ROBERTA SOUZA D'ALMEIDA COUTO

Análise *in vitro* da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral)

São Paulo

2013

ROBERTA SOUZA D'ALMEIDA COUTO

Análise *in vitro* da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral)

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2013

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

Couto, Roberta Souza D'Almeida.

Análise in vitro da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral) / Roberta Souza D'Almeida Couto ; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2013.

92 p. : fig., tab., 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. Capeamento da polpa dentária. 2. Células-tronco. 3. Biomateriais. I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Couto RSDC. Análise *in vitro* da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral). Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 01/11/2013

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: _____

Dedicação é ***empenho, afeto, responsabilidade e amor.....***

A ciência odontológica, na
busca constante de uma
saúde bucal melhor e mais
digna.

Ao amor maior da minha vida,
Minha Família, pelo amor
incondicional de sempre,
além de todos os valores
obtidos e construídos a partir
de vocês. Amor sem igual.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e toda força, sabedoria que sempre esteve ao meu lado;

Aos meus pais, **Jorge e Lourdes**, pelo amor pleno, incentivo, força, garra, coragem que sempre cultivaram em minha vida e sempre sempre estiveram ao meu lado em tudo. Obrigada amor maior;

A minha irmã, **Renata**, maravilha é ter você em minha vida. Amor, cumplicidade, lealdade, parceria para sempre. Obrigada por todas as maravilhas que me proporcionas e que me presenteaste com os meus sobrinhos lindos, **Kazuyuki e Taiyo**, alegrias e sorrisos que me cativam e me tornam mais viva. Meu cunhado, **Makoto**, por toda sua generosidade e simplicidade ímpar, obrigada;

Ao meu irmão, **João Paulo**, meu pequeno grande homem. Amor e alegria sem igual. Obrigada por fazer parte da minha vida;

Aos meus avós, **Osmar** (*in memoriam*) e **Balbina**, pelo amor infinito e que sempre estiveram presentes na minha formação. Vocês são exemplos de muito amor, fidelidade, fortaleza e alegrias em minha vida. Amo vocês, muito.

A minha família paraense gringa, que me recebeu e recebe com muito amor e carinho em São Paulo. **Elise**, minha irmã gringa, agradeço por todo seu companheirismo, generosidade e lealdade. Amiga que levo no meu coração. Meu irmão gringo, **Armando**, exemplo de fidelidade e companheirismo sem igual. Agradeço muitíssimo por todos os momentos incríveis que vivemos juntos. E agradeço de coração a grande amiga de muitos muitos anos, **Luciana**, que foi a intercessora de toda essa amizade, obrigada Lulu.

A minha família paraense papa chibé, tios (as), primos (as), sobrinhos (as), meus afilhados lindos **Raine, Kazuyuki, Camille e Brenda**, amigos e colegas que sempre estiveram na torcida, famílias **Souza, D'Almeida Couto, Azevedo, Santiago, Kadosaki, Gonçalves, Francês, Castro, Ribeiro & Morete, Lima & Raiol, Addario, Chaves** obrigada.

A minha família paraense mais paulista, agradeço pelos momentos vividos ao lado de vocês durante minha estadia em São Paulo e que me aproximavam do aconchego do lar paraense. Obrigada família **Yamaguchi, Kaieda, Rodrigues, Moraes, Souza & Segadilha, Amaral & Ferreira, Nardi & Silva, Santana, Neves**;

A minha família paulista original, agradeço pelo carinho e receptividade que tiveram comigo. **Profa Dra Márcia Marques**, que carinhosamente gosto de chamar de Marcita ou Má, uma mulher inteligente, bonita, trabalhadora e de retidão. Possui uma capacidade incrível de estimular e desenvolver seus alunos. Obrigada por minha formação durante o período do doutorado, por todo aprendizado, incentivo, apoio e carinho que sempre teve comigo. Jamais irei esquecer o *darlingzinha* e minha música Roberta de Pepino Di Capri que cantarolava quando o andamento dos trabalhos estava ao seu contento. Agradeço de coração por tudo, você e seu marido **Cesar**, que sempre me receberam com muito carinho, obrigada. **A turma do laboratório** de pesquisa básica, conhecida como a *Tchurma do Lab*, foi fundamental no meu dia a dia do trabalho, dividindo emoções, dúvidas, angústias, alegrias. Conhecer essa turma foi demais. Agradeço aos decanos do laboratório **Leila, Nilton, Cacio, Fernando, Sueli, Stella e Mariana** pelo aprendizado iniciado por vocês de grande valia para meu desenvolvimento na área de cultivo celular e pelos momentos vividos juntos. **Leila** (Leilinha) de um coração gigantesco, generosa, amável e sempre estimulando meu desenvolvimento profissional. **Nilton** (Niltinho) prestativo, alegria em pessoa e companheiro de todas as horas. **Cacio**, brincalhão sempre, deixando a dureza mais flexível. **Fernando** (Fê) o professor pardal, sempre com boas saídas nos momentos de dúvidas. **Sueli** (Su) determinação, foco, planejamento é com ela mesma. **Stella** (Stellinha) trabalhar sempre e muito, pique total e com muitas histórias e estórias para

contar. **Mariana** (Mari) atenciosa, prestativa, muito querida. Agradeço aos que chegaram comigo e posteriormente **Renata**, **Talita**, **Ivana**, **Thaís**, **Cindy**, **Sairo** pelo companheirismo, parceria e aprendizado. **Renata** (Rê) amiga de longas datas, coração sem igual, parceira, leal, sábia, carinho gigantesco. **Talita** (Tali) meiga, amorosa, verdadeira *mame* das minhas filhinhas células, momentos de cumplicidade juntas, és demais. **Ivana** (Iva) dedicada, prestativa, muito ativa, valeu por tudo, jamais esquecerei nossa viagem em congresso. **Thaís** (Tha) atenciosa, amorosa e prestativa, uma querida. **Rejane** (Reje) maturidade impressionante em tratar com as pessoas, bate papo agradabilíssimo. **Karen**, sempre muito atenta aos ensinamentos. **Cindy** aluna de iniciação científica dedicada, cuidadosa e perseverante. **Sairo** aluno de iniciação científica maduro sabe o que quer e muito alegre. A técnica do laboratório, **Débora** (Dezinha), obrigada por sua presença constante seja nos momentos de carinho, de puxão de orelha, a verdadeira *mame* do laboratório. Agradeço por tudo, pelos seus abraços e mimos que já sabia quando minha saudade de casa apertava. E agradeço pelo convívio mesmo que curto, mas intenso de alunas egressas do laboratório **Lorena** (Lo) e **Manoela** (Manô), vocês são um encanto e muito intensas, foi um prazerzão conhecê-las. Obrigada por tudo Tchurma do Lab;

À **Maria Fernanda** (Fe), por toda sua dedicação, trabalho, contribuições e empenho comigo na biologia molecular. Foi muito bom trabalhar com você, és exemplo de compromisso, seriedade, garra admirável, obrigada por tudo, foi um presente conhecê-la. Ao **Prof Dr Fábio Daumas**, agradeço por ceder gentilmente o laboratório de biologia molecular da FOU SP e sua pesquisadora **Maria Fernanda**, além da **Michella** e **Lília** que sempre me estimularam e apoiaram na biologia molecular;

Aos **Prof Dr Decio Pinto Júnior** e **Prof Dr Fernando Nogueira** que cederam gentilmente os laboratórios de cultivo celular e bioquímica da FOU SP, respectivamente, agradeço por tudo, pois foi de grande valia para o desenvolvimento do nosso trabalho e que ainda me oportunizaram conhecer pessoas maravilhosas e que muito me auxiliaram. Obrigada **Thaysse** (Thay) pelos momentos incríveis e de descontração, e **Thaty** pelos finais de semanas de muito trabalho que compartilhamos;

Às Coordenadoras do DINTER (doutorado interinstitucional), Profas Dras **Miriam** e **Cecy**, pela construção e condução habilidosa e que permitiu o sucesso do programa. Obrigada pelo apoio e carinho de vocês nessa jornada. Vocês favoreceram juntamente com as instituições Universidade Federal do Pará (UFPA), Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal do Piauí (UFPI) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) desenvolvimento profissional e pessoal;

Aos professores que fizeram parte da minha formação acadêmica durante o DINTER (doutorado interinstitucional) e que tive a oportunidade de conhecer e aprender com vocês. **Profs Drs do Departamento de Dentística:** Márcia Marques, Glauco Vieira, Adriana Matos, Margareth Oda, Maria Angela Sobral, Ana Cecília Aranha, Patrícia Freitas, Miriam Turbino, Carlos de Paula, Rubens Carvalho, Alessandra Andrade, Narciso Netto, Maria Aparecida Luz. **Profs Drs do Departamento de Biomateriais:** Rafael Ballester, Walter Miranda Júnior, Paulo Cesar, Igor Medeiros, Leonardo Rodrigues Filho, Victor Chavez, Carlos Fracci, Fernando Nogueira, Alyne Gonçalves. **Profs Drs do Departamento de Patologia Bucal:** Décio Pinto Júnior, Fábio Daumas, Luciana Corrêa e Karem Ortega. Agradeço todo aprendizado construído com esses professores de experiência ímpar em suas áreas;

Aos amigos e colegas do DINTER (doutorado interinstitucional), **Danielle, Andréa, Cláudia, Luciana, Jesuína, Max, Newton, Ana Daniela, Armando, Simone, Noélia, Aladim, Leonardo** e **Renata** foi um grande presente essa turma. Agradeço pela convivência agradável, pelas trocas de experiências e por compartilharmos momentos de dúvidas, ansiedades, alegrias, risadas. Com vocês, foi bom demais tudo isso;

Aos amigos para além da vida acadêmica **Renata Rodrigues, Danielle Emmi, Rafael Lima** e **Stella Ferreira**, obrigada por fazerem parte da minha vida e por todos os momentos que vivemos juntos. Com vocês foi tudo tão melhor, mais alegre, mais leve e mais divertido, sei que contamos sempre uns com os outros;

A todos os **colegas de trabalho da UFPA**, por facilitarem meu processo de liberação para o doutorado e por todos os momentos de compreensão quando necessários. Meu muito obrigada;

Aos colegas de pós-graduação da FOU SP que tive o privilégio de conviver durante minha estadia em São Paulo e inclusive trabalhar com alguns deles, **George, Maria, Adriano, Simoni, Laís, Amanda**, obrigada pelo companheirismo, conhecimentos e conversas agradabilíssimas que tivemos juntos;

Aos funcionários do Departamento de Dentística da FOU SP, **Sônia** (Soninha), **Selma, David, Arnaldo** (Paixão), **Aldo, Leandro** e do Departamento de Biomateriais da FOU SP, pelos trabalhos desenvolvidos por vocês e que sempre estiveram de pronto a me auxiliarem no que fosse preciso.

Ao funcionário da segurança, **Sr Nilson**, pelos seus cuidados e atenção ao sair altas horas da FOU SP, obrigada pela proteção, seu cuidado era paterno;

A todos os **funcionários da biblioteca**, pelos serviços prestados em todos os momentos que precisei sempre fui muito bem atendida;

Ao funcionário da copiadora, **Marcos**, sempre muito gentil e prestativo, obrigada por seus serviços e acolhimento;

A todos os **funcionários do restaurante Bala de Coco**, pelo carinho e alegria de vocês diária ao dizer “Bom Almoço” e os mix de sucos deliciosos que sempre que possível preparavam;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram e contribuem nesse ciclo da minha vida. Esse é o grande tesouro que levo comigo, meu curriculum vitae oculto, este não é registrado em plataformas, mas fica em um registro maior que é minha vida. Agradeço de coração todo aprendizado e amadurecimento profissional e pessoal. E como essa frase me representa, não poderia ficar de fora da tese “Huhuhuhuhu.....valeu por tudo”.

*Existe um tempo pra cada coisa, existe um momento debaixo do céu
Existe um tempo pra cada coisa.
Existe um tempo pra cada coisa, existe um momento debaixo do céu
Existe um tempo pra cada coisa.*

*Tempo pra plantar, tempo pra colher
Tempo pra ganhar, tempo pra perder,
Tempo pra nascer, tempo pra morrer.*

*Tempo pra chegar, tempo pra partir,
Tempo pra apartar, tempo pra unir,
Tempo pra chorar, tempo pra sorrir.
Tempo pra cantar, tempo pra calar,*

*Tempo pra cair e pra recomeçar,
Hoje é o tempo, é tempo de amar!
Tempo pra cantar, tempo pra calar,
Tempo pra cair e pra recomeçar,
Hoje é o tempo, é tempo de amar!*

Composição: Rozeli Duque / Eugênio Jorge

RESUMO

Couto RSDA. Análise *in vitro* da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado a hidróxido de cálcio ou a agregado de trióxido mineral) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

O hidróxido de cálcio (HCa), o agregado de trióxido mineral (MTA) e o óleo-resina de copaíba (COP) isoladamente apresentam características biológicas do material de capeamento pulpar direto mais apropriado. Com o pressuposto que associados poderiam originar materiais mais apropriados para serem aplicados em capeamento pulpar direto, este estudo objetivou analisar *in vitro* proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa de dente decíduo humano esfoliado (SHEDs) em resposta a substâncias liberadas pelo COP isolado ou associado ao HCa ou ao MTA. Proliferação, diferenciação e migração de SHEDs (Linhagem PDH3) foram analisadas através do ensaio de redução do MTT; da atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de nódulos mineralizados pelo ensaio de Vermelho de Alizarina e expressão dos genes (*BGLAP*, *DSPP*, *DMP1* e *HSP-27*) pelo qRT-PCR; e, do ensaio do *Scratch*, respectivamente. As células foram submetidas à ação de meios condicionados pelos biomateriais, de acordo com os seguintes grupos experimentais: COP isolado (COP); HCa isolado (HCa); HCa associado ao COP (HCa+COP); MTA isolado (MTA) e MTA associado ao COP (MTA+COP). Células crescidas em meio de cultura fresco serviram de controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O grupo HCa apresentou número de células viáveis significativamente menor que o dos demais grupos, inclusive o do grupo HCa+COP ($p < 0,01$) em todos os tempos experimentais. A atividade de ALP em 14 dias foi similar em todos os grupos experimentais. Em 21 dias, o grupo COP apresentou quantidade maior de mineralização que os demais grupos ($p < 0,01$) e o grupo HCa+COP maior que o grupo HCa ($p < 0,01$). O gene *DMP1* não foi expresso pelas células em nenhum

grupo experimental. O grupo COP apresentou as menores expressões dos genes *BGLAP*, *DSPP* e *HSP-27*. As SHEDs do grupo MTA+COP apresentaram superexpressão dos genes *BGLAP*, *DSPP* e *HSP-27*, e as do grupo HCa+COP superexpressão dos genes *BGLAP* e *HSP-27*. O grupo HCa foi o único que não apresentou células em migração em todos os tempos experimentais. Os demais grupos apresentaram migração similar à do grupo Controle, exceto o grupo MTA em 12 e 24 horas. As SHEDs dos grupos HCa+COP e MTA+COP migraram significativamente mais que as dos grupos HCa e MTA, respectivamente. O COP, isolado ou em associação aos demais biomateriais, não interfere na proliferação de SHEDs e quando associado ao HCa é capaz de anular a citotoxicidade deste biomaterial isolado. O COP, isoladamente ou em associação, não interfere na atividade de fosfatase alcalina. Isoladamente, o COP induz a maior diferenciação funcional e quando associado ao HCa melhora substancialmente a diferenciação induzida por este biomaterial isolado. Os biomateriais isolados ou associados não são capazes de induzir expressão de *DMP1*. O COP associado aos biomateriais induz superexpressão de genes relacionados à formação de matriz extracelular e de diferenciação odontoblástica. O COP isoladamente não interfere na migração celular e, quando associado ao HCa, anula por completo a inibição de migração causada por esse biomaterial isolado. Quando associado ao MTA, o COP aumenta a velocidade de migração das células em relação ao MTA isolado. Óleo-resina de copaíba (COP) promove proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dental sendo uma proposta de um biomaterial para capeamento pulpar.

