UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica

PATRICIA HELENA COLBACHINI REZENDE

Estudo *in vitro* do potencial estimulatório do extrato de semente de uva (GSE) na atividade funcional e na expressão gênica de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23

Ribeirão Preto

2018

PATRICIA HELENA COLBACHINI REZENDE

Estudo *in vitro* do potencial estimulatório do extrato de semente de uva (GSE) na atividade funcional e na expressão gênica de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Rezende, Patricia HC

Estudo *in vitro* do potencial estimulatório do extrato de semente de uva (GSE) na atividade funcional e na expressão gênica de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23. Ribeirão Preto, 2018.

124p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F

1. Extrato de semente de uva. 2. Proantocianidina. 3. Odontoblastos. 4. Estudo *In Vitro*.

Rezende, P. H. C. **Estudo *in vitro* do potencial estimulatório do extrato de semente de uva (GSE) na atividade funcional e na expressão gênica de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23**. 2018. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, ambos pertencentes à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Aos meus pais **Sandra Maria de Aguiar Colbachini** e **Marcus José Colbachini**, por me darem a vida e pela dedicação à minha educação e formação do meu caráter, sempre baseados no amor.

Ao meu marido e grande amor **Renato Marques de Rezende**, companheiro de quase três décadas, por ter sido meu principal incentivador neste trabalho, por sempre ter uma visão otimista da vida e ser exemplo de garra, perseverança, alegria e amor, me mostrando que temos que ter serenidade e controle emocional em todas as circunstâncias da vida apesar das dificuldades que possam surgir ao longo dela.

Aos meus queridos filhos, **Priscilla Colbachini Rezende** e **Rafael Colbachini Rezende**, os quais são a maior razão do meu viver. Deixo para eles a mensagem de que nunca é tarde para realizarmos os nossos sonhos.

À toda a minha **família**, obrigada pelo apoio incondicional, mesmo à distância. Em especial a meus irmãos **Luciana, Ana Elizabete e Marcus Filho**. Amo vocês!

À todos amigos queridos que me apoiaram com palavras de ânimo e estímulo.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora e, antes disso, amiga de longa data, **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, pelo carinho com que sempre me acolheu, mesmo após onze anos de distância pelas circunstâncias da vida, pelo seu espírito leve e alegre durante a convivência diária deste trabalho, fazendo tudo fluir com serenidade e profissionalismo, mostrando a sua grande competência como profissional e acima de tudo, como ser humano.

Ao grande mestre do Laboratório de Biologia Celular da FORP-USP **Roger Rodrigo Fernandes**, sem a ajuda do qual este trabalho não seria possível. Obrigada pelos ensinamentos, pela sinceridade nas colocações, pela autenticidade de caráter, pela paciência dispensada, pela competência profissional demonstrada, enfim, desejo tudo de melhor em sua vida ao lado de sua linda família, a qual vi crescer ao longo deste experimento.

Agradecimientos

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/FORP-USP.**

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/FORP-USP.

À **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza**, Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP, por ter cedido o extrato de semente de uva rico (GSE) utilizado nesta pesquisa, resultado de sua parceria com a Profa. Dra. Ana Bedran-Russo, da Universidade de Illinois, Chicago.

Ao **Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör**, do Departamento de Cariologia, Ciências Restauradoras e Endodontia Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan (Ann Arbor, USA) por ceder as células da linhagem odontoblastóide de camundongos (MDPC-23) utilizadas neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**, pelas sábias orientações ao longo desta pesquisa.

À **Profa. Dra. Selma Siéssere**, pela simpatia de sua convivência diária, e ensinamentos valiosos durante as disciplinas ministradas no decorrer do curso.

À todos os **professores** pertencentes ao programa de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

À Bióloga e Mestre do Laboratório de Biologia Molecular **Milla Sprone Tavares Ricoldi**, pelo seu bom humor durante a convivência diária, pela organização impecável dos laboratórios e pela ajuda profissional de grande competência.

À Farmacêutica e Doutora do Laboratório de Biologia Molecular **Fabíola Singaretti de Oliveira**, pela troca agradável de experiências pessoais e profissionais durante este trabalho. Além de valiosos conhecimentos teóricos e práticos repassados a mim com paciência e carinho.

À cirurgiã-dentista e mestre **Paula Katherine Vargas Sanchez**, colombiana de grande competência profissional, eficiência e simpatia, pela valiosa ajuda e parceira na realização deste trabalho.

À cirurgiã-dentista e mestre **Ana Luisa Riul Sório**, pela ajuda nos experimentos no início deste trabalho, sempre com boa vontade e disposição. Meu muito obrigado.

À cirurgiã-dentista e mestre **Mayara Sgarbi Semeghini**, pela preciosa ajuda ao longo da execução deste trabalho.

À cirurgiã-dentista e doutora **Larissa Moreira Spínola de Castro Raucci**, pela valiosa ajuda na análise da expressão gênica relacionada a este trabalho.

À cirurgiã-dentista **Sandra Viviana Zorro Rodriguez**, colombiana de muita coragem e determinação, pela oportunidade de me ensinar um pouco de sua cultura e pelo companheirismo em muitos momentos ao longo desta jornada.

Às irmãs cirurgiãs-dentistas **Adriana Ortiz** e **Simone Ortiz**, companheiras em várias disciplinas ao longo do mestrado, pela alegria do convívio e pela troca valiosa de conhecimentos.

Aos **colegas** companheiros das disciplinas vivenciadas durante o mestrado.

Aos colegas de laboratório que direta ou indiretamente contribuíram para minha evolução pessoal e profissional como é o caso do mestre **Allan Thaffarel Portilho de Souza**, da aluna **Yvana Murto Leguizamón**, da aluna **Maria Carolina Coelho**, do aluno **Gustavo Ribeiro Oliveira**, da mestre **Rayana Longo Bighetti Trevisan**.

À todos os colegas do laboratório de cultura de células do **Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da FORP** pelas alegrias, ensinamentos e colaborações.

À **Imaculada Janaína Miguel**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela grande ajuda ao sanar minhas dúvidas relacionadas ao programa e pela agradável companhia.

À **Clélia Aparecida Celino**, secretária do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, pela ajuda dispensada sempre que necessário.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento **CAPES** e **FAPESP**, pela ajuda e financiamento desta pesquisa.

“Nunca é tarde para o aprendizado. Pelo contrário, é ele que mantém nossa mente ativa e renovada”.

Patricia H.C.Rezende

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz”.

Ayrton Senna

Resumo

RESUMO

REZENDE, Patricia Helena Colbachini. **Estudo *in vitro* do potencial estimulatório do extrato de semente de uva (GSE) na atividade funcional e na expressão gênica de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23**. 2018. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

Apesar da capacidade regenerativa da dentina já ser bem estabelecida, este processo pode ser insuficiente no caso de injúrias decorrentes de traumas e/ou lesões cariosas extensas, podendo levar à exposição pulpar e perda de sua vitalidade. Assim, pesquisas recentes no campo da engenharia tecidual têm identificado materiais e substâncias que poderiam ser utilizadas como biomodificadores da dentina e auxiliares na regeneração do complexo dentina-polpa. Entre eles estão os extratos ricos em proantocianidina, um composto fenólico bioativo presente no extrato de semente de uva (GSE). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial estimulatório de quatro concentrações crescentes do GSE na atividade funcional de células odontoblastoides. Foram utilizadas células de camundongo da linhagem MDPC-23, cultivadas em garrafas de cultura até a subconfluência. Em seguida, as células foram cultivadas em placas de 24 poços em uma concentração de 10^4 /poço e divididas em cinco grupos: células sem adição do GSE, células + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 10 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 20 $\mu\text{g/mL}$ de GSE. Após 3, 7 e 10 dias, foram analisados os seguintes parâmetros: proliferação e viabilidade celular, detecção e atividade de fosfatase alcalina, quantidade de proteína total, detecção e quantificação de nódulos mineralizados, expressão quantitativa dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* por meio de PCR em tempo real e sua expressão proteica correspondente por meio de imunolocalização. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e submetidos aos testes estatísticos ANOVA e Kruskal-Wallis, com nível de significância estabelecido em 5%. Os resultados mostraram proliferação e viabilidade celular com as concentrações mais baixas de GSE (0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$), assim como a atividade de síntese de proteínas totais e da fosfatase alcalina. A deposição de nódulos mineralizados foi significativamente maior com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Esta mesma concentração favoreceu a

expressão quantitativa dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* e a secreção das proteínas correspondentes vistas por imunolocalização. Conclui-se que baixas concentrações do extrato de semente de uva podem influenciar e favorecer a atividade de células odontoblastoides, contribuindo para a regeneração dentinária, devido à suas características antioxidantes e biomineralizadoras.

Palavras-chave: Extrato de semente de uva. Proantocianidina. Odontoblastos. Estudo *in vitro*.

Abstract

ABSTRACT

REZENDE, Patricia Helena Colbachini. ***In vitro* study of the stimulatory potential of grape seed extract (GSE) in the functional activity and gene expression of odontoblast-like cells from MDPC-23 line.** 2018. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

The process of dentinogenesis generally involves several steps of cell differentiation, culminating with an extracellular matrix very similar to bone tissue. Dentin regeneration may be necessary in cases of pulp exposure, root resorption and carious lesions. Studies on functional regeneration of lost tissues are being carried on recently, based on the presence of cells, scaffolds and/or substances that induce cell proliferation and differentiation. Among the several substances which can interact with cell metabolism are the extracts rich in proanthocyanidin, bioactive phenolic compounds present in fruits, vegetables and seeds. The purpose of this project is to evaluate the stimulatory potential of four different concentrations of grape seed extract (GSE) in the functional activity of odontoblast-like cells. MDPC-23 cell line was seeded in culture flasks until subconfluence followed by cell seeding in 24-well culture plates in the concentration of 10^4 /well and divided in five groups: 1) cells without GSE, 2) cells + 0,1 $\mu\text{g/mL}$ of GSE; 3) cells + 1 $\mu\text{g/mL}$ of GSE; cells + 10 $\mu\text{g/mL}$ of GSE and cells + 20 $\mu\text{g/mL}$ of GSE. After 3, 7 and 10 days, there were evaluated the following parameters: cell proliferation and differentiation, ALP detection and activity, total protein content, mineralization detection and quantification, as well as the expression of genes *Alp*, *Col1a1* and *Dmp1* through Real Time PCR and their corresponding proteins by means of immunolocalization. Data were analyzed by ANOVA and Kruskal-Wallis statistical tests, with significance level set at 5%. The results demonstrated cell proliferation and viability with low GSE concentrations (0,1 and 1 $\mu\text{g/mL}$), as well as total protein content and ALP activity. Deposition of mineralized nodules was significantly increased with the GSE concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$. The same concentration favoured the expression of genes *Alp*, *Col1a1* and *Dmp1* as well as the corresponding proteins. It is concluded that low concentrations of grape seed extract may influence functional activity of odontoblast-

like cells, contributing to dentin regeneration by means of its antioxidant and biomineralizing properties.

Key words: Grape seed extract. Proanthocyanidin. Odontoblasts. *In Vitro* study.

