PAOLA DANIELA HIDALGO ARAUJO

Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana tratados com diferentes soluções desmineralizantes e adesão das células da papila apical cultivadas.

São Paulo

2018

PAOLA DANIELA HIDALGO ARAUJO

Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana tratados com diferentes soluções desmineralizantes e adesão das células da papila apical cultivadas

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia / Dentística para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

Área de concentração: Endodontia

São Paulo

2018

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Araujo, Paola Daniela Hidalgo.

Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana tratados com diferentes soluções desmineralizantes e adesão das células da papila apical cultivadas / Paola Daniela Hidalgo Araujo; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2018.

69 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Expressão gênica. 2. Papila dentária. 3. Endodontia. I. Gavini, Giulio. II. Título.

Araujo, PDH. Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana tratados com diferentes soluções desmineralizantes e adesão das células da papila apical cultivadas. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: / /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEUS, pai que com suas bênçãos permitiu encontrar o caminho certo para o crescimento profissional. A minha mãe Noemi Araujo e meu namorado David Román que com seu amor fazem cada dia da minha vida mais especial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por seu amor infinito porque ele sempre me iluminou em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a minha linda **mamãe** que sempre com seu amor, conselhos e carinho consegui realizar meus sonhos.

Um agradecimento muito especial à **Universidade Central do Equador**, que desde a graduação me educou e agora me recebe como parte de seu corpo docente e sempre me ajudou na minha formação profissional, assim como na **Universidade de São Paulo**, todos os professores que ajudaram no desenvolvimento do programa DINTER e especialmente ao meu tutor **Prof. Dr. Giulio Gavini**, que me ajudou no desenvolvimento do meu trabalho e a **Profa. Dra. Marcia Martins** que com seu compromisso com os equatorianos tem sido parte fundamental na conclusão deste projeto.

Um agradecimento muito especial ao meu namorado **David Román** que com seu amor e paciência tem sido meu fiel companheiro em todas as minhas ocorrências e tem sido muito importante no desenvolvimento desta tese.

Agradeço a **Ana Clara** por toda sua ajuda e ensinamentos no laboratório, assim como todos os meninos e meninas de laboratório que na época me ajudou e forneceu seus conhecimentos.

O que vemos muda o que você sabe. O que sabemos muda o que vemos.

Jean Piaget .

RESUMO

Araujo, PDH. Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana tratados com diferentes soluções desmineralizantes e adesão das células da papila apical cultivadas.[tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original

O sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos depende da adequada descontaminação do espaço endodôntico, da presença de células mesenquimais indiferenciadas, da liberação de fatores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras para atração, proliferação, diferenciação celular e da presença de um “*scaffold*” que propicia suporte para a organização e vascularização do tecido neoformado. Os protocolos de regeneração pulpar têm utilizado o EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) para remover o *smear layer* e liberar fatores de crescimento presentes na matriz dentinária. Poucos estudos analisaram se a utilização de soluções quelantes específicas para o cálcio ou menos agressivas, apresentam melhores resultados na liberação de fatores de crescimento e na adesão das células da papila apical à superfície dentinária. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana previamente tratados com EDTA, EGTA e Ácido Cítrico e a adesão das células da papila apical à esses discos. Foram utilizadas células criopreservadas do biorrepositório de células do Laboratório de Biologia Básica do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os discos de dentina foram obtidos da porção radicular interna de pré-molares e terceiros molares hígidos, humanos, que foram obtidos do Biobanco da FOU SP – Divisão de Dentes Humanos. Após a imersão por 1 minuto nas soluções desmineralizantes, os discos de dentina foram transferidos para placas com 90 poços e as células foram plaqueadas. A adesão celular foi avaliada após 48 horas empregando-se a Microscopia Eletrônica de Varredura. Determinou-se a expressão gênica após os períodos de 07 e 21 dias de cultivo celular. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância a 1 critério (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Aos 21 dias o tratamento da dentina com EGTA resultou em significativo aumento da BMPR1, comparado com PBS. Nenhuma condição experimental alterou a expressão de BMPR2. A expressão da TGBR1 aos 21 dias foi significativamente aumentada pelo tratamento prévio dos discos com EGTA. Embora não tenha ocorrido distribuição uniforme de células ao longo dos discos, foi observada adesão celular em todos os grupos experimentais. Conclui-se que o tipo de solução desmineralizante interfere na quantidade liberada dos fatores de crescimento BMPR1 e TGFBR1, presentes na dentina humana, não interferindo na adesão das células da papila apical na superfície dentinária.

Palavras chave: Expressão gênica. Papila dentária. Endodontia

ABSTRACT

Araujo, PDH. Gene expression of BMPR1, BMPR2 and TGFBR1 released from human dentin disks treated with different demineralizing solutions and adhesion of cultured apical papilla cells [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

The success of regenerative endodontic procedures depends on the proper disinfection of the root canal, the presence of undifferentiated mesenchymal cells, the release of growth factors that act as signaling molecules for attraction, proliferation, cell differentiation and the presence of a scaffold that provides support for the organization and vascularization of neoformed tissue. Pulp regeneration protocols have used EDTA to remove the smear layer and release growth factors present in the dentin matrix. A few studies have analyzed whether the use of calcium-specific chelating or less aggressive solutions have better results in the release of growth factors and the adhesion of apical papilla cells to the dentin surface. The objective of this study was to evaluate the gene expression of BMPR1, BMPR2 and TGFBR1 released from human dentin disks previously treated with EDTA, EGTA and Citric Acid and the adhesion of apical papilla cells to these disks. Cryopreserved cells from the cell biorepository of the Basic Biology Laboratory of the Department of Dentistry of the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo were used. Dentin discs were obtained from the inner root portion of premolars and human third molars that were obtained from the Biobank of the Human Tooth Division (FOUSP). After 1 min immersion in the demineralizing solutions the discs were transferred to plaques and the cells were plated. The cell adhesion was evaluated after 48 hours using the Scanning Electron Microscopy. Gene expression was determined after the periods of 7 and 21 days of cell culture. Statistical analysis was performed by analysis of variance at 1 criterion (ANOVA) followed by Tukey test post, with a significance level of 5%. At 21 days treatment of dentin with EGTA resulted in a significant increase of BMPR1 compared to PBS. No experimental condition altered BMPR2 expression. The expression of TGBR1 at 21 days was significantly increased by pretreatment of the EGTA discs. Although there was no uniform distribution of cells along the discs, cell adhesion was observed in all experimental groups. It is concluded that the type of

demineralizing solution interferes with the released amount of the BMPR1 and TGFBR1 growth factors present in the human dentin, not interfering in the adhesion of apical papilla cells to the dentinal surface.

Keywords: Gene Expression. Dental papila. Endodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 –	Fotomicrografia da expansão celular das células da papila apical.....	37
Figura 4.2 –	Disco de dentina obtido do interior da raiz.....	39
Figura 4.3 –	Discos de dentina cortados e lixados.....	39
Figura 4.4 –	Colocação individual dos discos de dentina de acordo com os grupos experimentais.....	40
Figura 5.1–	Expressão gênica relativa dos receptores de BMPR1 (1A – 7 dias; 1B - 21dias), BMPR2 (1C – 7 dias; 1D - 21dias), TGFBR1(1E – 7 dias; 1F - 21dias). Os dados foram obtidos em triplicata e representam a média e o desvio-padrão de cada receptor nos diferentes tempos experimentais.....	46
Figura 5.2 –	Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com PBS. (1000 x).....	47
Figura 5.3 –	Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com EDTA 17% (1000 x).....	48
Figura 5.4 –	Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com acido cítrico 15% (1000 x).....	49
Figura 5.5 –	Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com EGTA 17% (1000 x).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ARN	Do inglês <i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
BMP2	Do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein 2</i> (proteína morfogenética ossea 2)
BMPR1	Do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein Receptor, type IA</i>
BMPR2	Do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein Receptor, type II</i>
cDNA	Do inglês <i>complementar deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
CHX	Clorexidina
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ct	Do inglês <i>Cycle Threshold</i> (limiar do ciclo)
DEPC	Água tratada com 0.1% de dietilpirocarboneto
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EGF	Do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i> (fator de crescimento epidérmico)
EGTA	ácido etileno-glicol-bis-tetra-cético
FGF-1	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento do fibroblasto 1)
GAPDH	Do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDFs	Do inglês <i>Growth and Differentiation Factors</i> (Fatores de Crescimento e Diferenciação)
MD	Meio de diferenciação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIF	Do inglês <i>Müllerian inhibitory factor</i> (Fator inibitório de Müller)
MMPs	Metaloproteinases
MP	Meio de proliferação
MTA	Trióxido Mineral Agregado
MTAD	Mistura de isômero de tetraciclina, um ácido e um detergente
NaOCL	Hipoclorito de Sódio
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato-salina)
PCR	Do inglês <i>polimerase change reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PDGF	Do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDGF	Do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
pH	Potencial de hidrogênio
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SBF	Soro Bovino Fetal

