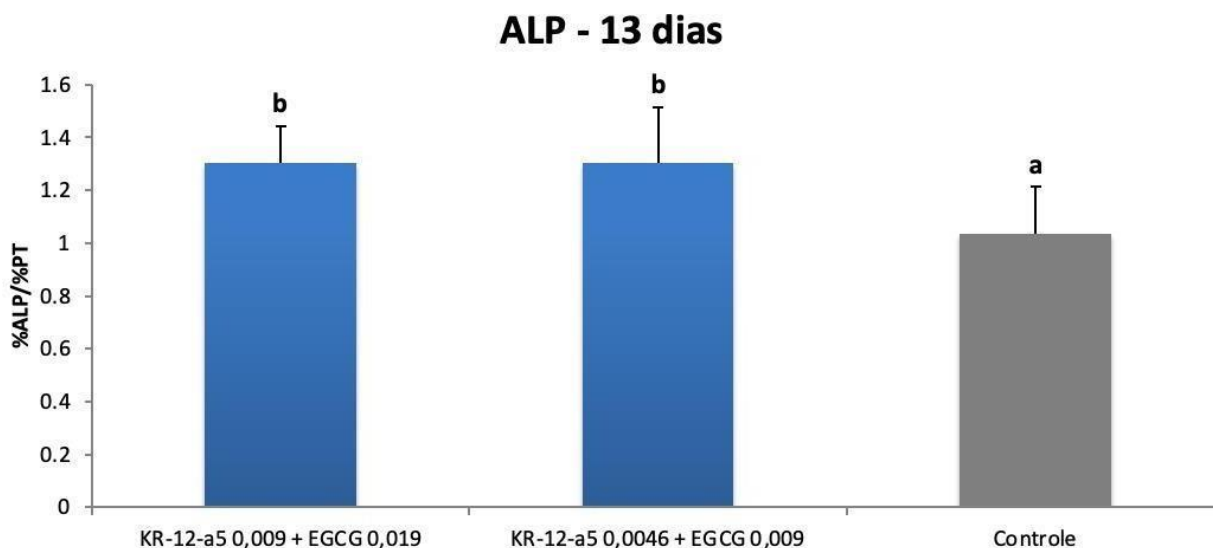


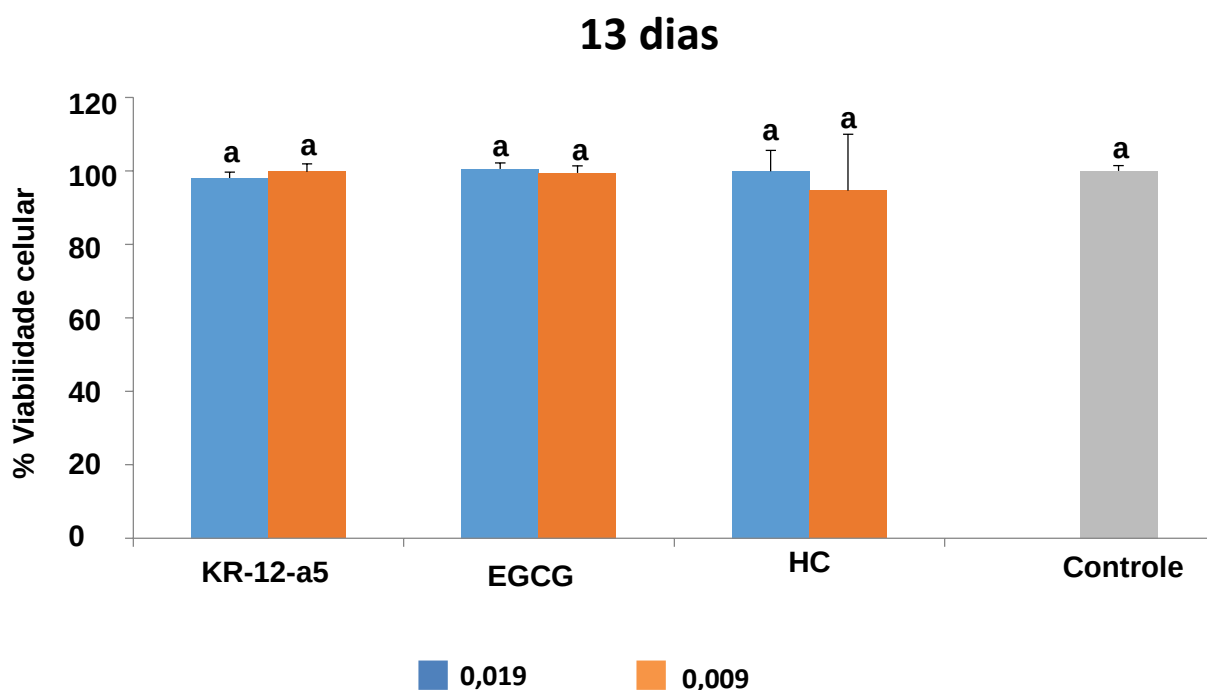
Figura 10. Atividade da fosfatase alcalina das células hDPC após tratamento com os compostos combinados por 48h e avaliação após 13 dias. Os dados foram normalizados pela produção de proteína total (PT) sendo apresentados em %ALP/%PT. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). * diferença estatística quando comparada ao controle (meio osteogênico), segundo ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.5 Formação de nódulos mineralizados 13 e 21 dias/ Viabilidade celular 13 e 21 dias

A viabilidade celular também foi monitorada para este ensaio de formação de nódulos mineralizados por 13 e 21 dias. Como representado na **figura 11**, a viabilidade das hDPCs não foi afetada nos dois tempos avaliados – 13 e 21 dias. No tempo de 13 dias, a formação de nódulos mineralizados de todos os compostos isolados foi semelhante ao grupo controle, não apresentando diferença estatística entre os grupos. Porém, em 21 dias, EGCG e hidróxido de cálcio (HC) em ambas concentrações de 0,009 e 0,019 mg/mL estimularam maior formação de nódulos mineralizados quando comparados ao controle de meio osteogênico, e

consequentemente tiveram significativo efeito indutor de mineralização sobre hDPC (**figura 12**). Isso confirma que o flavonoide EGCG apresenta propriedade de indução celular, com efeito sobre a mineralização.