Palavras-chave: Óleo de copaíba. Materiais de capeamento pulpar. Células-tronco de polpa dentária humana.

ABSTRACT

Couto RSDA. *In vitro* analysis of proliferation, differentiation and migration of human dental pulp stem cells in response to potential materials for direct pulp capping (oil-resin copaiba alone or associated to calcium hydroxyde or mineral trioxide aggregate) [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

The calcium hydroxide (CaH), the mineral trioxide aggregate (MTA) and the oil-resin copaiba (COP) by themselves have biological characteristics of the ideal direct pulp capping material. With the assumption that when associated they could originate materials more appropriated for direct pulp capping, this study aimed to analyze the *in vitro* proliferation, differentiation and migration of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) in response to substances leached from COP alone or associated with CaH or MTA. Proliferation, differentiation and migration of SHEDs (PDH3 lineage) were analyzed through the MTT reduction assay; alkaline phosphatase (ALP) activity, mineralized nodules formation using the Alizarin Red assay and gene expression (*BGLAP*, *DSPP*, *DMP1* e *HSP-27*) using qRT-PCR; and the *Scratch* assay, respectively. The cells were submitted to the culture medium conditioned by the biomaterials according to the following experimental groups: COP alone (COP); CaH alone (CaH); CaH associated to COP (CaH+COP); MTA alone (MTA) and MTA associated to COP (MTA+COP). Cells grown in fresh culture medium served as control. Data were compared by ANOVA complemented by the Tukey's test ($p \leq 0.05$). The CaH group presented number of viable cells significantly smaller ($p < 0.01$) than those of all other experimental groups, including the CaH+COP, during whole experimental time. The ALP activity in 14 days was similar in all experimental groups. In 21 days, the COP group presented the amount of mineralization higher ($p < 0.01$) than those of all other groups. The gene *DMP1* was not expressed by the cells in all experimental groups. The COP group presented the smallest expression ($p < 0.01$) of *BGLAP*, *DSPP* and *HSP-27* genes. The SHEDs of the MTA+COP group presented superexpression of the *BGLAP*, *DSPP* and *HSP-27* genes, and in the CaH+COP group the cells superexpressed the *BGLAP* and *HSP-27* genes. The

CaH group was the only one where there was no cell migration during whole experiment. Migration of all other groups was similar to that of the control group, except by the MTA group in 12 and 24 hours. The CaH+COP and MTA+COP migrated significantly more than the CaH and MTA groups, respectively. COP, alone or in association to the other biomaterials, does not interfere with the proliferation of the SHEDs, and when associated to CaH is able to annul the cytotoxicity of the CaH alone. The COP, alone or in association to the other biomaterials, does not interfere with the ALP activity. The COP alone induces the highest functional differentiation of the SHEDs and when associated to the CaH substantively improves this differentiation. The biomaterials, alone or in association, are not able to induce the expression of the *DMP1* gene. The COP associated to the biomaterials induces superexpression of the genes related to the extracellular matrix formation and odontoblastic differentiation. The COP alone does not interfere with the cell migration and, when associate to CaH, completely annuls the inhibition of migration caused by this material alone. When associated to MTA the COP increases the cell migration speed compared to the effect of the MTA alone. Oil-resin copaiba (COP) promotes proliferation, differentiation and migration of stem cells from dental pulp with a proposal for a biomaterial for pulp capping.

Keywords: Copaiba oil. Pulp capping materials. Human dental pulp stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 Fotomicrografia de fase de células PDH3 após a incubação com o MTT exibindo cristais de formazan antes de sua solubilização para a leitura do teste de MTT (setas; aumento original 100X).....41
- Figura 4.2 Fotomicrografia de fase de células PDH3 após a realização do teste de Vermelho de Alizarina (ARS) mostrando em vermelho a marcação de nódulos de mineralização (aumento original 100X).45
- Figura 4.3 Desenho esquemático da análise de migração celular. **(A)**: confluência da monocamada de células na placa de cultivo tipo Petri 60 mm. **(B)**: método *Scratch*, fazendo a ferida com a ponta da pipeta p200. **(C)**: área de análise. **(D)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida no tempo zero. **(E)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida após migração de células para área definida.....51
- Tabela 4.1 Divisão dos grupos experimentais de acordo com o biomaterial e o meio de cultura utilizado para os ensaios de proliferação e migração celular.....40
- Tabela 4.2 Divisão dos grupos experimentais de acordo com o biomaterial e o meio de cultura utilizado para os ensaios de diferenciação celular.....43
- Tabela 4.3 Genes alvos utilizados para amplificação por qRT-PCR, de acordo com o número de acesso no *GenBank*, a sequência dos *primers* e o tamanho do produto.....49
- Figura 5.1 Fotomicrografia de fase das culturas celulares dos grupos experimentais tratadas pelo ensaio de Vermelho de Alizarina em 21 dias de experimento. Detecção de nódulos de cálcio marcados em vermelho.....56
- Figura 5.2 Representação do qRT-PCR para expressão do gene *BGLAP* (osteocalcina). **(A)** amplificação do gene *BGLAP* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.....57
- Figura 5.3 Representação do qRT-PCR para expressão do gene *DSPP* (sialofosfoproteína dentinária) **(A)** amplificação do gene *DSPP* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados

para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.....59

Figura 5.4 Representação do qRT-PCR para expressão do gene *DMP1* (proteína da matriz dentinária 1). Sem formação da curva exponencial, o que caracteriza a não amplificação do gene *DMP1* para todos os grupos experimentais.....60

Figura 5.5 Representação do qRT-PCR para expressão do gene *HSP-27* (*heat shock protein 27*) **(A)** amplificação do gene *HSP-27* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.....61

Figura 5.6 Representação do qRT-PCR para expressão do gene *GAPDH* (gene constitutivo) **(A)** amplificação do gene *GAPDH* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.....63

Figura 5.7 Representação gráfica dos índices de migração celular (número de células /área da ferida) de todos os grupos experimentais. A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados: **(A)** em 12 horas, **(B)** em 24 horas e **(C)** em 48 horas.

*Não houve migração.

**Significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$).

Barra significa desvio padrão da média.....65

Figura 5.8 Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do Grupo Controle e do Grupo COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas.....66

Figura 5.9 Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do Grupo HCa e do Grupo HCa+COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas.....67

Figura 5.10 Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do Grupo MTA e do Grupo MTA+COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas. A seta aponta para presença de granulações birrefringentes.....68

Gráfico 5.1 Representação gráfica do crescimento celular dos grupos experimentais

* número de células viáveis significativamente menor que os demais grupos experimentais
 Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas em 72 horas na comparação entre os grupos experimentais ($p < 0,01$)
 Barra significa desvio padrão da média.....53

Gráfico 5.2 Representação gráfica dos valores da média de atividade de ALP em todos os grupos experimentais. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$)
 Barra significa desvio padrão da média.....54

Gráfico 5.3 Representação gráfica dos resultados de formação de nódulos mineralizados mostrando da média das absorbâncias dos grupos experimentais em 21 dias.
 Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas.
 Barra significa desvio padrão da média.....55

Gráfico 5.4 Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *BGLAP* (osteocalcina) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais.....58

Gráfico 5.5 Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *DSPP* (sialofosfoproteína dentinária) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais.
 * Não houve expressão gênica.
 Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).
 Barra significa desvio padrão da média.....59

Gráfico 5.6 Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *HSP-27* (*heat shock protein 27*) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais
 Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$)
 Barra significa desvio padrão da média.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	<i>alkaline phosphatase</i> , em português: fosfatase alcalina
ARS	<i>alizarin red Staining</i> , – em português: coloração vermelho de alizarina
BGLAP	<i>bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein</i> , conhecida em português como osteocalcina
cDNA	complementar deoxyribonucleic acid, em português ácido desoxirribonucleico complementar
COP	sigla para denominar o óleo-resina de copaíba
DMEM/Ham's F-12	meio de Eagle modificado por Dulbecco/Ham's F-12
DMP1	<i>dentin matrix protein1</i> , em português: proteína da matriz de dentina 1
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid, em português ácido desoxirribonucleico
DPP	<i>dentin phosphoprotein</i> , em português fosfoproteína dentinária
DSP	<i>dentin sialoprotein</i> , em português: fosfoproteína dentinária
DSPP	<i>dentin sialophosphoprotein</i> , em português fosfosialoproteína dentinária
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , em português desidrogenase de gliceroaldeído 3 fosfato
HCa	sigla para hidróxido de cálcio PA

hDPSCs	<i>human dental pulp stem cells</i> , em português: células-tronco polpa dentária humana
HSP-27	<i>heat-shock protein-27</i> , em português <i>proteína</i> de choque térmico-27
MTA	<i>mineral trioxide aggregate</i> , em português: agregado de trióxido mineral
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), em português: 3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	phosphate buffered saline, em português solução tampão fosfato-salina
PBSA	phosphate buffered saline <i>without calcium and magnesium</i> , em português solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> , em português: reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	<i>quantitative reverse trascriptase-polimerase chain reaction</i> , em português: reação quantitativa da transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , em português: ácido ribonucléico
SFB	soro fetal bovino
SHEDs	<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> , em português: células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 REAÇÃO DO COMPLEXO DENTINA-POLPA	23
2.2 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO	27
2.2.1 Hidróxido de Cálcio (HCa)	28
2.2.2 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)	30
2.3 ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA (COP)	32
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CULTIVO CELULAR	37
4.2 PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS	38
4.3 CONDICIONAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO	39
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR	41
4.6 DIFERENCIAÇÃO CELULAR	42
4.6.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)	44
4.6.2 Formação de nódulos de mineralização	45
4.6.3 Expressão gênica	46
4.6.3.1 Isolamento do RNA	47
4.6.3.2 Síntese do DNA Complementar (cDNA)	48
4.6.3.3 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	48
4.7 MIGRAÇÃO CELULAR	50
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da Odontologia Contemporânea é como restaurar o tecido dental perdido sem comprometer a vitalidade do dente (Petrovic e Stefanovic, 2009). Para tanto, o conhecimento integral das propriedades, estruturas e função do complexo dentina-polpa, é necessário para compreensão biológica que é de relevância para a tomada de decisões clínicas para garantir a longevidade das restaurações (Mjör, 2002; Mjör; Ferrari, 2002).

Baseado nesta compreensão foi desenvolvido o capeamento pulpar direto, técnica que consiste na aplicação de um agente de proteção diretamente sobre a polpa dentária exposta a fim de manter a vitalidade pulpar. Esta técnica, portanto se caracteriza como uma terapia regenerativa (American Association of Endodontics, 2012; Aguilar; Linsuwanont; 2011).

Sabendo-se que no processo de reparo da polpa exposta, onde os odontoblastos primários foram perdidos devendo ser substituídos por células odontoblasto-símile, o sucesso do capeamento pulpar depende da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco da polpa dentária (Harada et al., 2008; Güven et al., 2011).

O material para o capeamento direto deve ter a capacidade de controlar a infecção e a inflamação, apresentar adesividade à dentina para evitar infiltração, ser de fácil manipulação, promover a formação de tecido dentinário e ser biocompatível e bioestimulador, isto é, ser capaz de modular a resposta do tecido pulpar à agressão (Modena et al., 2009; Komabayashi; Zhu, 2010; Ferracane et al., 2010).

Os materiais utilizados para capeamento pulpar direto são principalmente aqueles à base de hidróxido de cálcio (HCa). Por suas características bioestimuladoras e de biocompatibilidade, outro material que poderia ser aplicado no capeamento pulpar direto é o agregado de trióxido mineral (MTA). Tanto o HCa quanto o MTA são materiais que apresentam

capacidade de induzir mineralização, formar barreira de tecido mineralizado e inibir crescimento bacteriano por sua alcalinidade (Olsson et al., 2006; Accorinte et al., 2008; Mohammadi; Dummer, 2011; Bakland; Andreasen, 2012). O MTA, além dessas propriedades, apresenta outras vantagens que são boa capacidade seladora, o que dificulta a infiltração marginal, baixa solubilidade e radiopacidade satisfatória (Parirokh; Torabinejad, 2010a; Torabinejad; Parirokh, 2010). Por outro lado, tanto o HCa como o MTA apresentam desvantagens. O HCa induz a formação de barreira de tecido mineralizada de pouca qualidade, com descontinuidade e longo tempo de formação, além de exibir baixa resistência biomecânica e alta solubilidade em água (Damaschke et al., 2010; Mohammadi; Dummer, 2011). O MTA apresenta como desvantagem longo tempo de presa e principalmente a dificuldade de manipulação (Parirokh; Torabinejad, 2010a; Torabinejad; Parirokh, 2010).

O óleo-resina de copaíba (COP) tem sido usado durante muitos anos pela população amazônica devido às suas propriedades medicinais, anti-inflamatória, cicatrizante, potencial antiséptico e analgésico (Veiga Junior; Pinto, 2002; Veiga Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012). Portanto, ele poderia ser um material indicado para capeamento pulpar, uma vez que o fator anti-inflamatório em polpa exposta limita a resposta inflamatória, acelera a regeneração do tecido, o que conduz à deposição de dentina mineralizada de qualidade fisiológica (Komabayashi; Zhu, 2010).

Diante do exposto, tendo em vista a constante busca pelo material de capeamento pulpar mais apropriado, capaz de promover uma terapia regenerativa da polpa dentária exposta, há que se estudar o efeito de materiais que apresentem características que poderiam favorecer processos envolvidos na regeneração tecidual tais como proliferação, diferenciação e migração de células-tronco da polpa dentária humana. Neste sentido, há que se testar o efeito de materiais que associados possam somar ou potencializar características físicas, químicas e biológicas que promovam esta regeneração tecidual. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi o de investigar o efeito de um potencial material para capeamento pulpar, o óleo-resina de copaíba, tanto quando aplicado de forma isolada, quanto quando aplicado associado ao HCa

ou ao MTA. Devido às propriedades físicas e biológicas do óleo-resina de copaíba, acreditamos que este possa compensar algumas das características desvantajosas dos demais materiais investigados neste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REAÇÃO DO COMPLEXO DENTINA-POLPA

As reações do complexo dentina-polpa aos materiais restauradores tem sido amplamente investigadas pela odontologia restauradora. Os procedimentos restauradores repercutem sobre este complexo, em especial quando lesões cavitadas são tratadas com materiais adesivos aplicados sobre dentina desmineralizada, o que pode acabar por expor o tecido pulpar a materiais nocivos. Além disso, preparos cavitários ou mesmo as lesões de cárie podem causar exposições pulpares, podendo comprometer a longevidade do tratamento restaurador (Mjör, 2002; Mjör; Ferrari, 2002).