SCAP	Do inglês <i>Stem cells from the Apical Papilla</i> (células-tronco da papila apical)
TGF-1	Do inglês <i>Transforming Growth Factor</i> (fator de crescimento transformante 1)
TGFBR1	Do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 1</i>
VEGF	Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Fator</i> (fator de crescimento vascular endotelial)
α -MEM	Do inglês <i>α-Modified Eagle Medium</i> (Meio Mínimo Essencial α)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
3	PROPOSIÇÃO	32
3.1	<i>Objetivo específico</i>	33
3.2	<i>Hipótese de Nulidade</i>	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	<i>Aspectos éticos</i>	34
4.2	<i>Descongelamento e Expansão Celular</i>	34
4.3	<i>Preparo dos discos de dentina</i>	36
4.4	<i>Extração de RNA para a expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 das células da papila apical</i>	38
4.5	<i>Quantificação do tRNA</i>	39
4.6	<i>Tratamento com DNase</i>	39
4.7	<i>Transcrição reversa</i>	40
4.8	<i>Reação em cadeia de polimerase em tempo real</i>	40
4.9	<i>Preparo dos espécimes para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	41
4.10	<i>Análise Estatística</i>	41
5	RESULTADOS	42
5.1	<i>Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 dos discos de dentina humana</i>	42
5.2	<i>Adesão Celular sob Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	44
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de dentes com rizogênese incompleta e periodontite apical sempre foi um grande desafio para a Endodontia. Nesses casos, a conduta convencional, denominada apicificação, baseia-se em procedimentos que têm como objetivo eliminar a infecção existente e induzir a formação de uma barreira apical calcificada. Para que isso ocorra, são necessárias múltiplas trocas de hidróxido de cálcio, prolongando o tempo de tratamento, o que altera as propriedades mecânicas da dentina, deixando os dentes susceptíveis à fratura.

O tampão apical de Trióxido Mineral Agregado (MTA) surgiu como alternativa à técnica de apicificação e apresenta, como principal vantagem, o fato de ser realizada em menos sessões, abreviando o tempo de tratamento.

Tanto a apicificação quanto o tampão apical de MTA não induzem espessamento das paredes radiculares e o desenvolvimento contínuo da raiz, fatores importantes para prevenir futuras fraturas radiculares.

A Endodontia Regenerativa é definida pela Associação Americana de Endodontia como o conjunto de procedimentos com bases biológicas que utilizam princípios da medicina regenerativa e da engenharia tecidual, indicados para reparar danos no complexo dentino-pulpar e na estruturas radicular.

Para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos é necessário a desinfecção do canal radicular, a manutenção da viabilidade das células da papila apical, a exposição de fatores de crescimento presentes na dentina, a presença de uma matriz para a condução da proliferação celular e um bom selamento do acesso coronário.

Nos protocolos de regeneração pulpar têm-se utilizado o EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) para promover a desmineralização da dentina e liberar fatores de crescimento presentes na matriz dentinária. Entretanto, desconhece-se a

concentração ideal a ser empregada, o tempo de contato necessário ou se a utilização de soluções quelantes específicas para o cálcio, como o ácido etileno-glicol-bis-tetracético (EGTA), ou menos agressivas como o ácido cítrico, apresentam melhores resultados na liberação de fatores de crescimento e na adesão das células da papila apical à superfície dentinária.

Assim sendo, a realização de estudos que avaliem a expressão gênica de fatores de crescimento liberados pela dentina humana tratada com diferentes soluções desmineralizantes, apresenta relevância, já que o tratamanto químico superficial da dentina pode afetar essa liberação, bem como a adesão das células da papila apical.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em dentes com incompleta formação radicular, a necrose pulpar resulta na paralisação do processo de rizogênese, resultando em dentes com ápice aberto, canais amplos e paredes radiculares finas e frágeis. O tratamento endodôntico, nestes casos, tem como objetivo promover a formação de uma barreira apical que permita posterior obturação do canal radicular, sem extravasamento do material obturador. Este tratamento recebe o nome de apicificação, podendo ser realizado através de medicação intracanal com hidróxido de cálcio ou tampão apical de MTA (Bose et al., 2009).

Na apicificação, a medicação intra-canal com hidróxido de cálcio induz a formação de uma barreira de tecido calcificado, basicamente composta por cemento, osso e dentina. A liberação de íons hidroxila confere ação antibacteriana e eficiência na formação da barreira apical (Rafter, 2005). O primeiro passo é a desinfecção do canal radicular por meio de irrigação com hipoclorito de sódio (NaOCL) e instrumentação do canal radicular. Em seguida, a pasta de hidróxido de cálcio é colocada no canal radicular, devendo permanecer por no mínimo uma semana, para potencializar a descontaminação do canal radicular (Witherspoon et al., 2008). Na segunda sessão, utiliza-se uma pasta mais consistente de hidróxido de cálcio, preenchendo todo canal radicular, verificando-se o total preenchimento do canal radicular através de radiografia periapical. O tempo de formação da barreira apical varia de 6 a 18 meses. A cada 3 meses verifica-se a presença de material no canal radicular, e, caso tenha sido reabsorvido, deve ser trocada a medicação por uma nova pasta de hidróxido de cálcio até que a barreira apical tenha sido formada. A formação da barreira deve ser constatada radiograficamente e clinicamente, através da sondagem apical com uma lima de pequeno diâmetro, procedendo-se, em seguida, à obturação do canal radicular (Trobe, 2010).

O tampão apical com MTA foi introduzido na Endodontia em 1998. O contato do MTA com os tecidos periradiculares estimula a diferenciação celular e formação de uma matriz dura, mais consistente que a obtida pelo uso do hidróxido de cálcio, e em

menor tempo (Rafter, 2005; Witherspoon et al., 2008). Após a desinfecção do canal radicular, coloca-se uma camada de sulfato de cálcio na região apical (barreira reabsorvida usada como anteparo) onde será compactado um incremento de 3 a 4 mm de MTA, impedindo que este extravase para toda a região apical. Uma bolinha de algodão úmida é deixada no canal até que o MTA tome presa e permita a posterior obturação endodôntica, que deve ser cuidadosamente realizada, evitando-se forças excessivas de compactação, devido à debilidade das paredes dentinárias (Trope, 2010).

Independente do tipo de medicamento utilizado, existe um risco de fratura radicular durante a apicificação. Além disso, o tempo necessário para a formação da barreira pelo uso do hidróxido de cálcio varia de 3 a 24 meses (Witherspoon et al., 2008), sendo que esta pode ser porosa e limitada apenas à parte apical, além da necessidade de múltiplas consultas (Shah et al., 2008; Wang et al., 2010).

O MTA tem a vantagem, em relação ao Hidróxido de Cálcio, de tomar presa em ambiente úmido, mesmo assim, não fortalece nem permite o desenvolvimento contínuo de raízes, mantendo a debilidade das paredes dentinárias e, conseqüentemente, a alta incidência de fratura radicular (Rafter, 2005; Shah et al., 2008; Wang et al., 2010). Segundo Yamauchi et al. (2011) o índice de fratura durante ou após a apicificação é de 30%.

A terapia endodôntica regenerativa no tratamento de dentes não vitais emprega dois conceitos: a regeneração tecidual e a invaginação de células mesenquimais indiferenciadas (Bansal; Bansal, 2011). A regeneração pulpar estuda o desenvolvimento de novo tecido pulpar *in vitro* a partir de células indiferenciadas estimuladas por fatores de crescimento, com o objetivo de regenerar o tecido pulpar perdido (Zhang; Yelick, 2010; Bansal; Bansal, 2011). Já a invaginação de células indiferenciadas da região apical de dentes de pacientes jovens com ápice aberto (Zhang; Yelick, 2010), fundamenta-se na sobrevivência destas células à necrose pulpar, mesmo na presença de infecção perirradicular (Huang et al., 2008).

Estudos realizados em dentes reimplantados ou transplantados, nas décadas de 50 e 60 (Hale, 1954; Myers; Flanagan, 1958), observaram a revascularização do tecido pulpar isquêmico e a ocorrência de revascularização desse tecido após 48

horas por meio de um fenômeno chamado embebição plasmática. Nygaard-Ostby (1961) em estudo histológico em cães, observou que após a desinfecção do canal radicular, a presença de sangramento com a formação do coágulo sanguíneo foi essencial para a formação de tecido conjuntivo fibroso no canal radicular vazio.

A revascularização com continuação do desenvolvimento radicular e deposição de tecido duro no canal radicular é observada muitas vezes quando um dente é reimplantado após a avulsão (Cvek, 1992). O tempo extraoral e o nível de maturação radicular, são fatores determinantes para que isso ocorra. Quanto menor o tempo exposto fora da boca, menores as chances de contaminação, tendo melhores chances das células se manterem vitais; e quanto maior a largura do forame, maiores as chances de ocorrer o restabelecimento do feixe vículo-nervoso (Skoglund; Trontad, 1981).

Essas observações preliminares foram extremamente relevantes para que a partir do ano 2000, a terapia endodôntica regenerativa pudesse ser estudada como uma alternativa à apicificação.