Lísta de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Beta Actina
ALP	Fosfatase Alcalina
ANOVA	Análise de Variância
BMP-2	Proteína Óssea Morfogenética 2
BMP-7	Proteína Óssea Morfogenética 7
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico
cm²	centímetro quadrado
cm³	centímetro cúbico
CO₂	gás carbônico
Col1A1	colágeno tipo 1
Ct cycle	Threshold (ciclo limiar)
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DEPC	dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP1	Proteína da Matriz Dentinária 1
DPP	Fosfoproteína Dentinária
DSP	Sialoproteína Dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína Dentinária
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
e.g.	Exempli gratia
EGF	Epidermal Growth Factor
EUA	Estados Unidos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fast Red	(4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate)
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

g	grama
G	Grupo
GSE	Grape Seed Extract
hs	Horas
i.e.	Id est
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
M	Molaridade (molar)
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTA	Agregado de Trióxido Mineral
MTS	Meio Total Suplementado
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m/v	Percentagem massa por volume
N	Número
Nm	Nanômetro
OH	Hidroxila
P	Página
PB	Phosphate-Bufferid
PBS	Phosphate-Bufferid Saline-solução tampão
pH	potencial Hidrogeniônico
PACs	Proantocianidinas
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	rotações por minuto
ROS	Reactive Oxygen Species
Rt.PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

TA	Temperatura Ambiente
TAqMan	sondas de hidrólisis- PCR
TGF-B	Fator de Crescimento Transformador Beta
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µg/mL	microgramas por mililitros
UV	Ultravioleta
v/v	percentagem em volume
V	volume
X	fração em Mol
°C	graus Celsius
I	1
III	3
V	5
/	por

Lísta de Figuras e Tabelas

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Delineamento Experimental.....	63
Figura 2.	A. Células odontoblastoides MDPC-23 em cultura. Microscópio de fase invertido, aumento de 20x. B. Células odontoblastoides MDPC-23 3 dias após o plaqueamento. Microscópio de fluorescência, aumento de 20x.....	65
Figura 3.	Atividade de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 expostas à 5 concentrações de GSE (0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL). Teste estatístico ANOVA para $p<0,05$	66
Figura 4.	Diluição da solução mãe em 4 concentrações de GSE: meio de cultura sem GSE, com 0,1, 1, 10 e 20 µg/mL.....	67
Figura 5	A. Ensaio bioquímico para avaliação da atividade de fosfatase alcalina. B. Leitura dos dados numéricos em espectrofotômetro.....	69
Figura 6.	Lamínula de vidro colocada no fundo dos poços para posterior cultura celular e realização da imunolocalização.....	73
Figura 7.	Células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Microscópio invertido, aumento de 20x.....	77
Figura 8.	Proliferação e viabilidade de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis e ANOVA para $p<0,05$	79
Figura 9.	Atividade de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis e ANOVA para $p<0,05$	80
Figura 10.	Análise qualitativa da detecção <i>in situ</i> de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura.....	81
Figura 11.	Análise quantitativa da detecção <i>in situ</i> de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p<0,05$	82

Figura 12.	Análise quantitativa da quantidade de proteína total em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$	84
Figura 13.	Análise quantitativa da formação de nódulos mineralizados em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$	85
Figura 14.	Ensaio de integridade do RNA ribossômico.....	86
Figura 15.	Expressão quantitativa do gene <i>Alp</i> em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$	88
Figura 16.	Expressão quantitativa do gene <i>Col1a1</i> em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$	89
Figura 17.	Expressão quantitativa do gene <i>Dmp1</i> em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$	90
Figura 18.	Imunolocalização da proteína Alp em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo).....	92
Figura 19.	Imunolocalização da proteína Col1a1 em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo).....	93

Figura 20. Imunolocalização da proteína Dmp1 em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo)..... 94

TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de qRT- PCR..... 72

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS	57
2.1 Objetivo geral	59
2.2 Objetivos específicos.....	59
2.2.1 Ensaio Bioquímicos	59
2.2.2 Ensaio Molecular	59
2.2.3 Ensaio de Imunolocalização	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 Delineamento experimental	63
3.2 Obtenção das células	63
3.3 Cultura celular	64
3.4 Administração <i>in vitro</i> do extrato de semente de uva (GSE).....	65
3.5 Divisão dos grupos.....	66
3.6 Ensaio Bioquímicos	67
3.6.1 Proliferação e Viabilidade Celular	67
3.6.2 Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina	68
3.6.3 Detecção <i>in situ</i> de fosfatase alcalina por meio da coloração de <i>Fast Red</i>	69
3.6.4 Detecção e quantificação de matriz mineralizada	70
3.7 Expressão gênica por meio de PCR em tempo real	70
3.8 Imunolocalização.....	72
3.9 Análise Estatística	73
4. RESULTADOS	75
4.1 Cultura das Células MDPC-23.....	77
4.2 Ensaio Bioquímicos	78
4.2.1 Proliferação e Viabilidade celular.....	78
4.2.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	78
4.2.3 Detecção <i>in situ</i> de fosfatase alcalina.....	81
4.2.4 Quantidade de proteína total	83
4.2.5 Detecção e quantificação de matriz mineralizada	83
4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	85
4.3.1 Avaliação da integridade do RNA Total	85
4.3.2 Expressão quantitativa dos genes associados à dentinogênese	86
4.4 Imunolocalização.....	91

5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	121

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O complexo dentina-polpa é capaz de responder a injúrias (e.g., cáries, traumas, preparos cavitários, procedimentos restauradores) por meio da deposição de tecido mineralizado. Este mecanismo envolve a solubilização dos constituintes da matriz dentinária, que podem induzir à diferenciação odontoblástica e à formação de dentina terciária. Neste contexto, os processos de reparo compreendem uma cascata de eventos celulares e moleculares resultando na formação de matriz, vasos e terminações nervosas (*Rosa et al., 2017*).

O desenvolvimento de técnicas na área de reparo e regeneração de órgãos e tecidos afetados por doenças, traumas e deformidades congênitas é uma realidade, devido aos avanços nas áreas de biologia molecular e celular. A multidisciplinaridade da engenharia tecidual, que agrega os princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas, permite o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de manter, restaurar ou aprimorar a função de órgãos e tecidos. Esta ciência encontra-se sedimentada em três componentes: células, matrizes biocompatíveis e moléculas bioativas, que são responsáveis pela sinalização morfogenética (*Reddi, 1998; Nakashima e Reddi, 2003; Casagrande et al., 2009*). Materiais capeadores como o hidróxido de cálcio e o MTA podem resultar em ganhos na formação de nova dentina (*Iohara et al., 2004; Paranjpe et al., 2010*) e são até hoje o padrão ouro e os materiais de escolha para terapias pulpares diretas e indiretas (*Rosa et al, 2017*), mas avaliações histológicas cuidadosas têm indicado que nenhum destes protocolos pode restaurar totalmente a arquitetura fisiológica da dentina original (*Ishimatsu et al., 2009*). Assim, a procura de novos materiais derivados de substâncias naturais poderia oferecer alternativas para o tratamento clínico em casos onde a regeneração do complexo dentina-polpa não foi alcançada pela habilidade inerente do tecido.

É interessante observar que o grupo de moléculas envolvido na regulação da diferenciação e produção de matriz pelos odontoblastos durante os estágios iniciais de dentinogênese também influenciam o processo de reparação dentinária (*Mitsiadis e Rahiotis, 2004*). No processo de dentinogênese, a dentina é formada por células altamente especializadas, os odontoblastos, localizadas na periferia da polpa dentária, sendo responsáveis pela secreção e mineralização da matriz (*Goldberg et al., 2004; Kimura et al., 2016*). Elas se originam da papila dentária e sua maturação

ocorre após sucessivas alterações morfológicas e funcionais, incluindo polarização celular, formação do processo odontoblástico, síntese e secreção proteica. Já o corpo da dentina é constituído por 90% de colágeno tipo I (*Col1a1*) com alguns traços de colágeno tipo III e V (*Tjäderhane et al., 2009*). Outros componentes da matriz dentinária incluem proteínas não colágenas como as proteoglicanas, sialoproteínas dentinárias, fosfoproteínas, proteínas ósseas morfogenéticas, enzimas e fatores de crescimento (*Breschi et al., 2018*). Os colágenos, entre eles o tipo I, representam uma família de moléculas triméricas da matriz extracelular usadas pelas células para a integridade estrutural de vários tecidos conjuntivos. As unidades elementares do colágeno são aminoácidos representados pela glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Estudos como o de *Shao et al. (2018)* mostraram que aminoácidos que contêm carga, especialmente aqueles com grupos carboxila, se ligam ao cálcio para servir de sítios nucleadores para a formação inicial de hidroxiapatita na biomineralização. De acordo com *Breschi et al. (2018)*, o colágeno da dentina não sofre remodelação e não é facilmente degradado. Esta estabilidade se dá pela lenta formação de ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares que ocorrem entre a terminação C de uma molécula de colágeno e a terminação N de uma molécula vizinha (*Yamauch e Shiiba, 2008*). A dentina possui o colágeno com maior quantidade de ligações cruzadas no corpo humano e as mesmas podem influenciar as propriedades mecânicas das fibrilas colágenas, lhes fornecendo força e estabilização (*Castellan et al., 2013*). Assim, a quebra destas ligações pode resultar em severa disfunção tecidual (*Miura et al., 2014*).

A estrutura final da dentina mineralizada conta com o auxílio das proteínas não colagenosas, um grupo numeroso de moléculas que reflete a complexidade dos eventos celulares capazes de promover a formação e regeneração dentinária. Entre elas, podemos citar a fosfatase alcalina (ALP), que é secretada pelos odontoblastos e participa do processo de mineralização (*Butler e Ritchie, 1995*), constituindo um marcador fenotípico da diferenciação odontoblástica e uma enzima crítica na calcificação (*Tang e Saito, 2017*). Outro exemplo é a proteína da matriz dentinária tipo 1 (DMP1), a qual possui um papel na mineralização da matriz (*Goldberg et al., 2011, Kawasaki e Weiss, 2008*), podendo agir tanto intra quanto extracelularmente como molécula sinalizadora (*Ravindran e George, 2014*), influenciando a diferenciação odontoblástica (*Narayanan, 2003 e 2006*).

Após a formação completa do elemento dentário, a dentina é continuamente depositada de maneira fisiológica e uniforme. Em resposta à injúrias, se a polpa for capaz de manter sua vitalidade, um mecanismo de deposição de dentina terciária é iniciado em locais específicos na interface polpa-dentina. Apesar do resultado final ser a deposição de matriz dentinária, duas sequências biológicas distintas ocorrem dependendo da sobrevivência dos odontoblastos já existentes: a dentinogênese reacionária e a dentinogênese reparadora (*Sangwan et al., 2012*). A reacionária geralmente resulta de uma injúria moderada onde a dentina terciária é secretada pelo estímulo de odontoblastos locais pré-existentes. Por outro lado, a dentinogênese reparadora envolve a secreção de matriz dentinária por uma nova geração de odontoblastos após a morte dos existentes em resposta à uma injúria pulpar direta ou severa (*Lesot et al. 1993, Smith et al. 1994*).