O complexo dentina-polpa é uma unidade biológica constituída de tecido dentinário e tecido pulpar, que mantêm íntima relação estrutural, embriológica e funcional. Este fato faz com que a dentina e a polpa não sejam consideradas como estruturas isoladas. Pelo contrário, as repercussões e mecanismos de resposta tecidual integradas fazem com que estes tecidos mantenham íntima relação ao longo de toda vida do órgão dental (Pashley, 1996; Goldberg et al., 2011; Cohenca et al., 2013)

A polpa dentária tem como função essencial formar dentina, através de odontoblastos que depositam matriz de colágeno, em uma sequência de deposição e mineralização. Mesmo após a formação inicial, a polpa continua produzindo fisiologicamente dentina. Este é um processo contínuo, enquanto a polpa é biologicamente ativa (Pashley, 1996; Goldberg et al., 2011).

A dentina protege a polpa das agressões do meio externo ao revestí-la com tecido duro, mineralizado. Quando essa dentina é agredida física e/ou quimicamente, a polpa responde a diferentes estímulos buscando diminuir a permeabilidade dentinária pela formação de dentina esclerosada. Diante de estímulos mais agressivos a dentina terciária pode ser formada, desde que

esses estímulos não excedam a capacidade de reparo da polpa (Pashley, 1996; Smith et al., 2012; Huang, 2011).

As injúrias ao complexo dentina-polpa podem ser por procedimentos restauradores, como preparos cavitários, materiais aplicados sobre a dentina, lesões de cárie; as respostas do complexo-dentina polpa são dependentes do tipo de injúria. Quando a injúria é de pequena extensão e baixa intensidade, não havendo perda de odontoblastos primários, uma camada de dentina terciária reacional é formada denominada dentinogênese reacional. Quando ocorre uma injúria de grande extensão e alta intensidade havendo exposições pulpares, a camada odontoblástica subjacente à lesão é destruída e o complexo dentina-polpa aciona a proliferação, diferenciação e migração de células secretoras e estimuladoras da dentinogênese reparativa (Sloan; Smith, 2007; Tziafas; Kodonas, 2010).

A dentinogênese reparativa é a secreção de dentina terciária após a morte dos odontoblastos primários subjacente à lesão e que induz a diferenciação de células-tronco da polpa dental em células odontoblasto-símile ou osteoblasto. Isso ocorre em condições patológicas e o principal objetivo é formar barreira de tecido mineralizado para proteger a polpa (Smith et al., 2012).

As células-tronco da polpa dental são células multipotentes que apresentam duas propriedades funcionais principais: a auto-renovação e a capacidade de manter a celularidade do tecido e originar diferente(s) célula(s) desse tecido, implicando a capacidade de diferenciação (Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Rodríguez-Lozano et al., 2012). Estas células tem capacidade de diferenciação em células odontoblasto-símile (Cordeiro et al., 2008; Casagrande et al., 2010; Tziafas; Kodonas, 2010; Hara et al., 2011) que consequentemente promovem o reparo do tecido dental, quando necessário (Sloan; Smith, 2007; Petrovic; Stefanovic, 2009).

Células-tronco foram isoladas a partir da polpa dental humana de dente adulto (hDPSCs do inglês *human dental pulp stem cells*) e de dente decíduo esfoliado (SHEDs do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*).

Marcadores tais como STRO-1, CD146, CD90 e CD105 (marcadores mesenquimais), Nestin (marcador neural), Oct 3-4 e Nanog (marcadores embrionários), são marcadores positivos, enquanto CD31, CD34 e CD45 (marcadores hematopoiéticos) são marcadores negativos; na identificação, isolamento e caracterização das células-tronco. O STRO-1 e o CD146 foram os primeiros marcadores de células-tronco mesenquimais encontrados (Petrovic; Stefanovic, 2009; Ulmer et al., 2010; Huang et al., 2011).

A polpa dentária contém numerosos tipos celulares responsáveis pela defesa e reparo do tecido pulpar, que incluem os fibroblastos, odontoblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, mastócitos e células-tronco mesenquimais. Durante o processo de reparo células-tronco presentes na polpa dental diferenciam-se em células odontoblasto-símile. Os odontoblastos são particularmente importantes por serem responsáveis pela dentinogênese durante o desenvolvimento e ao longo da vida do dente. Sintetizam principalmente colágeno tipo I, colágeno tipo V e macromoléculas não colagenosas como: sialofosfoproteína dentinária (DSPP, do inglês *dentin sialophosphoprotein*), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1, do inglês *dentin matrix protein 1*), osteocalcina (BGLAP do inglês *bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*), fosfatase alcalina (ALP do inglês *alkaline phosphatase*), proteoglicanas e glicoproteínas; todos componentes da matriz orgânica dentinária que subsequentemente mineralizam e formam tecido reparativo (Petrovic; Stefanovic, 2009; Goldberg et al., 2011; Suzuki et al., 2012).

O colágeno é o principal componente orgânico da dentina e sua presença desencadeia a formação de tecido mineralizado (Mizuno et al., 2003). As proteínas DSPP e DMP-1 são reguladoras positivas para mineralização de tecido com a DSPP agindo sobre dentina e a DMP-1 agindo sobre osso e dentina (Suzuki et al., 2012). A osteocalcina (BGLAP) é secretada por osteoblasto e é responsável pela mineralização óssea e homeostase de íons cálcio. A fosfatase alcalina está relacionada com a formação de osso nos processos de mineralização, enriquece o meio com fosfato inorgânico e viabiliza a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (Goldberg et al., 2011).

O processo de reparo é induzido com o início do processo inflamatório gerado durante a injúria pulpar. O equilíbrio entre o processo inflamatório e o processo reparo deve acontecer e resultam em sinergismo. Caso contrário, se houver intensa resposta inflamatória, os efeitos sobre o tecido pulpar serão deletérios e dificultarão o processo de reparo podendo provocar morte celular. No caso de infecção ao tecido pulpar, por cárie, por exemplo, há necessidade do equilíbrio entre os processos de infecção/inflamatório e o processo de reparo a fim de favorecer a recuperação do tecido pulpar (Goldberg et al., 2008; Komabayashi; Zhu, 2010; Cooper et al., 2010).

O sucesso da dentinogênese reparativa é garantido pela restauração da integridade morfofuncional do complexo dentina-polpa, com rápida formação de tecido dentinário na área da lesão e com o mínimo de resposta inflamatória. Para isso, a proteção do complexo dentina-polpa é realizada pela aplicação de uma ou mais camadas de material específico entre o material restaurador e o tecido dentário para evitar desafio adicional para o tecido da polpa causada pelo procedimento operatório, pela toxicidade dos materiais restauradores e pela penetração de bactérias devido à infiltração (Téclès et al., 2005; Chogle et al., 2012; Cohenca et al., 2013).

Pesquisas estão sendo realizadas para a compreensão de como os materiais realmente podem contribuir para favorecer os processos regenerativos no dente, ou seja, compreender a interação do material e os mecanismos celulares e moleculares de proliferação, de diferenciação e de migração de células-tronco de polpa dental (Ji et al., 2010; Güven et al., 2011; Seo et al., 2013). Para isso, tem-se avaliado a capacidade dos materiais de proteção pulpar em recrutar células-tronco de polpa dental através dos métodos de proliferação e migração celular (D'Antò et al., 2010; Varalakshmi et al., 2013). A diferenciação celular em células odontoblasto-símile tem sido analisada através da expressão de genes formadores da matriz dentinária, como por exemplo, *DSPP*, *DMP-1* e *BGLAP* (Mizuno et al., 2003; Huang et al., 2011; Woo et al., 2013) e por genes marcadores de diferenciação odontoblástica-símile como o *HSP* (do inglês *heat short protein*) (Ohshima et al., 2001; Ohshima et al., 2003; Nakakura-Ohshima et al., 2003; Nakasone et

al., 2006; Harada et al., 2008) e o quanto de mineralização foi formada pela ação dos materiais através da atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização (Zhang et al., 2013; Woo et al., 2013).

2.2 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO

O capeamento pulpar direto é o procedimento mais antigo da odontologia regenerativa (Smith et al., 2012). Consiste na aplicação de um agente de proteção diretamente sobre a polpa dentária exposta a fim de facilitar a formação de dentina reparadora e manter a vitalidade pulpar (Aguilar; Linsuwanont; 2011; American Association of Endodontics, 2012). Segundo a American Association of Endodontics (2012) a endodontia regenerativa é um procedimento biológico destinado a substituir fisiologicamente estruturas dentárias danificadas, incluindo a dentina e as estruturas de raiz, bem como as células do complexo dentina-polpa.

Os capeadores pulpares, materiais odontológicos utilizados na proteção do complexo dentina-polpa, devem reparar a polpa, sem causar danos às células e a matriz extracelular, mantendo assim o tecido conjuntivo especializado da polpa com características de normalidade e adequada reparação e formação de tecido dentinário (Pashley, 1996; Tjäderhane, 2002).

O material para capeamento pulpar direto deve ter a capacidade de controlar a infecção e a inflamação, ter adesividade à dentina para evitar infiltração, ser de fácil manipulação, biocompatível e promover a formação do tecido dentinário (Modena et al., 2009; Komabayashi; Zhu, 2010; Ferracane et al., 2010).

A avaliação do sucesso de diferentes materiais de capeamento pulpar direto tem sido através da análise da biocompatibilidade do material (Cavalcanti et al., 2005; Kuratate et al., 2008), da morfologia da barreira de tecido formado (Accorinte et al., 2008; Tabarsi et al., 2010), da intensidade da inflamação

pulpar (Lima et al., 2011; Cavalcanti et al., 2011) e da presença de células odontoblásticas-símile (Peng et al., 2011; Tran et al., 2012). As pesquisas mais recentes estão voltadas às respostas celulares específicas como: proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dental e, em particular, na compreensão de como os próprios materiais podem realmente contribuir para o processo regenerativo dos tecidos dentais (Ferracane et al., 2010; Ji et al., 2010; D'Antò et al., 2010; Paranjpe et al., 2011; Seo et al., 2013).

Conhecer o potencial do material em modular a resposta do tecido, mostra-se importante e dentre os materiais de capeamento pulpar direto utilizados estão o hidróxido de cálcio (HCa) e mais recentemente, o agregado de trióxido mineral (MTA) (Bakland; Andreasen, 2012).

2.2.1 Hidróxido de cálcio (HCa)

O HCa é um dos materiais mais estudados, desde 1920 por Hermann, e é amplamente utilizado como capeador pulpar direto e, por esta razão, é utilizado como padrão-ouro em comparação a novos materiais testados (Hilton, 2009; Mohammadi; Dummer, 2011).

Quimicamente, o HCa é uma base forte com um pH de aproximadamente 12,5 a 12,8; cuja ação principal do material é a dissociação iônica dos íons cálcio (Ca^{2+}) e hidroxila (OH^-), o que garante a propriedade de alcalinidade. O pH elevado ainda confere atividade antibacteriana, além de ajudar a manter o estado de alcalinidade do tecido pulpar exposto. Todas essas propriedades do material são importantes para a formação tecidual (Holland et al., 1979; Farhad; Mohammadi, 2005; Mohammadi; Dummer, 2011).

O HCa em contato com o tecido pulpar exposto induz a formação de uma zona de necrose por coagulação, que é saturada pelos íons cálcio, e assim parece estimular a formação de uma barreira de tecido mineralizado (Farhad; Mohammadi, 2005; Mohammadi; Dummer, 2011). Esses dados se confirmam por Tabarsi et al. (2010) que analisaram *in vivo* a resposta pulpar em cães e ainda observaram uma considerável inflamação pulpar.

A barreira de tecido mineralizada formada apresenta pouca qualidade, com descontinuidade e longo tempo de formação, o que propicia invasão bacteriana e complicações na reparação tecidual (Holland et al., 1979; Olsson et al., 2006; Accorinte et al., 2008; Nair et al., 2008; Bakland; Andreasen, 2012). No entanto, estudo clínico retrospectivo randomizado de Willershausen et al. (2011) sobre capeamento pulpar direto com HCa relataram que é uma terapia de sucesso quando a indicação e o tipo de material restaurador são empregados corretamente, mas observaram declínio na taxa de sucesso ao longo dos anos.

Nos estudos de Tran et al. (2012) ao avaliarem reparação do tecido pulpar injuriado de camundongos pelo uso do HCa confirmaram a pouca qualidade da barreira de tecido mineralizado formada, mas notaram a capacidade de proliferação de células pulpares, bem como positividade para marcadores odontogênicos DSP e osteopontina na barreira de tecido mineralizado formada.

Peng et al. (2011) investigaram *in vitro* o efeito do HCa na proliferação e na diferenciação de células-tronco de polpa dentária humana. A proliferação foi avaliada pelo ensaio de MTT e a diferenciação pelo ensaio qRT-PCR para genes marcadores odontogênicos *DSPP*, *DMP-1*, osteocalcina, *ALP* e colágeno tipo 1, além de avaliarem a atividade de ALP, mineralização pelo método do Vermelho de Alizarina e imunocitoquímica para DSP. Os resultados apontaram capacidade de proliferação celular, aumento da expressão gênica para os marcadores odontogênicos *DSPP*, *DMP-1* e osteocalcina, atividade para ALP, além da grande formação de nódulos de mineralização e imunocitoquímica positiva para DSP.

Em estudos *in vivo*, Ji et al. (2010) expuseram polpa dental de cães e realizaram o capeamento pulpar com HCa e outro grupo com a combinação de HCa e células-tronco da polpa dental autóloga. Para compreender a regeneração tecidual dentinária avaliaram a proliferação, a diferenciação e a migração de células-tronco de polpa dental. Observaram para ambos os grupos capacidade proliferativa e migratória das células, formação de nódulos de mineralização, além da expressão de DSP. Histologicamente identificaram no mesmo tempo experimental grande área de necrose com células inflamatórias

no grupo com HCa apenas, enquanto que o grupo com HCa e células-tronco autógenas apresentaram área regenerativa calcificada e diferenciada em dentina-símile.

De fato, estes estudos de Ji et al. (2010), Peng et al. (2011) e Tran et al. (2012) talvez sejam um início da compreensão da atividade dentinogênica do HCa no processo de regeneração tecidual. Por outro lado, o HCa é um material que apresenta desvantagem biomecânica por exibir baixa resistência e alta solubilidade em água; o que leva a degradação de sua interface no decorrer de alguns anos após sua aplicação (Damaschke et al., 2010).