Iwaya et al. (2001) relataram o caso clínico de um paciente de 13 anos de idade que possuía um pré-molar inferior com rizogênese incompleta e periodontite apical primária. Os autores não realizaram instrumentação mecânica, irrigando abundantemente o canal radicular e em seguida empregaram agentes antimicrobianos como medicação intra-canal. Assim o tecido coronário, necrótico e infectado, foi removido, deixando tecido pulpar apical no canal para promover revascularização. O canal radicular não foi obturado. Ocorreu a continuidade do desenvolvimento radicular, indicando a existência de potencial revascularização da polpa dentária em dentes permanentes jovens, em que o canal radicular esteja livre de contaminação. O exame radiográfico 5 meses após a conclusão do protocolo antimicrobiano, mostrou o início do fechamento apical. O espessamento das paredes do canal radicular e fechamento apical completo foi confirmado 30 meses após o término do tratamento.

O protocolo de revascularização empregado atualmente foi introduzido por Banchs e Trope (2004) e baseia-se na importância do coágulo reportado por Nygaard-Ostby (1961). Os autores observaram que em dentes com necrose pulpar e

rizogênese incompleta, a continuação da formação radicular e o espessamento das paredes dentinárias pode ocorrer, desde que seja criado um ambiente favorável (canal efetivamente desinfetado), presença de matriz para o crescimento de novo tecido e o acesso coronário efetivamente selado para prevenção de reinfecção.

Wang et al. (2010) avaliaram por meio de análise histológica o tipo de tecido formado após procedimentos endodônticos regenerativos em cães e concluíram que o espaço pulpar é formado por tecido duro semelhante a cimento, e somente em um caso, foi observado tecido pulpar parcialmente vital, porém são necessários mais estudos histológicos para avaliação do tecido formado.

Gomes-Filho et al. (2013) também observaram formação de cimento na cavidade pulpar de dentes previamente infectados. Pelo fato de não estar claro o tipo de tecido formado, o termo usado para tais procedimentos é muito discutido. Os termos mais utilizados são: regeneração, revitalização e revascularização. O termo revascularização descreve o restabelecimento de suprimento vascular com o tecido pulpar existente em dentes permanentes imaturos (Simon et al., 2007). Revitalização descreve o crescimento de tecido que pode não ser semelhante ao tecido perdido (Wang et al., 2010) e terapia endodôntica regenerativa se refere ao restabelecimento de estruturas que sofreram danos, incluindo dentina e estruturas radiculares, bem como células do complexo dentino-pulpar (Murray et al., 2007).

Trope escolheu o termo revascularização, não por ser um termo preciso, mas por não saber a natureza do tecido formado e por ter a certeza que esse tecido tem um suprimento sanguíneo, portanto afirma ser vascularizado (Trope, 2010). Porém mais recentemente sugeriu que o termo revitalização seria mais apropriado por descrever um tecido vital não específico formado no canal radicular (Lenzi; Trope, 2012).

Os termos geração tecidual guiada ou induzida e regeneração foram sugeridos por Huang e Lin (2008) que discordam do termo revascularização.

Hargreaves et al. (2008) deixaram de usar o termo revascularização para o uso de procedimentos endodônticos regenerativos, justificando que o objetivo do tratamento endodôntico é regenerar o complexo dentina/polpa com propriedades

funcionais que são capazes de dar suporte a continuação do desenvolvimento radicular, enquanto soluciona a periodontite apical.

Na literatura existem algumas teorias que tentam explicar o mecanismo de ação dos procedimentos endodônticos regenerativos. A primeira hipótese relaciona a regeneração pulpar às células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal, as quais podem proliferar na porção apical e se diferenciar em cementoblastos e depositar tecido mineralizado nas paredes dentinárias (Lieberman; Trowbridge, 1983). Outra teoria sugere que células mesenquimais indiferenciadas podem ser abundantes no tecido pulpar necrótico de dentes com rizogênese incompleta, as quais podem se aderir às paredes radiculares internas e se diferenciarem em odontoblastos, que secretariam dentina nesta região (Gronthos et al., 2002). Banchs; Trope (2004) sugerem que células pulpares vitais podem sobreviver na porção apical da raiz radicular, às quais proliferaram sobre a matriz formada e se diferenciam em odontoblastos sob estímulo das células dos restos epiteliais de Mallassez. Por sua vez Lovelace et al. (2011), afirmam que células mesenquimais indiferenciadas remanescentes da papila apical, polpa dentária, ligamento periodontal e osso alveolar, possuem alta capacidade proliferativa quando estimuladas por uma sobre-instrumentação, formando tecido mineralizado dentro do canal radicular.

Para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos é fundamental a presença da tríade: células tronco, “*scaffolds*” que propiciam um suporte para a organização, proliferação, diferenciação e vascularização celular e os fatores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras (AAE, 2013).

Essencial, o coágulo sanguíneo atua como suporte para a organização celular, proliferação, diferenciação e vascularização (Bohl et al., 1998). A maioria dos protocolos propostos na literatura envolve a manipulação dos tecidos periapicais, com o objetivo de promover o sangramento para induzir a formação de um coágulo sanguíneo no espaço do canal radicular (Banchs; Trope, 2004; Chueh; Huang, 2006; Petrino, 2007; Thibodeau; Trope, 2007; Cotti et al., 2008; Jung et al., 2008; Shah et al., 2008; Ding et al., 2009; Reynolds et al., 2009; Shin et al., 2009; Thibodeau, 2009; Kim et al., 2010; Petrino et al., 2010; Thomson; Kahler, 2010; Cehreli et al., 2011; Nosrat et al., 2011; Chen et al., 2012; Jeeruphan et al., 2012; Lenzi; Trope, 2012;

Nosrat et al., 2012; Nagata et al., 2014a,b). O coágulo ainda contribui para a migração de células indiferenciadas da papila apical ou do ligamento periodontal que atuarão na deposição de tecido mineralizado, nas paredes internas do canal radicular. A relevância da presença do coágulo tem sido sugerida por alguns estudos que relataram a expressão de marcadores específicos de células indiferenciadas em coletas de sangue do canal radicular durante procedimentos endodônticos regenerativos (Lovelace et al., 2011), sugerindo que o estímulo aos tecidos apicais e a formação do coágulo podem transportar células indiferenciadas para o espaço do canal radicular.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido sugerido como um “*scaffold*” para os procedimentos endodônticos regenerativos, Torabinejad e Turman (2011) relataram sucesso após quase seis meses de tratamento, com desenvolvimento de tecido mineralizado completo. Também é uma alternativa para os casos em que não se obtêm sangramento ao estimular o tecido apical. Relata-se que o PRP apresenta fatores de crescimento, produz agentes anti-inflamatórios, inicia a vascularização, induz diferenciação celular, controla a resposta inflamatória local e melhora o reparo por tecido mole e duro, entretanto traz como desvantagens a necessidade de coleta de sangue de pacientes jovens, aquisição de equipamentos especiais e aumento do custo do tratamento (Torabinejad; Turman, 2011).

Há também outros tipos de “*scaffolds*” biodegradáveis ou permanentes disponíveis como colágeno, ácido hialurônico ou sintéticos, como o ácido poliglicólico ou hidroxiapatita (Gotlieb et al., 2008; Chandrhasa et al., 2011). Petrino et al. (2010) estimularam o sangramento para a formação do coágulo e sobre ele inseriram uma membrana colágena (CollaTampe, Zimmer Dental, Carlsbad, CA). Jung et al. (2008) em um dos seus casos relatou que a presença da membrana facilita a inserção posterior do MTA.

Por outro lado, há relatos de casos clínicos de tratamento sem o estímulo do sangramento para a formação do coágulo que relatam sucesso, como o término do desenvolvimento radicular (Chueh; Huang, 2006).

A descontaminação constitui etapa fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico, sendo alcançada pela utilização instrumentos endodônticos e

substâncias químicas auxiliares. Porém, para dentes imaturos, a remoção de microrganismos por meios mecânicos é limitada devido à fina espessura das paredes dentinárias fazendo com que a limpeza seja obtida por meio de irrigação e medicação intracanal (Zhang; Yelick, 2010). O hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada mundialmente (Clarkson; Moule, 1998) e apresenta propriedades antimicrobianas contra os principais patógenos endodônticos, podendo ser utilizado em várias concentrações de cloro livre (Gavini et al., 2016).

