RENATA DUARTE DE SOUZA RODRIGUES

Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a atividade e a expressão gênica de proteases da matriz extracelular (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana

São Paulo

2014

RENATA DUARTE DE SOUZA RODRIGUES

Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a atividade e a expressão gênica de proteases da matriz extracelular (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2014

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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza - Rodrigues, Renata Duarte de.

Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a atividade e a expressão gênica de proteases da matriz extracelular (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana / Renata Duarte de Souza Rodrigues; orientadora Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2014.

91 p. : fig., graf. ; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Adesivos dentinários. 2. Metaloproteinases. 3. Células-tronco. 4. Polpa dentária. 5. Matriz extracelular. I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Souza-Rodrigues RDS. Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a atividade e a expressão gênica de proteases da matriz extracelular (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 05/12/ 2014

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Josemar e Tereza

Ao meu esposo Fábio

Às minhas filhas Giulia e Gabriella

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e oportunidade de reparar meus erros mais uma vez.

Aos meus pais **Josemar e Maria Tereza**, muitíssimo obrigada pelo amor incondicional e pela total dedicação durante toda a minha vida!!! Vocês sempre foram incansáveis em me proporcionar uma educação de qualidade, em me ensinar princípios cristãos, em me mostrar o caminho correto a seguir. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos da minha vida! Amo vocês muito, muito!!!

Ao meu esposo **Fábio**, amor da minha vida, meu companheiro de todas as horas, meu incentivador. Obrigada por me acompanhar nas minhas empreitadas, respeitando meus sonhos e meu desejo de crescer como profissional!!

Às minhas filhas **Giulia e Gabriella**, meus grandes amores e presentes de Deus!! Vocês são meus raios de sol, minha felicidade, os motivos dos meus sorrisos. Giulinha, minha princesa linda, desculpe minhas ausências para poder me dedicar ao trabalho e ao doutorado. Gabi, minha bebê linda, que me acompanhou nesse final de doutorado, dentro do meu ventre e vai chegar para completar minha vida.

À minha orientadora **professora Dra. Márcia Marques**, pela confiança, liberdade e afeto durante o meu curso de doutorado. A convivência com você me ensinou muito, e o que aprendi, já comecei a empregar na minha prática docente. Muito obrigada!! Você é demais!!

Aos meus avós **José Ubirajara** (*in memorian*) e **Maria Dorothy, Armando** (*in memorian*) e **Maria José**, pelo amor, carinho e incentivo durante todos os momentos da minha vida.

Às minhas tias-avós **Theonilla (Santa)** e **Arminda (Dindinha)**, *in memorian*, que me amaram como uma verdadeira filha, um amor incondicional que transcende a vida. Muitíssimo obrigada pela atenção e carinho dedicados durante toda a vida!!

Às minhas tias **Rita e Lúcia** e tio-padrinho **Antônio**, pela torcida, pelo carinho, incentivo, preces. Além de serem verdadeiros exemplos de profissionais a serem seguidos na docência!!

Aos meus sogros **Celestina e Francisco Rodrigues** (*in memorian*) e a vovó **Odaléa** pelo carinho, orações e torcida.

À minha amiga amada desde a época do Colégio Ideal, **Roberta Couto**, responsável por me trazer para a Faculdade de Odontologia da USP. Já passamos juntas por muitas situações alegres, tristes, engraçadas, são infinitas histórias. Foi muito bom conviver com você aqui em São Paulo!! Pena que você teve que retornar!! Espero que esses muitos anos de amizade perdurem a nossa vida inteira!!

Às minhas queridas amigas **Stella Ferreira** e **Maria Aparecida Silva**, cujas amizades foram gratas surpresas e presentes do curso de doutorado. Stellinha, tão prestativa, leal, solidária, divertida, companheira!! Foi muito bom conhecê-la e tê-la junto comigo, especialmente durante os momentos experimentais tensos, pois você sempre me incentivava e ajudava, injetando um novo ânimo. Muitíssimo obrigada!! Que a nossa amizade continue por toda nossa vida!! Maria, minha ouvinte e incentivadora durante todos os momentos do curso. Suas palavras sempre tão

oportunas foram um alento quando eu me sentia cansada, derrotada, quase sem forças. Muito obrigada, minha querida!!

Às minhas colegas do Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística: **Thalita Lopez, Sueli Miyagi, Stella Moreira, Leila Ferreira, Ivana Diniz, Thaís Regina, Paula Loures, Gabriela Abe, Ana Clara Pedroni, Cindy Uehara, Rejane Carvalho**. Todas vocês foram importantes durante esse período do doutorado, seja pela troca de conhecimento científico, seja pelos papos animados e risadas gostosas! À técnica do laboratório **Débora França**, obrigada pelo carinho e até mesmo pelas broncas, pois sei que eram necessárias para manter a ordem do nosso local de trabalho!

Às colegas de outros programas de pós-graduação da FOU SP que utilizavam o Laboratório: **Aline, Mariana Brozowski, Maria Fernanda Rodrigues**, pela troca de conhecimentos, dicas de experimentos, conversas gostosas sobre o cotidiano e histórias do dia a dia.

Aos **professores Drs.** da Pós-graduação em Dentística da FOU SP: **Márcia Marques, Glauco Vieira, Margareth Oda, Patrícia Freitas, Maria Ângela Sobral, Maria Aparecida Luz, Antônio de Cara, Michel, Adriana Matos, Miriam Turbino, Narciso Netto**, pelo aprendizado e convivência agradável.

Ao **professor Dr. Fernando Nogueira**, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOU SP, por abrir as portas do laboratório e permitir a realização de parte dos experimentos dessa tese. Muito obrigada pela troca de ideias sobre as técnicas, e paciência em ajudar a manusear os equipamentos! Ao técnico **Douglas de Souza** muito obrigada pela paciência, disponibilidade, solicitude, atenção e colaboração sempre que precisei utilizar o laboratório!

À **professora Dra. Katiúcia Batista Silva Paiva**, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda com os experimentos de Biologia Molecular dessa tese. Muito obrigada pelas explicações, disponibilidade, paciência em ensinar a técnica, explicar resultados, discutir ideias!

À **professora Dra. Sueli Miyagi**, por me ensinar as técnicas de cultivo de células, pela disposição em ajudar e desvendar o “maravilhoso mundo das células”. Muito obrigada!

Ao meu amigo desde a época da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará, **professor Dr. Rafael Lima**, pelo carinho, incentivo e críticas construtivas! Lembro-me do dia em que nos conhecemos, das nossas aventuras durante a graduação e, posteriormente os desafios vividos no período do mestrado em Neurociências! Valeu, amigo! Muito obrigada por toda a ajuda, sempre!

Ao **Centro de Facilidades Para Pesquisa (Fluir-CEFAP)** do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e à técnica Andrea Glatt, pela colaboração e disponibilidade para a realização do experimento de citometria de fluxo.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), especialmente aos professores **Gabriel Bestetti, Nelson Menolli Jr, Caroline Castilhona, Janduí Amorim, Flávio Krzyzanowski Jr, Maíra Abrahão, Audrey Paiva, Maria Cristina Brum, Fernanda Cangerana**, pela convivência maravilhosa, carinho, compreensão, adequação de horários para possibilitar que eu assistisse às aulas do doutorado, realizasse os experimentos e ainda ministrasse aulas! Sem a ajuda de vocês, isso seria impossível! Muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Dentística da FOU SP, **Sônia, Selma, Aldo, Arnaldo, Davi e Leandro**. Vocês sempre foram bastante prestativos e atenciosos quando precisei. Obrigada!

Aos meus **alunos**, desde os tempos de professora substituta da Universidade Federal do Paraná (setor Litoral), do Instituto Federal do Paraná (IFPR) e do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), principalmente os últimos que vivenciaram comigo o período do doutorado. Obrigada pela compreensão e torcida!

Aos **funcionários da Biblioteca**, que sempre foram muito solícitos e atenciosos sempre que precisei.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!!

RESUMO

Souza-Rodrigues RD. Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a atividade e a expressão gênica de proteases da matriz extracelular (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Adesivos dentinários aplicados diretamente sobre dentina aumentam a atividade de enzimas endógenas deste tecido que degradam colágeno, colocando em risco a integridade da camada híbrida de restaurações estéticas. Estes adesivos podem também alcançar a polpa dentária indiretamente através do fluido dos túbulos dentinários por substâncias liberadas pelos mesmos. Desta forma, a polpa dentária poderia responder a estas substâncias por meio de síntese e/ou aumento da atividade de collagenases, o que poderia colaborar na degradação da camada híbrida. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das substâncias liberadas por sistemas adesivos dos tipos autocondicionante e condicione e lave sobre a atividade e a expressão gênica de metaloproteinases (MMPs) e cisteíno-catepsinas (CTs) em células-tronco da polpa dentária humana. Foram aplicados meios de cultura condicionados por adesivos do tipo autocondicionante e condicione e lave polimerizados e não polimerizados sobre culturas celulares por 24 horas. O meio de cultivo fresco foi usado como controle. Depois de 24, 48, 72 e 96 horas, as atividades gelatinolíticas de MMP-2 e de MMP-9 foram avaliadas por meio da técnica de zimografia em gel de gelatina. Nos mesmos tempos experimentais, a modulação da expressão gênica das MMPs (1, 2, 3, 7, 9, 13 e 14) e das CTs (B e K) foi analisada por meio de reação de transcriptase reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os resultados obtidos dos dois experimentos foram avaliados por meio do teste estatístico ANOVA, complementado pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Todos os grupos mostraram atividade gelatinolítica aumentada de MMP-2 e MMP-9. Até 72 horas, as atividades foram similares em todos os grupos experimentais. Diferenças significativas apareceram somente em 96 horas. De forma geral, as maiores atividades de MMPs foram observadas nas culturas celulares tratadas com o adesivo autocondicionante. Para a MMP-2, o grupo do adesivo autocondicionante polimerizado mostrou atividade intermediária, enquanto o grupo não polimerizado mostrou a maior atividade. Os dois grupos do adesivo condicione e lave

polimerizado e não polimerizado mostraram atividade de MMP-9 intermediária, enquanto o grupo autocondicionante polimerizado mostrou maior atividade que o grupo controle. O qRT-PCR revelou que a maioria das MMPs e CTs analisadas tiveram a expressão gênica positivamente modulada em 24 e 48 horas. MMP-7 e MMP-9 não foram expressos em nenhum grupo experimental. Baseados nas limitações deste estudo *in vitro*, concluímos que substâncias liberadas por sistemas adesivos são capazes de influenciar células-tronco de polpa dentária humana levando ao aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 e também à modulação positiva de genes das MMPs e CTS estudadas.

Palavras-chave: Sistemas adesivos. Camada híbrida. Metaloproteinases. Cisteíno-catepsinas.

ABSTRACT

Souza-Rodrigues RD. Analysis of the effects of substances leached from adhesive systems on the activity and gene expression of extracellular matrix proteases (MMPs e CTs) in human dental pulp stem cells [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Adhesive systems directly applied to dentin increase the activity of endogenous collagen degrading proteinases of the dentin, which jeopardizes the integrity of the hybrid layer of aesthetic restorations. These adhesives can also reach the dental pulp through the dentinal fluid indirectly by substances leached from them. Then, the dental pulp tissue could respond by synthesizing and/or increasing the activity of collagen proteases, which in turn could collaborate to the hybrid layer degradation. Then, the aim of this study was to evaluate the effect of substances leached from self-etch and etch-and-rinse adhesive systems on the expression and activities of matrix metalloproteinases (MMPs) and cysteine cathepsins (CT-B and CT-K) in human dental pulp stem cells. Culture media conditioned by polymerized or non-polymerized self-etch and etch-and-rinse adhesive systems were applied to the cultures for 24 hours. Fresh medium was used as control. After 24, 48, 72 and 96 hours, the gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 were assessed by zymography technique. At the same experimental time gene expression of MMPs (1, 2, 3, 7, 9, 13 e 14) and CTs (B e K) were analyzed with quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Data was compared by ANOVA complemented by the Tukey's test ($p < 0.05$). All experimental groups showed increased gelatinolytic activity for MMP-2 and MMP-9. Until 72 hours, the activities were similar regardless the group. Significant differences appeared only after 96 hours. Overall, the highest activities of MMPs were observed in the cultures treated with the self-etch adhesive. For MMP-2, the group of polymerized self-etch adhesive showed intermediary activity, while the group of non-polymerized adhesive showed the highest activity. Both polymerized and non-polymerized etch-and-rinse adhesive groups showed intermediary MMP-9 activity, while the group of polymerized self-etch adhesive showed higher activity than control. The qRT-PCR revealed that most of MMPs and CTs analyzed presented the gene expression positively modulated at 24 and 48 hours. MMP-7 and MMP-9 were not expressed in any experimental group.

Based on the limitations of this *in vitro* study, it was concluded that substances leached from adhesive systems are able to influence human dental pulp stem cells leading to the increase of the activity of MMP-2 and MMP-9 along with positive modulation of MMPs and CTS studied genes.