Os compostos combinados não influenciaram negativamente na viabilidade celular nas concentrações e tempos avaliados (**figura 13**). Os compostos combinados apresentaram formação de nódulos mineralizados, porém não foram capazes de apresentar diferença estatística comparado ao grupo controle, no tempo de 13 dias. Por outro lado, no período de 21 dias ambas as combinações propostas de KR-12-a5 e EGCG apresentaram maior formação de nódulos diferindo estatisticamente do controle de meio α -MEM osteogênico (**figura 14**).



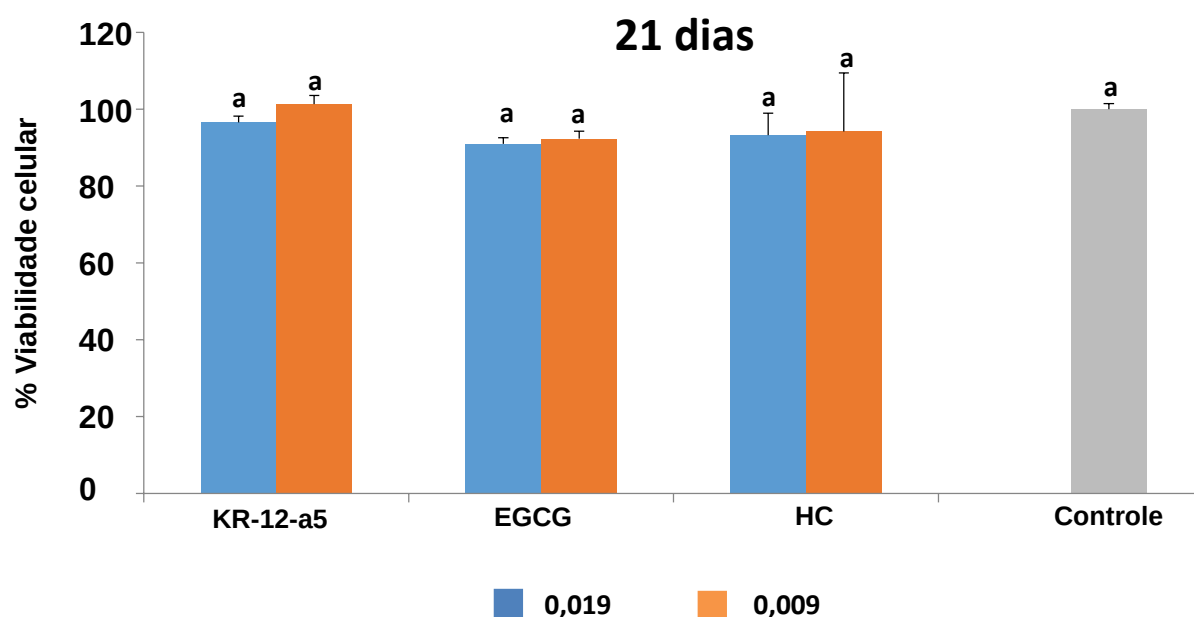
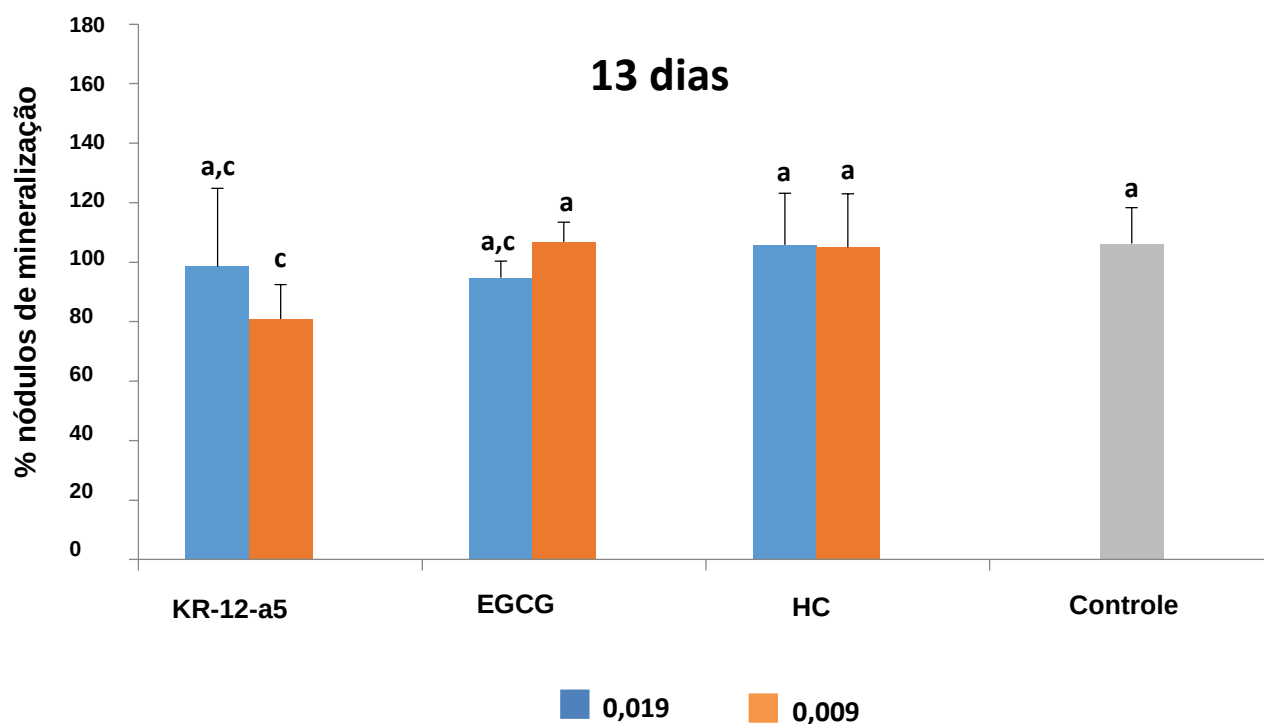


Figura 11. Viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos isolados por 48 horas e monitoramento dessa viabilidade por 13 e 21 dias, obtida por meio de ensaios de resazurina.