2.2.2 Agregado de trióxido mineral (MTA)

O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda nos Estados Unidos da América, e introduzido pela primeira vez por Torabinejad, em 1993, como material para cirurgia endodôntica com o principal objetivo de selar as áreas de comunicação do interior do dente com o exterior. Hoje é indicado em muitas situações clínicas como, por exemplo, capeamento pulpar direto (Parirokh; Torabinejad, 2010b) devido ao fato das reações teciduais serem bastante favoráveis indicando uma ação bioestimuladora deste material (Torabinejad; Parirokh, 2010; Parirokh; Torabinejad, 2010b).

Quimicamente o MTA é formado principalmente por sílica e cálcio e seu mecanismo de ação química é semelhante ao do HCa (Holland et al., 1999). Adicionalmente, o MTA tem boa capacidade seladora, o que dificulta a infiltração marginal, tem baixa solubilidade e radiopacidade satisfatória (Roberts et al., 2008; Parirokh; Torabinejad, 2010a; Torabinejad; Parirokh, 2010; Parirokh; Torabinejad, 2010b; Dammaschke et al., 2010; Khoury, 2011).

Pesquisas tem demonstrado que o tecido pulpar responde favoravelmente ao MTA, depositando barreira completa de tecido mineralizado em um menor tempo de formação comparado ao HCa, sinal mínimo de inflamação e mantém a polpa remanescente com características de normalidade. O índice de sucesso de terapias pulpares com o MTA tem sido

superior às técnicas utilizando materiais à base de HCa (Holland et al., 1999; Modena et al., 2009; Tabarsi et al., 2010; Eskandarizadeh et al., 2011; Danesh et al., 2012; Tran et al., 2012). Porém, ainda é um material de longo tempo de presa, dificuldade de manipulação, alto custo, e com um número relativamente pequeno de estudos clínicos, motivos que provavelmente ainda favoreçam o grande uso do HCa (Torabinejad; Parirokh, 2010; Parirokh; Torabinejad, 2010b).

Mente et al. (2010), ao compararem os resultados de tratamentos clínicos com o uso do MTA e do HCa em capeamento pulpar direto, observaram que o MTA foi mais efetivo por manter a vitalidade pulpar por mais tempo, sendo que os dentes foram restaurados imediatamente e definitivamente após o capeamento. Nair et al. (2008) ressaltaram com base em seus resultados de um estudo clínico randomizado, que o MTA deve ser considerado o mais novo padrão-ouro para tratamento de capeamento pulpar.

Kuratate et al. (2008) investigaram o processo reparativo de polpas expostas de camundongos e protegidas com MTA através de análises histológica e imunohistoquímica para detecção de osteopontina. No local da exposição foram observados nos primeiros dias presença de camada de necrose fina e poucas células inflamatórias e ao sétimo dia uma camada de formação de barreira dentinária fina e com imunoreatividade para osteopontina.

Estudos recentes tem apontado grande atividade dentinogênica do MTA. D'Antò et al. (2010) ao avaliaram o efeito do MTA na proliferação e migração de células-tronco mesenquimais da medula óssea, confirmaram que o material de fato permite proliferação e migração de células progenitoras. Esses resultados são respostas celulares úteis para o processo de regeneração tecidual. Lee et al. (2010) já mostraram a capacidade do MTA em proliferar células pulpares humanas indiferenciadas, bem como a de induzir sua diferenciação em células odontoblasto-símile pela expressão gênica dos marcadores odontogênicos *DSPP* e *DMP-1* desde o primeiro dia de contato do MTA com as células, além de causar grande atividade de ALP.

De fato, os estudos confirmam que o MTA é um material que em contato com células-tronco de polpa dental mostram capacidade em estimular a

proliferação pela biocompatibilidade do material; induz a diferenciação ósteo/odontogênica pela atividade da ALP, pela formação de nódulos de mineralização e pela expressão de genes importantes como osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo 1, *DSPP*, *DSP*, *DMP-1*, *ALP*, que conferem atividade dentinogênica do MTA, além de permitir a migração das células progenitoras à área injuriada (Paranjpe et al., 2011; Güven et al., 2011; Zhao et al., 2012; Güven et al., 2013; Seo et al., 2013; Varalakshmi et al., 2013; Zhang et al., 2013; Woo et al., 2013). Além disso, também tem sido apontado pelos estudos que a presença dos íons cálcio sobre células-tronco de polpa dental tem papel importante na diferenciação ósteo/odontoblástica (An et al., 2012; Woo et al., 2013).

Nesse aspecto, o conhecimento dos potenciais efeitos benéficos da interação dos materiais de capeamento pulpar direto com o complexo dentina-polpa contribui para melhores resultados dos processos regenerativos do tecido dental (Ferracane et al., 2010).

Considerando a regeneração pulpar, busca-se materiais que apresentem potencial dentinogênico, como HCa e MTA, bem como tenham a capacidade de modular a resposta inflamatória, como o óleo-resina de copaíba (COP).

2.3 ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA (COP)

Na região Amazônica, principalmente nos estados brasileiros do Pará e do Amazonas, há uma planta medicinal de vasto uso popular que é a copaíba. A origem do nome copaíba parece vir do tupi “cupa-yba”, a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que guarda em seu interior (Veiga Junior; Pinto, 2002).

O COP é um óleo-resina, produto exsudato, originário da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (Alencar, 1982; Maciel et al., 2002; Veiga Junior; Pinto, 2005). É uma substância natural obtida de perfuração no tronco da árvore do gênero *Copaifera* e pertencente à família *Leguminosae-Caesalpinaceae*.

Popularmente é conhecida como copaibeira ou pau d'óleo e apresenta uma variedade de espécies dentre as que se destacam na Amazônia são: *C. officinalis* L., *C. reticulada* Ducke e *C. multijuga* Hayne (Veiga Junior; Pinto, 2002; Pieri et al., 2009).

A designação correta para o óleo de copaíba é a de óleo-resina de copaíba (COP), por ser um exsudato composto de uma parte sólida, resinosa não volátil, formada por ácidos diterpênicos (46,9%) e a outra parte formada por óleo essencial composto de hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos (53%) (Veiga Junior; Pinto, 2002; Veiga Junior et al., 2007; Custódio; Veiga Junior, 2012). Esses compostos são potencialmente importantes como fonte de princípios ativos em farmacologia, tendo como principal atividade efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes e potencial antiséptico e analgésico (Veiga Junior; Pinto, 2002; Veiga Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012).

O COP tem sido tradicionalmente usado como cicatrizante e agente antiinflamatório na medicina popular brasileira. Existem hoje descritas algumas dezenas de propriedades medicinais diferentes, que vem sendo em alguns casos comprovadas cientificamente e pela etnofarmacologia¹ como atividade antimicrobiana (Santos et al., 2008; Leandro et al., 2012), anti-inflamatória (Veiga Junior et al., 2007; Viriato et al., 2009; Leandro et al., 2012), antineoplásica (Lima et al., 2003; Pedreira, 2007; Leandro et al., 2012) e antinociceptiva (Gomes et al., 2007; Leandro et al., 2012), entre outras (Guimarães-Santos et al., 2012; Leandro et al., 2012).

Uma das áreas que tem pesquisado a utilização do COP é a Odontologia. Estudos tem apontado grande potencial do COP como agente antimicrobiano, antineoplásico e antiinflamatório.

Bandeira et al. (1999a) avaliaram a atividade antibacteriana contra a bactéria cariogênica *Streptococcus mutans*, de pastas à base de HCa e óleo essencial de copaíba, HCa e resina de copaíba, óxido de zinco e óleo essencial de copaíba, óxido de zinco e resina de copaíba. Os resultados apontaram

¹ Etnofarmacologia é a ciência que estuda o conhecimento popular sobre fármacos, de determinado grupo étnico ou social, relacionado a sistemas tradicionais de medicina. O método etnofarmacológico investiga as possibilidades e hipóteses referentes aos conhecimentos tradicionais, buscando empiricamente o que provoca os efeitos dos "fármacos tradicionais". Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Etnofarmacologia> acesso 08.08.2013.

atividade antibacteriana para todas as pastas experimentais. O óleo essencial de copaíba isolado mostrou melhor atividade antibacteriana que a resina de copaíba isolada.

Vasconcelos et al. (2008) utilizaram o COP em substituição ao eugenol formulado com óxido de zinco e HCa, cimento com indicação para tratamento restaurador atraumático, e mostraram efeito antimicrobiano do cimento frente aos microorganismos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Costa et al. (1996) avaliaram a biocompatibilidade dos cimentos óxido de zinco e COP; e óxido de zinco e eugenol em subcutâneo de camundongo. Ambos os grupos apresentaram presença de células inflamatórias, necrose e degradação de fibras colágenas, porém o cimento com o COP foi menos irritante.

Pieri et al. (2010, 2012), avaliaram a aderência de bactérias formadoras de biofilme dental, como o *Streptococcus mutans*, em testes *in vitro* e *in vivo* e mostraram superioridade do COP comparado com a clorexidina na terapia antimicrobiana oral.

Nos estudos de Souza et al. (2011a) mostraram que o composto diperteno, especificamente o ácido copálico, presente na composição do COP apresenta efeito bacteriostático para bactérias cariogênicas nas primeiras 12 horas e efeito bactericida entre 12 e 24 horas. Souza et al. (2011b) apresentaram esse mesmo efeito para bactérias anaeróbias da doença periodontal. O que mostra potencial no desenvolvimento de novos produtos para saúde oral à base de COP.

Por outro lado, existe a preocupação de avaliar novos materiais quanto às propriedades físico-químicas. Rosa et al. (2010) avaliaram as alterações dimensionais e a solubidade de um novo cimento endodôntico, o Biosealer, à base de óxido de zinco, HCa, bismuto, subcarbonato de resina natural, bórax e COP e que não atendeu as especificações da ADA (*American Dental Association*). No entanto, nos estudos de Garrido et al. (2010) com o mesmo cimento foram apresentados resultados satisfatórios dos testes físico-químicos requeridos pela ADA. Assim sendo dados da literatura tem indicado resultados controversos quanto às propriedades físico-químicas deste cimento.

Outro achado do uso do COP na Odontologia foi o efeito inibidor tumoral em teste *in vivo*. Neoplasia foi induzida na mucosa bucal de hamster e o óleo-resina de copaíba foi aplicado. Reduções macro- e microscópica das lesões foram observadas (Pedreira, 2007).

A propriedade antiinflamatória do COP foi avaliada por Garcia et al. (2011) em teste *in vivo* no tecido subcutâneo de camundongo. A biocompatibilidade de dois novos cimentos endodônticos, ambos à base de HCa e própolis, porém um com COP e o outro apenas com a porção líquida do COP foram testados. Os resultados foram satisfatórios quanto à reação do tecido para ambos os cimentos, porém o cimento que melhor modulou a resposta inflamatória em 7 e 21 dias foi aquele à base de COP. Em 42 dias as respostas foram similares para os dois cimentos.

Lima et al. (2011) avaliaram *in vivo* reparação pulpar utilizando o COP em 24 horas, 15 e 30 dias após pulpotomia em molares de camundongo Wistar. O COP foi capaz de modular o processo inflamatório e em 15 dias foi observada presença de depósito de tecido mineralizado subjacente ao material protetor. Adicionalmente, Bandeira et al. (1999b) constataram *in vivo* que o COP potencializa as propriedades do HCa quanto à compatibilidade tecidual, bem como na indução da formação de tecido mineralizado.

De fato, a literatura aponta que o COP apresenta excelente propriedade farmacológica antiinflamatória e age regulando o excesso de inflamação patológica, o que leva a preservação tecidual e facilita o processo regenerativo (Veiga Junior et al., 2007; Viriato et al., 2009; Cooper et al., 2010; Guimarães-Santos et al., 2012; Leandro et al., 2012).

Assim, sabendo das características biológicas isoladas dos materiais hidróxido de cálcio (HCa), agregado de trióxido mineral (MTA) e óleo-resina de copaíba (COP) pressupõem-se que associados poderiam originar materiais mais apropriados para tratar polpa exposta como material de capeamento pulpar direto com capacidade de promover o potencial regenerativo das células pulpares, atuando nos processos de proliferação, diferenciação e migração de células-tronco da polpa dentária humana e resultando em regeneração tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar *in vitro* proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa de dente decíduo humano esfoliado (SHEDs) em resposta a substâncias liberadas por materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulpare, a saber: óleo-resina de copaíba (COP) isolado ou associado ao hidróxido de cálcio (HCa) ou ao agregado de trióxido mineral (MTA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP, cujo protocolo 106/11 CAAE 0116.0.017.000-11 (Anexo A), em razão de utilizar células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado humano (SHEDs), linhagem celular PDH3, isolada pela Profa. Dra. Sueli Patrícia Harumi Miyagi Cara e caracterizada pela Profa. Dra. Leila Soares Ferreira (Ferreira et al., 2012) e mantida no banco de células do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOUSP. Seguindo o protocolo do laboratório foi realizada a recaracterização das células-troncos antes de se iniciar os experimentos deste trabalho, a fim de checar a manutenção da natureza celular (Anexo B).

4.1 CULTIVO CELULAR

Alíquotas congeladas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) de linhagem de células PDH3 foram descongeladas em banho de água a 37°C por dois minutos. Essa suspensão de células foi diluída 10x em tubo de ensaio contendo meio de cultivo DMEM/Ham's F-12, (1:1, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Thermo Scientific, South Logan, Utah, EUA), 100U/ml de penicilina (Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100µg/ml de estreptomicina (Invitrogen/Gibco), 2mM de L-glutamina (Invitrogen/Gibco) e 2mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen/Gibco) (Kerkis et al., 2006). Após centrifugação dos tubos de ensaio a 300g por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os corpos de fundo foram ressuspensos em meio de cultura fresco e transferidos para frascos de cultivo celular de 25cm² de área cultivável. Foram incubados a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Estufa, Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific).

O subcultivo foi realizado quando as monocamadas de células atingiram a subconfluência, ou seja, quando cerca de 70% da área cultivável do frasco estava coberto por células. Para isso, 5ml do meio de cultura foi removido e reservado em tubo de centrifugação e a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução de PBS (1X, Tampão Salina-Fosfato pH 7,2; LGC Biotecnologia). Para a remoção da monocamada celular aderida ao fundo do frasco foi utilizada solução de tripsina a 0,25%, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1mM (Invitrogen/Gibco), por 3 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio de cultura contendo SFB reservado anteriormente, e as células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio de 15ml e centrifugadas a 300g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspenso em 1ml de meio de cultura fresco. Alíquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em frascos de 25cm², contendo 5ml de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares. Todos os experimentos foram realizados entre a quinta e nona passagem.