Keywords: Adhesive system. Hybrid layer. Metalloproteinases. Cysteine cathepsins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 -	Representação esquemática da estrutura proteica das MMPs. S: peptídeo sinalizador, que orienta o produto de secreção para o retículo endoplasmático no momento da exportação da enzima para fora da célula; Pro: pró-domínio; Cat: domínio catalítico; Zn: sítio ativo para o íon zinco; Hpx: hemopexina (adaptada de Visse; Nagase, 2003).....31
Figura 2.2 -	Esquema de uma cisteíno-catepsina endopeptidase, baseado na forma nativa da CT-L. Em verde, estão representadas as cadeias; em azul e vermelho, os elementos estruturais secundários; em amarelo, os resíduos Cys25 e His163 (adaptada de Turk et al., 2012)37
Figura 2.3 -	Vestígios de cadeias das CT exopeptidases B, X, H e C estão representados respectivamente em azul, amarelo, verde e vermelho, sobre a estrutura da CT endopeptidase L (adaptada de Turk et al., 2012)37
Figura 4.1 -	Aplicação do adesivo sobre o disco de papel filtro (A) e polimerização destes, quando necessário (B)44
Figura 4.2 -	Colocação dos discos de papel filtro (A) no tubo de centrifugação e posterior adição de meio de cultivo fresco (B)45
Figura 4.3 –	Condicionamento dos meios de cultivo em estufa durante 1 hora a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO ₂45
Figura 4.4	Desenho esquemático das fases do experimento de MTT47
Figura 4.5	A- Gel obtido após a utilização de solução descorante de metanol 50%; B- Gel escaneado; C- Imagem do gel invertido para quantificação dos pesos moleculares das bandas presentes51
Figura 5.1 –	Resultados da citometria de fluxo para caracterização das células-tronco derivadas da polpa dentária. As letras A, B, E e F indicam expressão positiva para os marcadores CD146, CD105, NESTIN e NANOG, respectivamente. Letras C, D, G e H indicam expressão negativa para os marcadores STRO-1, Oct3-4, CD34 e CD31, respectivamente.....56
Gráfico 5.1 -	Ilustração gráfica das curvas de crescimento celular. Os dados mostram as médias ($\pm$ erro padrão da média) das densidades ópticas (viabilidade celular) dos diferentes grupos em função dos tempos experimentais (horas) (*) - significativamente maior que o valor do primeiro tempo dentro do mesmo grupo experimental (crescimento significativo) (†) - significativamente menor que o valor do primeiro tempo dentro do mesmo grupo experimental (não houve crescimento significativo)

	Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,01$) dos valores de viabilidade celular entre os diferentes grupos no tempo experimental de 72 horas	58
Gráfico 5.2 -	Representação gráfica da atividade total (ativa + latente) de MMP-2 nos diferentes grupos experimentais em função do tempo (horas). Os dados mostram a média das porcentagens das bandas no gel de gelatina ($\pm$ erro padrão da média) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo experimental de 96 horas	59
Gráfico 5.3 -	Representação gráfica da atividade total (ativa + latente) de MMP-9 nos diferentes grupos experimentais em função do tempo (horas). Os dados mostram a média das densidades ópticas das bandas no gel de gelatina ($\pm$ erro padrão da média) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo experimental de 96 horas	60
Gráfico 5.4 –	Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-1. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa	61
Gráfico 5.5 –	Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-2. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa	62
Gráfico 5.6 –	Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-3. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa	63
Gráfico 5.7 –	Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-10. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa	64

- Gráfico 5.8 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-13. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa65
- Gráfico 5.9 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-14. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa66
- Gráfico 5.10 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa da CT-B. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa67
- Gráfico 5.11- Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa da CT-K. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa.....67
- Gráfico 5.12 – Gráfico ilustrativo das tendências de expressões dos genes estudados e modulados positivamente nos diferentes grupos experimentais em função do tempo
Note que as linhas de tendência dos grupos SB se sobrepõem .69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –	MMPs humanas divididas por numeração, grupos, outras denominações referidas na literatura, pesos moleculares nas formas latente e ativa	32
Tabela 4.1 –	Constituintes do gel de corrida/separação	48
Tabela 4.2 -	Constituintes do gel de empilhamento a 4%	49
Tabela 4.3 -	Componentes do tampão de corrida 5x	49
Tabela 4.4 –	Constituintes do tampão de amostra 5x concentrado	50
Tabela 4.5 –	Componentes do tampão de incubação	50
Tabela 4.6 –	Solução de Coomassie Blue R-250 0,1%	51
Tabela 4.7 –	Solução descorante de metanol 50%	51
Tabela 4.8 -	Reagentes utilizados na confecção da fita de cDNA	53
Tabela 4.9 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados no PCR em tempo real e o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons)	55
Tabela 5.1 -	Distribuição das expressões dos genes estudados nos diferentes grupos e tempos experimentais.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Do inglês <i>complementar deoxyribonucleic acid</i> , em português ácido desoxirribonucleico complementar
CT	Do inglês <i>cysteine cathepsins</i> , em português cisteíno-catepsinas
DMEM/Ham's	Do inglês <i>Dulbecco Modified Eagle Medium/ Ham's F-12</i> , em português meio de Eagle modificado por Dulbecco/Ham's F-12
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> , em português ácido desoxirribonucleico
GADPH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , em português deidrogenase de gliceraldeído 3 fosfato
kDa	quiloDalton
MEC	matriz extracelular
MMPs	Do inglês <i>matrix metalloproteinases</i> , em português metaloproteinases da matriz
MSC FBS	Do inglês <i>mesenchymal stem cells fetal bovine serum</i> , em português soro fetal bovino para células-tronco mesenquimais
MTT	Do inglês (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), em português 3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol -2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i> , em português solução tampão fosfato-salina
PBSA	Do inglês <i>phosphate buffered saline without calcium and magnesium</i> , em português solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio

PCR	Do inglês <i>polimerase chain reaction</i> , em português reação em cadeia de polimerase
qRT-PCR	Do inglês <i>quantitative reverse transcriptase-polimerase chain reaction</i> , em português reação quantitativa da transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase
ROS	Do inglês <i>reactive oxygen species</i> , em português espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TGF β -1	Do inglês <i>transforming growth factor- β-1</i> , em português fator de crescimento transformador
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
V	volt
W	Watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 COMPLEXO DENTINA-POLPA	23
2.2 SISTEMAS ADESIVOS	26
2.2.1 Sistemas adesivos condicione-lave	26
2.2.2. Sistemas adesivos autocondicionantes	27
2.2.3 Camada híbrida	28
2.4 METALOPROTEINASES	30
2.5 CISTEÍNO-CATEPSINAS	35
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	40
4.2 SISTEMAS ADESIVOS	43
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
4.4 MEIO CONDICIONADO	43
4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR	45
4.6 ZIMOGRFIA	47
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT- PCR	52
4.7.1 Extração do RNA Total	52
4.7.2 DNase	53
4.7.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)	53
4.7.4 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	54
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5 RESULTADOS	56
5.1 CARACTERIZAÇÃO CELULAR	56
5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR	57
5.3 ZIMOGRFIA	58
5.4 EXPRESSÃO GÊNICA	60
5.4.1 MMP-1	61
5.4.2 MMP-2	62
5.4.3 MMP-3	62

5.4.4 MMP-10	63
5.4.5 MMP-13	64
5.4.6 MMP-14	65
5.4.7 CATEPSINA B (CT-B)	66
5.4.8 CATEPSINA K (CT-K)	67
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

Já é um consenso em Dentística que os sistemas adesivos perdem sua união à dentina ao longo do tempo e essa perda tem sido atribuída à degradação da camada híbrida. Isso ocorre como resultado da hidrólise da matriz colágena associada à deterioração dos polímeros hidrofílicos dos sistemas adesivos (Montagner et al., 2014).

O condicionamento com ácido fosfórico e a aplicação dos *primers* ácidos dos sistemas adesivos dos tipos autocondicionantes e condicione e lave podem deixar exposta uma rede de fibras colágenas incompletamente infiltradas por esses materiais e estas fibras se tornam alvo de enzimas da matriz extracelular, as metaloproteinases (MMPS) e as cisteíno-catpsinas (CTs).

As MMPs são proteases cálcio-zinco dependentes, que medeiam a destruição de componentes moleculares da MEC (Pashley et al., 2004). As CTs são proteases lisossomais que também podem degradar proteínas da matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno, a laminina, a fibronectina e as proteoglicanas (Dickinson, 2002).

Diversos estudos confirmaram a ativação dessas proteases após a utilização de sistemas adesivos na dentina (Mazzoni et al., 2006; De Munck et al., 2010; Mazzoni et al., 2012; Mazzoni et al., 2013; Tezvergil-Mutluay et al., 2013). Apesar desses trabalhos, em geral, levantarem a hipótese de que a aplicação desses materiais poderia provocar a liberação das mesmas proteases a partir da polpa dentária, o que potencializaria os efeitos de degradação sobre a camada híbrida, poucos estudos investigaram essa possibilidade (Lehmann et al., 2009; Liu et al., 2011).

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das substâncias liberadas por sistemas adesivos dos tipos autocondicionante e condicione e lave sobre a atividade e a expressão gênica das referidas proteases em culturas enriquecidas por células-tronco da polpa dentária humana

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPLEXO DENTINA-PULPA

A manutenção da vitalidade do complexo dentina-polpa é fundamental para garantir a funcionalidade dos dentes e tem sido prioridade no planejamento e manejo de estratégias clínicas (Smith, 2003).

Estudos evidenciam que dentina e polpa são embriologicamente, histologicamente e funcionalmente integradas. A função primária da polpa é produzir dentina. Durante o desenvolvimento do germe dentário, uma série de interações epitélio-mesenquimais inicia a diferenciação de células ectomesenquimais da papila dental em odontoblastos, células pós-mitóticas responsáveis pela produção de dentina fisiológica primária e secundária (Sharma et al., 2013). Mesmo após esse processo de formação inicial, a polpa continua a produzir fisiologicamente dentina, enquanto permanecer biologicamente ativa (Pashley, 1996).

Em situações patológicas como cáries ou degradação da matriz dentinária, a compartimentalização entre esses dois tecidos é perdida e estes se tornam funcionalmente contínuos, o que pode difundir os subprodutos gerados até o tecido pulpar e provocar resposta celular (Pashley, 1996; Smith, 2003).

A dentina é o tecido subjacente ao esmalte dental e constitui a maior parte do dente. É o mais volumoso tecido mineralizado do órgão dental. Protege a polpa do ataque bacteriano e de outros estímulos tóxicos, pois é o primeiro tecido a sofrer a ação do agente irritante externo. Atua não somente como uma barreira mecânica passiva, mas também participa das complexas reações de defesa do complexo dentina-polpa (Bertassoni et al., 2012; Tjäderhane et al., 2013).

É formada tanto por componentes orgânicos e quanto inorgânicos, sendo 50% minerais, 30% proteínas e os 20% restantes água. Técnicas modernas de microscopia revelaram que a dentina é composta por um intrincado arcabouço orgânico tridimensional embebido com nanocristais de hidroxiapatita e atravessada por túbulos microscópicos, que se estendem desde a junção amelo-dentinária e a junção cemento-dentina até a polpa dental (Breschi et al., 2008; Mazzoni et al., 2011; Tjäderhane et al., 2013).

Os túbulos dentinários possuem aproximadamente 1-2 μm de diâmetro e são rodeados por uma camada hipermineralizada, denominada dentina peritubular, e pela matriz intertubular, a qual contém cristais de apatita associados a uma pequena quantidade de matriz orgânica (Bertassoni et al., 2012). A densidade, o diâmetro e a orientação desses túbulos variam conforme a sua localização: a quantidade, bem como os diâmetros desses túbulos é pequena próxima à junção amelo-dentinária e grande nas proximidades da câmara pulpar (Pashley, 1996; Marshall et al., 1997).

A matriz orgânica representa aproximadamente 45% do volume dentinário, sendo que desse valor aproximadamente 20% é água. Dentre os principais componentes da matriz dentinária estão as fibras colágenas do tipo I associadas a outras proteínas não colágenas e os proteoglicanos produzidos pelos odontoblastos durante a dentinogênese (Breschi et al., 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário do dente, as fibras colágenas fornecem o compartimento aquoso, no qual os nanocristais de apatita se desenvolvem. Nesses tecidos duros e também nos tecidos moles, as moléculas de água formam cilindros ao redor das fibras de colágeno, os quais progressivamente vão sendo substituídos por minerais (Tjäderhane et al., 2013). Desse modo, a integridade da matriz colágena extracelular é essencial, pois as proteínas da matriz promovem e controlam ativamente a mineralização das fibras colágenas e o crescimento dos cristais de apatita, durante a conversão de pré-dentina em dentina. Adicionalmente, as células da polpa dental também podem contribuir para esse processo (Butler et al., 2003).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, histologicamente formado por células e matriz extracelular (MEC). Em seu estado normal, a polpa contém populações heterogêneas de células, dentre as quais: fibroblastos, que são as principais e estão em constante renovação; odontoblastos, responsáveis pela formação da dentina primária e secundária; células vasculares e perivasculares, como por exemplo, células endoteliais da camada íntima, células musculares lisas da camada média e pericitos; células do sistema imune, tais como as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos T; células neurais e as células-tronco progenitoras (Goldberg et al., 2008).

Dentre as células da polpa destacam-se as células-tronco da polpa dentária (*dental pulp stem cells- DPSCs*), que foram primeiramente identificadas por Gronthos et al. (2000) e são caracterizadas como células multipotentes, capazes de

regenerar o complexo dentina-polpa. Posteriormente, outras populações de células-tronco derivadas da polpa foram isoladas e caracterizadas, dentre as quais encontram-se àquelas derivadas do dente decíduo esfoliado humano (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth- SHED*), as quais representam uma população de células pós-natais com grande capacidade de proliferação e diferenciação (Miura et al., 2003). Tanto as DPSCs quanto as SHEDs são células-tronco mesenquimais, portanto podem expressar os seguintes marcadores: STRO-1, CD-13, CD44, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD146. Também podem expressar os marcadores de células embrionárias Oct 3-4 e Nanog. Na caracterização de células-tronco de polpa também são utilizados marcadores negativos, a saber: CD14, CD34, CD45 e HLA-DR (Kawashima, 2012; Sharma et al., 2013).

Em tecidos saudáveis, as células-tronco da polpa dental geralmente permanecem em estado quiescente. Porém, situações patológicas como lesões por cáries, procedimentos cirúrgicos, restaurações e traumas são capazes de danificar e destruir odontoblastos e liberam fatores de crescimento da matriz dentinária. Esses fatores levam à mobilização dessas células, que passam a proliferar, migrar e se diferenciar com a finalidade de substituir as células mortas (Iohara et al., 2004; Sloan; Waddington, 2009; Harada et al., 2008; Ferracane et al., 2010).

Por sua vez, a matriz extracelular (MEC) da polpa dentária é composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos secretados, apresentando um papel bioativo na regulação do comportamento celular, influenciando no seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função. Dentre as principais classes de macromoléculas que compõem a matriz da polpa dentária, encontram-se as proteínas colágenas (colágenos tipo I e III), proteínas não-colágenas (fibronectina, tenascina, osteonectina, sialoproteína, osteocalcina), ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de heparana e os fosfolipídeos, constituindo o gel característico que banha todos os elementos celulares e fibrilares desse tecido. Essas proteínas estão envolvidas na diferenciação de celular e mineralização da dentina (Katchburian; Arana, 2004).

2.2 SISTEMAS ADESIVOS

As técnicas adesivas associadas aos materiais restauradores resinosos são bastante utilizadas em Dentística. Entretanto, entre as desvantagens de sua utilização estão a complexidade e a sensibilidade técnica, relativas à manipulação inadequada do material e que podem comprometer a longevidade e efetividade da restauração (Van Meerbeek et al., 2003).

O princípio fundamental de adesão ao substrato dentário baseia-se em um processo de troca do material orgânico por um material restaurador resinoso sintético e envolve duas fases. A primeira consiste na remoção do fosfato de cálcio das microporosidades expostas no esmalte e na dentina. A segunda, denominada hidridização, envolve infiltração e a subsequente polimerização *in situ* dos monômeros resinosos nas microporosidades descobertas. Essas duas fases resultam em um entrelaçamento micromecânico, baseado primariamente em mecanismos de difusão. Além da interação mecânica, há também uma interação química entre os monômeros dos sistemas adesivos e os componentes do dente (Van Meerbeek et al., 2001).

Atualmente, os sistemas adesivos utilizados podem ser classificados de acordo com número de etapas de aplicação clínica e com as estratégias de adesão propriamente ditas em: autocondicionantes e condicione e lave (Van Meerbeek et al., 2001).

2.2.1 Sistemas adesivos condicione e lave

Os adesivos do tipo condicione e lave podem ser aplicados em duas ou três etapas. A primeira etapa é sempre constituída pelo condicionamento ácido do substrato dentário, geralmente efetuado com ácido fosfórico a uma concentração que varia entre 35 a 37%, seguida de enxágue ou lavagem. As próximas etapas são a aplicação de *primer* e adesivo num só passo (duas etapas) ou em dois passos (três etapas) (Van Meerbeek et al., 2003; Milia et al., 2012).