O grau de severidade de uma injúria no complexo dentina-polpa pode muitas vezes impedir a adequada resposta pulpar, impedido a formação adequada e necessária de dentina terciária para sua proteção. Assim, o desenvolvimento de técnicas de manipulação celular e regeneração tecidual, baseadas principalmente na interação celular e utilização de arcabouços e/ou substâncias, poderia estimular a proliferação e diferenciação celular (*Ferreira et al., 2015*), favorecendo a formação dentinária. Apesar dos resultados promissores observados com os materiais hoje em dia utilizados, o sucesso clínico ainda não é adequado, principalmente em dentes afetados por cáries (*Barthel et al, 2000*).

Furey et al. (2010) afirmam que o hidróxido de cálcio é o biomaterial clássico mais utilizado para estimular a formação da ponte dentinária resultando no reparo mas sua efetividade têm sido questionada há algum tempo (*Ward, 2002*). Em estudo realizado por *Poggio et al. (2015)*, foi avaliada a biocompatibilidade *in vitro* de vários materiais capeadores em contato com as células odontoblastoides MDPC-23, mostrando que os materiais à base de hidróxido de cálcio apresentaram os maiores efeitos citotóxicos. Os mesmos autores sugerem que o hidróxido de cálcio apresenta fraca ligação à dentina, alta solubilidade e instabilidade mecânica. Segundo *Cox et al. (1996)*, o hidróxido de cálcio causa inflamação persistente na polpa dentária formando uma ponte de dentina porosa. Outro biomaterial muito utilizado na odontologia é o MTA (agregado de trióxido mineral). Ele é composto de silicato tricálcico, aluminato tricálcico e óxido de bismuto e sua biocompatibilidade é vista pela formação de tecido mineralizado por meio da expressão da proteína

morfogenética óssea BMP-2. O MTA promove a formação de uma ponte dentina de melhor qualidade e menor inflamação pulpar do que o hidróxido de cálcio após o capeamento pulpar em humanos. Apresenta, porém, como desvantagens, manipulação relativamente longa, alto custo, pH elevado, baixa força de compressão e potencial para descoloração (Moghaddame-Jafari *et al.*, 2005, Yasuda *et al.*, 2008, Chang *et al.*, 2016).

Outra alternativa tem sido o uso de fatores de crescimento como BMP7 (*bone morphogenetic protein 7*), EGF (*epidermal growth factor*), TGF- β (*Transforming growth factor beta*) e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), que podem estimular a diferenciação osteoblástica e formação dentinária (Furey *et al.*, 2010). Entretanto, para a utilização destas substâncias é necessária a associação de arcabouços que lhes sirvam de carreadores (Sivashankari *et al.*, 2016). Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de novos agentes bioativos com baixa toxicidade e fácil manuseio para o capeamento pulpar.

Entre os novos materiais alternativos, extratos ricos de plantas têm mostrado bioatividade pronunciada em componentes celulares e da matriz extracelular, principalmente devido à presença de fenóis. De todos os produtos fenólicos, os derivados da uva têm recebido bastante atenção por seu alto potencial antioxidante (López-Sepúlveda R. *et al.*, 2008; Leifert WR, 2008). Os produtos da uva derivados da pele, sementes, polpa e haste são boas fontes dos compostos fenólicos, mas mais de 70% dos mesmos estão concentrados nas suas sementes (Pastrana-Bonilla, 2003).

Os fenóis encontrados nas sementes de uva são derivados dos taninos, que podem ser classificados em hidrolisáveis e catéquicos. Estes últimos, também chamados de condensados, originam moléculas de elevado peso molecular denominadas proantocianidinas. As proantocianidinas (PACs) envolvem oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, exemplificados pela catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina (Aguilar *et al.*, 2014). Extratos ricos em PACs têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios (Park *et al.*, 2012; Zhou *et al.* 2011), anti-carcinogênicos (Uchino *et al.*, 2010), anti-mutagênicos (Sharma e Katiyar, 2010) e anti-isquêmicos (Song *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012), bem como proteção cardíaca (Bagchi *et al.*, 2003; Dermirkaya *et al.*, 2009) e neurológica (Ahn *et al.*, 2011). No campo da odontologia, é sugerido que podem favorecer as propriedades biomecânicas da

dentina e sua bioestabilidade (Castellan *et al.*, 2011). Segundo Guang *et al.* (2001), possuem um amplo espectro biológico, farmacológico e atividade terapêutica contra radicais livres e o estresse oxidativo. Suas habilidades antioxidantes excedem às das vitaminas C e E (Bagchi *et al.*, 1997) As PACs são altamente solúveis em água, encontradas em várias plantas em alta quantidade e podem ser absorvidas naturalmente (Aruoma *et al.*, 2006).

Segundo Phansalkar *et al.* (2015), as PACs presentes no extrato de semente de uva (GSE) têm grande potencial como biomodificadoras da dentina, promovendo maior rigidez e estabilidade para o tecido dentinário. O mecanismo de ação das PACs ocorre por meio da sua intermediação das ligações cruzadas do colágeno, ligando e melhorando as propriedades do tecido à base desta proteína, como a dentina. A extensão e natureza da ligação cruzada é influenciada pela composição e estrutura química específica do composto bioativo presente em extratos ricos em PACs (Vidal *et al.*, 2014).

Além de suas propriedades biomodificadoras, as PACs exercem efeitos protetores celulares através da redução do dano mitocondrial e inibição da apoptose celular (Gao *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2014) por meio de suas propriedades antioxidantes. Segundo Fraga e Oteiza (2011), as proantocianidinas poderiam ter um efeito antioxidante direto e limitado localmente em tecidos ou órgãos onde altas concentrações dos compostos podem ser alcançados. Elas também poderiam atingir efeitos antioxidantes indiretos por meio da regulação de enzimas que geram oxidantes ou prevenindo a ligação proteína-receptor que podem iniciar a produção dos oxidantes. Artigos associando a utilização do GSE rico em proantocianidinas com o tecido mineralizado mostram resultados favoráveis em parâmetros *in vivo* como: (1) na diminuição do processo inflamatório da periodontite, resultando em menor perda óssea em ratos diabéticos (Toker *et al.*, 2018); (2) na diminuição da destruição óssea em camundongos submetidos à modelo experimental de artrite reumatóide (Park *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2009); (3) no aumento de massa óssea do côndilo mandibular em animais com dieta pobre em cálcio (Kojima *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* como o de Zhang *et al.* (2014) observaram uma atividade anti-apoptótica das proantocianidinas da semente de uva em células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1. Os autores sugerem o mecanismo de ação das PACs principalmente devido à uma inibição nos

níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio), implicando em um forte efeito contra a disfunção mitocondrial.

As propriedades biomodificadoras do GSE na dentina têm sido bastante estudadas em osteoblastos e no tecido mineralizado ósseo, mas não existem dados na literatura demonstrando o efeito do GSE e das PACs em células que produzem matriz mineralizada dentinária, i.e., os odontoblastos. Assim, foi verificada e testada a hipótese de que o extrato de semente de uva pode influenciar positivamente a atividade funcional de células odontoblastoides, oferecendo uma nova terapia para a regeneração dentinária. As hipóteses nulas foram: (1) a aplicação *in vitro* de diferentes concentrações de GSE não influencia a atividade funcional proteica e mineralizadora na cultura de células odontoblastoides, (2) a aplicação *in vitro* de diferentes concentrações de GSE não influencia a expressão quantitativa de genes e suas proteínas correspondentes associados à dentinogênese em células odontoblastoides.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de estímulo do extrato de semente de uva (GSE) em diferentes concentrações na atividade funcional de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23.

2.2 Objetivos específicos

Os parâmetros analisados foram:

2.2.1 Ensaaios Bioquímicos

- Proliferação e Viabilidade celular (MTT);
- Atividade de fosfatase alcalina (Alp);
- Detecção *in situ* de fosfatase alcalina pela coloração de Fast red;
- Quantificação de proteínas totais;
- Detecção e quantificação de matriz mineralizada.
-

2.2.2 Ensaio Molecular

- Expressão quantitativa por meio de PCR em tempo real dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1*, associados ao processo de dentinogênese.

2.2.3 Ensaio de Imunolocalização

- Localização das proteínas *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* nas células odontoblastoides por meio de análise em imunofluorescência.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Figura 1. Delineamento Experimental.

3.2 Obtenção das células

Células da linhagem odontoblastóide de camundongos (MDPC-23) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan (Ann Arbor, USA). Esta é uma linhagem celular espontaneamente imortalizada derivada de células da papila dentária do primeiro molar de fetos de camundongos. São células com formato epitelióide (Rodriguez *et al.*, 2009) que apresentam alta atividade de fosfatase alcalina e habilidade para formar nódulos calcificados em multicamadas e um tempo de duplicação de 24 horas (Hanks *et al.*, 1998). Além disso, essa linhagem celular é a única que sintetiza proteínas como a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), que é clivada em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP). As células permanecem no Laboratório de Cultura Celular da FORP-USP e são

conservadas em tubos criogênicos de 2 mL em tanques de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção de culturas (Figura 2).

3.3 Cultura celular

No presente trabalho, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² em 10 mL de meio de cultura D-MEM, 10% de soro fetal bovino e 2,75 mL de penicilina-estreptomicina. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada dois dias. Após a confluência, as células foram removidas das garrafas de cultura por meio de tratamento com EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco). Em seguida, as células foram cultivadas em placas de cultura em contato com as concentrações selecionadas do extrato de semente de uva após o experimento de curva dose-resposta.

Figura 2. A. Células odontoblastoides MDPC-23 em cultura. Microscópio invertido, aumento de 20x. B. Células odontoblastoides MDPC-23 3 dias após o plaqueamento. Microscópio de fluorescência, aumento de 20x.

3.4 Administração *in vitro* do extrato de semente de uva (GSE)

O extrato de semente de uva utilizado nessa pesquisa foi o Meganatural BP® (Polyphenolics Inc., Madera, California), gentilmente cedido pela Professora Doutora Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, da FORP-USP, por meio de uma parceria realizada com a Professora Ana Bedran-Russo, da Universidade de Illinois, Chicago. Este extrato apresenta 93,9 g de compostos fenólicos em cada

100g de extrato. Esses compostos são principalmente proantocianidinas formadas por misturas de oligômeros e polímeros das catequinas e epicatequinas (*Edirisingle et al., 2008*).

No dia do plaqueamento, foram adicionados ao meio de cultura (odontogênico) 50 μg de ácido ascórbico para promover a formação de colágeno e matriz extracelular (*Franceschi et al., 1994*) e 2mM de beta-glicerolfosfato para a formação e mineralização de nódulos em multicamadas (*Tenenbaum, 1981*). A partir de uma solução mãe, foram utilizadas primeiramente cinco diferentes diluições de GSE para realizar um experimento de curva dose-resposta com os seguintes grupos: células sem adição do GSE, células + 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 10 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 100 $\mu\text{g/mL}$ de GSE; células + 1000 $\mu\text{g/mL}$ de GSE. A troca dos meios ocorreu a cada 2 dias e no sétimo dia de cultura foi realizado o ensaio de atividade de fosfatase alcalina. Este experimento permitiu a seleção de quatro concentrações para a obtenção de resultados a partir dos parâmetros propostos (Figura 3).

Figura 3. Atividade de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 expostas à 5 concentrações de GSE (0,1, 1, 10, 100 e $\mu\text{g/mL}$). Teste estatístico ANOVA para $p < 0,05$.