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

4.2 PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS

O óleo-resina de copaíba (COP) *in natura* foi obtido pelo método de exsudação artificial, através de orifícios feitos no tronco da árvore *Copaifera reticulata* Ducke, mantida no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária (Embrapa, Belém, PA, Brasil) sob o número 183939, seguindo as orientações internacionais sugeridas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O COP foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental da Universidade Federal do Pará – UFPA (Guimarães-Santos et al., 2012), sendo utilizado como óleo-resina extraído (Anexo C), de forma isolada e em associação ao hidróxido de cálcio PA (HCa) com o COP (HCa+COP) e ao agregado de trióxido mineral (MTA) com o COP (MTA+COP).

O HCa (hidróxido de cálcio PA, Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) foi preparado nas proporções de 1g de HCa para 960µl de água destilada estéril; e em associação com a COP nas proporções de 1g de HCa para 70µl de COP.

O MTA (agregado de trióxido mineral branco, Angelus, Londrina, PR, Brasil) foi preparado nas proporções de 1g de MTA para 760µl de água destilada estéril; e em associação com a COP nas proporções de 1g de MTA para 20µl de COP.

4.3 CONDICIONAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO

Os meios condicionados utilizados continham todas as substâncias liberadas pelo contato com o COP, bem como aquelas liberadas durante a presa do HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP (Freshney, 2010). Para produção dos meios condicionados, o meio de cultivo foi colocado em contato com os biomateriais experimentais, COP, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP, durante o período de 1 hora em estufa com atmosfera úmida e temperatura de 37°C. Os biomateriais, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP, foram colocados no fundo de tubos tipo Falcon e estes foram então preenchidos com meio de cultivo na proporção de 0,05g dos biomateriais para cada 1ml de meio. Para obter o meio condicionado do COP, o mesmo foi colocado no fundo do tubo e, a seguir, o tubo foi preenchido com meio de cultivo na proporção de 1µl do COP para cada 1ml de meio. Os meios condicionados foram esterilizados com filtro de 0,22µm.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do estudo foram estabelecidos seis grupos experimentais distribuídos da seguinte forma (Tabela 4.1):

Tabela 4.1 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com o biomaterial e o meio de cultura utilizado para os ensaios de proliferação e migração celular

Grupo experimental	Biomaterial	Tipo de meio de cultura
<i>Controle</i>	Controle (Condições ideais de cultivo)	Meio fresco
<i>COP</i>	Óleo-resina de copaíba (COP)	Meio condicionado por COP
<i>HCa</i>	Hidróxido de cálcio PA (HCa)	Meio condicionado por HCa
<i>HCa+COP</i>	Hidróxido de cálcio PA (HCa) e óleo-resina de copaíba (COP)	Meio condicionado por HCa e COP
<i>MTA</i>	Agregado de trióxido mineral branco (MTA)	Meio condicionado por MTA
<i>MTA+COP</i>	Agregado de trióxido mineral branco (MTA) e óleo-resina de copaíba (COP)	Meio condicionado por MTA e COP

4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os padrões de proliferação foram analisados com os dados de viabilidade celular obtidos em diferentes períodos através da utilização da análise da atividade mitocondrial das células submetidas ao teste de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, Invitrogen/Gibco). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. A solução de MTT foi preparada com 0,05g do pó de MTT dissolvido em 10ml de PBS (pH 7,2; LGC Biotecnologia). Para cada poço foi adicionado 20µl da solução de MTT e 180µl de meio fresco. A placa de cultivo foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, a placa foi levada para o microscópio invertido de fase para confirmar a formação dos cristais de formazan (Figura 4.1). Removida a solução de MTT, foi adicionado 200µl por poço da solução de DMSO (Sigma Aldrich) e tampão glicina na proporção de 4:1. O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado e então, sua concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro Synergy HT BioTeK® (BioTeK®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) com filtro de 562 nm.

Figura 4.1 – Fotomicrografia de fase de células PDH3 após a incubação com o MTT exibindo cristais de formazan antes de sua solubilização para a leitura do teste de MTT (setas; aumento original 100X)

Para a análise do crescimento celular através do teste de redução do MTT, as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e as culturas foram plaqueadas (2×10^3 células por poço) em 3 placas de cultivo de 48 poços com 6 réplicas por grupo experimental. Vinte quatro horas após o plaqueamento, os meios de cultura foram substituídos por meio fresco (Grupo Controle) ou pelos meios condicionados (Grupos: COP, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP) e o teste do MTT foi realizado nos tempos 24, 48 e 72 horas. Para a manutenção da viabilidade celular, a troca dos meios foi realizada a cada 2 dias. Com intuito de mimetizar a solubilidade do tecido pulpar, a substituição foi por meio fresco, sempre trocando apenas a metade da quantidade total do meio. Os dados de absorbância foram utilizados para a obtenção das curvas de crescimento e comparação entre os grupos.

4.6 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A indução do processo de diferenciação foi realizada por meio mineralizante composto por meio de cultivo DMEM-Baixa-Glucose (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen/Gibco), 100U/ml de penicilina (Invitrogen/Gibco), 100µg/ml de estreptomicina (Invitrogen/Gibco), 50µM de ácido ascórbico (Sigma Aldrich), 10mM de β-glicerofosfato (Sigma Aldrich) e 0,1µM de dexametasona (Sigma Aldrich). As células foram plaqueadas em subconfluência de 50% da área cultivável do poço e/ou placa de cultivo (Nascimento, 2013).

Para as análises de diferenciação celular foi acrescido um grupo experimental totalizando sete, distribuídos da seguinte forma (Tabela 4.2):

Tabela 4.2 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com o biomaterial e o meio de cultura utilizado para os ensaios de diferenciação celular

Grupo experimental	Biomaterial	Tipo de meio de cultura
<i>Controle +</i>	Controle positivo (Condições ideais para mineralização)	Meio mineralizante fresco
<i>Controle -</i>	Controle negativo (Condições ideais de cultivo convencional)	DMEM/Ham's F-12
<i>COP</i>	Óleo-resina de copaíba (COP)	Meio mineralizante condicionado por COP
<i>HCa</i>	Hidróxido de cálcio PA (HCa)	Meio mineralizante condicionado por HCa
<i>HCa+COP</i>	Hidróxido de cálcio PA (HCa) e óleo-resina de copaíba (COP)	Meio mineralizante condicionado por HCa e COP
<i>MTA</i>	Agregado de trióxido mineral branco (MTA)	Meio mineralizante condicionado por MTA
<i>MTA+COP</i>	Agregado de trióxido mineral branco (MTA) e óleo-resina de copaíba (COP)	Meio mineralizante condicionado por MTA e COP

Para manter a viabilidade celular e indução das células-tronco de polpa dentária humana derivadas de dente decíduo esfoliado (linhagem PDH3) a produzir matriz mineralizante, os ensaios de diferenciação foram submetidos a trocas de meios a cada 2 dias quando metade da quantidade total do meio foi substituída por meio mineralizante fresco, para os grupos experimentais, exceto o grupo controle negativo que recebeu trocas de meio convencional fresco.

Os padrões de diferenciação foram analisados pela atividade da fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz mineralizada por Vermelho de Alizarina (ARS do inglês alizarin red S) e expressão gênica pela quantificação em tempo real da cadeia de polimerase (qRT-PCR).

4.6.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina (ALPase) foi avaliada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato para todos os grupos experimentais. As células passaram por 5 ciclos de choque térmico alternando a temperatura entre 37°C por 15 minutos e -20°C por 20 minutos para lise celular, sendo o produto celular de análise. A medida da ALP foi realizada segundo as instruções do fabricante do kit comercial (Labtest Diagnostica AS, MG, Brasil). Em todos os poços de ensaio: branco, padrão e testes foram adicionados 10µl de substrato e 100µl de tampão. Apenas no poço padrão foi acrescentado 10µl da solução padrão. Os poços foram mantidos em banho-maria a 37°C, por 2 minutos. Em seguida, em cada poço teste, foram adicionados, 10µl do produto da lise celular de cada amostra-teste e mantidos a 37°C, por 10 minutos. Após esse período, 400µl de reagente de cor foram adicionados nos poços considerados como brancos, e nos padrão e testes. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP foi calculada a partir da solução padrão e os dados foram expressos em U/L de ALP.

Para análise de ALP as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e as culturas foram plaqueadas (5×10^3 células por poço) em placa de cultivo de 48 poços com 6 réplicas por grupo experimental. Vinte quatro horas após o plaqueamento, os meios de cultura foram substituídos por meio mineralizante fresco (Grupo Controle Positivo), ou pelos meios condicionados (Grupos: COP, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP) ou por meio convencional fresco (Grupo Controle Negativo) e o teste ALP foi realizado no tempo de 14 dias. Os dados de absorbância foram utilizados para a obtenção da atividade enzimática da ALP e comparação entre os grupos.

4.6.2 Formação de nódulos de mineralização

Culturas confluentes com 21 dias em placa de 48 poços foram submetidas ao ensaio de Vermelho de Alizarina (ARS), para detecção de possíveis nódulos mineralizados. O Vermelho de Alizarina cora áreas ricas em cálcio e é usado para visualizar precipitações de cálcio nas células (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Fotomicrografia de fase de células PDH3 após a realização do teste de Vermelho de Alizarina (ARS) mostrando em vermelho a marcação de nódulos de mineralização (aumento original 100X)

Os poços foram lavados com PBS (pH 7,2; LGC Biotecnologia) por 2 vezes, as células aderidas foram fixadas em etanol a 70% por 45 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram lavadas com água destilada por 2 vezes e deixadas para secar em temperatura ambiente. Os poços foram corados com 200µl de solução de Vermelho de Alizarina (*alizarin red S* -ARS da Sigma Aldrich) a 1%, pH 4,2 por 45 minutos sobre agitação e lavados 4 vezes com água destilada para reduzir coloração não-específica. O precipitado de cálcio presente foi corado em vermelho, revelando nódulos de mineralização, que foram examinados ao microscópio invertido de fase (análise qualitativa) e contados (análise quantitativa).

Na análise qualitativa foram feitas capturas de imagens pela câmera digital para microscópio invertido de fase (Digital Sight DS-U3; DS-Fi 1; Nikon) utilizando o *software* NIS Elements F 3.2, identificando nódulos de mineralização. Na análise quantitativa, a solução de ácido acético a 10% e metanol na proporção 4:1 foi adicionada 200µl aos poços por 30 minutos sobre agitação. Após esse período, 100µl foi transferido para placas de 96 poços e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 490 nm.

Para análise dos nódulos de mineralização, as células foram cultivadas e plaqueadas nas mesmas condições da análise da atividade da fosfatase alcalina (ALPase), diferenciando no tempo que foi de 21 dias. Os dados de absorbância foram utilizados para quantificar e as imagens para identificar os nódulos de mineralização, além de comparação entre os grupos.

4.6.3 Expressão gênica

As células foram cultivadas durante 21 dias em condições normais de nutrição em placas do tipo Petri de 100 mm. O plaqueamento foi com 3×10^5 células por placa de cultivo e o período de incubação de 24 horas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após a aderência das células, os meios de cultura foram substituídos por meio mineralizante fresco (Grupo Controle

Positivo), pelos meios condicionados (Grupos: COP, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP) ou por meio convencional fresco (Grupo Controle Negativo).

Ao final dos 21 dias, foi realizado o isolamento do RNA total, síntese do DNA complementar (cDNA) e análise da expressão de genes relacionados à formação de matriz extracelular (MEC) da dentina [osteocalcina ou proteína óssea com ácido gamacarboxiglutâmico (BGLAP), sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1)], e também relacionado à diferenciação odontoblástica [*heat shock protein-27* (HSP-27)]; todos analisados pela técnica do qRT-PCR.

4.6.3.1 Isolamento do RNA

O RNA total foi extraído dos cultivos celulares pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina, seguindo recomendações do fabricante (Life Technologies, São Paulo, Brasil). As células foram lavadas com PBS (pH 7,2; LGC Biotecnologia) e incubadas com 1,5ml de TRIzol (Invitrogen/Gibco) por 5 minutos. Após a lise celular pelo TRIzol, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,3ml de clorofórmio (Invitrogen/Gibco). Após a centrifugação a 11.000xg durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga refrigerada 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 0,75ml de álcool isopropílico por mililitro de solução desnaturante. Os tubos foram novamente centrifugados a 7500xg por 10 minutos a 4°C. Neste momento, foi observado a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. A solução sobrenadante foi descartada e adicionado 1ml de etanol a 75 % gelado. Após centrifugação a 6.000 g durante 5 minutos, o álcool foi descartado e o RNA ressuspendido em água livre de DNase e RNase. A concentração do RNA foi determinada em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda de 260 e 280nm e armazenado a -80 °C até o momento de sua utilização.

4.6.3.2 Síntese do DNA Complementar (cDNA)

O cDNA utilizado nas reações de qRT-PCR foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa (RT) utilizando o *High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems Carlsbad, CA, EUA) com volume final de 21µl, partindo-se de 600ng de RNA total. Para a síntese do cDNA, as amostras foram incubadas em termociclador (Termociclador Matercyler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetidos a 25°C por 10 minutos seguidos de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos.

4.6.3.3 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR para análise dos níveis de expressão dos genes *BGLAP*, *DSPP*, *DMP1*, *HSP-27* nos diferentes grupos celulares avaliados foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System, fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems), *primers* específicos para os genes *BGLAP*, *DSPP*, *DMP1*, *HSP-27* e para o gene constitutivo *GAPDH* (Tabela 4.3). Os *primers* para os genes alvos estudados foram obtidos no banco de *primers* *PrimerBank* (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por qRT-PCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 25µl em tubos óticos com os seguintes reagentes: 200nM dos *primers sense* e *antisense* para o gene *DMP1* e 400nM dos *primers sense* e *antisense* para os genes *BGLAP*, *DSPP*, *HSP-27* e *GAPDH*, 12,5µl Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1µl) e água estéril. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por quarenta ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e associação/extensão a 60°C por 1 minuto para os genes *BGLAP*, *DSPP*, *HSP-27* e *GAPDH* e 62°C para o gene *DMP1*. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise

da curva de dissociação para análise da especificidade por meio da cinética de dissociação dos produtos amplificados, observando-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi realizada qRT-PCR utilizando-se água estéril para avaliação de sua possível contaminação.

Para a quantificação relativa dos genes *BGLAP*, *DSPP*, *DMP1*, *HSP-27* nos grupos estudados, todas as amostras experimentais foram amplificadas em triplicata, sendo consideradas para quantificação somente aquelas com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores do Ciclo de amplificação (Ct). O valor de expressão do gene alvo normalizado pelo gene constitutivo *GAPDH* foi determinado pelo método da curva padrão, a qual foi obtida utilizando-se 4 diluições seriadas do cDNA do grupo controle positivo, quantificada em triplicata. A eficiência da reação para cada gene analisado foi determinada por meio da respectiva diluição do cDNA X valores de Ct e calculada por meio da equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, na qual 'E' é a eficiência e *slope* representa o coeficiente angular da reta.