Em dentina, o condicionamento ácido provoca uma agressiva e completa desmineralização peri e intertubular, que abrange desde a superfície a uma profundidade de até 3-5µm e expõe uma intrincada rede de fibras colágenas que ficam praticamente desprovidas de hidroxiapatita. Esta desmineralização aumenta a permeabilidade dentinária (Pashley; Carvalho, 1997; De Munck et al., 2010). O enxágue/lavagem é responsável pela remoção completa tanto de *smear layer* quanto de *smear plugs*. Em seguida, vem a aplicação do *primer*, contendo monômeros específicos com propriedades hidrofílicas dissolvidos em solventes orgânicos. Os monômeros são responsáveis por melhorar a umidade e promover a reexpansão das fibras colágenas, enquanto os solventes orgânicos são capazes de deslocar água a partir da superfície dentinária, preparando as mesmas fibras para subsequente infiltração do adesivo. Por último, está a aplicação de um agente de união ou resina adesiva na superfície preparada, permitindo a infiltração do monômero hidrofóbico nos espaços interfibrilares e nos túbulos dentinários. Os adesivos de duas etapas também apresentam o condicionamento ácido e enxágue/lavagem, contudo o *primer* e o adesivo encontram-se combinados em um único produto (Van Meerbeek et al., 2003; Cardoso et al., 2011).

Assim, o mecanismo primário de adesão do adesivo condicione e lave baseia-se em difusão e depende da infiltração e hibridização micromecânica dos monômeros resinosos entre as fibrilas colágenas expostas na úmida e desmineralizada dentina (Peumans et al., 2005).

No entanto, como desvantagem existe a possibilidade de deixar uma camada de matriz colágena desmineralizada e desprovida de cobertura de adesivo, que nem sempre é capaz de se difundir em toda a extensão da área que foi previamente desmineralizada pelo ácido (Hashimoto, 2010; Pashley et al., 2011).

2.2.2 Adesivos autocondicionantes

Os adesivos do tipo autocondicionante podem ser aplicados uma ou duas etapas, na dependência do *primer* estar separado do adesivo ou combinado com este, o que nesse caso permite realizar o procedimento em uma única etapa (Van Meerbeek et al., 2003). Nesses adesivos, são utilizados monômeros ácidos que não

precisam de enxágue e que funcionam como condicionamento e *primer*, simultaneamente (Peumans et al., 2005).

Devido as suas características ácidas, os adesivos autocondicionantes são capazes de dissolver a *smear layer* e desmineralizar o esmalte e a dentina subjacentes (Cardoso et al., 2011).

Dentre as vantagens na utilização deste tipo de adesivo, destacam-se: a redução das etapas de aplicação e manipulação do material, redução ou inexistência dos riscos de discrepâncias entre as etapas de aplicação, a infiltração de resina acontece simultaneamente ao processo de autocondicionamento e a possibilidade de interação química com as fibras colágenas cobertas pela hidroxiapatita (Van Meerbeek et al., 2003; Ikeda et al., 2009).

Dependendo da intensidade do condicionamento, este sistema adesivo pode ser classificado como forte ou suave. O primeiro possui pH em torno de 1.0 ou abaixo, o que provoca efeitos de desmineralização profunda. Em dentina, o colágeno é exposto e quase toda a hidroxiapatita é dissolvida (Pashley; Tay, 2001).

O suave possui pH em torno de 2 e promove somente uma desmineralização parcial na dentina, de aproximadamente 1 μm apenas ou até menos que essa espessura, deixando cristais de hidroxiapatita residuais ao redor das fibrilas colágenas. Apesar de a desmineralização ser considerada como parcial, a porosidade superficial criada é suficiente para obtenção de uma hibridização micromecânica, bem como, a preservação da hidroxiapatita residual parece servir como receptor para uma adicional interação química com o monômero funcional, que contribui para o potencial adesivo do material (Yoshida et al., 2004).

2.2.3 Camada híbrida

Durante os procedimentos restauradores, o condicionamento ácido antes ou concomitante à aplicação do sistema adesivo permite que a matriz dentinária exposta seja impregnada por monômeros dos adesivos, formando uma nova estrutura chamada camada híbrida (Nakabayashi et al., 1982).

Como em dentina mineralizada, normalmente não há infiltração de resina, o processo de condicionamento ácido dos sistemas adesivos tipo condicione e lave

faz com que cerca de 50% da superfície mineral e da camada imediatamente abaixo desta seja solubilizado, extraído e substituído pela água usada no enxágue para retirada do ácido. Esta combina-se com o volume de água intrínsecos da matriz, formando um volume de água ao redor das fibras colágenas que permanecem ancoradas na dentina mineralizada. Também são criadas microporosidades entre as fibras colágenas, permitindo que na fase subsequente a infiltração de monômeros resinosos oriundos dos adesivos aplicados substitua completamente esse volume de da água, penetre dentro e ao redor das fibras colágenas e polimerize *in situ*, produzindo um biocompósito hibridizado de resina, denominado camada híbrida ou zona de interdifusão (Pashley et al., 2011).

Entretanto, a penetração completa desses monômeros no interior das fibrilas nunca é ideal. Isso ocorre porque enquanto a distância entre as fibrilas colágenas é suficiente para permitir o espalhamento de pequenos monômeros hidrofílicos, dentro das fibrilas a distância entre as moléculas de colágeno é inferior ao diâmetro da maioria dos monômeros, não permitindo seu espalhamento intrafibrilar (Bertassoni et al., 2012).

Hashimoto et al. (2004) investigaram durante um ano a degradação na interface de ligação entre resina-dentina de amostras submetidas à imersão em água. Concluíram, através de testes de microtração, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, que modificações micromorfológicas como a desorganização das fibrilas colágenas e a perda de resina dos espaços interfibrilares entre a camada híbrida podem resultar no enfraquecimento das propriedades físicas da união resina-dentina.

Dentre os fatores responsáveis pela degradação da camada híbrida incompletamente infiltrada por resina, Pashley et al. (2011) destacam o papel de um grupo de enzimas, denominadas Metaloproteínases (MMPs), as quais possuem a habilidade de degradar quase todos os componentes da matriz extracelular,

Mazzoni et al. (2013) demonstraram ainda que devido os monômeros resinosos dos sistemas adesivos serem ácidos, estes promovem diminuição do pH do meio, e além de ativar as MMPs, adicionalmente também podem ativar um outro grupo de enzimas, as catepsinas cisteínas, proteases recentemente descritas em dentina e em tecido pulpar.

2.4 METALOPROTEINASES

As metaloproteinases da matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*), coletivamente denominadas matrixinas ou colagenase dos vertebrados, são proteases pertencem à família das enzimas dependentes dos íons zinco e cálcio. Foram assim denominadas devido à dependência aos íons metálicos para desempenhar atividades catalíticas (Visse; Nagase, 2003; Tallant et al., 2010; Mazzoni et al., 2012).

Em humanos, foram encontrados 24 genes que codificam esta protease, porém há somente 23 tipos de MMPs, uma vez que a MMP-23 é codificada por dois genes idênticos no cromossomo 1 (Hadler-Olsen et al., 2011).

As MMPs podem ser secretadas por alguns tipos celulares ou mesmo encontrarem-se ancoradas à membrana plasmática das células. Como diversas outras proteases, as MMPs são secretadas na sua forma latente, inativa, denominada zimogênio (Visse; Nagase, 2003; Tallant et al., 2010).

São consideradas como proteases neutras, cuja ativação acontece em pH ácido, porém a melhor atuação funcional ocorre em pH neutro (Tjäderhane et al., 1998).

De maneira geral, estruturalmente consistem em um pró-domínio, um domínio catalítico, uma região hinge e um domínio hemapexina (Visse; Nagase, 2003). O pró-domínio possui um resíduo cisteína em seu interior, que em associação com o íon zinco do domínio catalítico, resulta na exclusão da molécula de água. Quando essa associação zinco-cisteína é interrompida, quer seja por uma mudança conformacional quer seja por proteólise, o resíduo cisteína é removido e substituído por água, o que torna a enzima ativa (Mazzoni et al., 2012).

Figura 2.1- Representação esquemática da estrutura proteica das MMPs. S: peptídeo sinalizador, que orienta o produto de secreção para o retículo endoplasmático no momento da exportação da enzima para fora da célula; Pro: pró-domínio; Cat: domínio catalítico; Zn: sítio ativo para o íon zinco; Hpx: hemopexina (adaptada de Visse; Nagase, 2003)

Baseado na especificidade de seu substrato e em sua organização estrutural, essas proteases podem ser divididas em seis grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, MMPs tipo membrana (MT-MMP) e outras MMPs (Tabela 2.1). Embora essa classificação seja comumente usada, não reflete a complexidade das funções e atividades biológicas dessas enzimas, pois estas podem degradar um número considerável de substratos com especificidade variável. Por exemplo, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 podem degradar diversos tipos de colágenos, especialmente o colágeno do tipo I e IV (Nagase et al., 2006; Zhang; Kern, 2009; Mazzoni et al., 2012).

Tabela 2.1 – MMPs humanas divididas por numeração, grupos, outras denominações referidas na literatura, pesos moleculares nas formas latente e ativa

MMP	GRUPO	OUTRAS DENOMINAÇÕES	PRINCIPAIS SUBSTRATOS	PESO MOLECULAR (FORMAS LATENTE E ATIVA)
MMP-1	Colagenase	Colagenase-1	Colágenos tipos III, I, II, VII, X; gelatina; tenascina; agrecan	52; 43, 41
MMP-2	Gelatinase	Gelatinase A	Gelatina, colágenos tipos I, IV, V, VII, X, XI, fibronectina; laminina-5; agrecan; vitronectina; elastina	72; 67, 62
MMP-3	Estromelisina	Estromelisina-1	Agrecan; laminina; fibronectina; colágenos tipos II, III, IV, V, IX, X, XI gelatina; tenascina; fibrina/ fibrinogênio; elastina	57; 45, 28
MMP-7	Matrilisina	Matrilisina-1	Fibronectina;	28; 19
MMP-8	Colagenase	Colagenase-2	Colágenos tipos I, II, III, VII, X; gelatina; tenascina; agrecan	85; 64
MMP-9	Gelatinase	Gelatinase B	Gelatina; colágenos tipos I, IV, V, VII, X, XI; elastina; fibronectina; laminina; agrecan	92; 82
MMP-10	Estromelisina	Estromelisina-2	Gelatina tipos I, III, IV, V; fibronectina; proteoglicana	52; 44
MMP-11	Estromelisina	Estromelisina-3	Fibronectina; laminina; agregan	58, 51; 46, 28
MMP-12	Outras MMPs	Metaloelastase	Elastina; fibronectina; laminina; proteoglicana; fibrina/fibrinogênio	54; 45, 22
MMP-13	Colagenase	Colagenase-3	Colágenos tipos II, III, I, VII, X; gelatina; tenascina; agrecan	65, 55; 42
MMP-14	MT-MMP	MT1-MMP	Colágenos tipos I, II, III; gelatina;	66; 54

			fibronectina; agrecan; vitronectina	
MMP-15	MT-MMP	MT2-MMP	Proteoglicanos	71, 68; 62
MMP-16	MT-MMP	MT3-MMP	Colágeno tipo III; fibronectina	64; 55
MMP-17	MT-MMP	MT4-MMP	Gelatina; fibrinogênio/ fibrina	71; 67
MMP-19	Outras MMPs	RASI-1	Gelatina	57; 45
MMP-20	Outras MMPs	Enamelisina	Amelogenina; agrecan; COMP	54; 43, 22
MMP-23	Outras MMPs	(CA-)MMP	Gelatina	44; -
MMP-24	MT-MMP	MT5-MMP	Fibronectina; proteoglicanas; gelatina	73; 64
MMP-25	MT-MMP	MT6-MMP	Colágeno tipo IV; gelatina; fibronectina; proteoglicanas; laminina-1; fibrinogênio/fibrina	62; 58
MMP-26	Matrilisina	Matrilisina-2	Colágeno tipo IV; gelatina; fibronectina; fibrina/ fibrinogênio	29; 19
MMP-27	Outras MMPs	-	Há não substratos definidos	59
MMP-28	Outras MMPs	Epilisina	Há não substratos definidos	56; 45

Como explicitado na tabela 2.1, as MMPs são potencialmente capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular (MEC), sejam estes fibrilares e não fibrilares, como colágenos, fibronectina, laminina e glicoproteínas da membrana celular. Durante o desenvolvimento do organismo e desempenho funcional celular normal, essa habilidade em degradar proteínas extracelulares é essencial para a interação individual de cada célula com os outros componentes da MEC (Zhang; Kern, 2009).

As MMPs são requeridas em inúmeros processos fisiológicos de desenvolvimento dos organismos multicelulares, como por exemplo, ovulação, implantação do blastocisto, embriogênese, pós-parto, remodelação tecidual normal, reparo de feridas, reabsorção óssea e angiogênese. Nesses casos, a atividade dessas proteases é regulada precisamente por inibidores teciduais de MMPs, os chamados TIMPs. Em situações patológicas, como por exemplo, inflamação, fibrose

e doenças cardiovasculares, esse controle de inibição é perdido e a atividade desregulada das MMPs tem como consequência a hidrólise dos componentes da matriz extracelular (Visse; Nagase, 2003; Tallant et al., 2010).

Especificamente na cavidade bucal, as MMPs estão associadas a situações fisiológicas como o desenvolvimento dental embrionário, podendo ser detectadas em tecidos duros e moles. Durante esse período, no complexo dentina-polpa essas proteases estão implicadas às interações epitélio-mesenquimais dos estágios iniciais da odontogênese. Exercem um papel fundamental no *turnover* e na degradação de proteínas da membrana basal do germe dentário durante a morfogênese e a citodiferenciação (Fanchon et al., 2004). Após essas etapas, a matriz dentinária mineraliza-se e todas as proteínas ligadas ao colágeno, incluindo as MMPs, são recobertas por nanocristais de hidroxiapatita e tornam-se bastante rígidas (Tezvergil-Mutluay et al., 2011).

Em situações patológicas da cavidade bucal, as MMPs têm sido relacionadas a tipos de neoplasias (Miyagi et al., 2012), doença periodontal (Sorsa et al., 2004), inflamação pulpar (Hannas et al., 2007) e cárie (Tjäderhane et al., 1998). Nesse último exemplo, ainda na década de 80 e sem indicar especificamente as MMPs, Dayan et al. (1983) realizaram um estudo preliminar comparando a atividade colagenolítica em dentina humana cariada e não-cariada e encontraram maior atividade enzimática em dentina cariada, sugerindo que as enzimas responsáveis pela degradação de colágeno seriam ativadas durante o processo de cárie dental.