^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e Teste deTukey, $p < 0.05$.



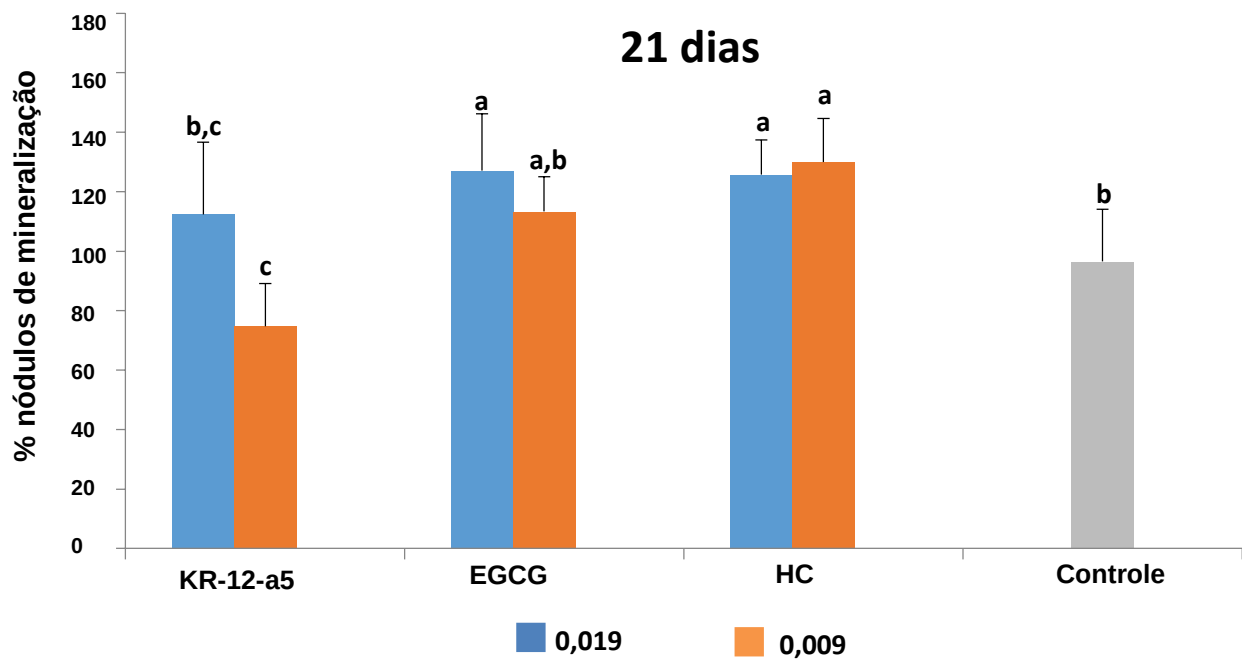
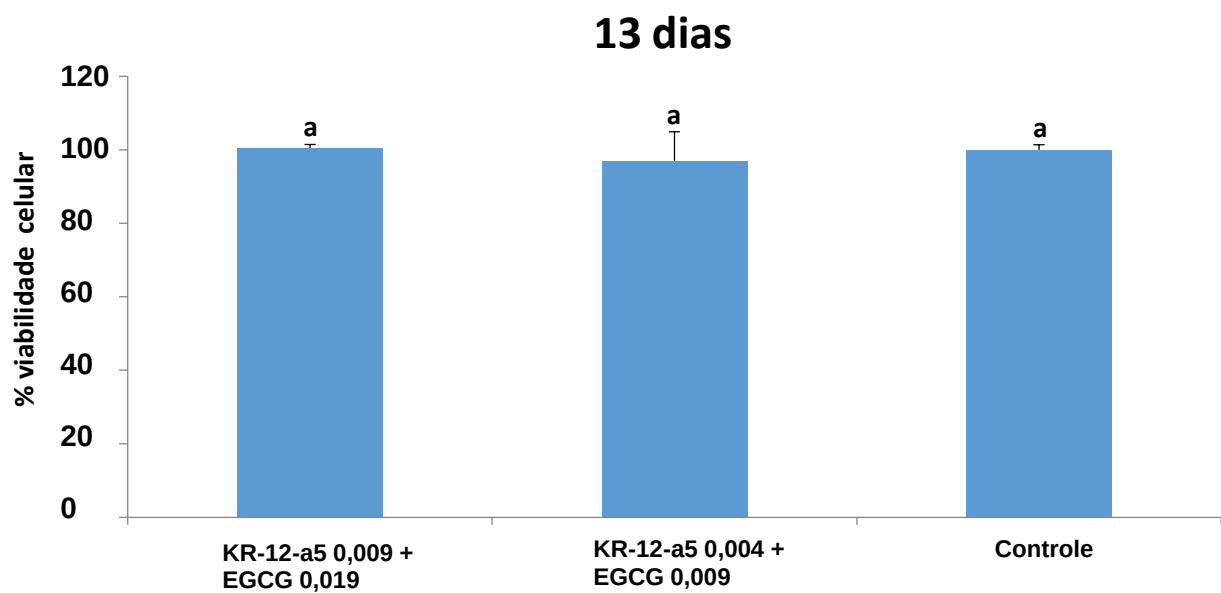


Figura 12. Quantificação dos nódulos de mineralização formados por 13 e 21 dias após tratamento com os compostos isolados por 48h. ^aLetras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e Teste de Tukey ($p < 0.05$).