Na grande maioria dos casos reportados de regeneração pulpar, foram utilizadas concentrações elevadas de hipoclorito de sódio. Reynolds et al. (2009), Shin et al. (2009) e Nagata et al. (2014a,b) empregaram hipoclorito de sódio a 6%. Iwaya et al. (2001); Cotti et al. (2008) e Iwaya et al. (2011) por sua vez, utilizaram NaOCL a 5% associado a peróxido de hidrogênio a 3%. Banchs e Trope (2004), Petrino (2007), Jung et al. (2008), Ding et al. (2009), Petrino et al. (2010), Nosrat et al. (2011), Torabinejad e Turman (2011), Chen et al. (2012) e Nosrat et al. (2012) indicam a solução de NaOCL a 5,25%. Chueh e Huang (2006), Jung et al. (2008), Chueh et al. (2006), Cehreli et al. (2011), Lenzi e Trope (2012) e Jeeruphan et al. (2012) utilizaram o NaOCL a 2,5%. Shah et al. (2008) utilizaram o NaOCL a 2,5% associado ao peróxido de hidrogênio a 3%. Thibodeau e Trope (2007) e Thibodeau (2009) utilizaram NaOCL a 1,25%. Thomson e Kahler (2010) fizeram uso de NaOCL a 1%, com auxílio de ultrassom.

Também existem relatos do emprego da clorexidina nas concentrações de 0,12% a 2%, onde apesar das propriedades antimicrobianas satisfatórias, esta substância não é biocompatível, podendo inviabilizar as células-tronco presentes no tecido pulpar, impedindo as mesmas de se aderirem à superfície dentinária intraradicular (Ring et al., 2008). Treviño et al. (2011) comprovaram que o emprego do NaOCL não afeta a sobrevivência das células mesenquimais indiferenciadas, ao contrário da Clorexidina (CHX), que talvez por sua substantividade, parece interferir na adesão dessas células.

Além do uso de soluções antimicrobianas, faz-se necessário também o uso de agentes desmineralizantes para a remoção da smear layer, sendo os mais comuns o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), o ácido cítrico e MTAD®. Essa última é composta por solução de tiosulfato 3%, ácido cítrico 4,25% e o detergente polisorbato

0,5%, utilizada por Torabinejad et al. (2011). O EDTA é capaz de liberar vários fatores de crescimento presentes na matriz dentinária (Tziafas et al., 1995; Zhao et al., 2000), portanto é indicado seu uso pela American Association of Endodontics (AAE, 2013).

Wingler et al. (2013) afirmam que para o sucesso da revascularização é fundamental a eliminação do tecido pulpar necrótico acompanhado da desinfecção química do canal radicular, sendo a instrumentação contraindicada. Essa descontaminação será alcançada na primeira sessão de atendimento pelo emprego do hipoclorito de sódio (NaOCL), que além da ação antimicrobiana promove a dissolução da matéria orgânica sem contudo afetar as células mesenquimais indiferenciadas da papila dentária. A desinfecção obtida nessa etapa é complementada pela medicação intra-canal, que segundo os autores pode ser a pasta tri-antibiótica ou o Hidróxido de Cálcio. Na segunda sessão a medicação é removida com irrigação abundante com NaOCL e soro fisiológico. Antes de induzir o sangramento apical, é utilizado o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), para descalcificar a dentina e expor sua matriz orgânica, rica em fatores de crescimento que atrairão células mesenquimais indiferenciadas e promoverão sua diferenciação. O coágulo formado a partir do sangramento apical faz o papel de *scaffold* para que as células e os vasos possam povoar o canal radicular, observando-se em seguida a diferenciação, o crescimento e a maturação dos fibroblastos, odontoblastos e cementoblastos.

O tratamento da dentina com EDTA, além de expor a matriz orgânica liberando fatores de crescimento, também pode facilitar a adesão das células mesenquimais indiferenciadas e induzir sua diferenciação. Pang et al. (2014) demonstraram que o tratamento prévio de discos de dentina com EDTA favorece a adesão das células da polpa dental e sua diferenciação em odontoblastos e osteoblastos, ao liberar fatores de crescimento da matriz orgânica dentinária, como BMP2, PDGF, VEGF conhecidos por promover a proliferação e diferenciação celular.

Ácidos orgânicos e condicionadores são usados para expor estes fatores de crescimento, entre os quais estão o fator de crescimento do fibroblasto 1 e 2 (FGF-1, FGF- 2), fator de crescimento transformante 1 (TGF-1), a proteína osteomorfogenética 2 (BMP-2), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), bem como de fatores angiogênicos tais como fator de

crescimento vascular endotelial-fator (VEGF), que regulam as respostas imunológicas, angiogênicas, recrutamento celular, proliferação e diferenciação, que servirão de guia celular em protocolos que visam a regeneração tecidual (Galler et al., 2015).

O EDTA além de expor fatores de crescimento presentes na matriz dentinária, lava os resíduos dos irrigantes utilizados para a descontaminação da dentina (Kim et al., 2015).

Alghilan et al. (2017) ao testarem vários protocolos de endodontia, observaram que a utilização do EDTA é essencial para reverter os efeitos citotóxicos dos irrigantes e medicamentos empregados, além de viabilizar a liberação de fatores de crescimento e a migração e diferenciação celular.

Galler et al. (2016) salientam que o condicionamento da dentina favorece a migração celular, porque ao promover a liberação dos fatores de crescimento, estes podem difundir no sangue do canal radicular, estabelecendo um gradiente, que promove a migração celular dentro do canal e adesão às paredes dentinárias. Além disso os fatores de crescimento expostos na dentina, promovem a diferenciação das células aderidas.

Para neutralizar os efeitos deletérios dos irrigantes na dentina, Shrestha et al. (2016) constataram que o condicionamento da dentina com duas associações de dexametasona com quistosona, melhora a aderência, viabilidade e diferenciação das células da papila apical. O tratamento de superfície com as nanopartículas associado ao tratamento com EDTA e NaOCL, parece promover uma superfície hidrofílica, melhorando as propriedades mecânicas da dentina, aumentando a reatividade química, ocorrendo a liberação de moléculas bioativas essenciais para os procedimentos regenerativos.

A regeneração é uma cascata de eventos onde há uma interdependência entre inflamação e angiogênese onde, as proteínas da matriz orgânica da dentina, que podem ser liberadas, induzem recrutamento celular, pois são moléculas quimiotáticas, que sinalizam a localização espacial das células tronco ao longo das paredes dentinárias (Smith et al., 2016)

Prompteecha et al. (2018), ao compararem vários protocolos de irrigação dinâmica, observaram que a adesão foi significativamente aumentada em protocolos onde a solução salina foi utilizada como irrigador final.

Wei et al. (2009) demonstraram que a adesão dos osteoblastos aumentou com a elevação da molhabilidade da superfície, em particular, em uma superfície super-hidrofílica, na qual ocorreu adsorção de fibronectina no modo competitivo. Estes resultados sugerem que a adsorção de fibronectina pode ser responsável por aumentar a adesão celular em superfícies hidrofílicas num fluido corporal ou meio de cultura sob condições fisiológicas.

Resultados semelhantes foram observados por Huang et al. (2012), que ao avaliarem o efeito da molhabilidade da dentina intracanal na adesão de células pulpares humanas, após a utilização de diferentes irrigantes, observaram aumento significativo da adesão celular, quando do emprego de soluções como MTAD e EDTA.

Hashimoto et al. (2018) concluíram que a irrigação final com EDTA por 10 minutos, de discos de dentina bovina pré-tratados com NaOCL a 1,5%, aumenta a adesão e diferenciação celular, pois além de eliminar o *smear layer* e expor fatores de crescimento, expõe também os componentes da matriz, como o colágeno tipo I, III e V, ou glicosaminoglicanos, havendo uma subsequente ativação da sinalização integrina / PI3K, que são essenciais para a recuperação da superfície da dentina, alterada pelo pré-tratamento com NaOCL. A maior adesão celular está relacionada com o aumento da molhabilidade da superfície provocada pelo emprego do EDTA.

O efeito quelante do EDTA depende de fatores como pH, temperatura, concentração, apresentação e suas associações, além do tempo de contato, salientando que o tempo ótimo de desmineralização é de 15 minutos (Serper, Çalt, 2002; Sousa-Neto et al., 2002; Sousa, Silva, 2005).

O interesse sobre o ácido etileno-glicol-bis-tetra-cético (EGTA) está relacionada com sua capacidade quelante específica sobre o íon Cálcio enquanto o EDTA possui capacidade de quelar íons metálicos em geral como são Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Bi^{3+} e Fe^{3+} (Segura et al, 1996; Segura et al, 1997; Segura-Egea, 2003)

Calt e Serper (2000) relatam que o EDTA quela os íons Ca + bem como outros cátions divalentes, desmineralizam a dentina e removem componentes inorgânicos do smear layer. O EGTA liga-se mais especificamente aos íons cálcio e comparou a remoção da smear layer entre 17% de EDTA e 17% de EGTA e os dois subsequentemente irrigados com NaOCL a 5% e mostrou que o EDTA o removeu completamente causando erosão, e o EGTA também removeu o smear layer sem causar erosão.

Cruz Filho et al. (2002), relata que na área médica quando é necessário um meio isento de cálcio, o EGTA (ácido etilenoglicol-bis-tetra-acético) tem sido utilizado em baixas concentrações a pH neutro, mostrou ação semelhante em diminuir a microdureza da dentina EDTA em concentrações mais baixas, mesmo que sempre ser escolhida para ser menos tóxicos.