Alguns anos mais tarde, Tjäderhane et al. (1998), através de ensaios de atividade enzimática funcional e Western Blot, investigaram se as MMPs poderiam participar da degradação da matriz orgânica dentinária após desmineralização. Concluíram que os mecanismos de ativação das MMPs são pH-dependentes e que as MMPs endógenas ativadas pelos ácidos bacterianos possuíam um papel determinante na destruição da dentina pela cárie.

Assim, desde que as referidas proteases foram relacionadas com a degradação da matriz dentinária durante a progressão da doença cárie também tem sido especulado que as MMPs endógenas presentes na matriz orgânica dentinária podem potencialmente hidrolisar as fibrilas colágenas da dentina não cariada. Pashley et al. (2004) foram os primeiros a testar tal hipótese e, para tanto, utilizaram matrizes de dentina parcialmente desmineralizadas por meio de condicionamento ácido e estocadas em saliva artificial contendo inibidores enzimáticos ou óleo

mineral puro por 24 h, 90 e 250 dias. Sugeriram que a degradação dessas fibras colágenas pode ocorrer o tempo todo, mesmo na ausência de bactérias.

Após esses estudos iniciais, outros autores apresentaram diferentes técnicas e métodos capazes de confirmar a atividade colagenolítica das MMPs presentes nesse substrato (Mazzoni et al., 2006), de localizar as MMPs em diferentes profundidades de dentina (Sulkala et al., 2007; Mazzoni et al., 2007; Boushell et al., 2008; Niu et al., 2011), e identificar que essas proteases possuem um papel central na degradação da matriz dentinária incompletamente infiltrada por resina em restaurações adesivas (Lehmann et al., 2009; De Munck et al., 2010; Mazzoni et al., 2012; Mazzoni et al., 2013).

Mais recentemente, outro grupo de proteases, as cisteíno-catepsinas (CTs) tem despertado o interesse dos pesquisadores da área e tem sido associadas juntamente com as MMPs à destruição da matriz dentinária.

2.5 CISTEÍNO-CATEPSINAS

O nome catepsina, derivado do grego *kathepsin* que significava “para digerir”, foi inicialmente atribuído à protease que era ativa em um ambiente ligeiramente ácido. Posteriormente, o nome catepsina foi introduzido para as serino-proteases A e G, às proteases aspárticas D e E, e às cisteíno-catepsinas lisossomais (Turk et al., 2012).

Atualmente, as cisteíno-catepsinas (CTs) são classificadas como pertencentes ao clã CA das cisteínas proteases lisossomais, membros da família C1 das enzimas semelhantes à papaína, a maior e mais bem caracterizada família das cisteínas peptidases (Tjäderhane et al., 2013).

São conhecidos 11 tipos de CTs humanas, as quais são denominadas B, C, D, F, H, K, L, O, S, V, X e W. Inicialmente, acreditava-se que estavam relacionadas com a proteólise intracelular não específica nos compartimentos lisossomais e endossomais. Entretanto, nos dias atuais, sabe-se que essas proteases também podem ser localizadas em outros compartimentos celulares, como no núcleo, no citoplasma, na membrana plasmática, sendo algumas específicas de cada tecido. Por exemplo, a maioria das cisteíno-catepsinas B, H, L, C, X, F, O são expressas de

forma ubíqua nos tecidos humanos e a presença destas indica que estão envolvidas na degradação proteica normal e no turnover tecidual. Por sua vez, as cisteíno-catepsinas K, W e S estão restritas a alguns tipos celulares e tecidos específicos, como em osteoclastos; linfócitos CD8⁺ e em células natural killer (NK); células apresentadoras de antígenos (APC), respectivamente. A localização dessas proteases em diferentes compartimentos e tipos celulares faz com que as mesmas tenham funções fisiológicas específicas e atuem como importantes moléculas sinalizadoras, relacionadas ao controle de alguns mecanismos fisiológicos e patológicos (Turk et al., 2012).

As CTs são sintetizadas na forma de pré e pró-peptídeo, sendo que após a síntese, o pré-peptídeo é removido durante a passagem pelo retículo endoplasmático. A ativação e maturação da enzima acontecem quando o pró-peptídeo é removido através de um processo proteolítico, provocado por outras proteases ou por um mecanismo de autoativação no microambiente ácido dos lisossomos e dos endossomas (Turk et al., 2000)

Dessa maneira, foi identificado que as CTs são ativas em pH ligeiramente ácido e mais instáveis em pH neutro. Quando estão fora dos lisossomos ou em meio extracelular, as CTs podem ser irreversivelmente inativadas em pH neutro, com exceção da CT-S, a qual é estável em pH neutro ou ligeiramente alcalino (Turk et al., 1995; Dickison, 2002).

Quanto à estrutura, Dickison (2002) e Turk et al. (2012) descrevem as CTs endopeptidases como tendo dois domínios, o direito e o esquerdo. O primeiro apresenta uma estrutura em barril, com a cadeia anterior formando uma estrutura enrolada e parte inferior, fechada por uma α -hélice. Na parte superior, existe o sítio reativo da histidina. O segundo possui três α -hélices, sendo que a mais longa, a hélice vertical também chamada hélice central contém trinta resíduos de aminoácidos. A interface dos dois domínios abre-se na parte superior, formando uma fenda, que é o sítio ativo da enzima. Nesse sítio, há dois resíduos reativos, um Cys25 e outro His163, cada qual localizado em um domínio diferente. O Cys25 encontra-se na extremidade N-terminal da hélice central do domínio esquerdo, enquanto o resíduo His163 encontra-se dentro do domínio direito. Esses dois resíduos catalíticos formam o par iônico tiolato-imidazol, o qual é essencial para a atividade proteolítica da enzima. A figura 2.2 ilustra a representação esquemática de uma CT endopeptidase.

Figura 2.2- Esquema de uma cisteíno-catepsina endopeptidase, baseado na forma nativa da CT-L. Em verde, estão representadas as cadeias; em azul e vermelho, os elementos estruturais secundários; em amarelo, os resíduos Cys25 e His163 (adaptada de Turk et al., 2012)

A maioria das CTs atua predominantemente como endopeptidases, porém as CTs X e C são somente exopeptidases. Dessa maneira, Turk et al. (2012) diferenciam a estrutura dos dois tipos de CTs, esclarecendo que as exopeptidases possuem características adicionais que modificam os sítios ativos da fenda formada pela interface dos dois domínios. Assim, nas exopeptidases esses sítios de ligação estão reduzidos. A figura 3 ilustra as cadeias de exopeptidases sobre a CT-L.

Figura 2.3- Vestígios de cadeias das CT exopeptidases B, X, H e C estão representados respectivamente em azul, amarelo, verde e vermelho, sobre a estrutura da CT endopeptidase L (adaptada de Turk et al., 2012)

Com relação à atuação das CTs sobre os tecidos bucais, a maioria dos estudos é recente e demonstra a presença das mesmas em situações como doença

periodontal (Dickison, 2002), neoplasias (Nakashima et al., 2012; Chen et al., 2012), no fluído gengival de pacientes após implantes (Yamalík et al., 2011).

Na área da Dentística, Tersariol et al. (2010) foram os primeiros a analisar a atividade conjunta das CTs e MMPs em amostras de dentina através da degradação de seus respectivos substratos fluorogênicos, bem como a avaliar a expressão de CTs em células do complexo dentina-polpa.

Em dentina cariada, Nascimento et al. (2011) detectaram maior atividade de CTs quando comparada à dentina intacta e, observaram uma forte correlação destas enzimas com a atividade de MMPs. Também verificaram que essa atividade é maior conforme aumenta a profundidade dentinária, o que indica que as CTs derivadas dos odontoblastos e das células da polpa dentária podem ser importantes contribuintes para o desenvolvimento de lesões de cárie ativa, pois uma vez secretadas, podem facilmente alcançar os túbulos dentinários e penetrar na dentina profunda.

Tjäderhane et al. (2013) levantaram a hipótese de, como grande parte dos dentes restaurados foram afetados pela doença cárie e usualmente a esse processo pode estar associado uma leve pulpíte, um aumento na expressão e no influxo dessas proteínas a partir do tecido pulpar, também poderia atuar como contribuinte para a destruição da camada híbrida *in vivo* e comprometer a durabilidade e eficácia de restaurações adesivas.

Tezvergil-Mutluay et al. (2013) mensuraram a atividade enzimática total funcional de MMPs e CTs em matrizes dentinárias desmineralizadas por EDTA, antes e após a exposição ao ácido fosfórico em variadas concentrações, e concluíram que não houve desnaturação das proteases endógenas da matriz dentinária após o tratamento da dentina com ácido fosfórico a 37%.

Como pode ser observado na fundamentação científica do presente estudo, ainda existem lacunas no entendimento da participação de células pulpares sob a influência de sistemas adesivos, quer seja do tipo condicione e lave ou autocondicionante, na síntese, ativação e expressão tanto de MMPs quanto de CTs, o que justifica a realização de novas pesquisas.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito das substâncias liberadas por sistemas adesivos dos tipos autocondicionante e condicione e lave sobre a atividade e a expressão gênica de proteases que degradam colágeno (MMPs e CTs) em culturas enriquecidas por células-tronco da polpa dentária humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo foi precedida da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob o número CAAE 12963913.6.0000.0075 (Anexo).

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas culturas celulares derivadas da polpa de dente decíduo esfoliado humano, mantidas no banco de células do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOUSP.

As alíquotas de células estavam armazenadas congeladas em freezer de nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). Inicialmente, foi realizada a caracterização das células por meio de citometria de fluxo. Este experimento foi realizado no Centro de Facilidades Para Pesquisa (Fluir-CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com a colaboração de Andrea Glatt.

Foram utilizados como marcadores positivos mesenquimais: STRO-1 e CD146 (Biolegend, San Diego, CA, EUA) e CD105 (Santa Cruz Biotechnologies, St Cruz, CA, EUA); marcador positivo neural: NESTIN (Santa Cruz Biotechnologies, St Cruz); marcadores positivos embrionários: Oct 3-4 e Nanog (Santa Cruz Biotechnologies, St Cruz). Como marcadores negativos, foram usados: CD31 e CD34 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), que são hematopoiéticos (Ulmer et al., 2010; Kawashima, 2012). Todos os anticorpos foram utilizados em concentração de 1:200.

Brevemente, para a caracterização foi utilizado o conteúdo celular de oito garrafas de cultivo. Estes frascos foram colocados individualmente em um isopor com gelo e todo o meio de cultura desprezado. As células foram lavadas 2 vezes com 3ml de solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) gelada, sendo esta completamente removida após cada lavagem. Em seguida, foram adicionados 1,5ml da enzima Accutase™ (Millipore, Darmstadt, Alemanha) e 3ml de PBSA e todo esse conteúdo colocado em um tubo de centrifugação com

fundo cônico (Costar, Corning, NY, EUA). O tubo foi levado à centrifugação por 5 minutos à 4°C e 800 RPM, sendo esses parâmetros de centrifugação repetidos em todas as etapas do experimento. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células ressuspense em 10ml de paraformaldeído e incubado durante 1 hora à 4°C. Novamente, o conteúdo foi centrifugado, intercalando-se com lavagens de 10ml de PBSA.

Após as centrifugações e lavagens, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspense em 10ml de solução de bloqueio filtrada gelada (5% BSA diluída em PBSA) e incubado por 1 hora à 4°C. Decorrido esse tempo, o conteúdo do tubo foi centrifugado, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspense em 200µl de solução de anticorpo diluído em BSA a 3%. Após incubação de 1 hora a temperatura ambiente, o conteúdo do tubo foi novamente centrifugado e acrescentado o anticorpo secundário diluído em PBSA. Decorridos 30 minutos, foi retirado o sobrenadante, acrescentado 500µl de PBSA gelado e realizadas 3 centrifugações e lavagens subsequentes. No final, o conteúdo de células foi ressuspense em 500µl de PBSA gelado e lido no citômetro de fluxo (BD FACSAria II™ Cell Sorter, EUA). O procedimento de caracterização identificou uma população de células da polpa dental enriquecida com células-tronco, denominada linhagem PDH1.

Realizada a caracterização, alíquotas de células da linhagem PDH1 foram descongeladas em banho de água à 37°C. A suspensão de células foi diluída 10 vezes em tubo de centrifugação, contendo meio de cultivo DMEM/Ham's F-12 (1:1, Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 15% de soro fetal bovino específico para células-tronco mesenquimais (MSC FBS, Invitrogen/Gibco), 1mM L-glutamina (Invitrogen/Gibco), 1mM aminoácidos não-essenciais (MEM Non-essential amino acid solution 100X, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), 100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Pen Strep, Invitrogen/ Gibco).

Em seguida, o tubo foi levado para centrifugação à 300g por 5 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado, o precipitado de células formado no fundo do tubo ressuspendido em meio de cultura fresco, suplementado com os mesmos componentes citados acima e, transferido para frascos (garrafas) de cultivo celular com área de crescimento de 75cm². Esses frascos foram incubados em estufa (Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Darmstadt, Alemanha) à 37°C com atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

Quando as monocamadas de células atingiam a subconfluência, ou seja, 70% da área de crescimento do frasco estavam cobertos de células, era realizado o subcultivo. Para tanto, 5ml do meio de cultura contido no frasco foi removido e reservado em um tubo de centrifugação, enquanto o restante foi desprezado. A monocamada de células foi lavada duas vezes com solução de PBS, sendo aspirado todo esse volume de líquido entre cada lavagem. Para promover a remoção da monocamada de células aderida ao fundo do frasco, foi utilizada 1mM de solução de tripsina a 0,25% contendo ácido etilenodiaminotetracético- EDTA (Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA) à 37°C, durante 3 minutos. Após esse tempo, a solução de tripsina foi inativada com os 5ml de meio de cultura reservados previamente no tubo Falcon. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação de 15ml e levadas para centrifugação por 5 minutos à 300g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células formado no fundo do tubo ressuspenso em 1ml de meio fresco.

Para contagem do número células viáveis, 50µl dessa suspensão foram homogeneizados com 50µl de azul de trypan (Trypan Blue Solution 0,4%) em microtubo tipo Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e, deste volume, 10µl levado à câmara de Neubauer. Após a contagem, alíquotas das células foram transferidas para novos frascos de cultivo de 75cm², os quais continham 10ml de meio suplementado fresco. Os referidos frascos foram novamente mantidos em estufa à 37°C com atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

Cada subcultura originou uma nova passagem de linhagens celulares, sendo que todas as etapas do presente estudo foram realizadas entre a terceira e quinta passagens.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil) seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade dos materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA), sendo o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.2 SISTEMAS ADESIVOS

Foram utilizados dois sistemas adesivos disponíveis comercialmente, um do tipo condicione e lave (AdperTM Single Bond® 2- 3M ESPE- St.Louis, MN, EUA) e um do tipo autocondicionante (Clearfil SE Bond® – Kuraray, NY, EUA).