3.5 Divisão dos grupos

A partir de uma solução mãe, foram utilizadas quatro diferentes concentrações selecionadas de GSE: 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$.

dissolvidos em meio de cultura odontogênico (Figura 4). O GSE foi colocado em contato com as células durante todo o período de cultivo das mesmas e renovado a cada troca de meio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com $n=5$ para cada parâmetro proposto. Foi realizado o plaqueamento com 1 mL de meio de cultura por poço e acrescidas as células MDPC-23. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e os experimentos realizados após 3, 7 e 10 dias.

Figura 4. Diluição da solução mãe em 4 concentrações de GSE: meio de cultura sem GSE, com 0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

3.6 Ensaios Bioquímicos

3.6.1 Proliferação e Viabilidade Celular

Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolio]] (Sigma). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT + MTS por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passado esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e, em seguida, adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL foram removidas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) em comprimento de onda de 570nm.

3.6.2 Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina

Após 3, 7, 10 dias de cultura celular, o meio de cultura foi removido das placas e os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C para remoção das células não aderidas e do meio de cultura sobressalente. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e deixados à temperatura ambiente (TA) por 30 minutos antes de iniciar os ensaios:

a) Proteína total: a dosagem de proteína foi realizada seguindo o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para isso, 500µL das amostras contidas em cada poço da placa de cultura foram transferidos aos respectivos tubos de ensaio, ao qual foi adicionado 500µL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em T.A. por 20 minutos. Após este período, 250µL da solução de Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma) foram adicionados aos tubos, que após agitação, ficaram em TA por 30 minutos para desenvolvimento da coloração azul. Passado o tempo, a absorbância de cada tubo foi determinada em um espectrofotômetro (Bio-Tek), em comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma). Os resultados foram utilizados para normalização da atividade da fosfatase alcalina.

b) Atividade de ALP: Foi determinada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando o kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio para os grupos testes, padrão e branco. Em todos

os tubos foram adicionados 50 μ L de substrato e 500 μ L de solução tampão; somente no tubo padrão foram acrescentados 50 μ L da solução padrão. Posteriormente, todos os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C, para a realização do experimento. Foram acrescentados 50 μ L das amostras aos respectivos tubos testes em uma etapa realizada em intervalo máximo de 10 minutos. Decorrido o tempo, 2 mL do reagente de cor foram adicionados a todos os tubos de ensaio e, em seguida, determinou-se a absorbância em espectrofotômetro (Bio-Tek), no comprimento de onda de 590 nm. Os dados da atividade de ALP foram normalizados pelo conteúdo de proteína total (Figuras 5A e 5B).

Figura 5. A. Ensaio bioquímico para avaliação da atividade de fosfatase alcalina. B. Leitura dos dados numéricos em espectrofotômetro.

3.6.3 Detecção *in situ* de fosfatase alcalina por meio da coloração de *Fast Red*

A detecção *in situ* de Alp foi realizada aos 3, 7 e 10 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20 mL de água deionizada e foi adicionado 7 mg do reagente *Fast Red* (Sigma). Foram desprezados 2 mL desta solução e acrescentados 8 mg de Naftol (Sigma) diluídos em 2 mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa foi seca à temperatura ambiente para posterior análise qualitativa.

3.6.4 Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A detecção de matriz mineralizada foi avaliada ao final dos 10 dias de experimento. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes com solução de Hanks e foram adicionados 2 mL de álcool 70% para fixação e mantidos a 4°C por 60 minutos. O álcool 70% foi removido, foi feita a lavagem dos poços uma vez com PBS e uma vez com água bidestilada. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina a 2%, pH 4,2 (Sigma), à temperatura ambiente por 15 minutos e as áreas de mineralização ricas em cálcio foram evidenciadas pela coloração vermelha. Em seguida, os poços foram lavados com água bidestilada e preenchidos com PBS por 15 minutos. Os poços foram novamente lavados com água bidestilada e secos à temperatura ambiente (Raucci, 2013; Oliveira *et al.*, 2008).

Para quantificação da coloração segundo método de Gregory *et al.* (2004), 280 µL de ácido acético a 10% (Labsynth, Lab Ltda, Diadema, SP, Brasil) foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada com o auxílio de uma ponteira e a solução transferida para tubos eppendorf de 1,5mL, aquecida a 85°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. Um volume de 150 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40 µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405 nm.

3.7 Expressão gênica por meio de PCR em tempo real

Para avaliar a expressão dos genes da fosfatase alcalina (*Alp*), colágeno do tipo I (*Col1a1*) e proteína da matriz dentinária (*Dmp1*) ao final de 3, 7 e 10 dias de experimento, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à temperatura ambiente, sob agitação por pipetagem. As amostras foram transferidas para tubos eppendorf e armazenadas em freezer a -20°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA) e sua integridade avaliada

por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Bioanalyser 2100 Agilent* e com o *RNA 6000 Nano Chips* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O resultado da quantificação foi obtido com o auxílio do *Agilent 2100 Expert Software*.

Foi realizada a eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). Para o preparo da água, foi adicionado 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada à TA por 24 hs e autoclavada por 30 minutos. O gel foi preparado dissolvendo-se 3g de agarose (Gibco) em 144 mL de água DEPC. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65⁰C e, então, foram adicionados 36 mL de formaldeído a 12,3 M (Merck), 7 µL de GelRed (Biotium, Inc, Hayward, CA, EUA) e 20 mL de tampão de corrida, constituído de 50 mM de acetato de sódio (Merck, HE, Alemanha), 5 mM de EDTA (Merck) e 100 mM de ácido 3- [N- morfolino] propanosulfônico (MOPS, Sigma). A mistura foi despejada em fôrmas adequadas para moldagem do gel. Para o preparo das amostras, foram adicionados 3 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida, 4 µL de formaldeído a 12,3 M e 10 µL de formamida (Merck). Esta mistura foi aquecida a 4⁰C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado o tampão de amostra, composto por 50 % de glicerol (v/v), 0,25% de azul de bromofenol (m/v), 0,25% de xileno cianol (m/v) e 10 nM de EDTA em água DEPC. A eletroforese foi conduzida a 60 V durante 1 a 3 horas, utilizando-se tampão de corrida. Após esse período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta (UV) a 300 nm. A integridade do RNA foi verificada pela visualização de 2 subunidades (18S e 28S) do RNA ribossômico presente em organismos eucariotos.

O passo seguinte foi a confecção da fita de cDNA a partir de 1µg de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Fort City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações de *Real-time PCR*, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems) para genes-alvo em equipamento CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata, utilizando: 5µL de *TaqMan Gene Expression*

Master Mix, 0,5µL de sonda TaqMan para os genes de interesse e 4,5µL de cDNA (11,25ng), para um volume final de 10µL/reação.

Tabela 1- Primers Utilizados nas reações de qRT- PCR

<i>Símbolo do gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>
<i>Alp</i>	Forward	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA
	Reverse	GGCTACATTGGTGTT GAGCTTTT
<i>Col1a1</i>	Forward	GCTCCTCTTAGGGGCCACT
	Reverse	CCACGTCTCACCATTGGGG
<i>Dmp1</i>	Forward	CCAGAGGGACAGGCAAATAG
	Reverse	CTGGACTGTGTGGTGTCTGC
<i>ACT</i>	Reverse	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA
	Reverse	GTAAACGCGAGCTCAGTAACAGTCCG

As reações de amplificação consistem em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold*, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras). Como controle endógeno foi utilizada a beta-actina. Os níveis de expressão do controle endógeno foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001). Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pela beta-actina.

3.8 Imunolocalização

Para a imunolocalização das proteínas *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1*, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro (Figura 6) e após 3 dias de cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (De Oliveira e Nanci, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Os anticorpos primários monoclonais e/ou policlonais para fosfatase alcalina (*Sigma-Aldrich, USA*), colágeno tipo I e *Dmp1* (*Larry Fisher, USA*) foram diluídos em concentrações de

trabalho (1:200) e incubados por 1 hora, seguidos de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas à lamínula, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). A substituição dos anticorpos primários por PB foi usada como controle negativo. Após montagem de lamínula de vidro sobre os discos, com meio de montagem *anti-fade* (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).

Figura 6. Lamínula de vidro colocada no fundo dos poços para posterior cultura celular e realização da imunolocalização.

3.9 Análise Estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Mann-Whitney quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada por meio do software *GraphPad Prism*.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Cultura das Células MDPC-23

As células foram cultivadas por um período de 10 dias, e observadas em microscópio invertido ao longo do experimento. Foi observado que as células do grupo controle assim como as células em contato com as concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ mostraram aumento qualitativo na adesão e proliferação dos 3 aos 10 dias. Em contato com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, observou-se um atraso na adesão e espraio celular, mas com recuperação aos 10 dias. Já as células em contato com a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ mostraram uma diminuição da adesão e consequente proliferação das células nos poços de cultura (Figura 7).

Figura 7. Cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Microscópio invertido, aumento de 20x.

4.2 Ensaios Bioquímicos

4.2.1 Proliferação e Viabilidade celular

O ensaio de proliferação e viabilidade celular realizado por meio do MTT (Figura 8) mostrou um aumento da proliferação celular e viabilidade ao longo do período de cultura. Aos 3 dias, podemos observar que não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos que receberam as diferentes concentrações; entretanto, o grupo que recebeu 0,1 $\mu\text{g/mL}$ mostrou um aumento significativo na proliferação quando comparado ao grupo com 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0019$). Aos 7 dias, os dados mostram que não houve diferença estatística entre os grupos controle e os grupos 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$, os quais mostraram aumento significativo na proliferação e viabilidade quando comparados aos grupos com 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.0001$). Aos 10 dias, todas as concentrações utilizadas promoveram proliferação e viabilidade similares ao controle, exceto a de 10 $\mu\text{g/mL}$ que mostrou uma diminuição significativa ($p=0,016$).

4.2.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A Figura 9 mostra que aos 3 dias não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto à atividade de o fosfatase alcalina nos poços com as células MDPC-23. Já aos 7 dias, que foi o pico de atividade ao longo do experimento, é visível que as células expostas à concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade similar às células do grupo controle. Os grupos com 0,1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade significativamente menor que o grupo controle e grupo 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.0001$). Aos 10 dias, a atividade de ALP caiu similarmente para os grupos controle, 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que foi significativamente maior nos grupos 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.0001$).

Figura 8. Proliferação e viabilidade de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis e ANOVA para $p < 0,05$.

Figura 9. Atividade de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Testes estatísticos de Kruskal-Wallis e ANOVA para $p < 0,05$.

4.2.3 Detecção *in situ* de fosfatase alcalina

As imagens da Figura 10 mostram um aumento na detecção *in situ* da fosfatase alcalina ao longo do tempo, com um pico aos 7 dias de cultura. A análise qualitativa aos 3 dias mostra uma similaridade na presença da proteína nos grupos controle e com as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Aos 7 dias todos os grupos mostram uma grande deposição de fosfatase alcalina de maneira similar. Já aos 10 dias a deposição de *Alp* continua com intensidade um pouco menor em todos os grupos. A análise quantitativa (Figura 11) não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais nos períodos de 3 e 7 dias. Aos 10 dias os poços do grupo controle apresentaram coloração similar aos dos grupos expostos às concentrações de 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, exceto para o grupo de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.0148$). Entre os grupos com GSE, houve diferença estatística entre os grupos com 0,1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.0304$).