Tabela 4.3 - Genes alvos utilizados para amplificação por qRT-PCR, de acordo com o número de acesso no *GenBank*, a sequência dos *primers* e o tamanho do produto

Gene	GenBank	Primers 5' → 3'	Tamanho do produto (bp)
<i>BGLAP</i>	NM_199173.4	F: CGCTAACCTGTATCAATGGCTGG R: CTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA	123
<i>DSPP</i>	NM_014208.3	F: CAACCATAGAGAAAGCAAACGC R: TTTCTGTTGCCACTGCTGGGAC	120
<i>DMP1</i>	NM_001079911.2	F: GAGCAGTGAGTCATCAGAAGG R: GAGAAGCCACCAGCTAGCCTAT	138
<i>HSP27</i>	NM_01540.3	F: ACGGTCAAGACCAAGGAT R: AGCGTGTATTTCCGCGTG	104
<i>GAPDH</i>	NM_001256799.1	F: GCATCCTGGGCTACACTGA R: CCACCACCCTGTTGCTGTA	162

4.7 MIGRAÇÃO CELULAR

Para migração celular foi utilizado o método *Scratch*, baseado na criação de uma interrupção de continuidade de uma monocamada celular, ou ferida, e o acompanhamento do fechamento desta ferida é realizado por observação em microscópio invertido de fase (Todaro et al., 1965; Liang et al., 2007).

Na análise da migração celular, as células foram cultivadas em condições normais de nutrição e plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por placa de cultivo tipo Petri 60 mm, em triplicata por grupo experimental. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C.

Após a constatação da confluência da monocamada foi realizado o ensaio de *Scratch* fazendo a ferida, ou seja, uma linha reta na placa com a ponta da pipeta p200 (Figura 4.3 A e B). A seguir, os debris formados foram removidos, lavando-se a placa uma vez com 1ml de meio fresco e em seguida, as placas receberam 2ml de meio fresco (Grupo controle) ou meios condicionados (Grupos experimentais: COP, HCa, HCa+COP, MTA e MTA+COP) e o teste de migração foi realizado nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas.

As imagens foram captadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase, utilizando *software* NIS Elements F 3.2, foram obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio com marcadores de ponta fina. O posicionamento das placas também foi auxiliado por um suporte para placa tipo Petri. Com os pontos de referência e o suporte, as placas foram levadas ao microscópio invertido de fase, posicionando os pontos de referência para captura da primeira imagem, tempo zero (Figura 4.3 C e D). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e no período de 12, 24 e 48 horas as mesmas placas foram levadas novamente ao microscópio invertido de fase e colocadas na mesma posição com o auxílio dos pontos de referência para obter imagens sempre na região fotografada no tempo zero.

Com a obtenção das imagens, as amostras foram analisadas quantitativamente usando identificação do núcleo celular, o que permitiu a contagem do número de células presentes na área da ferida, previamente definida (Figura 4.3 E), obtendo-se a quantidade de célula por área (Índice de migração celular) em cada tempo experimental.

Figura 4.3 – Desenho esquemático da análise de migração celular. **(A)**: confluência da monocamada de células na placa de cultivo tipo Petri 60 mm. **(B)**: método

Scratch, fazendo a ferida com a ponta da pipeta p200. **(C)**: área de análise. **(D)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida no tempo zero. **(E)**: fotomicrografia de fase do campo de visão da ferida após migração de células para área definida.

* marcação do núcleo celular para contagem de células por área definida (retângulo vermelho)

* mesma área de visualização

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos da proliferação, diferenciação e migração celular dos grupos experimentais foram analisados e comparados utilizando ANOVA complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os testes foram realizados utilizando-se do programa BioEstat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>).

5 RESULTADOS

5.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os dados da proliferação celular foram analisados nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas. No gráfico 5.1 observa-se crescimento celular em todos os grupos experimentais. Houve crescimento celular significativo em todos os grupos experimentais, exceto no grupo HCa. O grupo Controle foi o que apresentou o maior número de células viáveis em 72 horas ($p<0,01$). O grupo HCa manteve o mesmo número de células viáveis durante todo o experimento. Este número foi sempre significativamente menor que o dos demais grupos nos mesmos tempos experimentais ($p<0,01$).

Quando o biomaterial HCa foi associado ao COP (grupo HCa+COP), a capacidade proliferativa das células aumentou significativamente ($p<0,01$) em todos os tempos experimentais.

Gráfico 5.1 – Representação gráfica do crescimento celular dos grupos experimentais

* número de células viáveis significativamente menor que os demais grupos experimentais

Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas em 72 horas na comparação entre os grupos experimentais ($p < 0,01$)

Barra significa desvio padrão da média

5.2 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

5.2.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) em 14 dias foi similar em todos os grupos experimentais (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 – Representação gráfica dos valores da média de atividade de ALP em todos os grupos experimentais. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$)

Barra significa desvio padrão da média

5.2.2 Formação de nódulos de mineralização

O ensaio do Vermelho de Alizarina (ARS) revelou em 21 dias formação de nódulos mineralizados em todos os grupos experimentais. O grupo Controle Positivo, onde as células foram cultivadas com meio mineralizante, apresentou maior quantidade de corante que o grupo Controle Negativo, onde as células foram cultivadas com meio convencional ($p < 0,05$). Todos os demais grupos apresentaram quantidade de mineralização significativamente maiores que a do grupo Controle Positivo ($p < 0,01$). Dentre os grupos experimentais, o grupo COP foi o que apresentou quantidade significativamente maior de corante que os demais grupos ($p < 0,01$). Mais ainda, quando o COP foi associado ao HCa (grupo HCa+COP) houve formação de nódulos mineralizados significativamente maior que no grupo do HCa isolado ($p < 0,01$). A formação de nódulos mineralizados do COP associado ao MTA (grupo MTA+COP) foi similar àquela do grupo MTA isolado ($p = 0,05$; Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 - Representação gráfica dos resultados de formação de nódulos mineralizados mostrando a média das absorbâncias dos grupos experimentais em 21 dias. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Barra significa desvio padrão da média.

A figura 5.1 ilustra culturas tratadas pelo ensaio de Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais em 21 dias. Nódulos de mineralização de cor avermelhada são observados em diferentes densidades nos diferentes grupos experimentais, sendo que no grupo COP esta coloração é mais exuberante e distribuída por toda a cultura celular.

Figura 5.1 – Fotomicrografia de fase das culturas celulares dos grupos experimentais tratadas pelo ensaio de Vermelho de Alizarina em 21 dias de experimento. Detecção de nódulos de cálcio marcados em vermelho

5.2.3 Expressão gênica

5.2.3.1 Gene *BGLAP*

A figura 5.2 mostra a amplificação do gene *BGLAP* por qRT-PCR e a curva de *melting*, detectando pico único de dissociação para o produto amplificado. No gráfico 5.4 observa-se que o grupo Controle Positivo apresentou maior expressão do gene *BGLAP* quando comparado com os grupos experimentais (Controle Negativo, COP, HCa, HCa+COP e MTA; $p < 0,05$) com exceção do grupo MTA+COP, o qual apresentou os maiores níveis de expressão de *BGLAP* em relação a todos os grupos avaliados ($p < 0,05$). Os grupos: COP, HCa e MTA apresentaram expressão gênica similares ($p = 0,05$) e quando esses biomateriais foram associados, grupo HCa+COP e grupo MTA+COP, houve aumento da expressão gênica ($p < 0,05$). O grupo Controle Negativo mostrou expressão gênica significativamente menor que todos os grupos experimentais.

Figura 5.2 – Representação do qRT-PCR para expressão do gene *BGLAP* (osteocalcina). **(A)** amplificação do gene *BGLAP* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos

amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.

Gráfico 5.4 – Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *BGLAP* (osteocalcina) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais

Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Barra significa desvio padrão da média

5.2.3.2 Gene *DSPP*

A figura 5.3 mostra a amplificação do gene *DSPP* por qRT-PCR e a curva de *melting*, detectando pico único de dissociação para o produto amplificado. No gráfico 5.5 observa-se que o grupo experimental com maior expressão gênica para o gene *DSPP* foi o grupo MTA+COP ($p < 0,05$), seguido dos grupos HCa+COP e HCa. O grupo Controle Positivo e os dos biomateriais avaliados isoladamente, grupo COP e grupo MTA, apresentaram os menores níveis de expressão gênica. Não houve expressão do gene *DSPP* no grupo Controle Negativo

Figura 5.3 – Representação do qRT-PCR para expressão do gene *DSPP* (sialofosfoproteína dentinária) **(A)** amplificação do gene *DSPP* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.

Gráfico 5.5 – Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *DSPP* (sialofosfoproteína dentinária) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais

* Não houve expressão gênica

Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Barra significa desvio padrão da média

5.2.3.2 Gene *DMP1*

A figura 5.4 demonstra a ausência de amplificação deste gene nos grupos avaliados. O gene *DMP1* não foi expresso em nenhum grupo experimental, ou seja, as células-tronco PDH3 originadas de polpa dentária de dente decíduo humano, utilizadas neste trabalho, não expressam este gene.

DMP1 (proteína da matriz dentinária 1)

Figura 5.4 – Representação do qRT-PCR para expressão do gene *DMP1* (proteína da matriz dentinária 1). Sem formação da curva exponencial, o que caracteriza a não amplificação do gene *DMP1* para todos os grupos experimentais.

5.2.3.3 Gene *HSP-27*

A figura 5.5 mostra a amplificação do gene *HSP-27* por qRT-PCR e a curva de *melting*, detectando pico único de dissociação para o produto amplificado. No gráfico 5.6 observa-se que todos os grupos experimentais expressaram o gene *HSP-27*, sendo os maiores níveis de expressão gênica encontrados no Grupo MTA+COP ($p<0,05$), seguido pelo grupo HCa+COP ($p<0,05$). O grupo Controle Positivo e o grupo MTA apresentaram níveis de expressão gênica similares ($p=0,05$), assim como os níveis de expressão para *HSP-27* no grupo Controle Negativo foi similar ao encontrado nos grupos COP e HCa ($p=0,05$). Houve maior expressão de *HSP-27* nos grupos em que o COP esteve associado aos biomateriais de capeamento pulpar, HCa e MTA.

Figura 5.5 – Representação do qRT-PCR para expressão do gene *HSP-27* (*heat shock protein 27*) **(A)** amplificação do gene *HSP-27* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.

Gráfico 5.6 – Representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *HSP-27* (*heat shock protein 27*) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais

Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$)

Barra significa desvio padrão da média

5.2.3.4 Gene *GAPDH*

Gene constitutivo utilizado para normalizar a reação de qRT-PCR e quantificar a expressão dos genes *BGLAP*, *DSPP*, *DMP1* e *HSP-27*. A figura 5.6 mostra a amplificação do gene *GAPDH* por qRT-PCR e a curva de *melting*, detectando pico único de dissociação para o produto amplificado.

Figura 5.6 – Representação do qRT-PCR para expressão do gene *GAPDH* (gene constitutivo) **(A)** amplificação do gene *GAPDH* para todos os grupos experimentais, evidenciado pela curva exponencial. **(B)**: curva de dissociação dos produtos amplificados para todos os grupos experimentais demonstrando especificidade dos *primers* utilizados, como representado pelo pico único de dissociação.

5.3 MIGRAÇÃO CELULAR

A figura 5.7 ilustra os índices médios de migração dos diferentes grupos nos diferentes tempos experimentais. O grupo HCa foi o único que não apresentou células em migração em todos os tempos experimentais.

Dentre os grupos que apresentaram células em migração, foi observado que nos tempos experimentais de 12 e 24 horas, os grupos COP, HCa+COP e MTA+COP apresentaram índice de migração similar àquele do grupo Controle ($p=0,05$). O grupo MTA apresentou índice de migração significativamente menor em relação aos demais grupos ($p<0,01$). Em 48 horas, todos os grupos

experimentais, inclusive o do MTA, apresentaram índices de migração similares ($p=0,05$).

Os grupos em que o COP foi associado aos demais biomateriais (HCa e MTA) apresentaram índices de migração significativamente maiores que os dos grupos destes biomateriais isolados (HCa e o MTA) em todos os tempos experimentais, exceto para o grupo MTA em 48 horas. Neste período experimental o grupo MTA apresentou índice de migração similar ao do MTA associado ao COP (grupo MTA+COP).

Figura 5.7 – Representação gráfica dos índices de migração celular (número de células /área da ferida) de todos os grupos experimentais. A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados: **(A)** em 12 horas, **(B)** em 24 horas e **(C)** em 48 horas

*Não houve migração;

**Significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)

Barra significa desvio padrão da média

A figura 5.8 ilustra o comportamento migratório do grupo Controle e do grupo COP nos tempos experimentais 0, 12, 24 e 48 horas. Para ambos os grupos, observa-se o mesmo comportamento da migração celular, não havendo diferença no mesmo tempo experimental.

Figura 5.8 – Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do grupo Controle e do grupo COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas.

A figura 5.9 ilustra o comportamento migratório do grupo HCa e do grupo HCa+COP. O tempo zero é o momento em que é realizada a ferida (ensaio de *Scratch*), não havendo presença de células. Para o grupo HCa não observa-se migração de células, mas sim granulações birrefringentes em toda área definida de análise da migração celular e em todos os tempos experimentais.

Para o grupo HCa+COP, observa-se migração celular em todos os tempos experimentais com praticamente o fechamento da ferida em 24 horas.

Figura 5.9 – Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do do grupo HCa e do grupo HCa+COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas.

A figura 5.10 ilustra o comportamento migratório do grupo MTA e do grupo MTA+COP. O tempo zero é o momento em que é realizada a ferida. Para o grupo MTA observa-se migração celular reduzida nos tempos experimentais de 12 e 24 horas e presença de granulações birrefringentes, um material floculado, em pequena quantidade em todos os tempos experimentais (12, 24 e 48 horas). Para o grupo MTA+COP nota-se migração celular em todos os tempos experimentais com praticamente o fechamento da ferida em 24 horas.

Figura 5.10 – Fotomicrografias de fase de células PDH3 no ensaio de migração na área definida da ferida do do grupo MTA e do grupo MTA+COP nos tempos experimentais de 0, 12, 24 e 48 horas. A seta aponta para presença de granulações birrefringentes.

6 DISCUSSÃO

A Odontologia tem sido pioneira na medicina regenerativa com a utilização de técnicas de capeamento pulpar direto para terapia da polpa vital. Biomateriais tais como o hidróxido de cálcio (HCa), que tem sido usado por mais de 90 anos para estimular a reparação pulpar, e mais recentemente o agregado de trióxido mineral (MTA do inglês *mineral trioxide aggregate*), demonstram considerável mérito clínico. Esses biomateriais apresentam características biológicas ideais para o capeamento pulpar, como atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, capacidade de formar barreira tecidual e potencial dentinogênico; que podem favorecer as terapias regenerativas do complexo dentina-polpa (Kuratate et al., 2008; D'Antò et al., 2010; Ji et al., 2010; Peng et al., 2011; Paranjpe et al., 2011; Güven et al., 2011; Tran et al., 2012; Zhao et al., 2012; Güven et al., 2013; Seo et al., 2013; Varalakshmi et al., 2013; Zhang et al., 2013; Woo et al., 2013).