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do estudo, foram estabelecidos os grupos experimentais descritos a seguir:

- CONT:** controle, células expostas ao meio de cultura fresco;
- SBNP:** células expostas ao meio de cultura condicionado com Single Bond® não polimerizado;
- SBP:** células expostas ao meio de cultura condicionado com Single polimerizado;
- CNP:** células expostas ao meio de cultura condicionado com Clearfill® não polimerizado;
- CP:** células expostas ao meio de cultura condicionado com Clearfill® polimerizado.

4.4 MEIO CONDICIONADO

O meio de cultivo fresco foi condicionado pelos sistemas adesivos acima mencionados em tubos de centrifugação de 15ml, separadamente. Para padronização da área de contato dos adesivos com os meios de cultura, os sistemas adesivos foram aplicados, de acordo com as instruções do fabricante, como auxílio de um pincel Microbrush (Brush fine, KGsoresen, Cotia, SP, BR) em discos de filtro

de papel filtro de diâmetros de 6x6 cm, confeccionados com um cortador comum e previamente esterilizados.

Com o objetivo de se aproximar ao máximo da aplicação dos adesivos realizada na clínica de rotina, sobre cada disco de papel foi aplicada 1 gota do adesivo Adper™ Single Bond® 2, o qual possui *primer* e adesivo em um único frasco, e 1 gota de cada componente do Clearfil SE Bond®, que possui *primer* e adesivo em frascos separados.

Figura 4.1- Aplicação do adesivo sobre o disco de papel filtro (A) e polimerização destes, quando necessário (B)

Após a aplicação dos adesivos, nos grupos não polimerizados os discos de papel filtro foram colocados, um a um, com o auxílio de uma pinça no fundo do tubo de centrifugação e no final, acrescentado o meio de cultivo fresco, na proporção de 1 ml de meio para cada 1 disco de papel. Nos grupos polimerizados, antes da colocação no tubo de centrifugação, os discos de papel filtro previamente aplicados com os adesivos foram polimerizados individualmente, através uma lâmpada halógena fotopolimerizadora calibrada por um radiômetro, seguindo-se o tempo preconizado por cada fabricante. Em seguida, cada disco de papel foi colocado no fundo do tubo e, novamente no final, adicionado o meio de cultivo fresco na mesma proporção citada anteriormente.

Figura 4.2- Colocação dos discos de papel filtro (A) no tubo de centrifugação e posterior adição de meio de cultivo fresco (B)

O período de condicionamento dos meios foi de 1 hora em estufa com atmosfera úmida com 5% CO₂ e temperatura de 37°C.

Figura 4.3- Condicionamento dos meios de cultivo em estufa durante 1 hora a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂

4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para identificação dos padrões de proliferação celular foram utilizados os dados de viabilidade celular de diferentes tempos experimentais determinados através da análise da atividade mitocondrial. Essa análise foi realizada por meio do

teste de redução de MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio), o qual quantifica a conversão do MTT solúvel em água em formazan insolúvel.

Células da polpa foram semeadas em microplacas de 96 poços (Costar, Corning, NY, EUA) com densidade correspondente a 5×10^3 células por poço ($n=8$ poços para cada tempo e grupo experimental). Vinte e quatro horas depois, o meio de cultivo foi substituído pelos meios condicionados, exceto o grupo controle que recebeu apenas meio de cultivo fresco. Os meios condicionados foram mantidos em contato com as células por 24 horas e, depois desse período de exposição, os meios de cada poço foram completamente substituídos por meio de cultivo fresco (Cavalcanti et al., 2010). As células foram novamente incubadas em estufa com atmosfera úmida e 5% CO_2 à temperatura de 37°C por mais 24, 48, 72 e 96 horas, quando foi realizado o ensaio de redução de MTT para cada tempo experimental descrito. Durante este período, metade da quantidade dos meios de cultivo de cada poço era trocado a cada 48 horas.

Em cada período experimental citado, os 8 poços de cada grupo tiveram seus meios totalmente removidos e substituídos pela solução A de MTT. Esta solução foi preparada com 0,05g de pó de MTT (Invitrogen/Gibco), dissolvidos em 10ml de PBS. Assim, após a aspiração de todo o meio contido em cada poço, foram adicionados 10 μl da solução A e 90 μl de meio fresco. A placa, embrulhada com folha de papel alumínio para ser protegida da luz, foi mantida em estufa com atmosfera úmida e 5% CO_2 à 37°C , durante 4 horas.

Decorrido esse tempo, o conteúdo de cada poço foi novamente aspirado e completamente substituído por 100 μl da solução B de MTT, que era composta por DMSO (LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil) e tampão glicina, na proporção de 4:1. O formazan foi solubilizado e a leitura da placa feita em espectrofotômetro Synergy HT Bio-Tek® (Bio-Tek®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) com filtro de 562nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata por tempo experimental. Os dados de absorbância foram utilizados para obtenção das curvas de crescimento e comparação entre os grupos.

Figura 4.4 Desenho esquemático das fases do experimento de MTT

4.6 ZIMOGRAFIA

A zimografia é uma técnica simples, sensível e quantificável que identifica MMPs por meio da degradação do seu substrato preferencial e de seus pesos moleculares (Snoek-van Beurden; Von den Hoff, 2005)

Para o preparo das amostras, células da polpa foram semeadas em placas de Petri para cultivo com diâmetro 100mm (Costar, Corning) com densidade de 5×10^4 células/placa em meio de cultivo fresco e, incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera úmida e 5% CO_2 à 37°C . Após esse período, quando já havia a aderência das células ao fundo da placa de cultivo, as células foram lavadas 1 vez com PBS, o conteúdo aspirado e acrescentado o meio fresco, porém sem soro fetal (MSC FBS), para que as MMPs presentes no soro não influenciassem nos resultados.

Após 24 horas, os meios de cultivos foram substituídos pelos meios condicionados ou não (controle), seguido o estabelecido para os grupos experimentais (SBNP, SP, CNP e CP) e pelo meio fresco convencional no grupo

controle (CONT). Após 24 horas, todas as placas de todos os grupos tiveram seus meios de cultivo substituídos por meio de cultivo fresco livre de soro fetal bovino.

Nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição ao meio condicionado, os meios de cultura de cada placa foram coletados e transferidos para tubos de centrifugação de 15ml, para serem posteriormente submetidos à análise zimográfica. Esses meios foram centrifugados durante 5 minutos à 3000g em temperatura de 4°C, para evitar a degradação das proteínas. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf previamente identificados e, a seguir, armazenados em freezer -80°C até a sua utilização. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Uma das amostras armazenadas foi utilizada para quantificação da concentração de proteínas totais do meio, através do método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951). Essa padronização foi necessária para que não houvesse variação da quantidade de proteínas de um grupo para o outro.

Para detecção da presença e a atividade proteolítica de MMPs, primeiramente foi preparado o gel de corrida/separação a 6% ou 10%, o qual continha poli(acrilamida) (Sigma Chemical Co.) e como substrato a gelatina A (Sigma Chemical Co.). Nesse gel, as proteínas presentes foram desnaturadas pelo dodecil sulfato de sódio – SDS (Sigma Chemical Co.) e, posteriormente separadas por eletroforese em gel. Os componentes do referido gel, assim como seus volumes, estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Constituintes do gel de corrida/separação

Componentes	6%	10%
Água	6,5ml	4,4ml
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	3,0ml	5ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	3,8ml	3,8ml
Gelatina 1%	1,5ml	1,5ml
SDS 10%	150µl	150µl
TEMED	12µl	6µl
Persulfato de amônio	150µl	150µl

O gel foi colocado vagarosamente entre as placas de vidro com auxílio de uma pipeta Pasteur e, sobre ele, foi acrescentada água Milli-Q, fim de impedir o

contato do mesmo com o ar. Após a completa polimerização do gel, a água Milli-Q foi retirada e preparado o gel de empilhamento, cujos constituintes estão descritos na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Constituintes do gel de empilhamento a 4%

Componentes	Volumes
Água	2,7ml
Acrilamida 30%/Bisacrilamida	670µl
Tris 0.5M pH 6.8	1ml
SDS 10%	40µl
TEMED	4µl
Persulfato de amônio	40µl

Em seguida ao preparo, o gel de empilhamento foi colocado com auxílio de uma pipeta Pasteur até o limite da placa de vidro inferior. O pente que forma os poços foi posicionado e aguardado a polimerização total do gel. Decorrido esse tempo, o pente foi removido e os poços lavados com água destilada para remover possíveis restos de poliacrilamida não polimerizada. Os poços foram secos com papel filtro e a cuba de eletroforese do aparelho carregada com tampão de corrida 1x. Os componentes do tampão de corrida 5x estão descritos na tabela 4.3. Para utilização no experimento, este foi diluído para 1x com água Milli-Q.

Tabela 4.3 – Componentes do tampão de corrida 5x

Componentes	Quantidades
Tris	15,5g
Glicina	72g
SDS	5g
Completar em quantidade suficiente para (q.s.p) 1000 ml de água destilada	

Para o preparo e padronização das amostras, 80 µg de proteína do meio de cada grupo experimental foi misturada ao tampão de amostra 5x concentrado, em uma proporção de 1 parte de tampão para 4 partes da amostra. Os componentes do referido tampão estão descritos na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Constituintes do tampão de amostra 5x concentrado

Componentes	Quantidades
1.5 M Tris	4,543g
50% Glicerol	12,5ml
0,05% azul de bromofenol	1,25ml a 1%
10% SDS	2,5g
Ajustar o pH para 7.6 e completar o volume para 25ml	

As amostras preparadas foram colocadas em estufa à 37°C por 10 minutos. Em seguida, cada poço foi carregado com 20µl dessa amostra e, para monitorar a corrida do gel, foi colocado em um dos poços remanescentes 10µl de amostra padrão (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad Laboratories Inc, EUA).

A eletroforese foi realizada em geladeira à 4°C, com voltagem fixa em 110 V, sendo a amperagem controlada pelo próprio aparelho (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Bio-Rad Laboratories Inc, EUA). O tempo médio de corrida foi de 2 horas.

Terminada a corrida, o gel foi removido das placas e lavado 2 vezes por 60 minutos em temperatura ambiente, em movimentação suave com solução contendo Triton X-100 2% (Sigma Chemical Co.), um detergente não iônico que remove o SDS e renatura as proteínas. Esta solução foi preparada dissolvendo-se 10ml de Triton X-100 em quantidade suficiente para (q.s.p) 500ml de água destilada quente.

Para reativar as enzimas presentes no gel, após as lavagens, este foi incubado com uma solução tampão em estufa à 37°C por 24 horas. A relação dos constituintes do tampão de incubação está na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Componentes do tampão de incubação

Componentes	Quantidades
50 mM Tris-HCl	7,880g
5 mM CaCl ₂	0,7351g
Completar para 1000ml e ajustar o pH para 7.4	

Para verificação da atividade de degradação, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 1 hora e para remoção do excesso de corante, foi utilizada solução aquosa descorante com 50% de metanol até o aparecimento das bandas de lise, as quais foram

identificadas como bandas claras ou transparentes em um fundo azul. Os componentes das duas soluções estão relacionados nas tabelas 4.6 e 4.7, respectivamente.

Tabela 4.6 – Solução de Coomassie Blue R-250 0,1%

Componentes	Quantidades
50 mM Tris-HCl	7,880g
5 mM CaCl ₂	0,7351g
Completar para 1000ml de água destilada e ajustar o pH para 7.4	

Tabela 4.7 – Solução descorante de metanol 50%

Componentes	Volume
Metanol	50ml
Ácido acético glacial	10ml
Completar q.s.p 1 ml de água destilada	

Para a análise dos resultados, o gel foi escaneado (Molecular Imager® Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories Inc, EUA), as imagens captadas por meio do programa Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories Inc,) e os pesos moleculares das bandas presentes quantificados de forma invertida com base nas marcações da amostra padrão através do programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

Figura 4.5 A- Gel obtido após a utilização de solução descorante de metanol 50%; B- Gel escaneado; C- Imagem do gel invertido para quantificação dos pesos moleculares das bandas presentes

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR

Células PDH1 foram semeadas em placas de Petri para cultivo com diâmetro 100 mm (Costar, Corning) em duplicata (experimentos independentes), com densidade de 5×10^4 células/placa em meio de cultivo fresco e, incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera úmida e 5% CO₂ à 37°C. Após a aderência completa das células, o meio de cultura foi substituído pelos meios condicionados de acordo com os grupos experimentais anteriormente descritos (SBNP, SBP, CNP e CP) e pelo meio fresco convencional no grupo controle (CONT), sendo trocado 24 horas depois por meio de cultivo fresco em todos os grupos.

4.7.1 Extração do RNA Total

O RNA total foi extraído das culturas celulares 24, 48, 72 e 96 horas após o condicionamento, através do kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74104, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Sucintamente, as células foram lavadas duas vezes com 3ml de PBS gelado, o conteúdo líquido aspirado e acrescentado 700µl da solução tampão de lise RTL em cada placa. Foi adicionada a mesma quantidade de etanol 70% para interromper a reação. Em seguida, 700µl da amostra foram transferidos para uma coluna de centrifugação do próprio kit e a purificação do RNA foi realizada através de sucessivas lavagens com os tampões RW1 e RPE. No final, o RNA foi diluído em água livre de RNase.

A concentração do RNA foi determinada pelo equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e a integridade e a pureza avaliados pela razão das absorbâncias 260/280nm ($A_{260/280}$) e 230/260nm ($A_{230/260}$), respectivamente. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C, até sua utilização.

4.7.2 DNase

Com a finalidade de eliminar traços de DNA genômico que possam ter contaminado as amostras, foi ainda utilizado o kit DNase I (Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. Sucintamente, foram acrescentados 1µg da amostra de RNA, 1µl de tampão de reação 10X DNase I, 1µl de DNase I e, se necessário, quantidade suficiente de água (q.s.p) DEPC para 10µl. Foram preparados dois tubos para cada amostra, os quais foram incubados em temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1µl de solução de EDTA em cada tubo e estes foram levados ao termociclador por 10 minutos à 65°C. Assim, as amostras tratadas foram utilizadas como molde para síntese do cDNA.

4.7.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA de cada grupo experimental foi sintetizado através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Reagentes utilizados na confecção da fita de cDNA

Reagentes	Volumes (µl)
10X Tampão RT	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8
10X RT Random Primer	2.0
Multiscribe™ transcriptase reversa	1.0
Inibidor de RNase	1.0
Água livre de nuclease	3.2
Volume total por reação	10.0

Aos componentes acima citados foram acrescentados os 11µl obtidos na etapa anterior (DNase I). A reação foi incubada em termociclador com os seguintes parâmetros: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização.