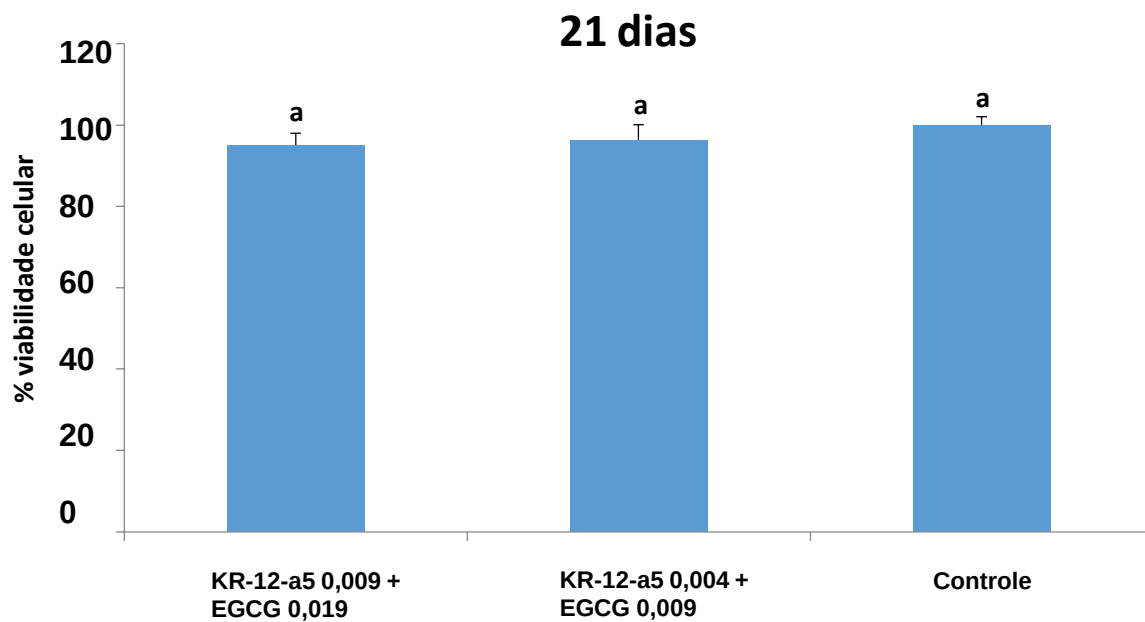
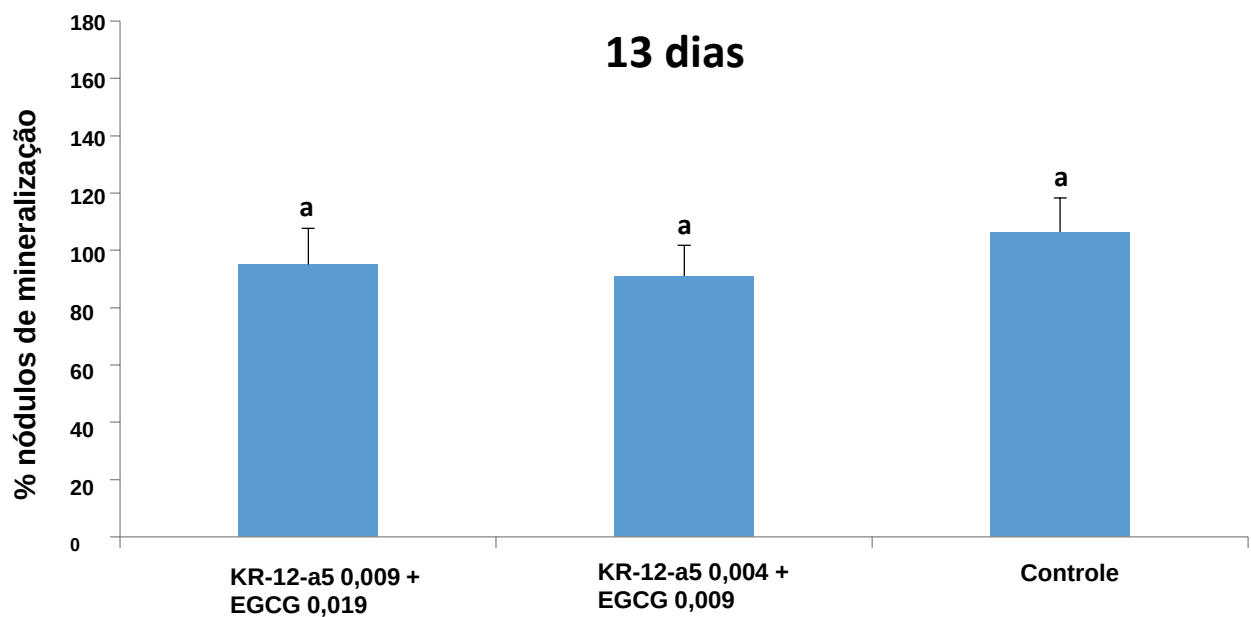


Figura 13. Viabilidade das células hDPC após tratamento com os compostos combinados por 48 horas e monitoramento dessa viabilidade por 13 e 21 dias, obtida por meio de ensaios de resazurina. ^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e Teste de Tukey ($p < 0.05$).