Outro desmineralizante empregado na Endodontia é o ácido cítrico, que é um ácido orgânico fraco que apresenta propriedades descalcificantes semelhantes ao EDTA, sendo menos citotóxico (Scelza et al., 2001; Scelza et al., 2003; Amaral et al., 2007).

Diante do exposto, fica evidente que o tratamento de superfície da dentina intracanal com soluções irrigantes com capacidade desmineralizante, pode interferir positivamente na adesão e diferenciação celular, desempenhando importante papel nos procedimentos endodônticos regenerativos. Encontrar a solução desmineralizante mais efetiva, menos citotóxica, que promova aumento da molhabilidade da superfície dentinária, sem provocar sua erosão, liberando os fatores de crescimento presentes na matriz orgânica, mostra-se de extrema importância para o sucesso da regeneração pulpar.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da revisão da literatura apresentada, observa-se a importância da realização de trabalhos que avaliem a expressão gênica de fatores de crescimento

liberados pela dentina humana, que modularão a diferenciação celular durante a realização dos procedimentos regenerativos pulpaes. O tratamento químico superficial da dentina pode afetar essa liberação, bem como a adesão das células da papila apical.

3.1 Objetivo específico

- Avaliar a expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 liberados de discos de dentina humana previamente tratados com EDTA, EGTA e Ácido Cítrico.
- Avaliar a adesão das células da papilla apical aos discos de dentina humana, tratatados com EDTA, EGTA e Ácido Cítrico.

3.2 Hipótese de Nulidade

- O tipo de solução desmineralizante não interfere na quantidade liberada de fatores de crescimento (BMPR1, BMPR2 e TGFBR1) presentes na dentina humana.
- O tipo de solução desmineralizante não interfere na adesão das células da papila apical em discos de dentina humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo baseou-se em artigos já expostos na Revisão da Literatura. Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados, seguindo criteriosos protocolos de assepsia e de manuseio dos materiais a fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi iniciado após aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Parecer No. 2.253.947, CAAE: 73429617.0.0000.0075. Anexo A).

Para esse experimento foram utilizadas células da linhagem SCAP (células-tronco da papila apical) previamente caracterizadas que se encontravam criopreservadas no biorrepositório de células do Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2 Descongelamento e Expansão Celular

Para o descongelamento e cultivo das células da papila apical foi utilizado o meio de cultura *α -Modified Eagle Medium* (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), 100 μ M de L-ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen). As células foram transferidas para frascos de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável e mantidos em incubadora a 37°C com 5%

de CO₂ e 100% de umidade. As culturas foram mantidas neste primeiro frasco até que as células alcançassem subconfluência, ou seja, quando 70% da área cultivável do frasco estava coberto por células, com trocas de meio a cada 2-3 dias. A expansão foi realizada da seguinte forma: a camada celular foi lavada com PBS (1X, Tampão Salina-Fosfato pH= 7,2; LGC Biotecnologia) e para a remoção das células aderidas ao fundo do frasco foi utilizada solução de tripsina (1mL) a 0,25% contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1mM (Invitrogen/Gibco), por 3 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada utilizando-se meio de cultura contendo SBF e as células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio de 15 mL e centrifugadas a 800 x g/5min/TA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspense em 1 mL de meio de cultura fresco. Aliquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em frascos de 25 cm² contendo 3 mL de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares. A utilização das células ocorreu a partir da quarta passagem.

Figura 4.1 - Fotomicrografia da expansão celular das células da papila apical

4.3 Preparo dos discos de dentina

Pré-molares e terceiros molares hígidos humanos foram obtidos do **Biobanco** **fa FOU SP** – Divisão de Dentes Humanos, e foram estocados em solução de *Cloramida* ao 0.5%

A coroa foi removida (Isomet; Buehler Ltd, Evanston, IL) e a raiz foi seccionada longitudinalmente em 2 metades por meio de discos de diamante sob refrigeração. A partir da superfície interna de cada raiz foram obtidos discos de 4mm de largura e 1 mm de espessura, para se ajustarem ao diâmetro dos poços das placas de 96 poços. Em seguida, os discos foram polidos em lixas de gramatura decrescente (600-, 800-, 1000- e 2000). As amostras foram mantidas em EDTA 17% por 1 min em banho ultrassônico para a remoção de *smear layer* e enxaguadas em PBS por 1 min.

Com o intuito de mimetizar o protocolo de revascularização, os discos foram irrigados com 100 μ L de NaOCL 1,5% por 1 min. Os discos de dentina foram lavados com 200 μ L de PBS e divididos em 4 grupos experimentais: PBS (controle negativo), EDTA 17%, EGTA 17% e Ácido cítrico 15%. Os espécimes foram imersos em 100 μ L de solução e incubados durante 01 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, os espécimes foram removidos e colocados individualmente em poços de placas de 96 poços contendo 100 μ L de α -MEM 15% de SBF.

As células foram descoladas dos frascos, centrifugadas a 800 x g / 5 min/ TA e contadas em hemocítômetro. Em seguida, as células foram ajustadas na concentração de 8×10^4 células/mL e distribuídas em cada poço em volume de 100 μ L totalizando 8×10^3 células/ poço. Após 4 h para permitir a adesão, 100 μ L de meio completo foi adicionado totalizando 200 μ L.

As células foram cultivadas durante 48 horas para análise em MEV da adesão nos discos e 7 e 21 dias para a extração de RNA.

Figura 4.2 - Disco de dentina obtido do interior da raiz

Figura 4.3 - Discos de dentina cortados e lixados

Figura 4.4 – Colocação individual dos discos de dentina de acordo com os grupos experimentais

4.4 Extração de RNA para a expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 das células da papila apical

A expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 das células de papila apical foi avaliada por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) nas amostras coletadas aos 7 e 21 dias após cada um dos 4 tratamentos propostos (PBS, EDTA, Ácido cítrico e EGTA) sobre os discos de dentina.

O RNA total (RNA) foi obtido pela homogeneização das amostras em Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol-Invitrogen Brasil LTDA (1mL/ 100µL de amostra)]. O meio de cultura de cada espécime foi descartado e em seguida foram adicionados 100 µL de Trizol. A solução foi transferida para tubos de microcentrifuga onde foram adicionados 900 L de Trizol totalizando 1000 µL conforme recomendação do fabricante. Nos poços contendo discos, estes foram transferidos para os tubos e vigorosamente agitados em vórtex. As amostras foram armazenadas a -80 ° C.

Previamente à extração de RNA, os discos de dentina foram descartados com a ajuda de uma pinça. Foram adicionados 300 mL de clorofórmio e após vigorosa agitação por 15 s, as amostras foram centrifugadas a 13000 g / 15 min / 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 R – Eppendorf, Califórnia, EUA). A fase aquosa sobrenadante ($\approx$ 300 μ L) foi recuperada em novo tubo e adicionada de 600 μ L de isopropanol. Seguiu-se nova centrifugação a 13000 g / 10 min / 4°C e a solução foi descartada. O pellet foi lavado com 1 mL de solução de álcool 75% em água acrescida de dietilpirocarboneto (DEPC) 0,01% por duas vezes seguido de centrifugação a 7000 g / 5 min / 4°C. Após secagem, o RNA foi reconstituído com água DEPC 0,01% (12 μ L).

4.5 Quantificação do tRNA

Para a padronização da quantidade de RNA previamente à transcrição reversa, o RNA total foi quantificado. Alíquotas de 2 μ L foram analisadas por meio da absorbância a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, Winooski, EUA), sendo as concentrações de RNA calculadas considerando a relação 1 AU = 40 μ g / mL, conforme a fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g / mL}] = \text{Abs} \times \text{Fator de diluição} \times 40$$

Foram consideradas adequadas aquelas razões 260RNA/280PROT entre 1,8 e 2,0.

4.6 Tratamento com DNase

Para o tratamento com DNase (Sigma), foram adicionados 1 μ L do Tampão 10X, 8 μ L de RNA + DEPC e 1 μ L de DNase I – Invitrogen Brasil LTDA) sendo o volume final de 10 μ L. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Posteriormente, foi adicionado 1 μ L de solução de parada (EDTA 25 μ M) e em seguida esta solução foi incubada a 65° C por 10 min..

4.7 Transcrição reversa

Para a confecção da fita de DNA complementar (cDNA) foi utilizado (High Capacity RNA to cDNA kit) no produto da reação anterior RNA tratado com DNase, de acordo com as recomendações do fabricante. O mix foi preparado em tubos de microcentrifuga contendo 10 µL de RT Buffer, 1 µL de Enzyme Mix e 9 µL RNA total + H₂O, totalizando 20 µL. O mix foi incubado a 37 ° C por 60 min e 95° C por 5 min. As amostras foram armazenadas a 4°C.

4.8 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 10µL contendo 1 µL de cDNA (transcrito anteriormente), 0,5 µL do oligonucleotídeo, 3,5 µL de H₂O ultrapura e por fim 5µL de Taqman Universal Mastermix (Thermofisher).