4.7.4 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para análise dos níveis de expressão gênica nos grupos experimentais avaliados foram realizadas reações de qRT-PCR. O cDNA sintetizado foi o molde utilizado para a reação pelo método do SYBR Green Dye I e a avaliação da expressão gênica relativa pelo método de Pfaffl (2001), segundo o cálculo:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{\text{Eficiência}^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\Delta Ct_{\text{calibradora}} - \Delta Ct_{\text{amostra}})}}{\text{Eficiência}^{\Delta Ct_{\text{normalizador}} (\Delta Ct_{\text{calibradora}} - \Delta Ct_{\text{amostra}})}}$$

Foi utilizado o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como gene endógeno para a normalização das amostras. As amostras calibradoras foram as células da polpa enriquecidas com células-tronco não tratadas com os diferentes adesivos nos mesmos tempos experimentais (grupo Controle). As reações foram realizadas em um volume total de 10µL, contendo 1µL de amostra (diluição 1:10), 10pmol de cada *primer* (400 nmol), 5µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems) e água q.s.p. As reações foram realizadas no equipamento da Applied Biosystems (ABI 7300), entre 60-62°C em 40 ciclos. Os genes avaliados estão descritos na tabela 4.9. Os *primers* foram desenhados inter-éxon no *software* GeneTool 2.0 ou obtidos pelo banco público de *primers* para PCR (Primer Bank - <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

Tabela 4.9 - Sequência dos *primers* utilizados no PCR em tempo real e o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons)

Gene-Alvo	Número de Acesso (Pubmed)	Sequência dos primers (5' - 3')	Amplicon (pb)	Temp. de Anelamento (°C)
MMP-1	NM_002421	F: acacgccagatttgccaaga R: cgatgatctcccctgacaaa	145	60
MMP-2	NM_004530	F: ccctcgcaagcccaagt R: ggattcgagaaaaccgcagt	149	60
MMP-3	NM_002422	F: ttgctcagcctatccattgg R: ccactgtcctttctcctaac	132	60
MMP-7	NM_002423	F: gcgttcacctcatcgaagt R: tgtatggggaactgctgaca	151	62
MMP-9	NM_004994	F: cagcgccagtcaccctt R: cccgagtgtaacatagcg	103	60
MMP-10	NM_002425	F: gccagcaatacctagaaaag R: cctccagagtgtcagtgtc	154	60
MMP-13	NM_002427	F: gcgctacctgagatcatact R: tcgtcaagttgccagtcac	135	60
MMP-14/MT1-MMP	NM_004995	F: gcagaagtttacggcttgca R: tcgaacattggccttgatctc	100	60
Catepsina B	NM_147783	F: acaacgtggacatgagctact R: tcggtaaataactctctgggg	85	61
Catepsina K	NM_000396	F: actcaaagtaccctgtctcat R: ccacagagctaaaagcccaac	161	62
GAPDH	NM_002046	F: gcatcctgggctacactga R: ccaccaccctgtgtgctgta	162	60

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da proliferação celular, da expressão gênica e da zimografia (pixels das bandas) foram analisados e comparados através do teste de variância multifatorial ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi o de 5% ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007, Belém, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Os resultados da caracterização celular realizada por meio de citometria de fluxo estão apresentados na figura 5.1.

Figura 5.1 – Resultados da citometria de fluxo para caracterização das células-tronco derivadas da polpa dentária. As letras A, B, E e F indicam expressão positiva para os marcadores CD146, CD105, NESTIN e NANOG, respectivamente. Letras C, D, G e H indicam expressão negativa para os marcadores STRO-1, Oct3-4, CD34 e CD31, respectivamente.

As células apresentaram expressão positiva para os marcadores mesenquimais CD146 e CD105; para o marcador neural NESTIN e para o marcador embrionário NANOG. As células não expressaram os marcadores hematopoiéticos CD31 e CD34; o marcador mesenquimal STRO-1 e o marcador embrionário Oct 3-4.

5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

O gráfico 5.1 ilustra as curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais. O grupo CONT (controle) apresentou crescimento significativo e progressivo durante todos os tempos experimentais ($p < 0,01$).

O grupo SBNP (Single Bond não polimerizado) manteve a viabilidade celular nos mesmos valores que no tempo inicial até 48 horas e estes valores diminuíram significativamente a partir de 72 horas ($p < 0,05$). Os valores de viabilidade celular deste grupo foram significativamente menores que os do grupo CONT nos mesmos tempos experimentais durante todo o experimento ($p < 0,01$).

O grupo SBP (Single Bond polimerizado) apresentou crescimento significativo do início até o final do experimento ($p < 0,01$). Os valores de viabilidade celular foram mantidos nos mesmos níveis até 72 horas e aumentaram significativamente em 96 horas ($p < 0,05$). Nos mesmos tempos experimentais os valores de viabilidade celular deste grupo SBP foram significativamente menores que os do grupo CONT ($p < 0,01$) e maiores ($p < 0,01$) que os do grupo do mesmo sistema adesivo não polimerizado (SBNP).

O grupo CNP (Clearfil não polimerizado) apresentou viabilidade celular significativamente ($p < 0,01$) menor no primeiro tempo experimental. A partir de 48 horas as viabilidades foram mantidas nos mesmos níveis até o final do experimento ($p > 0,05$). Os valores de viabilidade celular deste grupo foram significativamente menores que os do grupo Controle ($p < 0,01$) nos mesmos tempos experimentais.

O grupo CP (Clearfil polimerizado) apresentou crescimento significativo do primeiro ao último tempo experimental ($p < 0,01$). Durante todo o tempo experimental, os valores de viabilidade celular deste grupo foram menores que os do grupo controle ($p < 0,01$) nos mesmos tempos experimentais e maiores ($p < 0,01$) que os do mesmo sistema adesivo não polimerizado (CNP).

Na comparação entre grupos de adesivos diferentes não polymerizados (SBNP e CNP) foi observado que, a partir de 48 horas os valores de viabilidade do grupo CNP foram significativamente menores que os do grupo SBNP ($p < 0,01$). A comparação entre os grupos de sistemas adesivos polymerizados (SBP e CP) mostrou que a partir das 48 horas experimentais os valores de viabilidade celular do grupo CP foram significativamente maiores que os do grupo SBP ($p < 0,05$).

Gráfico 5.1- Ilustração gráfica das curvas de crescimento celular. Os dados mostram as médias ($\pm$ erro padrão da média) das densidades ópticas (viabilidade celular) dos diferentes grupos em função dos tempos experimentais (horas)
 (*) - significativamente maior que o valor do primeiro tempo dentro do mesmo grupo experimental (crescimento significativo)
 (†) - significativamente menor que o valor do primeiro tempo dentro do mesmo grupo experimental (não houve crescimento significativo)
 Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,01$) dos valores de viabilidade celular entre os diferentes grupos no tempo experimental de 72 horas

5.3 ZIMOGRAFIA

O gráfico 5.2 mostra os resultados de atividade total da MMP-2 (ativa + latente) nos diferentes grupos e tempos experimentais. Todos os grupos mostraram

a presença de MMP-2 nas suas formas latente (72KDa) e ativa (62KDa). A atividade da MMP-2 até as primeiras 72 horas foi similar independentemente do grupo experimental. Diferenças significativas na atividade desta MMP apareceram apenas em 96 horas. Nesse tempo, as menores atividades foram encontradas nos grupos controle, SBNP e SBP ($p < 0,05$). O grupo CP mostrou atividade intermediária e o grupo CNP apresentou atividade significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,01$), exceto o grupo CP. Na comparação entre os grupos polimerizados e não polimerizados do mesmo adesivo, não houve diferença significativa de atividade de MMP-2.

Gráfico 5.2- Representação gráfica da atividade total (ativa + latente) de MMP-2 nos diferentes grupos experimentais em função do tempo (horas). Os dados mostram a média das porcentagens das bandas no gel de gelatina ($\pm$ erro padrão da média)

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo experimental de 96 horas

O gráfico 5.3 mostra os resultados de atividade total da MMP-9 (ativa + latente) nos diferentes grupos e tempos experimentais. Todos os grupos mostraram a presença de MMP-9 nas suas formas latente (92KDa) e ativa (82KDa), exceto em 24 horas onde somente a forma latente foi observada. A atividade gelatinolítica até as primeiras 72 horas foi similar independentemente do grupo experimental. Diferenças significativas na atividade da MMP-9 apareceram apenas em 96 horas. Nesse

tempo, as menores atividades foram encontradas nos grupos controle e SBNP ($p < 0,05$). Os grupos SBP e CNP mostraram atividades intermediárias e o grupo CP apresentou atividade significativamente maior que a do grupo CONT ($p < 0,01$). Na comparação entre os grupos polimerizados e não polimerizados do mesmo adesivo, não houve diferença significativa de atividade gelatinolítica de MMP-9.

Gráfico 5.3- Representação gráfica da atividade total (ativa + latente) de MMP-9 nos diferentes grupos experimentais em função do tempo (horas). Os dados mostram a média das densidades ópticas das bandas no gel de gelatina ($\pm$ erro padrão da média)

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo experimental de 96 horas

5.4 – EXPRESSÃO GÊNICA

Os genes estudados (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, MMP-14, CT-B e CT-K) foram expressos pelas células-tronco da polpa dentária humana (células PDH-1), exceto os genes MMP-7 e MMP-9. Foram apresentadas as expressões relativas destes genes normalizadas pelo gene constitutivo (endógeno)

GAPDH e, como amostra calibradora ou de referência, a célula-tronco da polpa dentária sem tratamento com os adesivos e do mesmo período experimental. Assim, o valor relativo da expressão gênica para a amostra calibradora, na escala linear, sempre será “1”. Os resultados para o grupo CNP não serão apresentados, pois em todos os tempos experimentais, devido à elevada citotoxicidade do adesivo, a pequena quantidade de células viáveis não foi suficiente para a obtenção de RNA total de boa qualidade e, portanto, para a síntese de cDNA.

5.4.1 MMP-1

O gráfico 5.4 ilustra a expressão relativa do gene da MMP-1. Em todos os grupos experimentais a expressão do gene da MMP-1 foi modulada positivamente em 24 e 48 horas. Nos grupos SBP e CP, esta expressão foi modulada negativamente em 72 e 96 horas, respectivamente.

Gráfico 5.4 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-1. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.2 MMP-2

O Gráfico 5.5 apresenta os resultados da expressão da MMP-2 que foi modulada positivamente em 24 e 48 horas nos grupos SBNP e SBP e em 48 horas no grupo CP. Nos demais tempos experimentais, foi modulada negativamente.

Gráfico 5.5 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-2. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.3 MMP-3

O gráfico 5.6 apresenta os resultados da expressão da MMP-3. Houve modulação positiva para o grupo SBNP em todos os tempos experimentais. Para o grupo SBP, houve modulação positiva em 24, 72 e 96 horas, enquanto para o grupo CP a modulação foi positiva somente em 24 e 48 horas. Nos demais tempos experimentais, a MMP-3 foi modulada negativamente.

Gráfico 5.6- Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene de MMP-3. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como "1" (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.4 MMP-10

Os resultados da expressão gênica da MMP-10 são mostrados no gráfico 5.7, que indica que em 24 horas, houve modulação positiva para todos os grupos experimentais. Em 48 horas, apenas o grupo SBP apresentou modulação positiva, enquanto em 72 horas, apenas os grupos SBNP e CP apresentaram modulação positiva para o gene. Em 96 horas, o gene foi modulado negativamente em todos os grupos.

Gráfico 5.7 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-10. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.5 MMP-13

O gráfico 5.8 apresenta os resultados para a expressão gênica relativa de MMP-13. Observa-se que para os grupos SBNP e SBP, a MMP-13 foi modulada positivamente apenas em 24 horas, enquanto para o grupo CP a modulação positiva ocorreu somente em 96 horas. Em todos os grupos, nos demais tempos experimentais, a modulação foi negativa.

Gráfico 5.8 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-13. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.6 MMP-14

O gráfico 5.9 ilustra a expressão relativa de MMP-14. Observa-se que no grupo SBNP este gene foi modulado positivamente apenas em 24 horas, enquanto para os grupos SBP e o CP esta modulação positiva ocorreu somente em 48 horas. Nos demais tempos experimentais, a MMP-14 foi modulada negativamente.

Gráfico 5.9 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa do gene da MMP-14. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.7 Catepsina B (CT-B)

No gráfico 5.10, observa-se que a CT-B foi modulada positivamente em 24 e 48 horas no grupo SBNP. Por sua vez, o grupo CP apresentou modulação positiva para o gene apenas em 48 horas. Nos demais tempos, a CT-B foi modulada negativamente em todos os grupos.

Gráfico 5.10 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa da CT-B. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

5.4.8 – Catepsina K (CT-K)

No gráfico 5.11, observa-se que a CT-K foi modulada para todos os grupos experimentais apenas em 48 horas. Nos demais tempos, a modulação foi negativa para o gene.

Gráfico 5.11 – Representação gráfica dos valores da expressão gênica relativa da CT-K. Gene constitutivo: GAPDH e amostra calibradora: células-tronco da polpa dentária não tratadas com os adesivos no mesmo período experimental. O parâmetro de expressão foi o grupo CONT indicado como “1” (linha tracejada). Valores acima da linha indicam modulação positiva para o gene, enquanto valores abaixo indicam modulação negativa

A tabela 5.1 ilustra a distribuição dos genes testados em todos os grupos e tempos experimentais. O sinal “+” significa que houve modulação positiva para o gene em questão, enquanto o “-” significa modulação negativa.

Tabela 5.1 - Distribuição das expressões dos genes estudados nos diferentes grupos e tempos experimentais

Genes	Grupos Experimentais											
	SBNP				SBP				CP			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
MMP-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
MMP-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
MMP-3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
MMP-10	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
MMP-13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MMP-14	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
CT-B	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
CT-K	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Total de expressões positivas	7	4	3	2	6	6	2	2	3	7	2	1

Desse modo, percebe-se que a grande maioria das MMPs e as CTs foram moduladas positivamente durante os tempos 24 e 48 horas em todos os grupos.

O gráfico 5.12 ilustra a tendência de expressões dos genes estudados. Observa-se que em todos os grupos a modulação positiva diminuiu ao longo dos tempos experimentais, havendo sobreposição das linhas dos grupos SBNP e SBP.

Gráfico 5.12- Gráfico ilustrativo das tendências de expressões dos genes estudados e modulados positivamente nos diferentes grupos experimentais em função do tempo

Note que as linhas de tendência dos grupos SB se sobrepõem

6 DISCUSSÃO

Adesivos dentinários aplicados diretamente sobre a dentina aumentam a atividade de enzimas endógenas deste tecido, as quais degradam colágeno, colocando em risco a integridade da camada híbrida de restaurações estéticas. Essa degradação da camada híbrida ainda é considerada como uma das principais falhas das restaurações adesivas. Ocorre devido à infiltração e a impregnação incompletas de monômeros resinosos na matriz extracelular (MEC) da dentina deixando esta matriz, composta principalmente por colágeno, exposta à ação de dois grupos de proteases, as MMPs e as CTs (Mazzoni et al., 2006; Tersariol et al., 2010). A degradação deste colágeno ao longo do tempo afeta a longevidade e durabilidade das restaurações adesivas (De Munck et al., 2003; Breschi et al., 2008; Lehmann et al., 2009).