À vista disso, tem-se buscado melhorar e aperfeiçoar o uso de tais biomateriais. O óleo-resina de copaíba (COP) é uma substância natural obtida do tronco da copaibeira, originário da floresta Amazônica e tem sido utilizado por mais de 500 anos na medicina tradicional popular, com grande diversidade de aplicações. Apresenta excelente propriedade farmacológica anti-inflamatória e age regulando o excesso de inflamação patológica, o que leva a preservação tecidual e facilita o processo regenerativo (Veiga Junior et al., 2007; Viriato et al., 2009; Cooper et al., 2010; Guimarães-Santos et al., 2012; Leandro et al., 2012).

Conhecendo as características biológicas isoladas dos materiais HCa, MTA e COP pressupomos que associados poderiam originar materiais mais apropriados para serem aplicados como material de capeamento pulpar direto e que poderiam ser capazes de melhorar o potencial regenerativo das células pulpares, atuando na proliferação, diferenciação e migração de células-tronco da polpa dentária humana.

O estudo foi delineado para testes *in vitro* que se baseiam no cultivo de células porque as características fisiológicas, bioquímicas e genéticas originais das células são mantidas ao máximo, uma vez que estas se encontram fora do corpo humano e, a sua capacidade de proliferação, diferenciação e migração em placas ou frascos de cultura podem ser visualizadas e mensuradas. Foram utilizadas no estudo células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado humano (SHEDs; linhagem PDH3). A escolha pelas SHEDs se baseou no fato destas serem células multipotentes com capacidade de auto-renovação e altíssima capacidade proliferativa (Miura et al. 2003; Petrovic; Stefanovic, 2009). Mais ainda, estas células são capazes de se diferenciarem em múltiplas linhagens (Gronthos et al., 2002; Miura et al. 2003), inclusive de células odontoblasto-símile (Cordeiro et al., 2008), responsáveis pela formação de tecido dentinário. Além disso, é uma população de células que por ser obtida de dentes decíduos esfoliados não causam morbidade aos doadores e nem preocupações éticas.

Os biomateriais testados quando utilizados como capeadores pulparem diretos liberariam substâncias para o tecido pulpar que poderiam interferir com a proliferação, diferenciação e migração de SHEDs ou de células progenitoras que são recrutadas durante o processo regenerativo do tecido dentinário *in vivo*. Para mimetizar esta situação clínica foram utilizados neste estudo os meios condicionados pelos biomateriais. Estes são meios de cultivo que ao contato com os biomateriais apresentam todas as substâncias liberadas para meio líquido. Assim, os dados obtidos de proliferação, de diferenciação e de migração das SHEDs poderiam ser interpretados como aqueles que ocorreriam no processo de regeneração pulpar quando do uso destes biomateriais.

Os biomateriais COP e MTA quando isolados ou associados se mostraram biocompatíveis, pois substâncias por eles liberadas não prejudicaram o crescimento celular das SHEDs. De fato, outros autores já haviam observado esta biocompatibilidade, tanto do COP (Veiga Junior et al., 2007; Garcia et al., 2011; Lima et al., 2011) quanto do MTA (Modena et al., 2009; Torabinejad; Parioikh, 2010; Danesh et al., 2012; Zhang et al., 2013). Por outro lado, isoladamente o HCa mostrou-se altamente citotóxico. Este achado também tem sido apresentado na literatura (Tran et al., 2012), no entanto,

ainda é um achado bastante controverso, uma vez que alguns autores consideram este biomaterial como biocompatível (Ji et al., 2010). Provavelmente, estes diferentes pontos de vista se baseiam nas formas de analisar a citotoxicidade, onde alguns autores utilizam o material em direto contato com células e tecidos, enquanto outros utilizam meio condicionado pelo HCa, as concentrações também são variadas e os métodos de análise *in vitro* apresentam técnicas variadas (Peng et al., 2011). Os achados do presente trabalho provavelmente estejam relacionados à natureza irritante do HCa que é altamente solúvel em água e dissocia-se em íons cálcio e hidroxila liberando uma grande quantidade destes íons no meio de cultura (meio condicionado). Sabe-se que os íons cálcio ao reagirem com o CO₂ dos tecidos formam granulações de calcita que em grande quantidade podem ser irritantes teciduais (Holland et al., 1999; Mohammadi; Dummer, 2011). Nos testes *in vitro*, quando da obtenção de meios condicionados, pelas condições específicas de cultivo celular, o CO₂ que está presente na estufa poderia ter reagido com os íons liberados pelo HCa formando granulações de calcita. De fato, era possível se observar ao microscópio de fase depósitos de material floculado e birrefringente no fundo das placas de cultivo celular com meio condicionado pelo HCa.

Surpreendentemente, quando o HCa foi associado ao COP seu efeito deletério sobre a sobrevivência celular não foi mais observado. Ou seja, a associação de COP com HCa foi capaz de reverter a citotoxicidade do HCa isolado. Isto pode ter ocorrido provavelmente pelo fato do COP, por sua maior viscosidade, ter perturbado tanto a dissociação iônica do HCa, já que quanto maior a viscosidade do material menor é a dissociação iônica do HCa (Mohammadi; Dummer, 2011); quanto a reação destes íons com o CO₂ o que levaria a uma menor formação de calcita. Em favor desta hipótese podemos declarar que no grupo onde o meio foi condicionado pelo HCa associado ao COP as culturas não apresentavam os depósitos no fundo das placas. Isto também foi observado no meio condicionado por MTA, que quando isolado apresentou diminuta quantidade de granulações no fundo da placa que, quando da associação com o COP desapareceram. Assim sendo, pela ausência tanto da calcita quanto pelo menor contingente de íons no meio

condicionado pelo HCa associado ao COP haveria uma atenuação da irritabilidade que o HCa isolado causava às SHEDs.

Na diferenciação, tradicionalmente, o meio mineralizante é utilizado para induzir a diferenciação das SHEDs em células com fenótipo de odontoblasto-símile. O meio de diferenciação de nosso estudo continha dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico, substâncias utilizadas para diferenciação ósteo/odontogênica (Seo et al., 2013). Para a análise da diferenciação, neste estudo foram utilizados os seguintes métodos: atividade da ALP, formação de nódulos mineralizados pelo ensaio de Vermelho de Alizarina; e análise da expressão dos genes para marcadores ósteo/odontogênicos (*BGLAP*, *DSPP*, *DMP-1* e *HSP-27*) pelo qRT-PCR.

A ALP é uma enzima que tem importante papel na deposição mineral fornecendo fosfato inorgânico para promover mineralização e está presente nos estágios iniciais de diferenciação sendo secretada por osteoblastos maduros, odontoblastos e cementoblastos (Goldberg et al., 2011). A atividade da ALP avaliada em 14 dias no presente estudo foi similar em todos os grupos experimentais. O COP isoladamente ou em associação não interferiu na atividade de ALP. Este fato salienta que as SHEDs tem capacidade de sintetizar ALP e que a atividade desta enzima não é alterada com a presença dos materiais avaliados. Em 21 dias, ao avaliar a formação de nódulos de mineralização, o grupo COP apresentou quantidade significativamente maior de mineral que os demais grupos. Quando o COP foi associado ao HCa houve melhora substancial da diferenciação em relação àquela induzida por este biomaterial isolado. Os estudos *in vivo* de Lima et al. (2011) apontaram o grande potencial do COP na formação de tecido mineralizado na reparação pulpar, além de não observarem área de necrose. Os resultados do presente estudo corroboram estes achados mostrando que o COP promove maior diferenciação funcional.

Para a expressão gênica, marcadores de diferenciação ósteo/odontogênicos (*BGLAP*, *DSPP*, *DMP-1* e *HSP-27*) foram analisados. O *BGLAP* tem importante papel na regeneração de tecido duro e é sintetizado somente por osteoblastos maduros, odontoblastos e cementoblastos (Goldberg

et al., 2011). *DSPP* é uma das mais importantes proteínas não-colagenosas envolvidas no desenvolvimento dos dentes e mineralização da dentina (Goldberg et al., 2011; Suzuki et al., 2012). *DMP-1* é outra proteína específica da dentina e tem importante função reguladora na mineralização (Goldberg et al., 2011; Suzuki et al., 2012). *HSP-27* é um marcador de células odontoblásticas (Harada et al., 2008).

As células do grupo COP foram as que apresentaram as menores expressões dos genes *BGLAP*, *DSPP* e *HSP-27*, mas igual a expressão dos grupos HCa e MTA para o gene *BGLAP*; dos grupos Controle Positivo e MTA para o gene *DSPP*; e dos grupos Controle Negativo e HCa para o gene *HSP-27*; o que confere ao COP, quando isolado, baixo potencial dentinogênico. Quando associado ao MTA, o COP induziu superexpressão dos genes *BGLAP*, *DSPP* e *HSP-27* e quando associado ao HCa houve superexpressão dos genes *BGLAP* e *HSP-27*, o que confere aos novos materiais propostos, HCa+COP e MTA+COP, altíssimo potencial dentinogênico em razão de terem superexpressado componentes da matriz dentinária e marcador de odontoblastos. O gene *DMP-1* não foi expresso pelas células em nenhum grupo experimental. Este dado mostra que as SHEDs (linhagem PDH3) utilizadas no presente estudo não apresentaram capacidade de expressar *DMP-1*, o que corrobora com os estudos de Casagrande et al. (2010) que somente identificaram expressão para o gene *DMP-1* em SHEDs quando cultivadas em fatias de dentes utilizadas como arcabouço.

Compreender os mecanismos que envolvem a ativação seletiva de genes e de proteínas necessárias na dentinogênese ainda são passos iniciais na pesquisa com muitos questionamentos e poucas respostas. No caso do presente estudo, utilizou-se o COP que apresenta uma gama de princípios ativos farmacológicos e que não são atribuídos a um único constituinte, mas sim a interação sinérgica entre os constituintes presentes na sua composição, o que indicou o seu uso na forma bruta de extrato de óleo-resina. O entendimento dos prováveis fatores relacionados às respostas obtidas neste estudo de diferenciação torna-se então ainda mais complexa. A hipótese era que em razão do COP apresentar na sua composição ácido diterpênicos,

porção resinosa, ao ser associado aos materiais de capeamento pulpar, HCa e MTA, que são bases fortes, quimicamente devem formar sais minerais. Considerando os achados de An et al. (2012) que apontam que o aumento de íons cálcio promove diferenciação osteogênica, a presença dos sais formados pela associação HCa+COP e MTA+COP podem ser uma possível explicação da superexpressão dos genes formadores de matriz dentinária e do marcador de diferenciação odontoblástica. De fato, estudos já apontaram a capacidade dentinogênica do HCa (Ji et al., 2010; Peng et al., 2011; Tran et al., 2012) e do MTA (Kuratate et al., 2008; D'Antò et al., 2010; Lee et al., 2010; Güven et al., 2011; Paranjpe et al., 2011; Zhao et al., 2012; Seo et al., 2013; Varalakshmi et al., 2013; Woo et al., 2013; Zhang et al., 2013; Güven et al., 2013).

A migração celular foi analisada pelo ensaio do *Scratch*, baseado na criação de uma interrupção de continuidade de uma monocamada celular, ou ferida, onde o acompanhamento do fechamento desta ferida é realizado por observação em microscópio invertido de fase (Todaro et al., 1965; Liang et al., 2007). Este método mimetiza a área da injúria pulpar que precisa ser regenerada com a chegada de células. Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo HCa foi o único que não apresentou células em migração em todos os tempos experimentais. Os demais grupos apresentaram migração similar àquela do grupo Controle, exceto o grupo MTA em 12 e 24 horas. Este evento provavelmente esteja relacionado às granulações supostamente de calcitas formadas tanto pelo HCa quanto pelo MTA quando utilizados isolados. As granulações de calcita são birrefringentes para luz polarizada e ao se depositarem sobre as células formam uma barreira física o que provavelmente impede ou dificulta a migração celular. Diferentemente do que foi observado, Ji et al. em seu estudo de 2010, observaram migração de DPSCs em contato com o HCa, no entanto estes autores utilizaram quantidade extremamente reduzida da concentração de HCa, e consequentemente houve um número menor de granulações calcita formadas.

No MTA foram formadas quantidades bem pequenas de granulações de calcita e que se tornam barreiras física para as células recaiando em um retardo nas 12 e 24 horas de migração celular. Devido à presença de trocas

líquidas no tecido pulpar, graças à presença de vasos sanguíneos e linfáticos, neste estudo *in vitro* este aspecto foi mimetizado pelas substituições dos meios condicionados por meio fresco, realizando-se trocas de metade da quantidade total do meio a cada 2 ou 3 dias. Sendo assim, as granulações de calcita presentes no grupo MTA foram provavelmente sendo diluídas e retiradas dos poços, o que explicaria a normalização da migração celular para o grupo MTA em 48 horas. O presente estudo corroboram com os achados de D'Antò et al. (2010) que observaram migração celular sob o efeito do MTA, porém com atraso em 24 horas para células-tronco de medula óssea humana.

O COP isolado não interferiu na migração celular e positivamente, quando associado ao HCa reverteu por completo a inibição de migração causada por esse biomaterial isolado. Quando associado ao MTA, o COP promoveu o aumento da velocidade de migração das células em relação ao grupo do MTA isolado. O COP melhorou as características químicas do HCa e do MTA e consequentemente tornou esses materiais mais biocompatíveis frente as SHEDs, impedindo a formação de barreiras físicas. A migração celular de SHEDs para o local da injúria é peça chave durante o processo de regeneração, pois as células precisam chegar ao local da injúria para diferenciarem-se em odontoblasto-símile e formar barreira de tecido dentinário. Assim, o COP potencializa os efeitos dos biomateriais de capeamento pulpar direto.

Curiosamente, o presente estudo fornece as primeiras evidências *in vitro* do efeito do MTA sobre a migração de SHEDs, bem como o efeito sinérgico do COP aos biomateriais de capeamento pulpar direto, HCa e MTA, na proliferação, diferenciação e migração de SHEDs.

Quando novos materiais são propostos, não só as propriedades biológicas devem ser testadas, mas também as químico-físicas e microbiológicas. Neste estudo encontramos resultados positivos em relação à proliferação, a diferenciação odontogênica e a migração de SHEDs. Estes resultados são promissores e incentivam a busca do estudo de outras das características dos mesmos. Assim, outros testes devem ser conduzidos antes da aplicação do novo material proposto à base de COP, pois toda e qualquer

mudança na composição dos materiais de capeamento pulpar direto já existentes, HCa e MTA, podem afetar as propriedades físico-químicas, tais como tempo de presa, escoamento ou resistência mecânica, entre outras. O que foi constatado durante o preparo dos materiais para análise experimental é que a presença do COP facilitou a manipulação dos materiais, especialmente do MTA, fato que provavelmente esteja relacionado à presença do constituinte resinoso do COP, não prejudicando as propriedades biológicas do HCa e MTA, provavelmente em razão de ser uma resina natural.