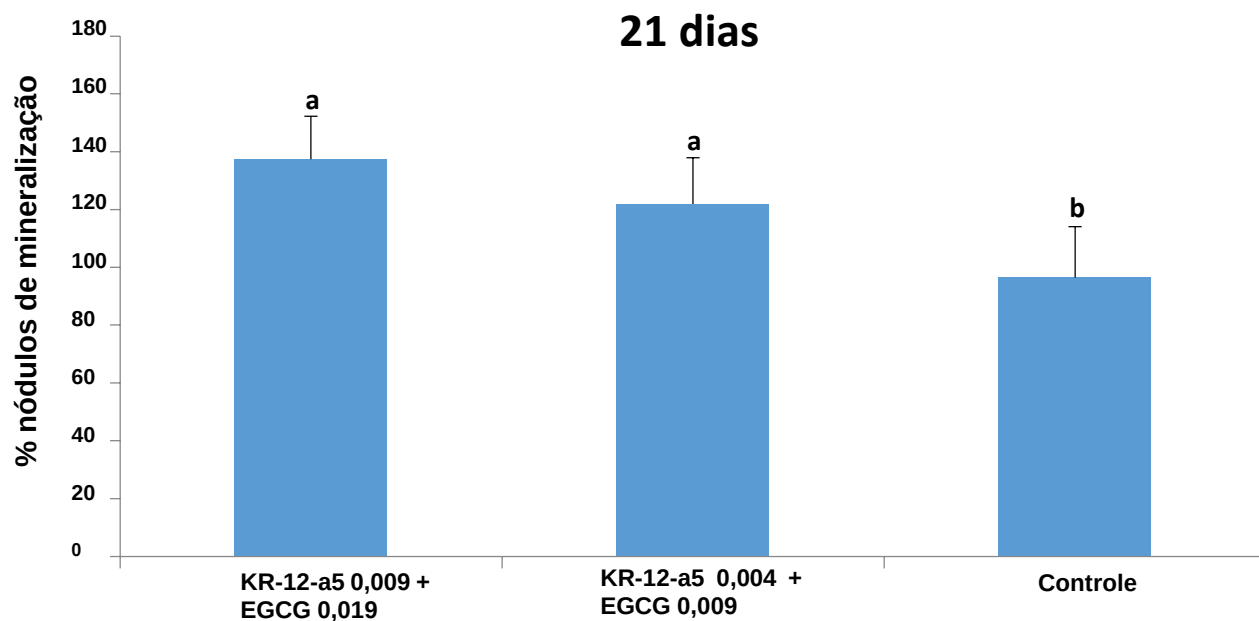


Figura 14. Quantificação dos nódulos de mineralização formados por 13 e 21 dias após tratamento com os compostos combinados por 48 h. ^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e Teste de Tukey ($p < 0.05$)

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível observar que as concentrações mais baixas dos compostos isolados e combinados apresentaram valores citocompatíveis acima de 80% de viabilidade sobre hDPC, e as concentrações mais altas foram mais citotóxicas, reduzindo o metabolismo celular. Mah *et al.*⁴¹ mostraram que, em altas concentrações, o EGCG pode resultar em efeitos negativos em células derivadas do osso alveolar de humanos, porém, em concentrações mais baixas pode estimular a atividade de osteoblastos. No presente estudo, o tempo foi um fator que também influenciou nos resultados obtidos. Nas primeiras 24 h, a maioria das concentrações dos compostos isolados ou combinados não apresentaram citotoxicidade, porém em períodos mais longos, como de 72 horas, os compostos ficaram maior tempo em contato com as células pulpares e houve maior interferência no metabolismo celular, e as concentrações mais baixas foram citocompatíveis nesse período. Caiaffa *et al.*⁶ mostraram que o tratamento de 24h com o peptídeo LL-37 não afetou a viabilidade celular de células semelhantes a odontoblastos (MDPC-23) em concentrações abaixo de 62,5 µg/mL e que para KR-12-a5 a viabilidade celular foi afetada acima de 31,25 µg/mL.

No estudo corrente, os compostos isolados nas concentrações abaixo de 0,037mg/mL, no período de 24 h, não foram citotóxicos (viabilidade acima de 80%, conforme Normas ISO 10993- 12-2012). Para o período de 48h, as concentrações não citotóxicas foram abaixo de 0,018 mg/mL, promovendo viabilidade maior que 80%. Enquanto em 72 h, somente os compostos com concentrações abaixo de 0,009 mg/mL foram citocompatíveis. Para os compostos combinados de KR-12-a5 + EGCG no período de 24 horas, a maioria das concentrações apresentaram bons resultados de viabilidade celular. Para os períodos de 48 e 72 h, as únicas combinações que não apresentaram citotoxicidade foram KR-12-a5 0,004 + EGCG 0,009 mg/mL e KR-12-a5 0,002+ EGCG 0,004 mg/mL. Poucos estudos realizaram a associação de peptídeos e flavonoides. Um estudo de Bedran *et al.*³⁹ usando um modelo de co-cultura 3D de células epiteliais gengivais (OBA-9) e fibroblastos (HGF-1) mostraram que EGCG (1 µg/mL) e LL-37 (0,05 µM) no tempo de 24 h foram citocompatíveis e reduziram individualmente a secreção de mediadores inflamatórios. Além disso, a combinação de EGCG e LL-37 também foi capaz de inibir sinergicamente a secreção

de citocinas inflamatórias, apresentando citocompatibilidade. A faixa de concentração de KR-12-a5 de 0-64 µg/mL foi avaliada em estudo de Liu *et al.*³⁷ e o peptídeo não foi citotóxico para as células mesenquimais da medula óssea humana (HBMSCs), mas pôde efetivamente eliminar vários patógenos, mostrando o potencial antimicrobiano do KR-12-a5. Em um dos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, a combinação de EGCG e KR-12-a5 aumentou a viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos primários (HGF-1) e a migração celular, enquanto diminuiu a secreção de citocinas por fibroblastos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS)⁶.

A escolha da concentração mais alta da combinação de KR-12-a5 0,009+ EGCG 0,018 mg/mL foi a única exceção para os próximos testes. Embora estes compostos combinados promoveram viabilidade celular de aproximadamente 70%, a justificativa para a escolha dessas concentrações foi baseada em estudos anteriores desenvolvidos por Caiaffa *et al.*^{5,6,7} Nesses estudos, essas concentrações aproximam-se daquelas que apresentaram efeito antimicrobiano. Assim, se essas concentrações tivessem efeitos positivos sobre as células hDPC nas concentrações que tem efeito antimicrobiano, seriam interessantes para o desenvolvimento de um princípio ativo com múltiplas propriedades e consequentemente sendo válido para aplicação endodôntica. Outra justificativa plausível é que esses compostos nessas concentrações quando isolados apresentaram citocompatibilidade (viabilidade acima de 80%) sobre as hDPC.

O ensaio de microscopia de fluorescência DAPI foi proposto como um experimento complementar para confirmar a viabilidade celular. Esse corante fluorescente emite cor azul brilhante e apresenta afinidade pelo material genético, sendo absorvido por células vivas. Além disso, a escolha do corante foi baseada no fato de que o DAPI tem maior fotoestabilidade quando comparado a outros corantes já utilizados na literatura⁸. As células foram expostas aos compostos isolados de KR-12-a5 e EGCG e suas combinações de KR 0,004 + EGCG 0,009 mg/mL e KR- 12-a5 0,009 + EGCG 0,019 mg/mL, e foi demonstrado mais uma vez, que os compostos isolados e combinados não afetaram a viabilidade celular, apresentando citocompatibilidade sobre as células hDPC, além de terem estimulado a proliferação celular.