Figura 10. Análise qualitativa da detecção *in situ* de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) após 3, 7 e 10 dias de cultura.

Figura 11. Análise quantitativa na detecção *in situ* de fosfatase alcalina em cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.2.4 Quantidade de proteína total

A quantidade de proteína total mostrou comportamento similar aos 3 e 7 dias de cultura, com um pico de 3 dias e subsequente diminuição e estabilização ao longo do experimento (Figura 12). Houve um aumento significativo aos 3 e 7 dias no grupo de células exposto à concentração de 0,1 µg/mL quando comparado ao grupo com 20 µg/mL ($p < 0,0003$ e $p < 0,0002$ respectivamente). Já aos 10 dias, não houve diferença estatística entre os grupos controle e expostos ao GSE, ao passo que entre os grupos com o extrato, houve uma diminuição no conteúdo de proteína total no grupo com 0,1 µg/mL quando comparado aos grupos com 10 e 20 µg/mL.

4.2.5 Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A análise qualitativa e quantitativa dos nódulos mineralizados após 10 dias de cultura mostrou uma similaridade na quantidade de nódulos entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração de 0,1 µg/mL de GSE (Figura 13). Já o grupo de células em contato com 1 µg/mL de GSE mostrou um aumento estatisticamente significativo quando comparado aos outros grupos na formação de matriz mineralizada ($p < 0,0001$). Por outro lado, os grupos expostos às concentrações de 10 e 20 mostraram diminuição significativa em relação ao controle e grupo expostos à 0,1 e 1 µg/mL de extrato ($p < 0,0001$).

Figura 12. Quantidade de proteína total na cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 , 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Mineralização

Figura 13. Análise qualitativa e quantitativa de nódulos mineralizados na cultura de células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

4.3.1 Avaliação da integridade do RNA Total

A Figura 14 mostra que a integridade do RNA foi verificada previamente aos ensaios de PCR em tempo real pela visualização de duas subunidades ribossômicas características de células eucarióticas (18S e 28S). Foi utilizado o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* com os *RNA 6000 Nano Chips* (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA) para avaliar a viabilidade das amostras (só foram utilizadas aquelas com valores de RIN superiores à 7,5 (scores variando de 0 a 10)

Figura 14. Ensaio de integridade do RNA ribossômico.

4.3.2 Expressão quantitativa dos genes associados à dentinogênese

A expressão quantitativa dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* foi influenciada pela presença das diferentes concentrações de GSE nas culturas de células odontoblastoides MDPC-23. Não foi possível avaliar a expressão das células expostas à concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ pela quantidade insuficiente de RNA para realizar o experimento. Para os grupos analisados, a expressão de *Alp* (Figura 15) teve um pico aos 7 dias com subsequente diminuição aos 10 dias. Aos 3 dias de cultura, não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos expostos a 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, as células expostas a 10 $\mu\text{g/mL}$ mostraram uma diminuição significativa quando comparadas ao controle ($p=0,0396$). Já a expressão do gene *Col1a1* (Figura 16) foi mais evidente aos 3 dias de cultura com subsequente diminuição ao longo dos dias do experimento. Aos 3 dias não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, mas uma tendência à uma maior

expressão do gene nos grupos expostos à concentração de 1 µg/mL. Aos 7 dias, a expressão do colágeno do tipo I foi menor em todos os grupos que receberam o GSE quando comparado ao controle; entre os grupos expostos ao extrato, houve similaridade na expressão gênica nas células cultivadas com 0,1 e 1 µg/mL e uma diminuição significativa na expressão nas células expostas a 10 µg/mL ($p < 0,0001$). Aos 10 dias, houve um aumento significativo na expressão do *Col1a1* nas células expostas a 10 µg/mL quando comparado aos outros grupos ($p < 0,0001$), os quais não mostraram diferença significativa entre si. A análise do gene *Dmp1* (Figura 17) mostrou que houve um pico de sua expressão aos 7 dias de cultura. A expressão deste gene foi maior nas células expostas à concentração de 1 µg/mL de GSE aos 3 e 10 dias de cultura, apesar de haver significância estatística somente aos 10 dias quando comparado à células cultivadas com 10 µg/mL de GSE ($p = 0,017$). Aos 7 dias, a expressão de *Dmp1* foi similar entre os grupos controle, 0,1 e 1 µg/mL de GSE, e significativamente menor no grupo com células expostas à concentração de 10 µg/mL em relação ao controle ($p = 0,0044$).

Figura 15. Expressão quantitativa do gene *Alp* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Figura 16. Expressão quantitativa do gene *Col1a1* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 μ g/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Figura 17. Expressão quantitativa do gene *Dmp1* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 3 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1 e 10 µg/mL) após 3, 7 e 10 dias de cultura. Teste estatístico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.4 Imunolocalização

As Figuras 18, 19 e 20 mostram a imunolocalização aos 3 dias das proteínas *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* nos grupos experimentais controle e grupos expostos às quatro concentrações selecionadas. As imagens da primeira coluna evidenciam o contorno celular e o citoesqueleto por meio da coloração verde (marcação com faloidina), o núcleo em azul (marcação com DAPI) e a presença da proteína em vermelho (marcação com anticorpo). As imagens da segunda coluna são as mesmas sem a marcação do citoesqueleto para evidenciar a presença da proteína. A análise qualitativa mostra a presença das três proteínas em todos os grupos experimentais, mesmo com a diminuição da proliferação celular no grupo com concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Na Figura 18, podemos observar que a proteína *Alp* foi expressa de maneira similar, estando presente no citoplasma e bastante marcada no complexo de Golgi adjacente ao núcleo. A quantidade de células é expressivamente menor no grupo exposto a 20 $\mu\text{g/mL}$ de GSE quando comparado aos outros grupos, mas com a presença da *Alp* no citoplasma celular. Na Figura 19, a marcação de colágeno do tipo I foi demonstrada em todos os grupos, principalmente nas células odontoblastoides expostas às concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE. Novamente observamos uma diminuição da quantidade de células no grupo com 20 $\mu\text{g/mL}$ de GSE, com algumas células marcadas pela presença de *Col1a1*. A imunolocalização da *Dmp1* também foi possível em todos os grupos experimentais, mas ficou mais evidente no citoplasma das células odontoblastoides cultivadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE quando comparado aos outros grupos experimentais, como pode ser visto na Figura 20.

Figura 18. Imunolocalização da proteína *Alp* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo).

Figura 19. Imunolocalização da proteína *Col1a1* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo).

Figura 20. Imunolocalização da proteína *Dmp1* em células odontoblastoides MDPC-23 em contato com 4 diferentes concentrações de GSE (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) após 3 dias de cultura. Aumento de 40x, barra =50 µm. Filamentos de actina marcados em verde (faloidina), núcleo celular marcado em azul (DAPI) e proteína marcada em vermelho (anticorpo).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Atualmente, os produtos naturais têm sido o foco de muitas pesquisas para serem usados como agentes terapêuticos (*Ferrazzano et al., 2011*). O GSE utilizado neste estudo é composto essencialmente de proantocianidinas (PACs), conhecidas pelo seu potente papel antioxidante. As PACs são compostos fenólicos com o potencial de gerar matrizes colágenas não biodegradáveis (*Kim et al., 1997*) e este efeito têm sido investigado e comprovado na área da dentística restauradora, com resultados positivos no tratamento de lesões cariosas (*Silva et al., 2015*), no mecanismo de adesão dentina-resina (*Leme-Kraus et al., 2017*) e na resistência à biodegradação da dentina desmineralizada (*Fawzy et al., 2017*). Ainda são incipientes os estudos sobre o efeito do GSE na atividade funcional de células como osteoblastos e odontoblastos, as quais produzem a matriz orgânica colágena que sofre posterior mineralização. Os nossos resultados trazem novas informações na literatura, indicando a influência das proantocianidinas no metabolismo de células odontoblastoides.

A busca de substâncias alternativas para a regeneração dentinária é baseada no fato de que os dois materiais de escolha atualmente, i.e., hidróxido de cálcio e MTA, apesar de excelentes capeadores, podem apresentar algumas desvantagens importantes. O hidróxido de cálcio tem sido por muitas décadas usado para tratar uma variedade de complicações no reparo pulpar (e.g., capeamento pulpar, pulpotomia, apexificação e reabsorção radicular), mas apresenta um tempo demasiado longo na indução de formação de uma nova barreira tecidual, variando de 2 a 3 meses no caso de um capeamento pulpar (*Olsson et al., 2006*). Além disso, o hidróxido de cálcio pode induzir ao aparecimento de zonas de necrose pulpar assim como promover a perda de componentes orgânicos e inorgânicos na parte estrutural dentinária, favorecendo fraturas cervicais (*Sahebi et al., 2010*). No que diz respeito ao MTA, existem evidências indicando a possibilidade deste material promover o enfraquecimento da estrutura dentinária devido à sua alta alcalinidade (*Twati et al., 2009*), além de poder alterar a coloração dentinária quando usado como capeador pulpar ou na pulpotomia, afetando a estética principalmente em dentes anteriores (*Parirokh et al., 2010*).

Assim, o primeiro passo deste trabalho foi realizar um experimento de dose-resposta para indicar a possível toxicidade do GSE quando em contato com as

células MDPC-23. Das concentrações selecionadas de 0,1 a 1000 µg/mL, foi observado que a partir de 10 µg /mL houve um declínio progressivo na atividade metabólica celular. Isto pode ser visto também em outros estudos como o de *Yang et al. (2014)*, os quais observaram que a adição de concentrações acima de 15 µg/ml de GSE resultaram em diminuição da viabilidade celular, caindo para um valor mínimo na concentração de 60 µg/ml. *Kaur et al. (2008)* também observaram uma inibição na proliferação celular, indução de reguladores negativos do ciclo celular como o Cip1/p21 e Kip1/p27, assim como aumento da apoptose em linhagens celulares humanas de carcinoma expostas à altas doses de GSE (25, 50 e 100 µg /mL). A inclusão da concentração de 20 µg /mL em nosso estudo foi realizada para delimitar a concentração adequada de GSE e seus efeitos benéficos na atividade funcional da linhagem utilizada, e registro do possível declínio da viabilidade celular.