Os oligonucleotídeos para TGFBR1, BMPRIA, BMPRIA2, GAPDH utilizados foram comercialmente adquiridos (Taqman assays – Thermofisher). As referências são: TGFBR1 (Hs00610320_m1), BMPRIA (Hs01034913_g1), BMPRIA2 (Hs00176148_m1) normalizados com base na expressão gênica de GAPDH (Hs02758991_g1).

As reações de qPCR foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços nas seguintes condições: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 2 min. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o equipamento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Foi determinado para cada amostra, o primeiro ponto abaixo do corte fixo do produto de PCR (cycle threshold, Ct). As alterações na expressão do gene alvo foram calculadas usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual o Ct da amostra experimental (Ct gene alvo -Ct GAPDH) foi subtraído pelo Ct da amostra controle (Ct gene alvo- GAPDH).

4.9 Preparo dos espécimes para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os discos de dentina foram removidos dos poços e fixados com paraformaldeído a 4% por 30 min e desidratados por meio de diluições seriadas de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% por 10 min cada). Em seguida, as amostras foram secas e recobertas com ouro. A adesão celular foi observada por meio de MEV (1000x) (Kitikuson, Srisuwan, 2016).

4.10 Análise Estatística

A análise estatística da expressão gênica foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 7.0. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por meio de análise de variância a um critério (ANOVA) seguida de teste de Tukey para as comparações entre as soluções desmineralizantes testadas. Foi adotado nível de significância de 5% para a verificação das possíveis diferenças entre os grupos experimentais.

A análise da adesão das células da papila dental aos discos de dentina foi apenas visual.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 dos discos de dentina humana

Aos 7 dias a expressão de BMPR1 não foi estatisticamente significativa entre as amostras, embora mostre uma tendência de aumento para Ácido Cítrico (Fig.1A). Aos 21 dias nota-se redução da expressão desse receptor no grupo onde os discos de dentina foram tratados com PBS (Fig.1B). O tratamento da dentina com EGTA resultou em significativo aumento do receptor em comparação com PBS.

Em relação a expressão de BMPR2 nenhuma condição experimental induziu alteração na expressão gênica do receptor para ambos os períodos experimentais (Figura 5.1 C e D).

No período de 7 dias a expressão da TGBR1, não apresentou alterações estatisticamente significantes (Figura 5.1 E). Aos 21 dias, nota-se redução significativa da expressão do receptor nos espécimes de dentina tratada com PBS em comparação a MP e MD. Dentre os grupos de dentina tratados, o EGTA foi o único capaz de induzir aumento significativo da expressão do receptor da TGBR1 (Figura 5.1 F).

Figura 5.1- Expressão gênica relativa dos receptores de BMPR1 (1A – 7 dias; 1B - 21dias), BMPR2 (1C – 7 dias, 1D - 21dias), TGBR1(1E – 7 dias; 1F - 21dias). Os dados foram obtidos em triplicata e representam a média e o desvio-padrão de cada receptor nos diferentes tempos experimentais

5.2 Adesão Celular sob Microscopia Eletrônica de Varredura

A adesão celular foi observada em todos os grupos experimentais, embora não tenha havido distribuição uniforme de células ao longo dos discos. O pequeno número de células observadas nas fotomicrografias não permitiram a realização da análise estatística (Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5).

Figura 5.2 – Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com PBS. (1000 x)

Figura 5.3 – Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com EDTA 17% (1000 x)

Figura 5.4 – Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com ácido cítrico 15% (1000 x)

Figura 5.5 – Fotomicrografias ilustrativas da aderência das células da papila apical nos discos de dentina tratados com EGTA 17% (1000 x)

6 DISCUSSÃO

A análise dos resultados da expressão gênica de BMPR1, BMPR2 e TGFBR1 dos discos de dentina previamente tratados com EDTA, EGTA e Ácido Cítrico, evidencia que a solução desmineralizante pode interferir na liberação desses fatores de crescimento.

O EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Entre eles estão magnésio e cálcio, em valores de pH acima de 7 e manganês, ferro(II), ferro(III), zinco, cobalto, cobre(II), chumbo e níquel em valores de pH abaixo de 7. Sua estrutura química é composta por quatro grupamentos carboxílicos que reagem quimicamente com os íons metálicos da dentina através de reações covalentes e coordenadas. Esta reação é conhecida por quelação e resulta em compostos estáveis e solúveis, principalmente devido a ligação entre os compostos que apresentam íons metálicos na sua porção central e perifericamente mais de um par de elétrons livres. A ação quelante do EDTA é auto-limitante devido a alteração do pH durante o processo de desmineralização da dentina até a saturação da solução (Gavini et al., 2016)

O Ácido Cítrico (ácido 2-Hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é considerado um ácido tricarboxílico ($C_6H_8O_7$) e sua capacidade desmineralizante é proporcionada por estes três grupamentos carboxílicos que perdem prótons na presença de íons metálicos, como por exemplo o cálcio da superfície dentinária, colaborando para seu efeito desmineralizador. Como produto final desta reação formam-se sais de citrato de cálcio (Gavini et al., 2016).

Os resultados deste estudo são concordantes aos obtidos por Zhao et al. (2000) que ao estudarem a liberação e a localização ultraestrutural da TGF- β 1, observaram que o tratamento da dentina com EDTA a 17% proporcionou boa exposição deste fator de crescimento na superfície dentinária, enquanto o Ácido Cítrico a 10% e o Hipoclorito de Sódio a 3% liberaram quantidades significativamente menores. Salientam os autores que diferença entre os efeitos do EDTA e Ácido Cítrico sugerem que a liberação da TGF- β 1 não ocorre apenas pelo efeito desmineralizante

das soluções, mas poderia estar relacionada com a capacidade do EDTA em solubilizar componentes da matriz orgânica da dentina (Smith, Leaver, 1979).

Estudos mais recentes demonstram que o EDTA é um potente inibidor das metaloproteinases (MMPs), sendo capaz de removê-las e neutralizá-las (Pashley et al., 2004; Erhardt et al., 2008). Além disso, este ácido não desmineraliza a fibra de colágeno em profundidade e somente dissolve o cálcio extrafibrilar respeitando o intrafibrilar (Mazzoni et al., 2009).

Metaloproteinases representam um conjunto de 23 endopeptidases zinco e cálcio dependentes, que apresentam capacidade de degradação de componentes da matriz extracelular. Na dentina, são encontradas as MMP-2 (gelatinase-A), MMP-8 (colagenase-2), MMP-9 (gelatinase-B), MMP-14 e MMP-20 (enamelinase) (Tjaderhane et al., 1998; Martin-de Las Heras et al., 2000).

O EGTA (ácido etileno glicol-bis-(β -aminoetil éter)- N,N,N',N'- tetracético) apresenta uma maior especificidade para quelar íons cálcio que a solução de EDTA (Cruz Filho et al., 2002) sendo utilizada na medicina para obtenção de meios isentos de cálcio (Carini et al., 1997; Lvik et al., 2001). A solução de EGTA é, ainda, capaz de remover *smear layer* intracanal sem provocar a erosão da superfície dentinária tratada (Çalt & Serper, 2000; Viswanath et al., 2003). O EGTA também é um inibidor das MMPs (de Sousa et al., 2010).

EDTA e EGTA são duas substâncias similares, formados por ácidos poliamino carboxílicos. Ambos atuam ligando-se a íons metálicos. O EGTA tem maior especificidade de quelar íons cálcio e contém na sua formulação mais carbono, hidrogênio e oxigênio do que o EDTA. O EGTA tem 14 átomos de carbono, 24 átomos de hidrogênio, 10 átomos de oxigênio e 2 átomos de nitrogênio (C₁₄ H₂₄ N₂ O₁₀). O EDTA, por outro lado, contém 10 átomos de carbono, 16 átomos de hidrogênio, 8 átomos de oxigênio e 2 átomos de nitrogênio (C₁₀ H₁₆ N₂ O₈). Por outro lado, o EDTA tem maior especificidade pelo magnésio (Picoli, 2007).

EDTA e EGTA ao quelarem o cálcio, diminuem a disponibilidade deste cofator necessário para a atividade das metaloproteinases.

Dentre as soluções testadas o EGTA, aos 21 dias induziu aumento da

expressão dos receptores da BMPR1e da TGBR1. A maior especificidade do EGTA em quelar cálcio pode explicar os resultados encontrados neste estudo.

Nos casos de revascularização pulpar de dentes com necrose e rizogênese incompleta células mesenquimais indiferenciadas possuem a capacidade de se diferenciarem em odontoblastos-*like* produzindo proteínas de matriz dentinária. Estes processos são modulados por diversos fatores de crescimento (Cassidy et al., 1997; Roberts-Clark & Smith, 2000) que são capazes de regular o comportamento das células pulpares. O reparo pulpar é um fenômeno complexo, uma vez que muitos destes fatores estão envolvidos como *Transforming Growth Factor* (TGF- β)s, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)s, *Insulin Growth Factor* (IGF)s, *Fibroblast Growth Factor* (FGF) e *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) (Tziafas et al., 2000).