No presente estudo, o período analisado de 13 dias demonstrou que o EGCG isolado na concentração de 0,019 mg/mL e o controle positivo de hidróxido de cálcio (HC) nas concentrações de 0,009 e 0,019 mg/mL foram capazes de expressar maior atividade de fosfatase alcalina (ALP). Enquanto para este mesmo ensaio, os compostos combinados de KR-12-a5 0,009 + EGCG 0,019mg/mL e KR- 12-a5 0,0046 + EGCG 0,009mg/mL, foram capazes de expressar maior atividade de fosfatase alcalina, com diferença estatística significativa comparada ao grupo controle de meio osteogênico. A síntese de ALP está envolvida na sinalização e diferenciação celular, iniciando o processo de deposição da matriz extracelular e mineralização^{12,16}. A expressão da ALP também é responsável por regular os genes osteogênicos, levando a diferenciação osteogênica e formação de nódulos mineralizados²⁸, através do fornecimento de fosfato na fase de citodiferenciação².

O resultado obtido pelo EGCG pode ser justificado pelo efeito indutor da mineralização que esse flavonoide apresenta, evidenciado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, a produção de proteínas e de nódulos de mineralização. O EGCG aumenta drasticamente a expressão da ALP e formação de nódulos mineralizados, principalmente em concentrações de 5µm do flavonoide, indicando seu potente papel na osteogênese e que sua ação é dose-dependente^{28,41}. Portanto, a aplicação clínica de EGCG em uma concentração apropriada pode estimular a atividade celular dos osteoblastos, enquanto em concentrações muito altas pode suprimir⁴¹. Em um estudo, Liu *et al.*³⁷, demonstraram que o EGCG pode promover a indução de osteogênese a partir de células do ligamento periodontal humano (hPDLCS) de maneira dose-dependente, com concentrações de 4 e 6 µM de EGCG, mostrando potencial osteogênico sem causar citotoxicidade. Estudo recente mostrou o efeito do EGCG sobre células indiferenciadas da papila dentária (SCAPs) e EGCG (1 ou 10 µM) promoveu a proliferação de SCAPs, aumentou a atividade da fosfatase alcalina e a deposição mineral, e aumentou a expressão de marcadores osteo-/odontogênicos, incluindo sialofosfoproteína dentinária (Dspp), proteína da matriz dentinária-1 (Dmp-1), osso sialoproteína (Bsp) e colágeno tipo I (Col1), juntamente com a expressão elevada de BMP2 e nível de fosforilação de Smad1/5/9 ($p < 0,01$). EGCG em concentrações abaixo de 10 µM não teve influência significativa na migração celular³⁸.

O KR-12-a5 isolado não demonstrou significativa ação na mineralização, mas sua escolha no estudo é justificada uma vez que este peptídeo possui uma potente ação antimicrobiana e antiendotóxica¹⁷, sendo uma ação muito importante quando se trata de um princípio ativo para medicação intracanal. O peptídeo atua contra espécies bacterianas orais destruindo a membrana celular, levando a lise celular e consequente morte celular, além disso também tem ação de ligação e neutralização contra o LPS. Foi selecionado o análogo KR-12-a5 em detrimento do LL-37, por sua maior eficácia e por possuir uma cadeia mais curta e efetivamente ter um custo mais baixo²².

Embora a combinação de KR-12-a5 e EGCG tenha mostrado efeito interessante sobre os marcadores de mineralização em células pulpares indiferenciadas, deve-se considerar as limitações de um estudo *in vitro* e da necessidade de realizar outros ensaios complementares. Nosso grupo de pesquisa está analisando a expressão de proteínas envolvidas na dentinogênese, buscando entender os mecanismos de ação desses compostos isolados e em associação. Além disso, ambos os produtos apresentam limitações quanto a sua degradação rápida na cavidade bucal, se não inseridos em um sistema de liberação de medicamentos ou *scaffolds*, como também está sendo estudado pelo nosso grupo. Diante de resultados ainda mais interessantes, estudos *in vivo* também devem ser conduzidos antes de se considerar esses compostos como medicação em Endodontia.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a associação de KR-12-a5 e o flavonoide EGCG foi benéfica, uma vez que em baixas concentrações não causou citotoxicidade e induziu a expressão de marcadores de mineralização, como fosfatase alcalina e a formação de nódulos mineralizados. Dessa forma, esses compostos poderiam ser uma alternativa natural promissora de princípio ativo para medicação intracanal.

REFERÊNCIAS

1. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GT. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*. 2010; 5 (4): 617-31.
2. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod*. 2014; 40 (3): 387-92.
3. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30(4): 196-200.
4. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, Bressiani AH. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015; 9 (11): E116-23.
5. Caiaffa KS, Massunari L, Danelon M, Abuna GF, Bedran TBL, Santos-Filho NA, Spolidorio DMP, Vizoto NL, Cilli EM, Duque C. KR-12-a5 is a non-cytotoxic agent with potent antimicrobial effects against oral pathogens. *Biofouling*. 2017Nov;33(10):807-818.doi: 10.1080/08927014.2017.1370087. Epub 2017 Oct 12.
6. Caiaffa KS, Basso FG, Santos-Filho NA, de Souza-Costa CA, Sakai VT, Cilli EM, Duque C. Effect of analogues of cationic peptides on dentin mineralization markers in odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol*. 2019 Jul;103:19-25.
7. Caiaffa, KS. Efeito isolado ou combinado de flavonoides e peptídeos catiônicos sobre biofilme endodôntico e sua influência na viabilidade celular, capacidade de migração e inibição de citocinas em fibroblastos. 2019. 117 f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, São Paulo, 2019.
8. Chazotte B, Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011, doi: 10.1101/pdb.prot5556

9. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, Chen FM, Zhang M. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res*, 2015; 361 (2): 439-55.
10. Da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibioticintra canal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):779-87.
11. D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*, 2007; 14 (6): 1162-71.
12. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental Materials*. 2014; 30, 769-784.
13. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*. 2009 May;35(5):745-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.02.009.
14. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S52-7.
15. Domitrovic R. The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Curr Med Chem*, 2011;18: 4454-69.
16. Duque C, Hussein H, Bortolatto J, Prakki A, Kishen A. Effect of taxifolin and epigallocatechin-3-gallate on biomineralization potential of stem cells from dental

apical papilla. Arch Oral Biol. 2022 Jun;138:105413. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.

17. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? Odontology. 2010; 98 (1): 2-14.

18. Gorr SU, Aldolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. J Clin Periodontal. 2011; 38 Suppl 11:126-41.

19. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002; 81 (8): 531-5.

20. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001 Feb 23;276(8):5707-13.

21. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. 2013. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. J Endod. 39 (3): 30-43.

22. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? J Endod. 2008; 34: S51-S56,

23. Huang CC, Narayanan R, Alapati S, Ravindran S. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. Biomaterials. 2016; 111: 103-115.

24. Huang GT, Shagrameanova K, Chan SW (2006) Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. J Endod, 32 (11): 1066-73.

25. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod, 34 (6): 645-51.

26. Huo C, Wan SB, Lam WH, Li L, Wang Z, Landis-Piwowar KR, Chen D, Dou QP, Chan TH. The challenge of developing green tea polyphenols as therapeutic agents. *Inflammopharmacology*. 2008;16(5):248-52.
27. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. Stemcells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*. 2013 Mar;58(3):227-38.
28. Jacob B, Park IS, Bang JK, Shin SY. Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL37 possessing both antimicrobial and antiendotoxin activities without mammalian cell toxicity. *J Pept Sci*. 2013 Nov;19(11):700-7.
29. Jin P, Wu H, Xu G, Zheng L, Zhao J. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a pro-osteogenic agent to enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: an in vitro study. *Cell Tissue Res*. 2014;356(2):381–90.
30. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, 13 (4): 767-73.
31. Jönsson D, Nilsson BO. The antimicrobial peptide LL-37 is anti-inflammatory and proapoptotic in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2012 Jun;47(3):330-5.
32. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):876-87. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.023. Epub 2008 May 16.
33. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nör JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2013 Jan;39(1):76-82. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.013.

34. Kuang R, Zhang Z, Jin X, Hu J, Shi S, Ni L, Ma PX (2016) Nanofibrous spongy microspheres for the delivery of hypoxia-primed human dental pulp stem cells to regenerate vascularized dental pulp. *Acta Biomater*, 33: 225-34.
35. Kwon YS, Kim HJ, Hwang YC, Rosa V, Yu MK, Min KS. Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. *J Endod*. 2017 Feb;43(2):289-296. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.017;
36. Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol*. 2015;60(3):393–9.
37. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT (2011) Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod*,37 (9): 1217-24.
38. Limjeerajarus CN, Chanarattanubol T, Trongkij P, Rujiwanichkul M, Pavasant P (2014) Iloprost induces tertiary dentin formation. *J Endod*, 40 (11): 1784-90.
39. Liu C, Ma M, Zhang J, Gui S, Zhang X, Xue S. 2017. Galangin inhibits human osteosarcoma cells growth by inducing transforming growth factor- β 1-dependent osteogenic differentiation. *Biomed Pharmacother*. 2017; 89: 1415-1421. doi: 10.1016/j.biopha..03.030.
40. Liu Z, Lin Y, Fang X, Yang J, Chen Z. Epigallocatechin-3-Gallate Promotes Osteo-/Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla through Activating the BMP-Smad Signaling Pathway. *Molecules*. 2021 Mar 12;26(6):1580. doi: 10.3390/molecules26061580.
41. Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral*

Biol. 2015 Jun;60(6):845-53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.021.

42. Maglione M, Spano S, Ruaro ME, Salvador E, Zanconati F, Tromba G, Turco G (2017) In vivo evaluation of chitosan-glycerol gel scaffolds seeded with stem cells for full-thickness mandibular bone regeneration. *J Oral Sci*, 59 (2): 225-232.

43. Mah Y-J, Song JS, Kim S-O, Lee J-H, Jeon M, Jung U-W, et al. The effect of epigallocatechin-3- gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both in vitro and in vivo. *Arch Oral Biol*.2014;59(5):539–49.

44. Marí-Beffa M, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. 2017. Regenerative Endodontic Procedures: A Perspective from Stem Cell Niche Biology. *J Endod*. 43 (1): 52-62.

45. McCormick TS, Weinberg A. Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctionalagents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontology* 2000, 2010;Oct 54(1):195–206.

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

47. Nakanishi T, Mukai K, Hosokawa Y, Takegawa D, Matsuo T. Catechins inhibit vascular endothelial growth factor production and cyclooxygenase-2 expression in human dentalpulp cells. *Int Endod J*. 2015;48(3):277–82.

48. Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(2):145–50.

49. Nkhili E, Tomao V, El Hajji H, El Boustani E-S, Chemat F, Dangles O. Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochem Anal*.2009;20(5):408–15.

50. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):888-96.
51. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review- Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):16-27.
52. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000; 63:1035–42.
53. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol*. 2005 Feb;21(1):1-8.
54. Samanidou V, Tsagiannidis A, Sarakatsianos I. Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *J Sep Sci*. 2012;35(4):608–15.
55. Satué M, Arriero Mdel M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2013 Nov 15;86(10):1476-86.
56. Shabahang S, Torabinejad M. Treatment of teeth with open apices using mineral trioxide aggregate. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 2000 Apr;12(3):315-20; quiz 322.
57. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards C a, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly) phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. 2015;6(3):719– 29.
58. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Maurya R, Chattopadhyay N. Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss: evidence from in vitro and in vivo, human interventional and pharma-cokinetic studies. *Curr Med Chem*.

2009;16: 1138-57.

59. Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J.* 1997 Oct 11;183(7):241-6.

60. Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, Basso FG, Huck C, Hebling J, de Souza Costa CA. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium- aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. *Clin Oral Investig.* 2017

Dec;21(9):2827-2839.

61. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast- like cells. *IntEndod J.* 2014 Dec 30. doi: 10.1111/iej.12426.