A aplicação de fator antiinflamatório em polpa exposta controla a resposta inflamatória, acelera a regeneração do tecido e conduz à deposição de dentina mineralizada de qualidade fisiológica (Komabayashi; Zhu, 2010). O COP já apresenta esta propriedade antiinflamatória (Veiga Junior; Pinto, 2002; Veiga Junior et al., 2007), que aliada aos efeitos positivos na proliferação, diferenciação e migração de SHEDs, e a e melhora na facilidade de manipulação do MTA indica estes materiais associados para a aplicação em capeamento direto. Assim sendo, os novos materiais aqui propostos mostram-se promissores devendo ser em futuro próximo submetidos a testes mecânicos *in vitro* e testes *in vivo* de capaeamento pulpar direto. Talvez, estejamos frente a materiais odontológicos que exibem a maioria das características do material de capeamento direto ideal.

7 CONCLUSÃO

Do presente estudo pode-se concluir que:

- **Com relação à proliferação**, o óleo-resina de copaíba (COP) não interfere na capacidade proliferativa de células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado humano (SHEDs), nem quando associado aos demais biomateriais de capeamento pulpar, hidróxido de cálcio (HCa) e agregado de trióxido mineral (MTA). Mais ainda, o COP quando associado ao HCa é capaz de reverter completamente o efeito inibitório do HCa na proliferação celular.
- **Com relação à diferenciação**, o COP isolado, bem como associado aos biomateriais (HCa e MTA), não interfere na atividade de fosfatase alcalina em SHEDs. No entanto, aumenta consideravelmente a deposição de nódulos mineralizados, em especial quando aplicado de forma isolada sobre as culturas celulares. O COP associado ao HCa é capaz de aumentar a deposição de nódulos mineralizados induzida pelo HCa isolado. Na expressão gênica, os biomateriais isolados ou associados não promovem expressão de *DMP1* nas SHEDs. O COP isolado promove as menores expressões dos genes *BGLAP*, *DSPP* e *HSP-27* nas SHEDs. O COP associado ao MTA promove superexpressão dos genes relacionados à formação de matriz extracelular dentinária (*BGLAP* e *DSPP*), e quando associado ao HCa, promove superexpressão do gene *BGLAP*. O COP associado aos biomateriais (HCa e MTA) promove superexpressão do gene *HSP-27*, relacionado à diferenciação odontoblástica
- **Com relação à migração** o COP isolado, bem como associado aos biomateriais (HCa e MTA) não interfere na capacidade migratória das SHEDs. Quando associado ao HCa reverte por completo a inibição de migração causada por esse biomaterial isolado. Quando

associado ao MTA aumenta a velocidade de migração das células em relação ao MTA isolado.

- **Óleo-resina de copaíba (COP)** promove proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dental sendo uma proposta de um biomaterial para capeamento pulpar.

REFERÊNCIAS²

Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, Souza V, Alessandro LD. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):1-6.

Aguilar P, Linsuwanont P. Vital Pulp Therapy in Vital Permanent Teeth with Cariously Exposed Pulp: A Systematic Review *JOE.* 2011; 37(5) May: 581-7.

Alencar, J. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia central. 2 – produção de óleo resina. *Acta Amazônica.* 1982;12(1):79-82.

American Association of Endodontics. Glossary of Endodontic Terms. Chicago, IL; American Association of Endodontics: 2012.

An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 Mar;23(3):789-95.

Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol.* 2012 Feb;28(1):25-32.

Bandeira, MFCL; Oliveira, MRB de; Pizzolitto, AC; Benatti Neto, C. Preliminary study of the activity antibacterial of the essential oil and of the resin of the *Copaifera multijuga* (copaiba oil), associated to the zinc oxide and to calcium hydroxide. *JBC J. Bras. Clin. Estet. Odontol.* 1999a Set;3(17):46-51.

Bandeira, MFCL; Oliveira, MRB de; Benatti Neto, C; Comelli, LRC. Comparative study of biological compatibility rat molars of the essencial oil and resin of *Copaifera multijuga* (copaiba oil), associated to calcium hydroxide – Part II. *JBC J. Bras. Clin. Estet. Odontol.* 1999b Jul;3(16):42-9.

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

² De acordo com Estilo Vancouver.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*. 2005 Aug;38(8):505-9.

Cavalcanti BN, Rode Sde M, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. *Braz Oral Res*. 2011 Jan-Feb;25(1):13-8.

Chogle SM, Goodis HE, Kinaia BM. Pulpal and periradicular response to caries: current management and regenerative options. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):521-36.

Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. *Dent Clin North Am*. 2013 Jan;57(1):59-73.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010 Sep;38(9):687-97.

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

Costa, CAS; Hebling, J; Rabello, F; Villalba, H. Preliminary study of the biological compatibility of a zinc oxide-copaiba and zinc oxide-eugenol cements: histological evaluation of subcutaneous implants in rats. *Rev. Odontol. UNESP*. 1996 Jan.-Jun;25(1):19-26.

Custódio DL, Veiga Junior VF. True and common balsams. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2012;22(6):1-15.

Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schäfer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod*. 2010 May;36(5):814-9.

Danesh F, Vahid A, Jahanbani J, Mashhadiabbas F, Arman E. Effect of white mineral trioxide aggregate compared with biomimetic carbonated apatite on dentine bridge formation and inflammatory response in a dental pulp model. *Int Endod J*. 2012 Jan;45(1):26-34.

D'Antò V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1839-43.

Eskandarizadeh A, Shahpasandzadeh MH, Shahpasandzadeh M, Torabi M, Parirokh M. A comparative study on dental pulp response to calcium hydroxide, white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents. *J Conserv Dent*. 2011 Oct;14(4):351-5.

Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J*. 2005 Oct;55(5):293-301.

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.

Ferreira LS, Moura-Netto C, Destro MFSS, Maranduba CMS, Marques MM. Laser phototherapy improves the proliferation but not the differentiation of human dental pulp stem cells. *Med Oral Patol Oral Ciru Bucal*. 2012; 131.

Freshney R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. United States of America: Wiley-Blackwell; 2010.

Garcia L, Cristiane S, Wilson M, Soraya M, Lopes RA, Mônica R, de Freitas O. Biocompatibility assessment of pastes containing Copaiba oilresin, propolis, and calcium hydroxide in the subcutaneous tissue of rats. *J Conserv Dent*. 2011 Apr;14(2):108-12.

Garrido AD, Lia RC, França SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J*. 2010 Apr;43(4):283-91.

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.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:711-35.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol.* 2007 Feb 12;109(3):486-92.

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

Guimarães-Santos A, Santos DS, Santos IR, Lima RR, Pereira A, de Moura LS, Carvalho RN Jr, Lameira O, Gomes-Leal W. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;1-9.

Güven EP, Yalvac ME, Sahin F, Yazici MM, Rizvanov AA, Bayirli G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. *J Endod.* 2011 May;37(5):650-6.

Güven EP, Taşlı PN, Yalvac ME, Sofiev N, Kayahan MB, Sahin F. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *Int Endod J.* 2013 Apr 19;1-10.

Hara K, Yamada Y, Nakamura S, Umemura E, Ito K, Ueda M. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. *J Endod.* 2011 Dec;37(12):1647-52.

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

Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent.* 2009 Sep-Oct;34(5):615-25.

Holland R, de Souza V, de Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. *J Am Dent Assoc.* 1979 Sep;99(3):472-5.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999 Mar;25(3):161-6

Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011 Jan 1;3:788-800.
Huang X, Xu S, Gao J, Liu F, Yue J, Chen T, Wu B. miRNA expression profiling identifies DSPP regulators in cultured dental pulp cells. *Int J Mol Med.* 2011 Oct;28(4):659-67.

Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A.* 2010 Jun;16(6):1823-33.

Kerkis I, Kerkis A; Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissue Organs* 2006; 184:105-16.

Khoury J. Endodontic essay. *Aust Endod J.* 2011 Apr;37(1):6-11.

Komabayashi T, Zhu Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):e75-81.

Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008 Aug;34(8):970-4.

Leandro LM, Vargas Fde S, Barbosa PC, Neves JK, da Silva JA, da Veiga-Junior VF. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules.* 2012 Mar 30;17(4):3866-89.

Lee SK, Lee SK, Lee SI, Park JH, Jang JH, Kim HW, Kim EC. Effect of calcium phosphate cements on growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2010 Sep;36(9):1537-42.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols.* 2007; 2(2):329-33.

Lima RV, Esmeraldo MR, de Carvalho MG, de Oliveira PT, de Carvalho RA, da Silva FL Jr, de Brito Costa EM. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. *Pediatr Dent*. 2011 Jan-Feb;33(1):14-8.

Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res*. 2003 Nov;17(9):1048-53.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior VF. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Quim Nova*. 2002;25(3):429-38.

Mente J, Geletneky B, Ohle M, Koch MJ, Friedrich Ding PG, Wolff D, Dreyhaupt J, Martin N, Staehle HJ, Pfefferle T. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *J Endod*. 2010 May;36(5):806-13.

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 U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Mizuno M, Miyamoto T, Wada K, Watatani S, Zhang GX. Type I collagen regulated dentin matrix protein-1 (Dmp-1) and osteocalcin (OCN) gene expression of rat dental pulp cells. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 15;88(6):1112-9.

Mjör IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence Int*. 2002 Feb;33(2):113-35.

Mjör IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int*. 2002 Jan;33(1):35-63.

Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro MF, Santos CF. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):544-54.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697-730.

Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to

experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2008 Feb;41(2):128-50.

Nakakura-Ohshima K, Watanabe J, Kenmotsu S, Ohshima H. Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *J Electron Microsc* (Tokyo). 2003;52(6):581-91.

Nakasone N, Yoshie H, Ohshima H. The relationship between the termination of cell proliferation and expression of heat-shock protein-25 in the rat developing tooth germ. *Eur J Oral Sci*. 2006 Aug;114(4):302-9.

Nascimento PA. Caracterização da diferenciação osteogênica in vitro a partir das células-tronco da polpa dentária de paciente com Neurofibromatose tipo 1 [dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2013.

Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Yamamoto H, Takeyasu. Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (Hsp) 25. *Arch Histol Cytol*. 2001 Dec;64(5):493-501.

Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Takeuchi K, Hoshino M, Takano Y, Maeda T. Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc Res Tech*. 2003 Apr 1;60(5):483-90.

Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):429-42.

Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1691-5.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010a Jan;36(1):16-27.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010b Mar;36(3):400-13.

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

Pedreira, EN. Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (*Copaifera reticulada*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. J Endod. 2011 Sep;37(9):1240-6.

Petrovic V, Stefanovic V. Dental tissue--new source for stem cells. Scientific World Journal. 2009 Oct 14;9:1167-77.

Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Copaiba oil (*Copaifera* sp): history, extraction, industrial applications and medicinal properties. Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu. 2009;11(4):465-72.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Schneedorf JM. Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque forming bacteria in dogs. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010;62(3):578-85.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Moreira MAS, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. Braz Dent J. 2012;23(1):36-8.

Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. Dent Mater 2008;24:149-64.

Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez MD, Meseguer L, Meseguer-Henarejos AB, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 Nov 1;17(6):e1062-7.

Rosa PC, Mancini MN, Camargo SE, Garrido AD, Camargo CH, Rode Sde M. Dimensional alterations and solubility of new endodontic sealers. Braz Dent J. 2010;21(4):301-4.

Santos AO dos, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 2008 May;103(3): 277-81.

Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):242-8.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007 Mar;13(2):151-7.

Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):589-601.

Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, de Sousa JP, Rocha EM, Bastos JK, Cunha WR, Veneziani RC, Ambrósio SR. Phytother Res. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother. Res*. 2011a Feb;25(2):215-20.

Souza AB, de Souza MG, Moreira MA, Moreira MR, Furtado NA, Martins CH, Bastos JK, dos Santos RA, Heleno VC, Ambrosio SR, Veneziani RC. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules*. 2011b Nov 18;16(11):9611-9.

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

Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J*. 2010 Jul;43(7):565-71.

Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol*. 2005 Feb;50(2):103-8.

Tjäderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod J*. 2002 Aug;28(2):68-74.

Todaro GJ, Lazar GK, Green H. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *J Cell Physiol.* 1965 Dec;66(3):325-33.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):190-202.

Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C, Boukpepsi T. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012 Dec;91(12):1166-71.

Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod.* 2010 May;36(5):781-9.

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

Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):806-12.

Vasconcelos KRF, Veiga Junior VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. In vitro assessment of antibacterial activity of a dental cement constituted of a *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin. *Braz J. Pharmacogn.* 2008 Dez 18 (Supl.):733-8.

Veiga Junior VF, Pinto AC. The *Copaifera* L. GENUS. This review details the history, chemistry and pharmacology of the *Copaifera* L. genus (Leguminosae-Caesalpinoideae), including copaiba oils. *Quim Nova.* 2002;25(2):273-86

Veiga Junior VF, Pinto AC. Medicinal plants: safe cure? *Quim Nova.* 2005;28(3):519-28.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jun 13;112(2):248-54.

Viriato EP, Bianchetti ES, Santos KC dos, Vaz AF, Campos RMV, Pereira AP, Bezerra RM, Perazzo FF, Carvalho JCT. *Int. J. High Dilution Res.* 2009;8(26):9-14.

Willershausen B, Willershausen I, Ross A, Velikonja S, Kasaj A, Blettner M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. *Quintessence Int.* 2011 Feb;42(2):165-71.

Woo SM, Hwang YC, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim WJ, Kim SM, Jung JY. Effect of nifedipine on the differentiation of human dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):801-5.

Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2013 Oct;46(10):923-9.

Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep.* 2012 Jan;39(1):215-20.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 106/11
CAAE 0116.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Efeito de substâncias liberadas por biomateriais na proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpas dentárias humanas**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Roberta Souza D'Almeida Couto Santiago, sob orientação da Professora Doutora Marcia Martins Marques.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de novembro de 2011.

Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Recaracterização de células-tronco de polpa de dente decíduo humano (linhagem celular PDH3) por citometria de fluxo.

ANEXO C – Composição do óleo-resina de copaíba (COP) utilizado no estudo e revelado por cromatografia em fase gasosa.

Composição	Percentual (%)
δ-elemeno	0,2
Cyclosativene	0,9
α-copaeno	0,5
δ-elemeno	0,2
Cyclosativene	0,9
α-copaeno	0,5
β-elemeno	3,2
α-gurjunene	0,7
β-cariofileno	37,3
trans-α-bergamoteno	9,0
Aromadendreno	0,9
epi-β-santaleno	0,1
α-humuleno + (E)-β-farneseno	5,4
β-chamigrene	1,0
γ-gurjunene	0,6
γ-curcumeno	0,6
β-selineno	4,8
α-selineno	3,0
(Z)-α-bisaboleno	1,8
α-bulnesene	2,2
β-bisaboleno	14,5
β-curcumeno	0,4
β-sesquiphelandrene	1,2
(E)-γ-bisaboleno	1,4
óxido de cariofileno	0,1
epi-β-bisabolol	0,1
β-bisabolol	0,2

Guimarães-Santos et al., 2012