A reativação das atividades gelatinolíticas e colagenolíticas dessas enzimas endógenas encriptadas na matriz de dentina mineralizada e que são liberadas mediante a dissolução ácida da dentina ocorre por ação direta da utilização de adesivos dentinários (Mazzoni et al., 2006; Carrilho et al., 2007; De Munck et al., 2010; Mazzoni et al., 2012; Mazzoni et al., 2013). Contudo, devido à integração estrutural e funcional do complexo dentina-polpa existe a possibilidade de que esses monômeros também possam atuar sobre o tecido pulpar, influenciando a atividade e expressão de MMPs e CTs, o que potencializaria ou não o efeito degradativo dessas proteases sobre a camada híbrida. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das substâncias liberadas por sistemas adesivos dos tipos autocondicionante e condicione e lave sobre a atividade e a expressão gênica de proteases que degradam colágeno (MMPs e CTs) em células-tronco da polpa dentária humana. Como resultado, foi observado que em resposta aos diferentes adesivos dentinários testados em suas formas polimerizada ou não polimerizada, as MMP-2 e 9 foram ativadas e a expressão gênica de MMPs e CTs foi modulada de modos distintos.

Existem diversos estudos dos efeitos dos adesivos sobre a ativação de MMPs no substrato dentinário. No entanto, são poucos os estudos que investigaram o efeito dos adesivos sobre a atividade gelatinolítica e a modulação da expressão gênica das referidas enzimas em culturas de células pulpares (Lehmann et al., 2009; Orsini et al., 2011). No presente estudo, optou-se por utilizar culturas enriquecidas

por células-tronco de polpa dentária humana com o objetivo de se aproximar ao máximo da situação clínica, onde diante de agressões, tal como ocorre em cáries e preparos cavitários, a camada de odontoblastos é perdida. Neste momento, o complexo dentina-polpa passa a responder pela ação de células mesenquimais indiferenciadas, localizadas nas camadas subodontoblásticas da polpa dentária (Harada et al., 2008). Essas células são multipotentes, com grande capacidade de auto renovação, proliferação e diferenciação em outros tipos celulares (Miura et al., 2003).

Ainda na busca de aproximar o estudo *in vitro* da situação clínica *in vivo*, os adesivos dentinários não entraram em contato direto com as células em cultura, da mesma forma que acontece quando da aplicação dos sistemas adesivos ao dente, onde não é recomendada sua aplicação em cavidades muito profundas, quando já existem microexposições pulpares (Sengün et al., 2011). De fato, os adesivos dentinários entram em contato com a polpa de forma indireta, ou seja, substâncias liberadas pelos adesivos em meio líquido (fluido dos túbulos dentinários) é que são capazes de adentrar a polpa propriamente dita. Assim sendo, os adesivos entraram em contato com as culturas celulares de forma indireta, por meio de meios condicionados. Os meios de cultivo celular é que entraram em contato com os adesivos e foram condicionados pelos mesmos, passando a conter todas as substâncias que são liberadas pelos sistemas adesivos testados em meio líquido.

Por meio de marcadores específicos, a cultura celular utilizada mostrou possuir populações enriquecidas por células-tronco. Essas células então foram colocadas em contato com os meios condicionados por adesivos dentinários, a fim de que fossem mensuradas a citotoxicidade desses meios, bem como, a atividade e a expressão gênica de proteases envolvidas na degradação da camada híbrida de restaurações estéticas. Os resultados do presente estudo mostraram que, os sistemas adesivos dos tipos condicione e lave (Single Bond-SB) e autocondicionante (Clearfil-C) testados apresentaram diferentes graus de citotoxicidade. Quando polimerizados, os adesivos (SBP e CP) causaram morte celular, no entanto, a capacidade proliferativa das células não foi perdida. Por outro lado, quando não polimerizados (SBNP e CNP) estes adesivos se mostraram altamente citotóxicos, uma vez que as células perderam sua capacidade proliferativa. De fato, o meio de cultivo condicionado por adesivos não polimerizados devem conter quantidades maiores de monômeros resinosos. Estes achados estão de acordo com os

resultados de outros estudos (Chen et al., 2001; Huang; Chang, 2002; Mantellini et al., 2003; Cavalcanti et al., 2010; Trubiani et al., 2010). Esse resultado é de relevância no sentido de mostrar que os monômeros residuais dos sistemas adesivos quando polimerizados de maneira incompleta podem difundir-se através dos fluídos dos túbulos dentinários e provocar efeitos citotóxicos sobre a polpa, como já demonstrado na literatura (Pashley et al., 2000; Milia et al., 2012).

A citotoxicidade *in vitro* provocada pelas substâncias liberadas pelos adesivos sobre as culturas de células pode ser justificada pelo fato de que o HEMA, o TEGDMA e outros metacrilatos, quando atuando isolados ou interagindo quimicamente entre si, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo, o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), que são gerados pela redução incompleta do oxigênio durante processos catabólicos. As ROS produzem danos celulares de forma direta ou mesmo atuando como mensageiro intracelular durante a morte induzida por vários outros fatores ou estímulos. Esses danos incluem a quebra de importantes macromoléculas, a peroxidação de lipídeos, a oxidação de proteínas e alterações nos ácidos nucleicos (Schweik et al., 2006; Koulaouzidou et al., 2009).

No presente estudo, a citotoxicidade dos meios condicionados pelo Clearfil, independente de estarem polimerizados ou não, foi maior que os do Single Bond. Estes resultados são respaldados pelo estudo de Issa et al. (2004), que investigaram as concentrações citotóxicas individuais de monômeros resinosos sobre fibroblastos humanos em cultura e encontraram a seguinte escala decrescente de citotoxicidade: Bis-GMA>TEGDMA>DMAEMA>HPMA>HEMA. De fato, o Clearfil, de acordo com seu fabricante, apresenta em sua composição Bis-GMA e HEMA, enquanto o Single Bond apresenta apenas o Bis-GMA. Além disso, o HEMA do Clearfil é um monômero capaz de se difundir rapidamente através dos túbulos dentinários em direção à polpa (Trubiani et al., 2010) podendo então causar efeito citotóxico maior neste tecido (Milia et al., 2012).

A atividade gelatinolítica promovida pelos adesivos foi analisada nos meios das culturas celulares após o contato com meios condicionados pelos adesivos dentinários. Os resultados mostraram que essas células sintetizaram MMPs -2 e 9, tanto nas suas formas latentes quanto ativas. O resultado mais interessante foi que somente em 96 horas houve diferenças significativas entre a atividade observada nos diferentes grupos experimentais. Adicionalmente, os grupos do adesivo

autocondicionante (CP e CNP) foram os que mostraram as maiores atividades. Outros autores já haviam obtido resultados similares em estudos *in vitro* testando adesivos autocondicionantes em outros tipos celulares, como odontoblastos (Lehmann et al., 2009) e fibroblastos primários de polpa dentária humana (Orsini et al., 2011).

O adesivo autocondicionante foi o mais citotóxico e o que levou à maior ativação das MMPs estudadas no presente estudo. Uma explicação para este fato poderia estar relacionada aos monômeros destes adesivos, que são tóxicos e mais ainda são ácidos. Segundo Lehmann et al. (2009), o ambiente ácido poderia ativar canais iônicos dependentes de pH localizados na membrana plasmática das células pulpares, regulando a ativação de MMPs. De fato, meios condicionados por adesivo autocondicionante contendo adesivos ácidos poderiam ser capazes de induzir aumento de atividade de MMPs, mas neste caso era esperado que este aumento ocorresse imediatamente após o contato com as células, quando o meio ainda estava ácido, mas não foi o que ocorreu, o aumento da atividade só foi observado em 96 horas. Porém, segundo Visse e Nagase (2003), as MMPs são ativadas em pH ácido e sua funcionalidade ocorre em pH neutro. Assim sendo, a hipótese da ação do baixo pH do adesivo autocondicionante estudado pode explicar os resultados do presente estudo, que utilizou a zimografia como método de estudar a atividade das MMPs. Os meios condicionados pelo adesivo autocondicionante ativaram as enzimas nos primeiros momentos após o contato com as células e somente 96 horas após as MMPs encontrarem ambiente ideal para a sua função, aconteceu a maior degradação do gel de gelatina.

Corroborando a hipótese acima apresentada, esse ambiente ideal para a função das MMPs foi alcançado em 96 horas, devido a trocas de metade dos meios de cultivo celular que aconteciam a cada 48 horas após o contato com os meios condicionados pelos adesivos e que foram realizadas com a finalidade de se aproximar ao máximo o estudo *in vitro* com a condição biológica do complexo dentina-polpa *in vivo*. Essas trocas parciais do meio de cultivo procuraram mimetizar as circulações sanguínea e linfática da polpa que retiram parte das substâncias que porventura adentram este tecido através do fluido dos túbulos dentinários. O meio de cultura fresco contém bicarbonato de sódio que reage com o CO₂ da estufa onde as células ficam acondicionadas e eleva o pH do meio para um valor neutro. Desse modo, o meio ácido condicionado pelos sistemas adesivos, aos quais as células

foram expostas durante 24 horas, representou o mecanismo para ativar as MMPs. A completa substituição desse meio condicionado após o referido período de exposição por meio de cultivo fresco, cujo pH era neutro, promoveu a elevação do pH do meio em que as células estavam, propiciando o aumento da atividade funcional dessas proteases.

Para a análise da modulação da expressão gênica, foram selecionadas as MMPs -1, -2, -3, -7, -9, -10, -13 e -14, além das CTs -B e -K. A escolha desses genes-alvo foi baseada em estudos prévios que demonstraram a presença dessas proteases no complexo dentina-polpa (Palosaari et al., 2003; Tersariol et al., 2010), bem como foram eleitas as proteases capazes de degradar gelatina e colágeno (Overall, 2002; Mazzoni et al., 2012). Nosso estudo apresenta pela primeira vez os resultados de modulação da expressão gênica de MMPs e CTS para culturas de células da polpa dentária humana enriquecida com células-tronco, expostas aos meios condicionados por adesivos dos tipos autocondicionante e condicione e lave. Como achado relevante deve ser destacado que, de um modo geral, a modulação da expressão gênica de MMPs e CTs foi positiva em todos os grupos experimentais em 24 e 48 horas, exceto para as MMPs-7 e -9, as quais não foram moduladas em nenhum dos tempos experimentais. De fato, o resultado para MMP-7 já era esperado, uma vez que a presença de dessa proteinase no tecido pulpar tem sido relatada em um determinado tipo celular e em situações específicas, tais como em odontoblastos (Palosaari et al., 2003). Porém, a ausência de expressão gênica para MMP-9 mesmo tendo sido detectada atividade gelatinolítica para essa proteinase foi inesperado. Os mecanismos precisos que envolvem a modulação da expressão gênica de MMPs e CTs no tecido pulpar, especialmente sobre como as substâncias liberadas pelos sistemas adesivos podem influenciar nessa modulação, ainda não foram esclarecidos. Baseadas em estudos prévios de biologia celular e molecular, algumas hipóteses podem ser sugeridas.

Lozito et al. (2011) esclarecem que a atividade enzimática de MMPs nem sempre se correlaciona com a expressão de mRNA, assim como indicam a necessidade de ser realizada a distinção entre as atividades das MMPs que estão associadas com as células daquelas MMPs que foram liberadas para os compartimentos extracelulares (Lozito et al., 2014). De acordo com os experimentos realizados por esses autores, a tripsina utilizada no protocolo de cultura celular pode influenciar e modificar a interação entre as células e as MMPs exógenas. Desse

modo, no presente estudo, a tripsina pode ter ativado a forma latente de MMP-9 e foi a atividade dessa protease a determinada na zimografia. Corroborando com essa hipótese, em seu estudo, Bannikov et al. (2002) demonstraram que a própria interação da forma latente da MMP-9 com o substrato gelatina foi suficiente para induzir atividade proteolítica dessa proteinase. Os autores explicaram que possivelmente isso ocorreu devido à interação entre os domínios fibronectina da estrutura cristalina da forma latente de MMP-9 e o substrato gelatina, utilizado na zimografia.

Com relação à modulação da expressão gênica de MMPs e CTs, já foi estabelecido que esta é regulada por inúmeros fatores estimulantes ou supressores, que influenciam as vias de sinalização celular. De maneira geral, grande parte dessa modulação ocorre durante os mecanismos de transcrição, enquanto uma menor parte acontece em mecanismos pós-transcricionais, sendo essa modulação regulada de maneira específica para cada tipo celular (Svineng; Ravuri, 2008). Como fatores moduladores podem ser citados as próprias proteínas da matriz extracelular, estresse celular, espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas e fatores de crescimento (Berquin et al., 1999; Sternlicht; Werb, 2001; Overall, 2002; Yan; Boyd, 2007; Mazzoni et al., 2012). Estudos realizados com tipos celulares já diferenciados demonstraram essa regulação e justificaram como sendo um mecanismo de defesa da célula frente à agressão provocada por um agente irritante. Brevemente, o fator modulador ligar-se-ia a um receptor na membrana plasmática da célula, influenciaria na via de transdução intracelular e, consequentemente na resposta celular gerada (Meikle et al., 1992; Gordon et al., 2009).

Desse modo, no presente estudo, uma possível explicação para a regulação da expressão gênica é que as ROS, cuja produção foi induzida pelos monômeros resinosos, atuariam como estímulo externo responsável por esse controle da expressão gênica, bem como pela autoativação das MMPs. No primeiro caso, o H_2O_2 formado nas mitocôndrias e no citosol atuaria como um determinante do estado redox, que constitui o mecanismo regulatório para a conformação e função proteica. Como o H_2O_2 é livremente difundido através da membrana plasmática e apresenta uma longa vida, pode atuar como um segundo mensageiro em eventos celulares que culminam com a ativação ou inibição de fatores transcricionais e de cascatas de sinalização que envolvem proteíno-quinases (MAPK), responsáveis pela regulação gênica de MMPs.. No segundo caso, para promover a autoativação das MMPs, as

ROS atuariam interrompendo as ligações que mantêm essas proteases no estado latente, ou seja, romperiam as ligações tiol entre o íon zinco localizado no domínio catalítico e o grupamento cisteína localizado no pró-domínio da mesma proteinase (Nelson; Melendez, 2004; Svineng; Ravuri, 2008).

Quanto à modificação no padrão de modulação da expressão gênica ao longo dos tempos avaliados, ou seja, maiores expressões acontecendo em 48 horas, uma associação importante poderia ser feita com o mecanismo de ação das substâncias inibidoras de proteases, como por exemplo, a clorexidina. Um estudo recente demonstrou que esta pode atuar como inibidor tanto de MMPs quanto de CTs (Scaffa et al., 2012). Nos procedimentos adesivos, a clorexidina é utilizada imediatamente após o condicionamento ácido com o objetivo precípuo de inibir a atividade de proteases da matriz dentinária ativadas pelo condicionamento ácido. Considerando que os efeitos inibitórios da mesma seriam mais pronunciados nas primeiras horas após a sua utilização, quando estes efeitos estivessem diminuindo, se os genes de MMPs e CTs nas células pulpares ainda estivessem superexpressos, a possibilidade de ocorrer degradação da camada híbrida seria maior. Porém, já foi demonstrado que o uso da clorexidina após o condicionamento ácido da dentina realmente preserva a camada híbrida (Hembling et al., 2005). Assim sendo, os resultados do presente estudo podem contribuir para o entendimento deste achado, ou seja, a ação imediata da clorexidina inibindo a ação das proteases liberadas da matriz dentinária, se segue do período onde ocorre a diminuição fisiológica da expressão gênica das referidas enzimas tendo, como resultado a preservação da camada híbrida por um período maior de tempo.