A primeira hipótese nula deste trabalho foi rejeitada, pois as diferentes concentrações de GSE utilizadas apresentaram influência nos parâmetros bioquímicos avaliados quando em comparação ao grupo controle. O ensaio de viabilidade celular mostrou que todas as concentrações permitiram a proliferação das células odontoblastoides de maneira similar e progressiva ao longo do experimento, mas a partir do sétimo dia houve um declínio significativo da proliferação das células expostas às concentrações de 10 e 20 µg/mL. Não existem estudos similares com a análise de baixas a altas concentrações de GSE em células odontoblásticas; por outro lado, o GSE já foi muito estudado em associação com a inibição de proliferação de células cancerosas. *Veluri et. al. (2006)* e *Agarwal et al. (2007)* sugeriram que o efeito antiproliferativo do GSE em altas concentrações poderia ser respectivamente pela presença do ácido gálico e da proantocianidina B2-3,3'-di-O-galato no extrato. *Yen et al. (2015)* demonstraram que o declínio na proliferação celular por meio da geração de ROS e despolarização mitocondrial aumenta com altas concentrações de GSE (50-400µg/mL) mas não apresenta mudanças com baixas concentrações (1-10µg/mL). Estes efeitos puderam ser observados em microscópio invertido ao longo do experimento em nossas células, onde as concentrações de 0,1 a 10 µg/mL permitiram a manutenção da morfologia celular, agrupamento e proliferação das colônias de células odontoblastoides, característico da linhagem MDPC-23. Por outro lado, na presença de 20 µg/mL de GSE ficou evidente a diminuição na quantidade de células nos poços de cultura. A

atividade proteica também foi influenciada de acordo com o aumento da concentração de GSE, principalmente a partir dos 10 $\mu\text{g/mL}$. É interessante observar que o conteúdo de proteína total aumentou aos 10 dias de cultura para as concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e este resultado pode ter ocorrido pelo fato das culturas de células expostas à estas concentrações estarem mais atrasadas na sua atividade de síntese de proteínas quando comparado aos poços de células com concentrações menores. Uma das proteínas mais importantes para a formação de matriz mineralizada é a fosfatase alcalina (ALP), que apresenta um aumento gradual na fase inicial da diferenciação odontoblástica (*Liu et al., 2016*). Por meio do ensaio bioquímico foi observado que a atividade desta enzima sofreu um declínio com a exposição das células à alta concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, principalmente nos períodos iniciais de cultura. Já na fase tardia, apresentou-se maior a partir dos 10 $\mu\text{g/mL}$, provavelmente devido ao atraso na atividade funcional das células presentes no poço. É interessante observar que o ensaio de coloração com Fast Red resultou em dados distintos dos bioquímicos, onde a detecção *in situ* da enzima ALP foi similar ao grupo controle quando comparado à todas as concentrações, mostrando um pico no meio da cultura. Um resultado que indica a influência positiva do GSE na formação da matriz mineralizada é o aumento significativo de nódulos mineralizados na cultura exposta à concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao grupo controle e às outras concentrações, sugerindo a capacidade das PACs em promover a dentinogênese e formação de matriz. A influência do GSE na matriz dentinária têm sido mostrada na literatura principalmente com a indicação de que as proantocianidinas têm o potencial de melhorar as propriedades da dentina reduzindo sua degradação enzimática por meio de ligações cruzadas com o colágeno (*Vidal et al., 2016*). Estudos como o de *Canon et al. (2010)* e *He et al. (2011)* sugerem que a hidrogenação seja o principal mecanismo de interação entre os grupos hidroxila nas PACs e os grupos amina e amida do colágeno, favorecendo as ligações cruzadas e consequentemente trazendo estabilidade tecidual, força e resistência. Outros pesquisadores também sugerem que interações hidrofóbicas podem explicar a ligação dos polifenóis com proteínas como o colágeno, através da associação de seus anéis aromáticos com a prolina (*Hagerman et al., 1998*). Apesar da ausência de trabalhos mostrando o efeito do GSE e polifenóis na atividade metabólica dos odontoblastos, existem várias evidências experimentais indicando uma ação

estimulatória direta na mineralização com a administração de polifenóis como o resveratrol, principalmente pelo aumento da atividade de ALP em osteoblastos, sugerindo uma ação similar ao estrógeno (Mizutani *et al.*, 1998). Zhang *et al.* (2014) por sua vez, mostraram que as PACs em baixas concentrações exercem uma proteção antioxidante significativa às células osteoblásticas melhorando o efeito de disfunção mitocondrial exercido pelo H_2O_2 , também inibindo a apoptose pela supressão da ativação da sinalização da proteína p53 que atua como reguladora do ciclo celular.

A segunda hipótese nula deste projeto também foi rejeitada, pois a expressão quantitativa dos genes selecionados foi influenciada pelas diferentes concentrações de GSE. É conhecido que a diferenciação odontoblástica/osteogênica e a formação do tecido mineralizado são regulados pela expressão de genes como *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1*, regulados pela expressão do *Runx2* (Liu *et al.* 2016). As concentrações de GSE avaliadas neste parâmetro foram as de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, pois a quantidade de células na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ foi insuficiente para obtenção de RNA e realização da quantificação dos genes.

No presente estudo, o gene *Alp* foi modulado principalmente pela exposição das células odontoblastoides à concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ no pico de sua expressão (7 dias de cultura), mostrando um aumento significativo quando comparado ao controle. Esta modulação refletiu na regulação e diferenciação celular, culminando com a formação de mais nódulos mineralizados durante o presente estudo. Pesquisadores como Huang *et al.* (2015) também observaram uma indução dos genes *Alp* e *Runx2* após o contato de células osteoblásticas com um compósito feito de quitosana/polifenol, sugerindo que a presença do polifenol promoveu um melhor estímulo de diferenciação para as células estudadas.

É interessante observar que apesar da ausência de significância, a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ mostrou uma tendência no aumento da expressão do gene *Col1a1* no período inicial da cultura. Já na fase tardia, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ promoveu um aumento significativo do gene em questão, sugerindo que a presença do GSE pode modular a expressão e consequente secreção de colágeno na matriz mineralizada. Na literatura científica, são escassos os artigos que analisam a expressão gênica do *Col1a1 in vitro*. Entretanto, Lin *et al.* (2016) observaram por meio da análise em *microarray* de amostras de sangue de mulheres que ingeriram

uma mistura dos polifenóis quercetina e glabridina, um aumento significativo na expressão quantitativa do colágeno tipo I. A imunolocalização do colágeno tipo I realizada neste estudo confirma um aumento sutil na marcação desta proteína no citoplasma das células odontoblastoides.

A proteína DMP1 foi a primeira das proteínas da matriz dentinária a ser descoberta, sendo que inicialmente pensava-se ser específica da matriz dentinária. Posteriormente ficou comprovado que ela é expressa em muitos tecidos em um nível basal e em grande quantidade em tecidos sofrendo processo de biomineralização, tais como dentina e osso (*Hao et al. 2004; Huang et al. 2008*). Estudos recentes mostram que estas proteínas podem servir tanto como sinalizadoras intracelulares levando à diferenciação de células mesenquimais como proteínas nucleadoras na matriz extracelular, ajudando na orientação e reforço dos nanocristais, propriedades essenciais para a regeneração dentinária (*Ravindran e George, 2016*). Em nosso estudo, a expressão quantitativa de *Dmp1* mostrou um aumento nas fases inicial e tardia da cultura (significativo aos 10 dias), quando as células MDPC-23 foram expostas à concentração de 1 µg/mL de GSE, sugerindo que o extrato favoreceu a deposição de matriz dentinária, o que foi comprovado pelo ensaio de nódulos mineralizados. No ensaio de imunolocalização desta proteína nas células odontoblastoides realizado no presente estudo, também ficou claro um aumento qualitativo da mesma nas células expostas à 1 µg/mL do extrato, quando comparado aos outros grupos experimentais.

Os dados obtidos por meio dos experimentos deste trabalho são promissores e sugerem que avanços podem ser feitos principalmente com estudos *in vivo* em modelos animais, com a aplicação do GSE em preparos profundos ou mesmo em associação direta com a polpa dentária, visto que baixas concentrações do extrato não reduziram a viabilidade das células odontoblastoides. Efeitos positivos *in vivo* podem tornar o extrato de semente de uva uma substância em potencial para ser aplicada em substituição ou em conjunto com os materiais já existentes no mercado, principalmente em casos de necessidade de regeneração dentinária, unindo suas características antioxidantes e biomineralizadoras.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

A partir dos objetivos propostos, podemos concluir que o GSE em baixas concentrações tem potencial de estímulo da atividade funcional de células odontoblastoides da linhagem MDPC-23, visto que:

- permite a proliferação e viabilidade celular com as concentrações mais baixas de GSE (0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$);
- permite a atividade de síntese de proteínas totais e de fosfatase alcalina nas células odontoblastoides com as concentrações mais baixas de GSE (0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$);
- favorece maior deposição de nódulos mineralizados com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE;
- influencia a expressão quantitativa dos genes *Alp*, *Col1a1* e *Dmp1* e a secreção das proteínas correspondentes vistas por imunolocalização principalmente com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de GSE.

Referências

REFERÊNCIAS

AGARWAL C, VELURI R, KAUR M, CHOU SC, THOMPSON JA, AGARWAL R. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p. 1478-84, 2007.

AGUIAR TR, VIDAL CM, PHANSALKAR RS, TODOROVA I, NAPOLITANO JG, MCALPINEJB, CHEN SN, PAULI GF, BEDRAN-RUSSO AK. Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source. **J Dent Res**, v. 93, p. 417-422, 2014.

AHN SH, KIM HJ, JEONG I, HONG YJ, KIM MJ, RHIE DJ, JO YH, HAHN SJ, YOON SH. Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 78, 2011.

ARUOMA OI, SUN B, FUJII H, NEERGHEEN VS, BAHORUN T, KANG KS, SUNG MK. Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor Oligonol: Its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials. **Biofactors**, v. 27, n. 1-4, p. 245–265, 2006.

AZZI A. Antioxidants: Wonder drugs or quackery? **Biofactors**, v. 43, n. 6, p. 785-788, 2017.

BAGCHI D, GARG A, KROHN RL, BAGCHI M, TRAN MX, STOHS SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol**, v. 95, p. 179–189, 1997.

BAGCHI D, SEN CK, RAY SD, DAS DK, BAGCHI M, PREUSS HG, VINSONJA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 87–97, 2003.

BAO L, ZHANG Z, DAI X, DING Y, JIANG Y, LI Y. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on renal injury in type 2 diabetic rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, p. 645-652, 2015.

BARTHEL CR, ROSENKRANZ B, LEUENBERG A, ROULET JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. **J Endod**, v. 26, p. 525–528, 2000.

BEDRAN-RUSSO AK, PAULI GF, CHEN SN, MCALPINE J, CASTELLAN CS, PHANSALKAR RS, AGUIAR TR, VIDAL CM, NAPOLITANO JG, NAM JW, LEME AA. Dentin Biomodification: Strategies, Renewable Resources and Clinical Applications. **Dent Mater**, v. 30, n. 1, p. 62-76, 2014.

BRESCHI L, MARAVIC T, CUNHA SR, COMBA A, CADENARO M, TJADERHANE L, PASHLEY DH, TAY FR, MAZZONI A. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. **Dent Mater**, v. 34, n. 1, p. 78-96, 2018.

BUTLER WT, RITCHIE H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. **Int J Dev Biol**, v. 39, n. 1, p. 169–179, 1995.

CANON F, GIULIANI A, PATÉ F, SARNI-MANCHADO P. Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 815-22, 2010.

CASAGRANDE L, LAUXEN IS, FERNANDES MI. O emprego da engenharia tecidual na odontologia. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 50, n. 1, p. 20-23, 2009.

CASTELLAN CS, BEDRAN-RUSSO AK, ANTUNES A, PEREIRA PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. **Int J Dent**, 918010, 2013.

CASTELLAN CS, BEDRAN-RUSSO AK, KAROL S, PEREIRA PNR. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 4, n. 7, p. 1343–50, 2011.