A importância de TGF- β 1 na odontogênese e reparo da polpa dental vêm sendo demonstrada pela literatura. Cassidy et al. (1997) detectaram isoformas de TGF- β no conteúdo inorgânico e orgânico de dentina, sendo TGF- β 1 a predominante. Os receptores tipo I e II para TGF- β foram relatados em células de polpa por Toyono et al. (1997), o que sugere fortemente a funcionalidade deste fator de crescimento no tecido pulpar. Estes autores correlacionam ainda a expressão de TGF- β 1 durante a fase de síntese protéica por células odontoblastos-*like*. A aplicação de TGF- β 1 e TGF- β 3 em tecido pulpar de ratos em cultura induziu a produção de dentina reparadora (Sloan & Smith, 1999). De fato, TGF- β 1 levou ao aumento da síntese de DNA por células pulpares *in vitro*, o que sugere seu potencial indutor de proliferação (Shirakawa et al.; 1994). Shiba et al. (1998) demonstraram o aumento do conteúdo protéico, produção de fibronectina, e indução de proliferação. Este último fenômeno induzido por TGF- β 1 também foi demonstrado por Melin et al. (2000), em cultura tecidual de polpa dental humana. A implantação de TGF- β 1 em polpas de cães induziu a formação de dentina reparadora e a diferenciação em células com aspecto polarizado e alongado (Tziafas et al., 1998).

A família TGF- β inclui um grande número de fatores de crescimento relacionados estrutura e funcionalmente, que agem como reguladores multifuncionais, de um vasto número de processos biológicos (Huminięcki et al., 2009; Kang et al., 2009). Mais de 40 membros desta família são descritos, os quais possuem em comum

a estrutura dimérica e a presença de um motivo cisteína. A família TGF- β é subdividida em: TGF- β s, BMPs, GDFs (*growth and differentiation factors*), MIF (*Müllerian inhibitory factor*), activinas ou inibinas (Galat, 2011). Dentre a subfamília TGF- β , foram descritas 6 isoformas sendo que apenas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 são expressas em mamíferos (Roberts, 1998).

O sistema TGF- β regula uma gama de processos biológicos, incluindo morfogênese, desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e inflamação (Santibanez et al., 2011). Dentro do processo de reparo, um dos eventos sabidamente desencadeados por TGF- β é a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Em fibroblastos pulpares, a estimulação com TGF- β 1 levou ao aumento da marcação de α -SMA (Martinez et al., 2007) sendo que a expressão desta proteína pode estar relacionada com o fenótipo mineralizador de células pulpares (Alliot-Licht et al., 2001). Miofibroblastos estão presentes em tecidos de granulação e constituem um elemento celular central no reparo tecidual, sendo responsáveis pela contração da ferida em reparo e pelo aumento da síntese de diversas proteínas de matriz extracelular e fatores de crescimento (Vaughan et al., 2000; Hinz, 2007) e ainda pela deposição excessiva de colágeno e levando o tecido à fibrose (Desmouliere, 1995; Hinz, 2007).

Citocinas liberadas têm sido sugeridas como potenciais moduladores da biologia de células tronco de papila apical. O fator de crescimento transformador (TGF- β)1 se mostrou quimiotático para células de papila apical murina (MDPC-23) (Kwon et al., 2010). Esta citocina é capaz de aumentar a formação óssea induzida por BMP-2 (Tachi et al., 2011).

As BMP's constituem a maior subfamília da superfamília do TGF- β (Kim & Choe, 2011), excetuando-se a proteína BMP-1, que participa no processo de lise de fibras maduras de colagénio e cuja estrutura não se assemelha à da família das TGF- β (Solofofomalala et al., 2007; Chen et al., 2004; Matthews, 2005).

No processo de regeneração é fundamental que aconteça a adesão celular, para que em seguida possa ocorrer a proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos, que irão produzir nova dentina. A adesão celular é mediada pela interação com proteínas pré-adsorvidas tais como fibronectina, vitronectina, colágeno, laminina e fibrina, provenientes dos meios de

cultura, sangue e fluídos corporais ou depositados pelas próprias células (Bacakova et al., 2011). A adesão celular é afetada pelas propriedades da superfície, tais como estrutura química, topografia (Roach et al., 2005), e molhabilidade (Wei et al., 2009 ; Huang et al., 2012). Soluções desmineralizantes, como o EDTA, aumentam a molhabilidade superficial da dentina, podendo induzir maior adesão celular (Huang et al., 2012). O aumento da adesão celular pode estar relacionado ao aumento da adesão de fibronectina, que é a principal proteína de adesão e é propensa a adsorver preferencialmente em superfícies hidrofílicas (Wei et al., 2009).

Embora não tenha havido distribuição uniforme das células da papila apical, ocorreu adesão celular em todos os grupos experimentais em que os discos foram tratados com as soluções desmineralizantes. O aumento da molhabilidade da superfície dentinária, promovido por estas substâncias, explica esses resultados.

Novos estudos devem ser realizados, para esclarecer como o emprego dessas soluções desmineralizantes afeta a proliferação e diferenciação das células da papila apical.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:

- O tipo de solução desmineralizante interfere na quantidade liberada dos fatores de crescimento BMPR1 e TGFBR1, presentes na dentina humana, sendo que o EGTA foi capaz de induzir aumento significativo da expressão do receptor da TGBR1.
- A natureza química da solução desmineralizante não interfere na adesão das células da papila apical na superfície dentinária.

REFERÊNCIAS¹

AAE- American Association of Endodontics. Considerations for Regenerative Procedures [citado 1 out. 2013]. Disponível em: <http://www.aae.org/clinicalresources/regenerativeendodontics/considerations-for-regenerativeprocedures.aspx>.

Alghilan MA, Windsor LJ, Palasuk J, Yassen GH. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J*. 2017 Jul;50(7):667-675.

Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol*. 2001 Mar;46(3):221-8.

Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J*. 2007 May;40(5):338-43.

Bacakova L, Filova E, Parizek M, et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv*. 2011;29: 739–67.

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

Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian J Dent Res*. 2011 Jan-Feb;22(1):122-31.

Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(7):749-64.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

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;35:1343-9.

Calt S, Serper A. Smear layer removal by EGTA. *J Endod*. 2000 Aug;26(8):459-61.

Carini R, de Cesaris MG, Bellomo G, Albano E. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in preventing Na⁺ overload and hepatocyte injury: opposite effects of extracellular and intracellular Ca²⁺ chelation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 6;232(1):107-10.

Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*. 1997 Mar;42(3):219-23

Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1327-30.

Chandrasekhar S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature *ex vivo* human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1236-9.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41. Review. PubMed PMID: 15621726.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J*. 2012 Mar;45(3):294-305.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006 Dec;32(12):1205-13.

Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J*. 1998 Aug;43(4):250-6.

Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod.* 2008 May;34(5):611-6.

Cruz-Filho AM, Paula EA, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Effect of different EGTA concentrations on dentin microhardness. *Braz Dent J.* 2002;13(3):188-90.

Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol.* 1992 Apr;8(2):45-55.

de Sousa KP, Atouguia J, Silva MS. Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *Protein J.* 2010 May;29(4):283-9.

Desmoulière A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995 May;19(5):471-6

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.

Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent.* 2008 Dec;36(12):1068-73.

Galat A. Common structural traits for cystine knot domain of the TGF β superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Oct;68(20):3437-51.

Galler k, Buchalla W, Hiller K, et al. Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. *J Endod.* 2015;41:363-8.

Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, Schmalz G. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2016 Jun;49(6):581-90.

Gavini G, Siqueira EL, Lemos EM, Amaral KF. Substancias Químicas. In: Machado MEL. Endodoncia – Ciencia y Tecnologia. Caracas: AMOLCA; 2016. p. 539-77.

Gomes-Filho JE, Duarte PC, Ervolino E, Mogami Bomfim SR, Xavier Abimussi CJ, Mota da Silva Santos L, et al. Histologic characterization of engineered tissues in the canal space of closed- apex teeth with apical periodontitis. J Endod. 2013 Dec;39(12):1549-56.

Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. J Am Dent Assoc 2008 Apr;139(4):457-65.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002 Aug;81(8):531-5.

Hale MS. Autogenous Transplants. J Am Dent Assoc. 1954 Aug;49(2):193-8.

Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? J Endod. 2008 Jul;34(7 Supply):S51–6.

Hashimoto K, Kawashima N, Ichinose S, Nara K, Noda S, Okiji T. EDTA Treatment for Sodium Hypochlorite-treated Dentin Recovers Disturbed Attachment and Induces Differentiation of Mouse Dental Papilla Cells. J Endod. 2018 Feb;44(2):256-262.

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. 2007 Mar;127(3):526-37.

Huang GT, Lin LM. Letter to the editor: comments on the use of the term “revascularization” to describe root regeneration. J Endod. 2008 May;34(5):511-2.

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

Huang X, Zhang J, Huang C, Wang Y, Pei D. Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):346-53.

Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol*. 2009 Feb 3;9:28.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanente tooth with perirradicular abscesso after luxation. *Dent Traumatol*. 2011 Feb;27(1):55-8.

Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods- a retrospective study. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1330–6.

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.

Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*. 2009 Aug;19(8):385-94.

Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod*. 2010 Jun;36(6):1086-91.

Kim KW, Yassen GH, Ehrlich Y, Spolnik K, Platt JA, Windsor LJ. The effects of radicular dentine treated with double antibiotic paste and ethylenediaminetetraacetic acid on the attachment and proliferation of dental pulp stem cells. *Dent Traumatol*. 2015 Oct;31(5):374-9.

Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*. 2011 Oct;44(10):619-34.

Kitikuson P, Srisuwan T. Attachment Ability of Human Apical Papilla Cells to Root Dentin Surfaces Treated with Either 3Mix or Calcium Hydroxide. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):89-94.

Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):411-4.

Lieberman J, Trowbridge H. Apical closure of non- vital permanent incisor teeth where no treatment was performed: case report. *J Endod*. 1983 Jun;9(6):257-60.

Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):133-8.

Løvik G, Larsen Sand K, Iversen JG, Rolstad B. C1qRp elicits a Ca⁺⁺ response in rat NK cells but does not influence NK-mediated cytotoxicity. *Scand J Immunol*. 2001 Apr;53(4):410-5.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000 Sep;45(9):757-65.

Martinez EF, Araújo VC, Sousa SO, Arana-Chavez VE. TGF-beta1 enhances the expression of alpha-smooth muscle actin in cultured human pulpal fibroblasts: immunochemical and ultrastructural analyses. *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1313-8.

Matthews SJ. Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMP's). *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S34-7.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Breschi L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):697-703.

Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res*. 2000 Sep;79(9):1689-96.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):377-90.

Myers HI, Flanagan VD. A comparison of results obtained from transplantation and replantation experiments using Syrian hamster teeth. *Anat Rec.* 1958 Mar;130(3):497-513.

Nagata JY, Gomes BPF, Lima TFR, Murakami LS, de Faria DE, Campos GR, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod.* 2014a May;40(5):606-612.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod.* 2014b Jun;40(6):778-83.

Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J. Endod.* 2012 Oct;38(10):1428-34.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):562–7.

Nygaard-Ostby B. The Role of the blood clot in Endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontol.* 1961 Dec;19:324-53.

Pang N, Seung Jong Lee, Euseong Kim, et al. Effect of EDTA on Attachment and Differentiation of Dentária Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2014 Jun;40:5.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004 Mar;83(3):216-21.

Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010 Mar;36(3):536-41.

Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent.* 2007 May-Jun;86(3):33-5.

Picoli, Fábio. Avaliação da limpeza das paredes dos canais radiculares e da permeabilidade dentinária, após o uso da solução de EGTA isoladamente, ou sem associação com tensoativos [tese]. Bauru.; Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007 [citado 2018-09-03]. doi:10.11606/T.25.2007.tde-15062007-130717.

Prompteecha S, Sastraruji T, Louwakul P, Srisuwan T. Dynamic Irrigation Promotes Apical Papilla Cell Attachment in an Ex Vivo Immature Root Canal Model. *J Endod.* 2018 May;44(5):744-750.

Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005;21:1–8.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J.* 2009 Jan;42(1):84-92.

Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1474-9.

Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc.* 2005 Jun 8;127(22):8168-73.
Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000 Nov;45(11):1013-6

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):111-9.

Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011 Sep;121(6):233-51.

Scelza MF, Pinheiro Daniel RLD, Santos EM, Jaeger MMM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod* 2001;27:741-3.

Scelza MFZ, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2003;95:234-6.

Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits *in vitro* substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod* 1997;23:205-8.

Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod* 1996;22:337-40.

Segura-Egea JJ, Jiménez-Rubio A, Rios-Santos JV, Velasco-Ortega E, Calvo-Gutierrez JR. *In vitro* inhibitory effect of EGTA on macrophage adhesion: endodontic implications. *J Endod* 2003;29:211-3.

Serper A, Çalt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod* 2002;28:501-2.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):919-25.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. 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 Feb;174(2):194-205.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009 Dec;42(12):1118-26.

Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K, Noshiro M, Kato Y. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res*. 1994 Sep;73(9):1509-14.

Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin Conditioning with Bioactive Molecule Releasing Nanoparticle System Enhances Adherence, Viability, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. *J Endod*. 2016 May;42(5):717-23.

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* 2007 Mar;40(3):186-97.

Skoglund A, Tronstad L. Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod*. 1981 Jul;7(7):309-16.

Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol*. 1999 Feb;44(2):149-56.

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):47-56.

Smith AJ, Leaver AG. Non-collagenous components of the organic matrix of rabbit incisor dentine. *Arch Oral Biol*. 1979;24(6):449-54.

Solofomalala GD, Guery M, Lesiourd A, Le Huec JC, Chauveaux D, LaVenetre O. Bone morphogenetic proteins: from their discoveries till their clinical applications. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2007;17(6):609-15.

Sousa S e Silva T. Desmineralization effect of EDTA, EGTA, CDTA and citric acid on root dentin: a comparative study. *Braz Oral Res* 2005 19:3.

Sousa-Neto MD, Passarinho-Neto JG, Carvalho-Júnior JR, Cruz-Filho AM, Pécora JD, Saquy PC. Evaluation of the Effect of EDTA, EGTA and CDTA on Dentin Adhesiveness and Microleakage with Different Root Canal Sealers. *Braz Dent J* (2002) 13(2): 123-128.

Tachi K., Takami M., Sato H. ET AL. Enhancement of Bone Morphogenetic Protein-2-Induced Ectopic Bone Formation by Transforming Growth Factor- β 1. *Tissue Engineering*. 2011; 17(5-6): 597.

Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):680-9.

Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007 Jan-Feb;29(1):47-50.

Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent*. 2009 Mar-Apr;31(2):145-8.

Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics biologically based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J*. 2010 Dec;55(4):446-52.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998 Aug;77(8):1622-9

Torabinejad M e Faras H. Clinical and Histological Report of a Tooth with an Open Apex Treated with Regenerative Endodontics Using Platelet-rich Plasma. *J Endod* 2012, Jun;38(6):864-8.

Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):265-8.

Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res*. 1997 Sep;76(9):1555-60.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 2011;37:1109–15.

Trope M. Treatment of immature tooth with a non- vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin N Am.* 2010 Apr;54(2):313-24.

Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.* 1995 Oct;40(10):883-93.

Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol.* 1998 Jun;43(6):431-44.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000 Feb;28(2):77-92.

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 2000 May 25;257(1):180-9.

Viswanath D, Hegde AM, Munshi AK. The removal of the smear layer using EGTA: a scanning electron microscopic study. *J Clin Pediatr Dent.* 2003 Fall;28(1):69-74.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, 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.

Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater.* 2009 Aug;4(4):045002.

Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013;39:319–26.

Witherspoon D, Small J, Regan J, Nunn M. Retrospective Analysis of Open Apex Teeth Obturated with Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2008;34:1171-6.

Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, Teixeira FB, Yamauchi M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):390-7.

Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*. 2010;2010:856087.

Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J*. 2000 Aug;32(8):489-94.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Adesão e diferenciação das células mesenquimais da papila dentária sobre discos de dentina tratados com diferentes soluções desmineralizantes

Pesquisador: Giulio Gavini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 73429617.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.253.947

Apresentação do Projeto:

O projeto visa analisar e identificar a adesão e diferenciação das células mesenquimais da dentina, após o emprego de diferentes soluções desmineralizantes. Molares inferiores com rizogênes incompleta serão utilizados para fornecer células das papilas apicais e discos de dentina. Os dados de viabilidade celular coletados serão submetidos à análise estatística.

Objetivo da Pesquisa:

"Identificar a adesão e diferenciação de células mesenquimais da papila dentária sobre discos de dentina tratados com diferentes soluções desmineralizantes. Propor um protocolo de irrigação para a regeneração pulpar."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"Os riscos são mínimos pois trata-se de pesquisa com material biológico fornecido pelo Biobanco da FOU SP. A confiabilidade dos dados será mantida."

Benefícios: "Os resultados desta pesquisa poderão contribuir para melhorar a elaboração de um protocolo clínico de irrigação para casos de revascularização."

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 2.253.947

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem elaborada. Possui propostas e objetivos claros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos pela Resolução CNS 466/12 foram anexados corretamente (Projeto Detalhado, Folha de Rosto, e/ou Autorização do Biobanco e/ou Autorização da Clínica Odontológica e/ou Autorização de Uso de Acervo).

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_942203.pdf	14/08/2017 19:07:28		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Bancodedentesdaniela.pdf	14/08/2017 19:07:09	Giulio Gavini	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Bancodecelulasdaniela.pdf	14/08/2017 19:06:47	Giulio Gavini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Danielaprojeto0708.doc	14/08/2017 18:54:28	Giulio Gavini	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostodaniela.pdf	14/08/2017 18:52:00	Giulio Gavini	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.253.947

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Setembro de 2017

Assinado por:

**Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)**