Uma última hipótese seria que a acidez provocada pelos monômeros provocaria uma auto ativação das MMPs e CTs, em um mecanismo dependente de pH (Nascimento et al., 2011). Enquanto as MMPs são proteases neutras, cuja ativação ocorre em pH ácido, porém a atividade funcional acontece em pH neutro (Tjäderhane et al., 1998), as CTs são tanto autoativadas quanto funcionais em pH ácido, sendo consideradas, em grande, parte estáveis e inativas em pH neutro (Turk et al., 2000). Em uma situação real do complexo dentina-polpa, as circulações linfáticas e sanguíneas removeriam as substâncias liberadas pelos adesivos do local, aumentando o pH do tecido ao longo do tempo. Em nosso experimento, as trocas de meio que objetivam mimetizar essa situação poderiam explicar a modulação positiva da expressão gênica encontrada tanto para MMPs quanto CTs

nos dois primeiros tempos experimentais e a modulação negativa nos dois últimos tempos experimentais.

O presente estudo apresentou resultados de relevância para o entendimento da função de MMPs e CTs no dente. A expressão gênica e a atividade dessas proteases podem ser reguladas por substâncias liberadas por adesivos dentinários em meio líquido. Esses resultados apontam para uma provável coparticipação dessas enzimas sintetizadas por células indiferenciadas da polpa dentária em resposta a adesivos dentinários aplicados à dentina na degradação da camada híbrida de restaurações adesivas. As substâncias destes adesivos no fluido dos túbulos dentinários poderiam adentrar a polpa dentária tendo como resposta o aumento da expressão gênica de diversas MMPs (1, 2, 3, 10, 13 e 14) e CTs (B e K), bem como a atividade de ao menos duas delas as MMPs 2 e 9. Mais ainda, o fato deste aumento da expressão gênica das MMPs e CTs ser limitada às primeiras horas após o seu contato com as substâncias liberadas pelos adesivos dentinários pode ampliar o entendimento de como substâncias inibidoras de MMPs, quando aplicadas na dentina imediatamente após o condicionamento ácido deste substrato, atuam na preservação da camada híbrida de restaurações adesivas. Estudos *in vivo* da expressão gênica e de atividade de proteases aqui analisadas devem ser realizadas para testar as hipóteses aqui levantadas. Esses estudos serão de relevância para o entendimento da fisiologia da polpa no que diz respeito a respostas deste tecido a substâncias citotóxicas relacionadas com o metabolismo das proteases, o que em torno darão subsídios para melhorar os procedimentos adesivos em Dentística.

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais desse estudo, pode-se concluir que:

Substâncias liberadas por sistemas adesivos são capazes de influenciar células-tronco de polpa dentária humana levando ao aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9, em especial as do adesivo autocondicionante, e também à modulação positiva de genes das MMPs e CTs estudadas.

REFERÊNCIAS¹

Ayres M, Ayres-Jr M, Ayres DL, Santos AAS. Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Versão 5.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, MCT- CNPq; 2007.

Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*. 2002 May;277(18):16022-7.

Berquin IM, Yan S, Katiyar K, Huang L, Sloane BF, Troen Bruce R. Differentiating agents regulate cathepsin B gene expression in HL-60 cells. *J Leukoc Biol*. 1999 Oct;66(4):609-16.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012 Jul;8(7):2419–33.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008 Jan;24(1):90–101.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008 Feb;53(2):109-16.

Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res*. 2003;44(Suppl 1):171-8.

Cardoso MV, Neves AA, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Muck J, Van Meerbeek. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*. 2011 Jun;56(Suppl 1):31-44.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007 Jun;86(6):529–33.

Cavalcanti BN, Bärschneider LR, Marques MM. Citotoxicidade de substâncias liberadas de sistemas adesivos convencional e auto-condicionante sobre fibroblastos de polpa humana. *Braz Dent Sci*. 2010 Jul/Dez;13(2):10-4.

Chen RS, Liuw CC, Tseng WY, Hong CY, Hsieh CC, Jeng JH. The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin-bonding agent. *Oper Dent*. 2001 Sep-Oct;26(5):505-10.

Chen MK, Su SC, Lin CW, Tsai CM, Yang SF, Weng CJ. Cathepsin B SNPs elevate the pathological development of oral cancer and raise the susceptibility to carcinogen-mediated oral cancer. *Hum Genet*. 2012 Dec;131(12):1861-8.

Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 1983;28(2):185-7.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):136–40.

De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2010 Oct; 118(5):494–501.

Dickinson DP. Cysteine Peptidase of Mammals: Their Biological Roles and Potential Effects in the Oral Cavity and Other Tissues in Health and Disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(3):238-75.

Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, Goldberg M. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci*. 2004 Apr;112(2):171-6.

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

Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2010. 1170 p.

Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug;58(2):137-47.

Gordon GM, Ledde DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2009 Nov;221(2):402-11.

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

Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg J. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* 2011 Jan;278(1):28-45.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb;65(1):1-13.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakamura-Ohshima K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing processing following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol.* 2008 Oct; 130(4):773-83.

Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Fluid movement across the resin–dentin interface during and after bonding. *J Dent Res.* 2004 Nov;83(11):843–848.

Hashimoto M. A review – micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential prevention solutions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Jan;92(1):268-80.

Hembling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005 Aug;84(8):741-6.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentin bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J.* 2002 Nov;35(11):905-9.

Ikeda M, Kurokawa H, Sunada N, Tamura Y, Takimoto M, Murayama R, Ando S, Miyazaki M. Influence of previous acid etching on dentin bond strength of self-etch adhesives. *J Oral Sci.* 2009 Dec;51(4):527-34.

Iohara K, Nakashima M, Ita M, Ishikawa M, Nakashima A, Akamine A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J Dent Res.* 2004 Aug;83(8):590-5

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast in vitro. *Dent Mater.* 2004 Jan;20(1):12-20.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 388p.

Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012 Nov;57(11):1439-58.

Koulaouzidou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *Eur J Dent.* 2009 Jan;3(1):3-9.

Lehmann N, Debret R, Roméas A, Magloire M, Degranges M, Bleichen, Sommer P. Self-etching Increases Matrix Metalloproteinase Expression in the Dentin-Pulp Complex. *J Dent Res.* 2009 Jan; 88(1):77-82.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pahley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011 Aug;90(8):953-68.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-76.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrests of pulp cells. *J Dent Res.* 2003 Aug;82(8):592-6.

Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentine substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997 Nov;25(6):441-58.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006 Sep; 27(25):4470-6.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Lenard R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 isoforms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007 May;86(5):436-40.

Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent*. 2011 Jul; 39(7):470-7.

Mazzoni A, Breschi L, Carrilho M, Nascimento FD, Orsini G, Ruggeri Jr A, Gobbi P, Manzoli L, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. A review on nature, role and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endod Top*. 2012 Sep;21:19–40.

Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2013 Jan;92(1):82-6.

Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci*. 1992 Dec;103 (Pt 4):1093-9.

Milia E, Cumbo E, Cardoso RJA, Gallina G. Current Dental Adhesives System. A Narrative View. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5542-52.

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

Miyagi SPH, Maranduba CMC, Silva FS, Marques MM. Dental pulp stem cells express proteins involved in the local invasiveness of odontogenic myxoma. *Braz Oral Res*. 2012 Mar-Apr;26(2):139-44.

Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP inhibitors on dentin stability: a sistematic rewiew and meta-analisys. J Dent Res. 2014 Jun;93(8):733-43.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardio Res. 2006;69:562-73.

Nakashima T, Yasumatsu R, Masuda M, Clayman GL, Komune S. Prognostic value of cathepsin L and its inhibitor headpin in oral squamous cell carcinoma. J Laryngol Otol. 2012 Nov;126(11):1134-7.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res. 1982;16:265-73.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldelli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjäderhane L, Tersariol ILS. Cysteine Cathepsins in Human Dentin Carious. J Dent Res. 2011 Apr;90(4):506-11.

Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinase. Free Radi Biol Med. 2004;37(6):768-784.

Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MK, Tay FR, Chen JH. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. J Dent. 2011 Aug;39(8):536-42.

Orsini G, Mazzoni A, Orciani M, Putignano A, procaccini M, Falconi M, Pashley DH, Tay FR, Brschi L. Matrix metalloproteinase-2 expression induced by two different adhesive systems on human pulp fibroblasts. J Endod. 2011 Dec;37(12):1663-7.

Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. Mol Biotechnol. 2002 Sep;22(1):51-86.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Sato T. Expression profile of matrixmetalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. Eur J Oral Sci. 2003 Apr;111(2):117-27.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(2):104-33.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentin Permeability and dentin adhesion. J Dent. 1997 Sep; 25(5):355-7.

Pashley DH, Zhang Y, Agee KA, Rouse CJ, Carvalho RM, Russell CM. Permeability of desmineralized dentin to HEMA. Dent Mat. 2000 Jan;16(1):7-14.

Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: Etching effects on unground enamel. Dent Mat. 2001 Sep;17(5):430-44.

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.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tervegil-Mutluay. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011 Jan;27(1):1-16.

Peumans M, Kanumilli J, De Munck, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. Dent Mat. 2005 Sep;21(9):864-81.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May;29(9):2002-7.

Scaffa PMC, Vidal CMP, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjäderhane L, Tersariol ILS, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine Inhibits the Activity of Dental Cysteine Cathepsins . J Dent Res. 2012 Apr; 91(4):420-5.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. J Dent Res. 2006 Oct; 85(10):870-7.

Sengün A, Yalçın M, Ülker HE, Öztürk B, Hakki SS. Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Sep;112(3):83-8.

Sharma LA, Sharma A, Dias GJ. Advances in regeneration of dental pulp – a literature review. J Investig Clin Dent. 2013 Aug;4:1-14.

Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? Int J Paediatr Dent. 2009 Jan;19(1):61-70.

Smith A. Vitality of the pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003 Jun;67(6):678-89.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005 Jan;38(1):73-83.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinase (MMPs) in oral disease. *Oral Dis.* 2004 Nov;10(6):311-8.

Sternlicht MD, Werb Z. How metalloproteinases regulates cell behavior *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):121-7.

Svineng G, Ravuri C. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):197-202.

Tallant C, Marrero A, Gomis-Ruth FX. Matrix metalloproteinase: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):20-8.

Tersariol IL, Geraldini S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):475-81.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mat.* 2011 Sep; 27(9):926-33.

Tezvergil-Mutluay M, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DLS, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Nishitani Y, Tay FR, Pashley DH. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res.* 2013 Jan;92(1):87-91.

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.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay M, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013 Jan;29(1):116-35.

Trubiani O, Caputi S, Di Lorio D, D'Amario M, Paludi M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F, De Angellis F, D'Arcangelo C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2010 Aug;43(8):646-53.

Turk B, Bieth JG, Bjork I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V, Turk V. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995 Apr; 376(4):225-30.

Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar; 1477(1-2):98-111.

Turk V, Stoka V, Vasilveja O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cystein cathepsin: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan; 1824(1):68-88.

Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. Stem cells – prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(10):860-83.

Van Meerbeek B, Vargas S, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, Vanherle G. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent*. 2001;6:119-44.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003 May-Jun;28(3):215-36.

Van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, Ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003 Jan-Feb;37(1):58-65.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May;92(8):827-39.

Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci*. 2009 Dec;1(4):163–76.

Yamalik N, Günday S, Kilinc K, Karabulut E, Berker E, Tözüm TF. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Sep-Oct;26(5):991-7.

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):19-26.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B. Comparative study on Adhesive Performance of Functional Monomers. *J Dent Res*. 2004 Jun;83(6):454-58.

ANEXO - Parecer Comitê Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

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

Título da Pesquisa: Análise do efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a produção e atividade de proteínas da matriz extracelular (MMP-2, MMP-8, MMP-9 e catepsinas cisteínas) em células-tronco da polpa dentária humana.

Pesquisador: Márcia Martins Marques

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12963913.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 206.318

Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:

Este estudo tem por objetivo verificar o efeito de substâncias liberadas por adesivos dentinários sobre a produção e atividade de proteínas da matriz extracelular em células-tronco da polpa dentária humana. Para o estudo, será utilizada uma linhagem de células-tronco, obtida de polpa de dente decíduo, que se encontra no Laboratório de Pesquisas Básicas, Edmir Matson, do Departamento de Dentística da FOU SP. Estas células entrarão em contato com meios condicionados pelos sistemas adesivos do tipo autocondicionante e condicione-lave, polimerizados ou não, e o controle positivo será o de células-tronco crescidas em meio de cultura, sem qualquer intervenção ou material adicionado. Os meios condicionados serão postos em contato sobre as monocamadas celulares nos seguintes tempos experimentais 24, 48, 72 e 96 horas. A mensuração da produção e da atividade das proteínas MMP-2, MMP-8 e MMP-9 e catepsinas cisteínas B e K serão avaliadas por meio dos testes Elisa e zimografia, respectivamente, no meio de cultura. Os resultados, em triplicata, serão tratados estatisticamente por teste multifatorial ANOVA.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é verificar o efeito das substâncias liberadas por sistemas adesivos dos tipos autocondicionante e condicione-lave, sobre a produção e a atividade de enzimas que degradam colágeno (MMP-2, MMP-8, MMP-9 e de catepsinas cisteínas B e K) sobre células-tronco da polpa dentária humana em cultura

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Uma vez que as culturas de células foram obtidas a partir de células de polpa de dentes deciduos com indicação para exodontia, nenhum risco ou benefício ao paciente pode ser verificado

Na verdade, trata-se de culturas de células utilizadas em outros estudos, já aprovados anteriormente por este comitê

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum procedimento será realizado diretamente sobre os sujeitos da pesquisa. Trata-se de material obtido a partir de exodontias de dentes deciduos indicadas, e se estas não são um benefício em si para o paciente, nenhuma forma de risco pode ser suposto.

Deve-se ressaltar novamente, que o material utilizado, é remanescente de pesquisas anteriores já aprovadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não foi apresentado nenhum TCLE, visto que o material já se encontra armazenado no laboratório de pesquisa básica do departamento de dentística da FOUSS.

No entanto, é apresentado uma carta de autorização, do responsável pelo laboratório, esclarecendo que o mesmo material a ser utilizado neste estudo, já foi utilizados em estudos anteriores, quando os responsáveis pelos sujeitos, assinaram o TCLE e autorizaram o uso e armazenagem do material, inclusive para estudos posteriores

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está enquadrado dentro dos preceitos éticos preconizados e encontra-se sem pendências.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSS relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

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 DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP-FOUSP.

SAO PAULO, 25 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br