CHANG P, MO B, CAUVI DM, YU Y, GUO Z, ZHOU J, HUANG Q, YAN Q, CHEN G, LIU Z. Grape seed proanthocyanidin extract protects lymphocytes against histone-induced apoptosis. **Peer J**, v. 21, n. 5, p. 3108, 2017.

CHANG SW, KIM JY, KIM MJ, KIM GH, YI JK, LEE DW, KUM KY, KIM EC. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. **Acta Odontol Scand**, v. 74, n. 4, p. 298-306, 2016.

CHO ML, HEO YJ, PARK MK, OH HJ, PARK JS, WOO YJ, JU JH, PARK SH, KIM HY, MIN JK. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. **Immunol Lett**, v. 124, n. 2, p. 102-10, 2009.

CHOI EM. Luteolin protects osteoblastic MC3T3-E1 cells from antimycin A. Induced cytotoxicity through the improved mitochondrial function and activation of PI3K/Akt/CREB. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1671-9, 2011.

CÓRDOBA A, MONJO M, OLIVA MH, MARTIN MLG, RAMIS J.M. Bioinspired Quercitin Nanocoatings: A Fluorescence-Based Method for Their Surface Quantification, and their Effect on Stem Cell Adhesion and Differentiation to the Osteoblastic Lineage. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 7, n. 30, p. 16857-64, 2015.

COX CF, SÜBAY RK, OSTRO E, SUZUKI S, SUZUKI SH. Tunnel effects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Oper Dent**, v. 21, n. 1, p. 4-11, 1996.

DE OLIVEIRA PT, NANJI A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-13, 2004.

DEMIRKAYA E, AVCI A, KESIK V, KARSLIOGLU Y, OZTAS E, KISMET E, GOKCAY E, DURAK I, KOSEOGLU V. Cardioprotective roles of aged garlic extract, grape seed proanthocyanidin, and hazelnut on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 8, p. 633–640, 2009.

EDIRISINGLE I, BURTON-FREEMAN B, KAPPAGODA T. Mechanism of the endothelium-Dependent Relaxation Evoked by a Grape Seed Extract. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 4, p. 331-7, 2008.

FAWZY AS, PRIYADARSHINI BM, SELVAN ST, LU TB, NEO J. Proanthocyanidins-Loaded Nanoparticles Enhance Dentin Degradation Resistance. **J Dent Res**, v. 96, n. 7, p. 780-789, 2017.

FERRAZZANO GF, AMATO I, INGENITO A, ZARRELLI A, PINTO G, POLLIO A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. **Molecules**, v. 16, p. 1486-507, 2011.

FERREIRA MR, DERNOWSEK J, PASSOS GA, BOMBONATO-PRADO KF. Undifferentiated pulp cells and odontoblast-like cells share genes involved in the process of odontogenesis. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 4, p. 593-9, 2015.

FRAGA CG, OTEIZA PI. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 4, p. 813-23, 2011.

FRANCESCHI RT, IYER BS, CUI Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. **J Bone Miner Res**, v. 9, n. 6, p. 843-54, 1994.

FUKUMOTO S, YAMADA Y. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. **Connect Tissue Res**, v. 46, n. 4-5, p. 220-6, 2005.

FUREY A, HJELMHAUG J, LOBNER D. Toxicity of Flow Line, Durafill VS, and Dycal to dental pulp cells: effects of growth factors. **J Endod**, v. 36, n. 7, p. 1149-53, 2010.

GAO Z, LIU G, HU Z, LI X, YANG X, JIANG B. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p. 801–7, 2014.

GOLDBERG M, KULKARNI AB, YOUNG M, BOSKEY A. Dentin: Structure, composition and mineralization. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 1, n. 3, p. 711-735, 2011.

GOLDBERG M, SMITH AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 1, p. 13-27, 2004.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.

GUANG LW, YU ZX, JIE WY, XUAN T. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. **Acta Pharmacol Sin**, v. 22, n.12, p. 1117-20, 2001.

HAGERMAN AE, RICE ME, RITCHARD NT. Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin (4→8) Catechin (Procyanidin) **J. Agric. Food Chem**, v. 46, p. 2590–2595, 1998.

HANKS CT, FANG D, SUN Z, EDWARDS C, BUTLER WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. **Eur J Oral Sci**, v. 106, p. 260-266, 1998.

HAO J, ZOU B, NARAYANAN K, GEORGE A. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. **Bone**, v.34, n.6, . 2004

HE L, MU C, SHI J, ZHANG Q, SHI B, LIN W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. **Int J Biol Macromol**, v. 48, n. 2, p. 354-9, 2011.

HUANG B, MACIEJEWSKA I, SUN Y, PENG T, QIN D, LU Y, BONEWALD L, BUTLER WT, FENG J, QIN C. Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone. **Calcif Tissue Int**, v.82, n.5, p.401-10, 2008.

HUANG Q, HAO L, XIE J, GONG T, LIAO J, LIN Y. Tea Polyphenol-Functionalized Graphene/Chitosan as an Experimental Platform with Improved Mechanical Behavior and Bioactivity. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 7, n. 37, p. 20893-901, 2015.

HUANG XF, YUAN SJ, YANG C. Effects of total flavonoids from *Drynaria Fortunei* on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 3, p. 547-52, 2012.

IOHARA K, NAKASHIMA M, ITO M, ISHIKAWA M, NAKASIMA A, AKAMINE A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. **J Dent Res**, v. 83, n. 8, p. 590-5, 2004.

ISHIKAWA M, MAKI K, TOFANI I, KIMURA K, KIMURA M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 1, p. 47-52, 2005.

ISHIMATSU H, KITAMURA C, MOROTOMI T, TABATA Y, NISHIHARA T, CHEN KK, TERASHITA M. Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. **J Endod**, v. 35, n. 6, p. 858-65, 2009.

KAUR M, MANDAIR R, AGARWAL R, AGARWAL C. Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. **Nutr Cancer**, v. 60, p. 2–11, 2008.

- KAWASAKI K, WEISS KM. SCPP gene evolution and the dental mineralization continuum. **J Dent Res**. V. 87, n. 6, p. 520-31, 2008.
- KIM SJ, LIM MH, CHUN IK, WON YH. Effects of flavonoids of Ginkgo biloba on proliferation of human skin fibroblast. **Skin Pharmacol**, v.10, p. 200-05, 1997.
- KIMURA M, SASE T, HIGASHIKAWA A, SATO M, SATO T, TAZAKI M, SHIBUKAWA Y. High pH-Sensitive TRPA1 Activation in Odontoblasts Regulates Mineralization. **Jornal of Dental Research**, v. 95, n. 9, p. 1057-64, 2016.
- KOJIMA K, MAKI K, TOFANI I, KAMITANI Y, KIMURA M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 4, n. 3, p. 301-7, 2004.
- LATIF R. Health benefits of cocoa. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, n. 6, p. 669-74.
- LEE JH, LEE DS, CHOUNG HW, SHON WJ, SEO BM, LEE EH, CHO JY, PARK JC. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9696-706, 2011.
- LEIFERT WR, ABEYWARDENA MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutr Res**, v. 28, n. 11, p. 729-37, 2008.
- LEME-KRAUS AA, AYDIN B, VIDAL CM, PHANSALKAR RM2 NAM JW, MCALPINE J, PAULI GF, CHEN S, BEDRAN-RUSSO AK. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. **J Dent Res**, v. 96, n. 4, p. 406-412, 2017.
- LESOT H, BEGUE KIRN C, KUBLER MD, MEYER JM, SMITH AJ. (1993) Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. **Cells & Materials**, v. 3, p. 201-17, 1993.
- LIN Y, KAZLOVA V, RAMAKRISHNAN S, MURRAY MA, FAST D, CHANDRA A, GELLENBECK KW. Bone health nutraceuticals alter microarray mRNA gene expression: A randomized, parallel, open-label clinical study. **Phytomedicine**, v. 23, n. 1, p. 18-26, 2016.
- LIU G1, XU G, GAO Z, LIU Z, XU J, WANG J, ZHANG C, WANG S. Demineralized Dentin Matrix Induces Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 1, p. 65-76, 2016.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LOBO V, PATIL A, Phatak A, CHANDRA N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn Rev**, v. 4, n. 8, p. 118-26, 2010.

LÓPEZ-SEPÚLVEDA R, JIMÉNEZ R, ROMERO M, ZARZUELO MJ, SÁNCHEZ M, GÓMEZ-GUZMÁN M, VARGAS F, O'VALLE F, ZARZUELO A, PÉREZ-VIZCAÍNO F, DUARTE J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 1088-95, 2008.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU Z, LU F, ZHENG Y, ZENG Y, ZOU C, LIU X. Grape seed proanthocyanidin extract protects human umbilical vein endothelial cells from indoxyl sulfate-induced injury via ameliorating mitochondrial dysfunction. **Renal Failure**, v. 38, n. 1, p. 100-108, 2016.

MARTINEZ EF, DA SILVA LA, FURUSE C, DE ARAUJO NS, DE ARAUJO VC. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. **Braz Dent J**, v. 20, p. 365-9, 2009.

MITSIADIS TA, RAHIOTIS C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. **Journal of Dental Research**, v. 83, p. 896–902, 2004.

MIURA J, NISHIKAWA K, KUBO M, FUKUSHIMA S, HASHIMOTO M, TAKESHIGE F, ARAKI T. Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 2, p. 119-24, 2014.

MIZUTANI K, IKEDA K, KAWAI Y, YAMORI Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 253, p. 859–863, 1998.

MOGHADDAME-JAFARI S, MANTELLINI MG, BOTERO TM, MCDONALD NJ, NÖR JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. **J Endod**, v. 31, n. 5, p. 387–91, 2005.

MORRÉ DM, MORRÉ DJ. Anticancer Activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. **Cancer Letters**, v. 238, n. 2, p. 202-9, 2006.

NAKASHIMA M, REDDI AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. **Nat. Biotechnol**, v. 21, n. 9, p. 1025–32, 2003.

NARAYANAN K, GAJJERAMAN S, RAMACHANDRAN A, HAO J, GEORGE A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. **J Biol Chem**, v. 281, n. 28, p. 19064-71, 2006.

NARAYANAN K, RAMACHANDRAN A, HAO J, HE G, PARK KW, CHO M, GEORGE A. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 17500-8, 2003.

OLIVEIRA PT, OLIVA MA, MAXIMIANO WMA, SEBASTIÃO KEV, CRIPPA G E, CIANCAGLINI P, BELOTI MM, NANJI A, ROSA AL. Effects of a Mixture of Growth Factors and Proteins on the Development of the Osteogenic Phenotype in Human Alveolar Bone Cell Cultures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 629–38, 2008.

OLSSON H, PETERSSON K, ROHLIN M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. **Int Endod J**, v.39, p. 429-42, 2006.

ORSINI G, JR AR, MAZZONI A, NATO F, MANZOLI L, PUTIGNANO A, LENARDA RD, TJADERHANE L, BRESCHI L. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. **Endod Top**, v. 21, p. 1-18, 2009.

PARANJPE A, ZHANG H, JOHNSON JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. **J Endod**, v. 36, n. 6, p. 1042-7, 2010.