62. Suphasiroj W, Mikami M, Shimomura H, Sato S. Specificity of antimicrobial peptide LL-37 toneutralize periodontopathogenic lipopolysaccharide activity in human oral fibroblasts. *J Periodontol.* 2013 Feb;84(2):256-64. doi: 10.1902/jop.2012.110652.

63. Taneja S, Kumari M, Parkash H. Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemp Clin Dent.* 2010 Jan;1(1):31-5.

64. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One.* 2014 Feb 20;9(2):e89209. doi: 10.1371/journal.pone.0089209. eCollection 2014

65. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem* 2007;104:466– 79.

66. Tsukiboshi M, Ricucci D, Siqueira JF. Mandibular Premolars with Immature Roots

and Apical Periodontitis Lesions Treated with Pulpotomy: Report of 3 Cases. *Journal of endodontics*.2017; 43, 65-74.

67. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:33-63.

68. Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, Moustaid-Moussa N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem*. 2014 Apr;25(4):363-76.

69. Wang X, Thibodeau B, M Trope, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2010 Jan; 36 (1) :56-63.

70. Wang YJ, Zhang HQ, Han HL, Zou YY, Gao QL, Yang GT (2017) Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF- κ B pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 490: 36-43.

71. Washington JT, Schneiderman E, Spears R, Fernandez CR, He J, Opperman LA (2011) Biocompatibility and osteogenic potential of new generation endodontic materials established by using primary osteoblasts. *J Endod*. 37 (8): 1166-70.

72. Yuan Z, Nie H, Wang S, et al. Biomaterial selection for tooth regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 17:373–88, 2011.

73. Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *J Endod*. 2016; 42(8):1246-50.

ANEXO A - Comitê de Ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização físico-química e biológica de sistemas de hidrogéis de PNVCL e de nanopartículas de quitosana contendo peptídeos antimicrobianos e flavonoides para aplicação em procedimentos de regeneração endodôntica

Pesquisador: Karina Sampaio Caiaffa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22670819.0.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.926.322

Apresentação do Projeto:

Emenda: Compostos bioativos derivados de plantas como os flavonoides EGCG e taxifolina, têm recebido destaque na literatura devido à sua amplitude terapêutica. Outros agentes biológicos, como os peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCAM) estão sendo estudados para a eliminação de microrganismos em diversos campos da Medicina e, atualmente, na Odontologia, como o LL-37 e seu análogo KR-12-a5. A combinação proposta neste estudo de peptídeos e flavonóides incorporados ou não a um sistema de hidrogel, visa sua futura utilização como medicação intracanal nos casos de dentes imaturos com ápice aberto. É interessante que esta medicação tenha além do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório, tenha a capacidade de induzir células remanescentes a se diferenciarem em odontoblastos e a produzirem dentina interradicular para a completa formação radicular, sem apresentar qualquer citotoxicidade para as células do tecido remanescente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vitro os efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório e indutor de diferenciação celular e

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização físico-química e biológica de sistemas de hidrogéis de PNVCL e de nanopartículas de quitosana contendo peptídeos antimicrobianos e flavonoides para aplicação em procedimentos de regeneração endodôntica

Pesquisador: Karina Sampaio Caiaffa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22670819.0.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.926.322

Apresentação do Projeto:

Emenda: Compostos bioativos derivados de plantas como os flavonoides EGCG e taxifolina, têm recebido destaque na literatura devido à sua amplitude terapêutica. Outros agentes biológicos, como os peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCAM) estão sendo estudados para a eliminação de microrganismos em diversos campos da Medicina e, atualmente, na Odontologia, como o LL-37 e seu análogo KR-12-a5. A combinação proposta neste estudo de peptídeos e flavonóides incorporados ou não a um sistema de hidrogel, visa sua futura utilização como medicação intracanal nos casos de dentes imaturos com ápice aberto. É interessante que esta medicação tenha além do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório, tenha a capacidade de induzir células remanescentes a se diferenciarem em odontoblastos e a produzirem dentina intraradicular para a completa formação radicular, sem apresentar qualquer citotoxicidade para as células do tecido remanescente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vitro os efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório e indutor de diferenciação celular e

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

UF: SP

Município: ARACATUBA

CEP: 16.015-050

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 3.926.322

mineralização dentinária da combinação de peptídeos antimicrobianos e flavonoides e 2) caracterizar físico-química e biologicamente hidrogéis ou nanopartículas de quitosana como carreadores poliméricos desses compostos para fins de regeneração endodôntica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Emenda: risco mínimo, uma vez que esta pesquisa visa somente a coleta de dentes previamente extraídos na clínica de Cirurgia por equipe especializada, portanto, não realizaremos os procedimentos cirúrgicos. Assim, a participação nesta pesquisa não ocasionará nenhum desconforto e a doação será completamente voluntária. Também não infringe as normas legais e éticas. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade

Benefícios:

Emenda: Ao participar desta pesquisa o paciente não terá nenhum benefício direto. Porém, atualmente ainda não existe uma medicação intracanal considerada ideal para o grupo de dentes com rizogênese incompleta que foram comprometidos endodonticamente de forma irreversível, por isso, a busca por materiais mais biocompatíveis e que tenham capacidade de induzir tecido mineralizado sem causar toxicidade celular é de grande importância para a área. A pesquisadora se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto científico dentro das normas da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à execução do projeto.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"**



Continuação do Parecer: 3.926.322

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 20/09/2020. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1524561_É1.pdf	16/03/2020 15:38:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_karina_posdoc_Comite16_03_2020.pdf	16/03/2020 15:14:34	Karina Sampaio Caiaffa	Aceito
Folha de Rosto	NovafolhaDeRostoComitecelulasfinal.pdf	16/03/2020 12:34:32	Karina Sampaio Caiaffa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_tcle_posdoc_hdpc.pdf	16/03/2020 10:25:10	Karina Sampaio Caiaffa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ConsentimentoDoutorado.pdf	13/09/2019 17:20:32	Karina Sampaio Caiaffa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: JOSE BONIFÁCIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 3.926.322

ARACATUBA, 20 de Março de 2020

Assinado por:
Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE BONIFÁCIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

Página 04 de 04