PARIROKH M, TORABINEJAD M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J Endod**, v. 36, p. 16-27, 2010.

PARK JS, PARK MK, OH HJ, WOO YJ, LIM MA, LEE JH, JU JH, JUNG YO, LEE ZH, PARK SH, KIM HY, CHO ML, MIN JK. Grape-Seed Proanthocyanidin Extract as Suppressors of Bone Destruction in Inflammatory Autoimmune Arthritis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51377, 2012.

PASTRANA-BONILLA E, AKOH CC, SELLAPPAN S, KREWER G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. **J. Agric Food Chem**, v. 51, n. 18, p. 5497–503, 2003.

PÉREZ C, CASTILHO MLR, GIL C, BLANCH GP, FLORES G. Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. **Food Funct**, v. 6, n. 8, p. 2607-13, 2015.

PHANSALKAR RS, NAM JW, CHEN SN, MCALPINE JB, NAPOLITANO JG, LEME A, VIDAL CM, AGUIAR T, BEDRAN-RUSSO AK, PAULI GF. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potencial. **Fitoterapia**, v. 101, p.169-78, 2015.

POGGIO C, CECI M, DAGNA A, BELTRAMI R, COLOMBO M, CHIESA M. *In vitro* cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 66, n. 3, p. 181-8, 2015.

RAUCCI LMSC. Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental. **Tese de Doutorado**, p. 16-160, 2013.

RAVINDRAN S, GEORGE A. Multifunctional ECM proteins in bone and teeth. **Exp Cell Res**, v. 325, n. 2, p. 148-54, 2014.

REDDI, AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nat. Biotechnol**, v. 16, n. 3, p. 247–52, 1998.

RODRIGUEZ AP, TSUJIGIWA H, GUNDUZ M, CENGİZ B, NAGAI N, TAMAMURA R, BORKOSKY SS, TAKAGI T, INOUE M, NAGATSUKA H. Influence of the microenvironment on gene and protein expression of odontogenic-like and osteogenic-like cells. **Biocell**, v. 33, n. 1, p. 39-47, 2009.

ROSA LO, MACHADO DA SILVA T, FERNANDO DEMARCO F, PIVA E, FERNANDES DA SILVA A. Could the application of bioactive molecules improve vital pulp therapy success? A systematic review. **J Biomed Mater Res A**, v. 105, n. 3, p. 941-956, 2017.

SAHEBI S, MOAZAMI F, ABBOTT P. The effects of short-term calcium hydroxide application on the strength of dentine. **Dent Traumatol**, v. 26, p. 43-6, 2010.

SANGWAN P, SANGWAN A, DUHAN J, ROHILLA A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. **Int Endod J**, v. 46, n. 1, p. 3-19, 2013.

SHAO C, ZHAO R, JIANG S, YAO S, WU Z, JIN B, YANG Y, PAN H, TANG R. Citrate Improves Collagen Mineralization via Interface Wetting: A Physicochemical Understanding of Biomineralization Control. **Adv Mater**, v.30, n.8. doi: 10.1002/adma.201704876. Epub 2018 Jan 8.

SHARMA SD, KATIYAR SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced cyclooxygenase-2 expression and other inflammatory mediators in UVB-exposed skin and skin tumors of SKH-1 hairless mice. **Pharm Res**, v. 27, n. 6, p. 1092-102, 2010.

SILVA AP, GONÇALVES RS, BORGES AF, BEDRAN-RUSSO AK, SHINOHARA MS. Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 3, p. 302-9, 2015.

SIVASHANKARI PR, PRABAHARAN M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **Int J Biol Macromol**, v. 93, p. 1382-1389, 2016.

SMITH AJ, TOBIAS RS, CASSIDY N, PLANT CG, BROWNE RM, BEGUE-KIRN C, RUCH JV, LESOT H. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Archives of Oral Biology**, v. 39, p. 13–22, 1994.

SONG Q, SHI Z, BI W, LIU R, ZHANG C, WANG K, DANG X. Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis. **J Orthop Sci**, v. 20, n. 1, p. 196-204, 2015.

SONG X, XU H, FENG Y, LI X, LIN M, CAO L. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against liver ischemic reperfusion injury: particularly in diet-induced obese mice. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 10, p. 1345-62, 2012.

TANG J, SAITO T. Human Plasma fibronectin promotes proliferation and differentiation of odontoblast. **Journal of applied oral Science**, v. 25, n. 3, p. 299-309, 2017.

TENENBAUM HC. Role of organic phosphate in mineralization of bone *in vitro*. **J Dent Res**, v. 60, 1981.

TETI G, SALVATORE V, RUGGERI A, MANZOLI L, GESI M, ORSINI G, FALCONI M. *In vitro* reparative dentin: a Biochemical and morphological study. **Eur J Histochem**, v. 57, n. 3, p. e23, 2013.

THESLEFF I, MIKKOLA M. The role of growth factors in tooth development. **Int Rev Cytol**, v. 217, p. 93-135, 2002.

TJÄDERHANE L, CARRILHO MR, BRESCHI L, TAY FR, PASHLEY DH. Dentin basic structure and composition-an overview. **Endod Top**, v. 20, p. 3-29, 2009.

TOKER H, BALCI YUCE H, LEKTEMUR ALPAN A, GEVREK F, ELMASTAS M. Morphometric and histopathological evaluation of the effect of grape seed proanthocyanidin on alveolar bone loss in experimental diabetes and periodontitis. **J Periodontal Res**, doi: 10.1111/jre.12536.

TWATI WA, WOOD DJ, LISKIEWICZ TW, WILLMOTT NS, DUGGAL MS. An evaluation of the effect of non-setting calcium hydroxide on human dentine: a pilot study. **Eur Arch Paediatr Dent**, v.10, p. 104-9, 2009.

UCHINO R, MADHYASTHA R, MADHYASTHA H, DHUNGANA S, NAKAJIMA Y, OMURA S, MARUYAMA M. NFkappaB-dependent regulation of urokinase plasminogen activator by proanthocyanidin-rich grape seed extract: effect on invasion by prostate cancer cells. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 21, n. 6, p. 528-33, 2010.

VARALAKSHMI PR, KAVITHA M, GOVINDAN R, NARASIMHAN S. Effect of Statins with a-Tricalcium PHOSPHATEON Proliferation, Differentiation, and Mineralization Human Dental Pulp Cells. **J Endod**, v. 39, n. 6, p. 806-12, 2013.

VELURI R, SINGH RP, LIU Z, THOMPSON JA, AGARWAL R, AGARWAL C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-53, 2006.

VIDAL CM, LEME AA, AGUIAR TR, PHANSALKAR R, NAM JW, BISSON J, MCALPINE JB, CHEN SN, PAULI GF, BEDRAN-RUSSO A. Mimicking the Hierarchical Functions of Dentin Collagen Cross-Links with Plant Derived Phenols and Phenolic Acids. **Langmuir**, v. 30, n. 49, p. 14887-93, 2014.

VIDAL CM, ZHU W, MANOHAR S, AYDIN B, KEIDERLING TA, MESSERSMITH PB, BEDRAN-RUSSO AK. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. **Acta Biomater**, v. 41, p. 110-8, 2016.

VOSOUGHHOSSEINI S, LOTFI M, SHAHI S, BALOO H, MESGARIABBASI M, SAGHIRI MA, ZAND V, RAHIMI S, RANJKESH B. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. **J Endod**, v. 34, n. 6, p. 715–7, 2008.

WARD J. Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. **Aust Endod J**, v. 28, n. 1, p. 29-37, 2002.

WEI R, DING R, WANG Y, TANG L. Grape seed proanthocyanidin extract reduces renal ischemia/reperfusion injuries in rats. **Am J Med Sci**, v. 343, n. 6, p. 452-7, 2012.

YAMAUCHI M, SHIIBA M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. **Methods Mol Biol**, v. 446, p. 95-108, 2008.

YANG PY, HU DN, LIN IC, LIU FS. Butein Shows Cytotoxic Effects and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. **Am J Chin Med**, v. 43, n. 4, p. 769-82, 2015.

YANG T, LI X, ZHU W, CHEN C, SUN Z, TAN Z, KANG J. Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats *in vitro*. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107670, 2014.

YASUDA Y, OGAWA M, ARAKAWA T, KADOWAKI T, SAITO T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an *in vitro* study. **J Endod**, v. 34, n. 9, p. 1057-60, 2008.

YEN CY, HOU MF, YANG ZW, TANG JY, LI KT, HUANG HW, HUANG YH, LEE SY, FU TF, HSIEH CY, CHEN BH, CHANG HW. Concentration effects of grape seed extracts in anti-oral cancer cells involving differential apoptosis, oxidative stress, and DNA damage. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 94, 2015.

YONGUC GN, DODURGA Y, ADIGUZEL E, GUNDOGDU G, KUCUKATAY V, OZBAL S, YILMAZ I, CANKURT U, YILMAZ Y, AKDOGAN I. Grape seed extract has superior beneficial effects than vitamin E on oxidative stress and apoptosis in the hippocampus of streptozotocin induced diabetics rats. **Gene**, v. 555, n. 2, p. 119-26, 2015.

ZHANG W, WALBOOMERS XF, VAN OSCH GJ, VAN DEN DOLDER J, JANSEN JA. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. **Tissue Eng Part A**, v. 14, n. 2, p. 285-94, 2008.

ZHANG Z, ZHENG L, ZHAO Z, SHI J, WANG X, HUANG J. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂ -induced mitochondrial dysfunction. **J Toxicol Sci**, v. 39, n. 5, p. 803-13, 2014.

ZHEN J, QU Z, FANG H, FU L, WU Y, WANG H, ZANG H, WANG W. Effects of grape seedproanthocyanidin extract on pentylenetetrazole-induced kindling and associated cognitiveimpairment in rats. International. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 2, p. 391-8, 2014.

ZHOU DY, DU Q, LI RR, HUANG M, ZHANG Q, WEI GZ. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by downregulating inducible nitric oxide synthase. **Planta Med**, v. 77, n. 14, p. 1575-81, 2011.

Anexos

34ª REUNIÃO ANUAL

3 a 6 de setembro de 2017 - Campinas - SP

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho PN0388 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA (GSE) NA ATIVIDADE FUNCIONAL DE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES (MDPC-23) de Rezende PHC*, Fernandes RR, Sorio ALR, Semeghini MS, Sanchez PKV, Sousa ABS, Pires-

De-souza FCP, Prado KFB foi apresentado

na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, no período de 3 a 6 de setembro de 2017, em Campinas – SP – Brasil.

Isabela Almeida Pordeus
Vice-Presidente

Carlos Eduardo Francini
Presidente

JORNADA ODONTOLÓGICA
DE RIBEIRÃO PRETO

Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan

39º Jornada Odontológica de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan

CERTIFICADO

Certificamos que **Patrícia H. C. Rezende** ministrou a palestra "Substâncias Antioxidantes e seus Efeitos em Tecidos Mineralizados" na 39ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto (JORP), promovida pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP, no dia 20 de Outubro de 2017 com duração de 01 hora.

Ribeirão Preto, 20 de Outubro de 2017

Presidente da 39ª JORP

Vice-Presidente da 39ª JORP

Delegacia Científica

39
Realização:
JORNADA ODONTOLÓGICA
DE RIBEIRÃO PRETO
Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan