

JESSICA MOURA PACHECO

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA EM
CULTURA DE CÉLULAS PULPARES

BRASÍLIA
2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
JESSICA MOURA PACHECO

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA EM
CULTURA DE CÉLULAS PULPARES

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

BRASÍLIA
2017

*Dedico este trabalho à minha família,
que sempre se orgulhou de minhas escolhas
e nunca mediram esforços para apoiar meus objetivos.
Obrigada, amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ronaldo e Márcia, por sempre me incentivarem a batalhar pelos meus sonhos. Perto ou longe vocês são meu porto seguro.

À minha irmã Júlia, pelo conforto na agonia, otimismo no desespero e bom humor nos momentos de ansiedade.

À Professora Ana Paula, exemplo invencível de dedicação, amor pela vida acadêmica e odontológica e bom humor em todas as horas! Ana, você foi única em todas as suas atribuições: professora incansável ao ensinar e se disponibilizar para isso; orientadora sistemática ao corrigir e exigir pensando sempre no melhor para cada aluno e preocupando-se como Mãe; amiga ao escutar, aconselhar e compreender em todas as adversidades. Me ensinou muito mais do que Odontologia e Ciência e cultivou em todas as oportunidades as virtudes de humildade, alegria e fé, deixando todos ao seu redor orgulhosos e honrados por estar trabalhando ao seu lado. Agradeço ao João que, não por opção, me cedeu sua mãe em finais de semana, feriados e madrugadas, no seu escasso tempo, para que me acompanhasse em experimentos, treinamentos e correções.

À Professora Taia, que acreditou na minha vontade e me impulsionou ao início desta etapa acadêmica. Agradeço as palavras, preocupações e conselhos de diversas horas. A sua fé na minha capacidade fez toda a diferença nos momentos de dúvida.

À minha irmã que a ciência me trouxe, minha dupla científica e de vida, amiga e colega de tudo, Poliana, pelo exemplo de determinação, pelo companheirismo, pelas horas de convívio dentro e fora dos laboratórios, pelos desabafos, desespero e felicidade compartilhadas.

Aos colegas e amigos de bancada da UNB e UCB que participaram nas horas de acertos e de repetições, contribuindo sempre com conhecimento e bom humor, tornando esse período memorável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela oportunidade;

Ao Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura;

À CAPES, CNPq, FAPDF, pelo auxílio financeiro;

Às pessoas especiais que me acompanharam neste percurso,

Obrigada! Essa alegria não seria real, se não compartilhada com vocês!

“Todo progresso acontece fora da zona de conforto.”

(Michael John Bobak)

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito citotóxico do extrato de semente de uva (ESU) em contato direto e transdentinário com células de cultura primária de polpa humana, em diferentes concentrações e tempo de exposição. Células pulpares assim como discos de dentina foram obtidas a partir de terceiros molares de adultos com idades entre 18 e 25 anos. Culturas primárias foram estabelecidas e cultivadas até a obtenção do número adequado de células. O ESU foi diluído previamente ao início de cada experimento. Após a quarta passagem, no teste de contato direto, dez mil células foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 horas receberam os tratamentos. Na primeira fase, testou-se diferentes concentrações formando os seguintes grupos: G1: controle negativo celular (D-MEM); G2: controle negativo de tratamento (Hepes); G3: 6,5% de ESU; G4: 0,65% de ESU; G5: 0,065% de ESU; G6: 0,0065% de ESU; G7: controle positivo com peróxido (H_2O_2 a 20%). Após uma hora de contato, as soluções experimentais foram removidas e novo meio de cultivo (DMEM) foi adicionado. Na segunda fase foram testados diferentes tempos de exposição das melhores concentrações da “fase 1” (0,65% ESU e 0,0065% ESU). Para tal os grupos experimentais foram: G1: controle celular (DMEM) por 1 hora, G2: controle de tratamento (Hepes) por 1 hora, G3: ESU por 1 hora, G4: ESU por 30 minutos, G5: ESU por 10 minutos, G6: ESU por 1 minuto, G7: controle peróxido (H_2O_2 a 20%) em contato por 1 hora. No teste transdentinário, foram semeadas cinquenta mil células em discos de dentina adaptados a um dispositivo de câmara pulpar artificial em placas de 24 poços. Os seguintes grupos permaneceram por 24h em contato com o ESU: G1: controle negativo celular (D-MEM); G2: controle negativo de tratamento (Hepes); G3: 0,65% de ESU; G4: controle peróxido (H_2O_2 a 20%). Transcorridos os tempos experimentais de contato, as soluções testadas foram removidas e novo meio de cultivo (DMEM) foi adicionado. Para compor a análise de citotoxicidade, o metabolismo celular foi avaliado por meio do teste de produção de desidrogenase succínica (MTT) 24 e 72 horas após o tratamento; o estresse oxidativo foi avaliado por meio do ensaio de óxido nítrico (ON) 24 e 72h após os tratamentos, e foi realizada microscopia eletrônica de varredura para ilustração dos melhores grupos. Os resultados foram analisados por testes

paramétricos (ANOVA e Tukey) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; $\alpha=0,05$). De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que a menor concentração de extrato de uva testada (0.0065%) apresentou resultados favoráveis tanto para o metabolismo celular, com um aumento no período de 24 horas, quanto a produção de ON, com redução dessa produção no período de 72 horas. Nenhuma resultou em redução do metabolismo celular maior que 10% do controle, indicando a não toxicidade desse extrato tanto aplicado diretamente sobre a cultura primária de células pulpares quanto na presença de barreira dentinária. O ESU foi capaz de estimular o metabolismo celular sem levar a um aumento do estresse oxidativo em todos os tempos avaliados e mesmo na menor concentração, sugerindo uma potencial bioatividade deste agente *crosslinker* sobre células pulpares.

Palavras chave: Biocompatibilidade. Células pulpares. Proantocianidinas. Extrato de semente de uva.

ABSTRACT

The present study evaluated the cytotoxic effect of grape seed extract (GSE) in direct and transdental contact with cells of primary culture of human pulp, in different concentrations and time of exposure. Pulp cells as well as dentin discs were obtained from adults at the age of 18 years and 25 years. Primary cultures were established and cultured until adequate numbers of cells were obtained. GSE containing 95% proanthocyanidin was diluted in HEPES buffer before each experiment. After a fourth passage, on direct contact test, ten thousand cells were seeded in 96-well plates and after 24 hours, received treatments. In the first phase, different concentrations were tested to form the following groups: G1: cell negative control (D-MEM); G2: negative control of treatment (HEPES); G3: 6.5% GSE; G4: 0.65% GSE; G5: 0.065% GSE; G6: 0.0065% GSE; G7: Positive control with peroxide (20% H₂O₂). After one hour of contact, as experimental solutions were removed and new culture medium (DMEM) was added. In the second phase, different exposure times of the best concentrations of "phase 1" (0.65% GSE and 0.0065% GSE) were tested. G4: GSE for 1 hour, G3: GSE for 1 hour, G3: GSE for 1 hour, G3: GSE for 1 hour, G4: GSE for 1 hour G6: GSE for 1 minute, G7: control peroxide (H₂O₂ at 20%) in contact for 1 hour. In the transdental test, fifty thousand cells were seeded in dentin discs adapted to an artificial pulp chamber device in 24-well plates. The following groups remained for 24 hours in contact with the GSE: G1: cellular negative control (D-MEM); G2: negative control of treatment (HEPES); G3: 0.65% GSE; G4: peroxide control (20% H₂O₂). After the experimental times of contact, as tested solutions were removed and new culture medium (DMEM) was added. To compose a cytotoxicity analysis, the cellular metabolism, evaluated by means of the succinic dehydrogenase (MTT) test 24 and 72 hours after the treatment; Oxidative stress was evaluated by means of the nitric oxide (NO) test 24h and 72h after the treatments, and scanning electron microscopy was performed to illustrate the best groups. The results were analyzed by parametric (ANOVA and Tukey) or non-parametric testicles (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney; $\alpha = 0.05$). According to the data obtained, it was possible to observe that the lowest concentration of grape extract tested (0.0065%) presented favorable results both for the cellular metabolism, with an increase in the period of 24 hours, and for a production of NO, as Reduction of production in the 72-hour period. Although

different behaviors were observed for the different concentrations, they resulted in reduction of the cellular metabolism greater than 10% of the control, indicating the non-toxicity of this extract both applied directly on a primary culture of cellular cells in the presence of dentin barrier. The GSE was able to stimulate cell metabolism without increasing oxidative stress at all correct times and even at the lowest concentration, suggesting a potential bioactivity of this *crosslinking* agent on pulp cells.

Keywords: Biocompatibility. Pulp cells. Proanthocyanidins. Grape seed extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Terceiro molar sendo manipulado em fluxo laminar, para extração do tecido pulpar.

Figura 2. Fotografia em microscópio de mesa invertido. Cultura de células pulparens após cinco dias do estabelecimento da cultura primária.

Figura 3. Equipamento utilizado para avaliação da permeabilidade dentinária.

Figura 4. Esquerda: Demonstração de um dispositivo de Câmara Pulpar Artificial (CPA), com disco de dentina posicionado, previamente à colocação do anel de silicone para vedação lateral. Direita: CPAs posicionadas invertidas em placa de 24 poços.

Figura 5. Aspecto final da placa de 24 poços após plantio das células pulparens no discos de dentina e dispositivos CPAs.

Figura 6. Fotografias demonstrativas da aplicação e lavagem do condicionamento ácido no disco de dentina. Irrigação e aspiração simultânea da água destilada com uso de pipetas.

Figura 7. Fotografia em microscópio invertido de mesa mostrando a formação dos cristais de formazan que dão a coloração arroxeadada ao teste MTT.

Figura 8. Placa demonstrativa do teste colorimétrico de viabilidade celular MTT. A cor arroxeadada evidencia maior viabilidade, proporcional a produção de desidrogenase succínica

Figura 9. Placa demonstrativa do teste colorimétrico de produção de Óxido Nítrico. As linhas A e B representam a curva padrão de colorimetria para referência dos valores de absorvância, durante a leitura, enquanto os demais poços de coloração clara demonstram que não foi evidenciada produção significativa de óxido nítrico no experimento realizado.

Figura 10. Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorvância obtidos no teste de MTT em porcentagem para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

Figura 11. Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorvância obtidos no teste de óxido nítrico (ON) para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

Figura 12. Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorbância obtidos no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

Figura 13. Gráfico de barras apresentando os valores de média obtidos no teste de MTT para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

Figura 14. Gráfico de barra apresentando os valores de média no teste de ON para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

Figura 15. Imagem representativa do grupo controle exposto apenas ao meio de cultura DMEM. A- aumento de 100X; B- aumento de 1000X.

Figura 16. Imagem representativa do grupo controle negativo exposto apenas a solução Hepes em aumento de 500X.

Figura 17. Imagem representativa do grupo experimental exposto a 0.0065% do extrato de uva por 60 minutos em aumento de 100X(A) e 1000X(B).

Figura 18. Imagem representativa do grupo controle positivo, exposto a solução de peróxido de hidrogênio em aumento de 200X.

Figura 19. Imagens representativas dos grupos: (A) controle negativo exposto ao meio de cultura DMEM em aumento de 500X; (B) controle negativo exposto a solução diluente Hepes com aumento de 500X; (C) extrato de uva a 0.65% com aumento de 500X e (D) controle positivo (peróxido de hidrogênio) com aumento de 500X.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações testadas na primeira fase do experimento de contato direto.

Tabela 2. Grupos avaliados na segunda fase de contato direto. Tempo resposta à exposição do extrato.

Tabela 3. Valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas.

Tabela 4. Valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 72 horas.

Tabela 5. Valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância do teste de ON realizado após 24 horas de contato.

Tabela 6. Valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância do teste de ON realizado após 72 horas de contato.

Tabela 7. Valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas.

Tabela 8. Valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 72 horas.

Tabela 9. Valores da mediana e distancia interquartil dos valores em porcentagem do teste de ON realizado após 24 horas.

Tabela 10. Valores da mediana e distancia interquartil dos valores em porcentagem do teste de ON realizado após 72 horas.

Tabela 11. Valores de media e desvio-padrão do teste de MTT com barreira dentinária.

Tabela 12. Valores de media e desvio-padrão do teste de ON com barreira dentinária.

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂: dióxido de carbono

CPA: câmara pulpar artificial

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de cultura modificado Dubelco)

DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

GD: glutaraldeído

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

MEV: microscopia eletrônica de varredura

μl: microlitro

MTT: metiltetrazolium

NaF: fluoreto de sódio

ON: óxido nítrico

pH: potencial hidrogenômico

PBS: phosphate-buffered saline (solução tampão de fosfato)

SFB: soro fetal bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ADESÃO	16
2.2 AGENTES <i>CROSSLINKERS</i>	17
2.3 PROANTOCIANIDINAS	18
2.4 PROANTOCIANIDINAS E A INTERAÇÃO COM A DENTINA	19
2.5 PROANTOCIANIDINAS E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS	21
3. OBJETIVOS	22
4. MÉTODOS	23
4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS PULPARES	23
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EXTRATO DE SEMESTE DE UVA	24
4.3 TESTE DE CONTATO DIRETO	24
4.3.1 FASE 1: CONCENTRAÇÃO RESPOSTA	24
4.3.2 FASE 2: TEMPO RESPOSTA	24
4.4 TESTE DE CONTATO INDIRETO OU COM BARREIRA DENTINÁRIA	25
4.5 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR	29
4.5.1 TESTE DIRETO	29
4.5.2 TESTE INDIRETO	30
4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	31
4.7 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	32
5. RESULTADOS	33
5.1 TESTE DIRETO	33
5.1.1 FASE 1: CONCENTRAÇÃO RESPOSTA	33
5.1.2 FASE 2: TEMPO RESPOSTA	37
5.2 TESTE INDIRETO	42
5.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	45
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos atuais se ligam às estruturas dentárias e, em especial, à dentina através de um mecanismo micromecânico baseado na formação de uma camada híbrida. A dentina, por sua vez, possui fatores que dificultam a adesão desses materiais à sua superfície, como presença túbulos, umidade e prolongamentos odontoblásticos [1, 2]. Dessa forma, houve necessidade de desenvolver técnicas para condicionamento da dentina, que permitiriam a união entre dentina e restauração. Essa união ocorre através da infiltração de monômeros, hidrofílicos e hidrofóbicos, presentes no sistema adesivo, por entre as fibrilas colágenas presentes na dentina [3].

A camada híbrida é a parte mais vulnerável das interfaces, onde o esforço tende a se concentrar e a maioria das falhas de adesão ocorrem, desafiando a estabilidade longitudinal da união resina-dentina [4]. Fatores imediatos do processo de adesão contribuem para essa falta de estabilidade, tais como: alto peso molecular e baixa hidrofília de alguns monômeros resinosos, incompleta infiltração dos monômeros na dentina desmineralizada, ocasionando super exposição de fibrilas colágenas da camada híbrida [5] ; gradiente de umidade da dentina [6] e redução gradual dos espaços interfibrilares no sentido da dentina mineralizada. Além destes fatores imediatos, em longo prazo, ocorrem a degradação hidrolítica e a enzimática, essa solubilizando monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular, expondo mais fibrilas de colágeno, [7] e esta contribuindo para a degradação pela ação de colagenases tais como as metaloproteinases e catepsinas cisteínas [8, 9]

A degradação da interface adesiva entre resina e dentina pode resultar em microinfiltração marginal, a qual permite a passagem de bactérias, fluidos, moléculas e/ou íons pela interface dente restauração, acarretando em sensibilidade pós-operatória, cáries secundárias, manchamento das margens da restauração e danos pulpares irreversíveis [10, 11]. Geralmente, a degradação da interface adesiva é o resultado sinérgico de eventos que envolvem ambos os componentes poliméricos e orgânicos. Os primeiros são afetados exclusivamente pela

degradação hidrolítica, enquanto que as fibrilas de colágeno são degradadas também pela ação enzimática [7].

Algumas estratégias tem sido propostas a fim de reduzir ou prevenir a degradação da camada híbrida. Essas estratégias envolvem: o aumento do grau de conversão e conseqüente resistência a degradação hidrolítica dos adesivos hidrofílicos [12], uso de inibidores de colagenases tais como clorexidina [13, 14], emprego da técnica úmida com etanol que permite melhor infiltração de monômeros hidrófobos [15] e uso de agentes *crosslinkers* a fim de proporcionar maior número de ligações cruzadas adicionais ao colágeno dentinário [16, 17]. Essa última estratégia tem sido pesquisada nos últimos anos e tem se mostrado eficiente em aumentar a longevidade da união resina-dente com diferentes agentes *crosslinkers* tais como glutaraldeído, formaldeído, compostos epóxicos e carbodiamida [18]. Entretanto, esses agentes citados previamente possuem desvantagens tais como a toxicidade, dificuldade de controle da taxa e velocidade de ligação cruzada, e instabilidades [19]. Dessa forma, compostos mais biocompatíveis trariam benefícios tanto para campos como a engenharia de tecido como a odontologia adesiva. Nesse grupo encontram-se as proantocianidinas (PAs) que são bioflavonóides largamente encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e caules, o que garante sua biocompatibilidade, baixo custo e fácil obtenção, uma vez que são encontradas abundantemente na natureza. Esse composto tem sido pesquisado nas áreas de saúde médica e nutricional por diferentes efeitos biológicos, como capacidade antioxidante [20, 21], efeito apoptótico em células tumorais [22, 23], e efeito no metabolismo ósseo [24-29].

Em odontologia, tem sido explorada a capacidade antibacteriana na endodontia [30] e periodontia [21, 31, 32] e mais recentemente como agente *crosslinker* [16, 17] na dentística.

Alguns trabalhos já relataram o efeito do extrato de semente de uva (ESU) nas propriedades físicas e mecânicas da dentina, assim como seu potencial em reduzir a degradação da camada híbrida [16, 17]. Além de seu potencial como agente *crosslinker*, é possível que as PAs exerçam um papel bioestimulador e protetor das células pulpares. Tendo em vista o exposto, pouco se sabe sobre resposta celular a este tipo de extrato, então foi considerado oportuno avaliar *in vitro*

a citotoxicidade do ESU sobre cultura primária de células da polpa. A hipótese nula testada foi que o extrato não influencia na viabilidade celular, estresse oxidativo e morfologia celular em cultura primária de células pulpares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Adesão

A interface resina/dentina resultante da adesão, consiste na formação da camada híbrida ou zona de interdifusão, em que a matriz de dentina, estruturada por colágeno, é reforçada por resina. Esta, é considerada o elo mais fraco da interface adesiva [33]. Isso ocorre porque a substituição do mineral pela resina nunca é a ideal, uma vez que, a presença residual de solvente e o movimento do fluido dentinário em direção a mistura hipertônica dos monômeros [34], resultam em uma incompleta infiltração e encapsulamento das fibrilas de colágeno pelos monômeros resinosos no momento da restauração [16]. Ademais, a dentina desmineralizada contém metaloendoproteinasas (MMPs) e catepsinas ligadas à sua matriz que, uma vez ativadas pelo condicionamento ácido, podem vagarosamente degradar as fibrilas de colágeno da camada híbrida não infiltrada pela resina [13]. Esses fatores foram reconhecidos por reduzirem a longevidade das restaurações de resina, justificando a necessidade de novas estratégias de tratamento para reforçar a estrutura dentinária [35].

A dentina é um tecido mineralizado complexo e organizado numa estrutura tridimensional composta por túbulos estendidos da polpa à junção dentino-esmalte. A porção mineral é composta de apatita carbonada e 90% da matriz orgânica composta por fibrilas de colágeno tipo I; os 10% restantes consistem de proteínas não-colagenosas, que compreendem as fósforoproteínas e proteoglicanas. De todos os tipos de colágeno, o colágeno fibrilar tipo I é o mais abundante fornecendo a forma, estabilidade e conectividade à maioria dos tecidos e órgãos [36], e tendo um papel importante na substituição da estrutura dentária perdida. Sendo assim, proporciona retenção micromecânica de materiais à base de resina, bem como suporte para a remineralização do tecido [35].

A biomodificação da dentina tem sido investigada como uma terapia biomimética que visa fortalecer mecanicamente a rede de colágeno e também controlar as taxas de biodegradação dos componentes da matriz extracelular. A

durabilidade da ligação entre materiais restauradores e os tecidos dentais depende, assim, da resistência intrínseca dos constituintes dessa camada e dos processos de degradação que nela atuam [37].

2.2 Agentes *Crosslinkers*

Na tentativa de proporcionar maior longevidade de adesão dos materiais restauradores, algumas substâncias naturais e sintéticas têm sido utilizadas com o intuito de aumentar o número de ligações cruzadas do colágeno, recebendo o nome de agentes *cross-linkers*. O mecanismo consiste em tornar o colágeno dentinário mais resistente a degradação [18, 19, 38-42]. Dentre as substâncias mais investigadas, estão o extrato de Genipin, a proantocianidina (PA) e o glutaraldeído (GD) [18, 40].

Além da melhora mecânica na propriedade do colágeno, esses agentes têm sido investigados por inibir a ação de MMPs e catepsinas dentinárias [41-44]. Esse efeito é exercido via silenciamento alostérico ou via alteração do sítio de ligação na molécula de colágeno [41, 42, 44]. Com base nisso, a camada híbrida produzida na presença desses agentes são mais resistentes à degradação e apresentam maior estabilidade longitudinal na adesão dos materiais restauradores com a dentina [18, 19, 38-41, 45].

Pensando em controlar as taxas de biodegradação dos componentes da matriz, atividades colagenolíticas e gelatinolíticas das MMPs, uma substância proposta foi o digluconato de clorexidina [13, 46]. Esta, mimetizaria a ação de inibidores teciduais naturais da dentina [47]. A utilização da clorexidina é atraente do ponto de vista clínico, pois já tem sido frequentemente utilizada para limpeza de preparos cavitários, atuando como agente desinfetante sobre esmalte e dentina previamente à inserção das restaurações. Devido à composição da solução em 98% de água, a clorexidina pode atuar na manutenção da expansão da rede de fibrilas de colágeno desmineralizadas, requisito necessário à infiltração dos monômeros hidrofílicos do sistema adesivo para a adequada formação da camada híbrida. Por um mecanismo de quelação de cátions, esta também tem se mostrado efetiva na inibição de pelos menos três tipos de metaloproteinases: MMP-2, MMP-8 e MMP-9 [47].

Avaliando a resistência adesiva imediata após o uso de clorexidina, estudos demonstraram uma resistência compatível como quando ela não é usada, independente do momento de sua aplicação durante o procedimento adesivo [14, 48]. Entretanto, quando a resistência adesiva ao longo do tempo é avaliada e a clorexidina foi aplicada após o condicionamento ácido, foi demonstrado que os grupos experimentais com clorexidina obtiveram uma degradação da resistência adesiva menor comparada com os grupos controle [14, 49-53]. Ainda, estudos mostram que quando utilizada previamente à sistemas adesivos auto-condicionantes de um passo, a solução de clorexidina não é indicada, pois reduz os valores de adesão obtidos imediatamente ou após envelhecimento de 6 meses [49]. Quando da utilização de sistemas adesivos auto-condicionantes de dois passos, deve-se evitar concentrações de clorexidina acima de 0,2%, por 30 segundos [49].

Outra substância estudada como *crosslinker* sintético é o glutaraldeído. Utilizado como fixador de tecido biológico que afeta as propriedades mecânicas destes tecidos, ele interage com os tecidos por meio da formação de ligações cruzadas do tipo bases de Schiff, ao reagir com o grupo ϵ -amino de lisina e hidroxilisina [54].

Embora a ação do glutaraldeído seja comprovada como agente crosslinker, seu uso ainda é controverso pela sua toxicidade em altas concentrações [55]. Recentemente, demonstraram que o uso de uma solução que contendo 2, 5 ou 10% de GD, aplicada por 60 segundos em discos de dentina de 0,4 mm de espessura, após o condicionamento ácido, não exerce efeitos negativos às células odontoblastóides. Mesmo que hajam relatos de que o uso transdentinário não seja capaz de acarretar efeitos celulares negativos, as substâncias naturais têm preferência por não apresentarem efeitos citotóxicos [41].

O extrato de Genipina também foi investigado [39], porém, quando comparado com Glutaraldeído e Proantocianidinas, seu pré tratamento não teve efeito na melhora da força de adesão após tratamento restaurador [18].

2.3 Proantocianidinas

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa [56]. Os recursos terapêuticos

disponíveis para aplicação na área médica eram constituídos por plantas e extratos vegetais, sendo que, com o desenvolvimento da tecnologia, os chamados “princípios ativos” começaram a ser isolados e, a partir daí, aumentaram os estudos na área de produtos naturais e surgiram várias aplicações biotecnológicas.

As proantocianidinas (PAs) são bioflavonóides constituintes de um grupo específico de compostos polifenólicos e provem de uma categoria conhecida como taninos condensados [19]. Neste contexto, devido, principalmente, ao elevado número de hidroxilas, as proantocianidinas têm mostrado várias atividades biológicas, além de recentes pesquisas relacionadas à formação de ligações cruzadas verificadas em polímeros, apresentam bioatividade promissora, biocompatibilidade, recurso renovável/sustentável, baixo custo e aplicações aumentadas quando comparadas a outros agentes [35].

Proantocianidinas tem sido pesquisadas nas áreas de saúde médica e nutricional por diferentes efeitos biológicos, como capacidade antioxidante [20, 21], efeito apoptótico em células tumorais [22, 23], e efeito no metabolismo ósseo [24-29].

Esses efeitos estão provavelmente relacionados à sua afinidade com ligações proteicas. Existem quatro diferentes teorias para explicar como a proantocianidinas interage com as proteínas: formação de ligações covalentes [57], ligações iônicas [58], pontes de hidrogênio [59], e interações hidrofóbicas [19].

Proantocianidinas oligoméricas, são assim chamadas por possuírem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila e são conhecidos por diversos nomes também por leucocianidinas. Foram extraídas primeiramente da casca do pinheiro em 1951 por um pesquisador francês que descobriu que as cascas compartilhavam muitos efeitos bioquímicos e fisiológicos com a vitamina C [60]. Elas são metabólitos naturais secundários do reino vegetal e são encontradas em frutas, vegetais, castanha, sementes e flores, sendo que o cacau e seus produtos, além de semente de uva, estão entre as mais ricas fontes de PAs [19].

2.4 Proantocianidinas e a interação com a dentina

As propriedades mecânicas da camada de dentina subjacente e híbrida são significativamente melhoradas e em grande parte atribuída ao agente mediador de

colágeno não-enzimático da ligação cruzada. A estabilidade a longo prazo também foi relatada e atribuída a irreversibilidade da ligação *crosslinker* do colágeno, além da redução da biodegradação da matriz dentinária. Biomodificação de matrizes de dentina por extratos ricos em *PA*s induzem resistência notável contra a degradação de colagenases bacterianas ou proteases endógenas como *MMPs*. Os efeitos inibidores sobre as proteases foram descritos como não específicos, fazendo com que a determinação dos seus mecanismos de ação sejam desafiadores. No entanto, os principais efeitos inibitórios estão provavelmente envolvidos em vários mecanismos, tais como a redução da expressão de proteases endógenas, proteases de inativação e proteção de sítios de clivagem dentro do colágeno, expandindo sua potência e aplicação clínica [35].

Em paralelo, o ESU foi avaliado em comparação com solução de fluoreto de sódio, na desmineralização da dentina radicular *in vitro*. O extrato sozinho foi capaz de reduzir a progressão da lesão em dentina da raiz, mas a uma escala relativamente menor em comparação com o grupo controle NaF. Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a biomodificação do substrato dentinário usando ESU é uma alternativa biomimética na prevenção de cáries radiculares, podendo reforçar a matriz orgânica e aumentar remineralização da dentina radicular, associada ou não ao NaF [61].

O tratamento da dentina condicionada por ácido fosfórico com ESU previamente aos procedimentos adesivos aumentou significativamente a resistência de união entre dentina e restauração tanto para dentinas sadias quanto afetadas pela cárie, além de aumentar a estabilidade das fibrilas de colágeno [62]. No estudo de Castellan et al., (2010), a força de união dente-resina foi significativamente aumentada com aplicação de apenas 10 minutos de ESU sobre a dentina previamente aos procedimentos restauradores[63]. Bredan-Russo et al. (2011) observaram que o tratamento com ESU aumentou a resistência a biodegradação e melhorou as propriedades mecânicas da dentina quando exposta a ação enzimática de colagenases[61]. Nesse estudo *in vitro* foi demonstrada a capacidade dos agentes *crosslinkers* ricos em PA em melhorar a curto prazo as propriedades mecânicas do colágeno, reduzir a susceptibilidade do mesmo a degradação enzimática pelas colagenases e aumentar a estabilidade da interface adesiva [61].

2.5 Proantocianidinas e seus efeitos biológicos

Além dessas atividades, as PAs tem sido extensamente investigadas em outras áreas tais como a nutrição, saúde e medicina devido suas atividades fisiológicas que envolvem ação antioxidante, efeito antimicrobiano, propriedades anti-inflamatórias, atividade antialérgica e inibidora de atividades enzimáticas como a fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipooxigenase e seus receptores [59]. Dessa forma, além de seu potencial de estabilizar a camada híbrida, é possível que as PA exerçam um papel bioestimulador e protetor das células pulpares.

Seu efeito celular já foi previamente investigado em cultura de fibroblastos provenientes da pele de pacientes portadores de Ehlers-Danlos tipo V, uma doença hereditária na qual ocorre a formação de fibrilas colágenas com resistência diminuída. A excessividade da solubilidade do colágeno pode ser corrigida pela adição de PA sintética ao meio de cultura [64]. Estes bioflavonóides mostraram potencial em inibir o catabolismo do colágeno solúvel, estimular a proliferação de fibroblastos normais da pele, e aumentar a síntese de matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina [65, 66].

3. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do extrato de semente de uva (ESU) em cultura primária de células pulpares humanas por meio de contato direto e transdentinário. A avaliação da citotoxicidade do extrato foi realizada por meio de:

- Análise do metabolismo celular utilizando teste metiltetrazolium (MTT),
- Dosagem do estresse oxidativo através da produção de óxido nítrico (ON),
- Análise da morfologia celular utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e cultivo das células pulpares

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, CAE n° 43353515.0.0000.0030. A polpa dentária foi obtida a partir de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos com idades entre 18 a 25 anos. O tecido pulpar foi removido com pinça clínica e limas endodônticas estéreis e imerso em uma solução contendo D-MEM (Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) associado as enzimas colágenase tipo 1 (3mg/ml) e dispase (4mg/ml) por uma hora a 37° C, conforme descrito previamente na literatura [67]. Em seguida, a solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet celular cultivado em garrafas plásticas com área de base de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura D-MEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em uma atmosfera umidecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C. Essas células foram subcultivadas a cada três dias, até a obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento.



Figura 1. Terceiro molar sendo manipulado em fluxo laminar, para extração do tecido pulpar.

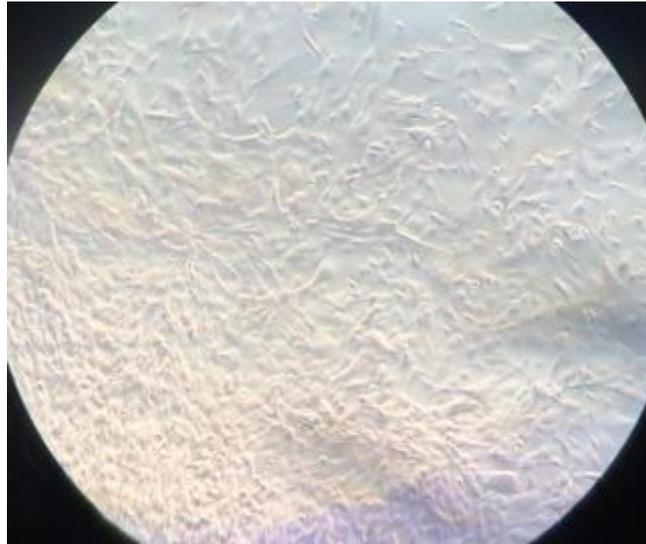


Figura 2. Foto em microscópio de mesa invertido. Cultura de células pulpares após cinco dias do estabelecimento da cultura primária.

4.2 Preparo das soluções de Extrato de Uva

O ESU foi diluído em diferentes soluções após testes de sedimentação por 24h. O solvente capaz de produzir uma solução homogênea sem sofrer decantação das partículas do extrato durante o tempo de experimento foi a solução de HEPES. Segundo estudo de Bedran Russo (2014), o extrato foi analisado através da análise de cromatografia líquida de alta eficiência, contendo 95% de proantocianidina [35]. A aquisição do extrato utilizado se deu por meio de parceria (*Department of Restorative Dentistry, College of Dentistry, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL*), sendo fornecidas todas as amostras do mesmo lote comercial - *Vitis vinifera*, Mega- Natural extrato de semente de uva dourado, Lote 13682503-01, Polyphenolics Madera, CA, EUA. A solução tampão HEPES foi preparada na proporção de 0,0047g de sal (4 {[2-hidroxiethyl]-1- {ácido piperazinetanesulfônico}}) para cada 10ml de água mili Q esterilizada. As soluções foram preparadas e filtradas previamente à cada experimento.

A escolha do extrato puro de semente de uva, assim como os parâmetros de concentração e tempo de contato utilizados neste estudo foi realizada dando continuidade aos estudos de agentes *crosslinkers* existentes em dentina [17, 35, 39, 40, 61] e com base na otimização da provável aplicação clínica de um material odontológico.

4.3 Teste de Contato Direto

Para o teste direto, o ESU avaliados foram diluídos em solução Hepes e tiveram o pH ajustado em 7,2 previamente ao experimento. As células foram

Substância testada	Tempo de contato
Controle Hepes	1h
6,5% ESU	1h
0,65% ESU	1h
0,065% ESU	1h
0,0065% ESU	1h
Controle Peróxido 20%	1h

plaqueadas 24h antes do experimento, dez mil células por poço em placas de 96 poços. A solução contendo os agentes *crosslinkers* foi colocada em contato com as células pulpares e mantida em uma atmosfera umidecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C por 24 e 72 horas.

Foram realizadas duas fases de análise para um screening da melhor concentração e tempo de contatos direto do extrato com as células.

4.3.1 Fase 1: Concentração resposta

O experimento contou com seis grupos. As concentrações avaliadas foram as demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações testadas na primeira fase do experimento de contato direto.

4.3.2 Fase 2: Tempo resposta

Após análise dos testes de concentração, a melhor concentração foi escolhida para ser testada sob diferentes tempos de contato. Os grupos avaliados são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos avaliados na segunda fase de contato direto. Tempo resposta à exposição do extrato.

4.4 Teste de Contato Indireto ou com Barreira Dentinária

Os mesmos terceiros molares utilizados para coleta da polpa, tiveram suas coroas armazenadas em água destilada com Timol 0,9% a 4°C. As coroas foram fixadas a uma máquina de corte de disco diamantado, para fornecer fatias de 0,5mm de espessura, na direção transversal da coroa, na região acima dos cornos pulpares e aquém da junção dentina-esmalte oclusal. Foram obtidos um disco de cada dente, e foram selecionados aqueles que possuíam apenas dentina em sua região central. Os discos foram imersos em EDTA 0.5M por 60 segundos e em seguida lavados copiosamente com água destilada, com o intuito de remover a *smear layer* formada no processo de corte e padronizar a permeabilidade.

A permeabilidade dentinária foi medida utilizando uma máquina para determinar a condutância hidráulica. As medidas foram feitas de acordo com o manual do fabricante do aparelho (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Luzerna, SC, Brasil). A condutância hidráulica baseia-se na medição do volume de fluido que passa através do disco de dentina sob uma pressão hidrostática constante, por unidade de área e por unidade de tempo. O disco foi fixado em uma câmara de filtração que é acoplada a um capilar. Ao ser regulada a

Substância testada	Tempo de contato
Controle Hepes	1h
0,0065% ESU	1h
0,0065% ESU	30 min
0,0065% ESU	10 min
0,0065% ESU	1 min
Controle Peróxido 20%	1h

pressão de 140mmHg, água destilada é conduzida no interior do capilar em direção ao disco dentinário. Para que seja determinada a permeabilidade, uma bolha de ar é injetada no capilar. Foi calculado o deslocamento da bolha de ar por um tempo pré-determinado. Esse procedimento foi feito três vezes, gerando uma média aritmética para cada disco. A partir desses dados, os discos foram randomizados de forma a

gerar grupos semelhantes, e divididos de acordo com os grupos experimentais.



Figura 3. Equipamento utilizado para avaliação da permeabilidade dentinária.

Os discos foram posicionados em um dispositivo denominado câmara pulpar artificial (CPA) [68], fixados por dois anéis de silicone (Orion – São Paulo, SP, Brasil) para permitir o vedamento lateral dos discos juntamente à câmara durante as trocas de soluções experimentais. Os dispositivos montados foram enviados para esterilização de gás de óxido etileno (Acecil Central de Esterilização Comercial Ltda, Campinas, SP, Brasil). Cada CPA ocupou um poço na placa de 24 poços (Corning Incorporated, NY, EUA).



Figura 4. Esquerda: Demonstração de um dispositivo de Câmara Pulpar Artificial, com disco de dentina posicionado, previamente à colocação do anel de silicone para vedação lateral. Direita: CPAs posicionadas invertidas em placa de 24 poços.

Para o plantio, as câmaras foram posicionadas invertidas nos poços da placa. Em seguida foram acrescentados 2 mL de meio completo em cada poço e foram plantadas cinquenta mil células por disco. A placa repousou por 24h em atmosfera umidecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C. Após esse período, as câmaras foram revertidas com auxílio de pinça e sonda clínica, simulando que a área interna onde as células aderiram, fosse uma parede pulpar, e o lado superior do disco, sem células, fosse a cavidade de dentina após um preparo cavitário.

Os discos foram condicionados com ácido fosfórico 37% (Condac, FGM) por 15 segundos e lavados copiosamente com 1 mL de água destilada com auxílio de pipetas, assim como demonstrado na Figura 7. Após o condicionamento de todas as amostras, os seguintes grupos permaneceram por 24h em contato com o ESU: G1: controle negativo celular (D-MEM); G2: controle negativo de tratamento (Hepes); G3: 0,65% de ESU; G4: controle peróxido (H₂O₂ a 20%).

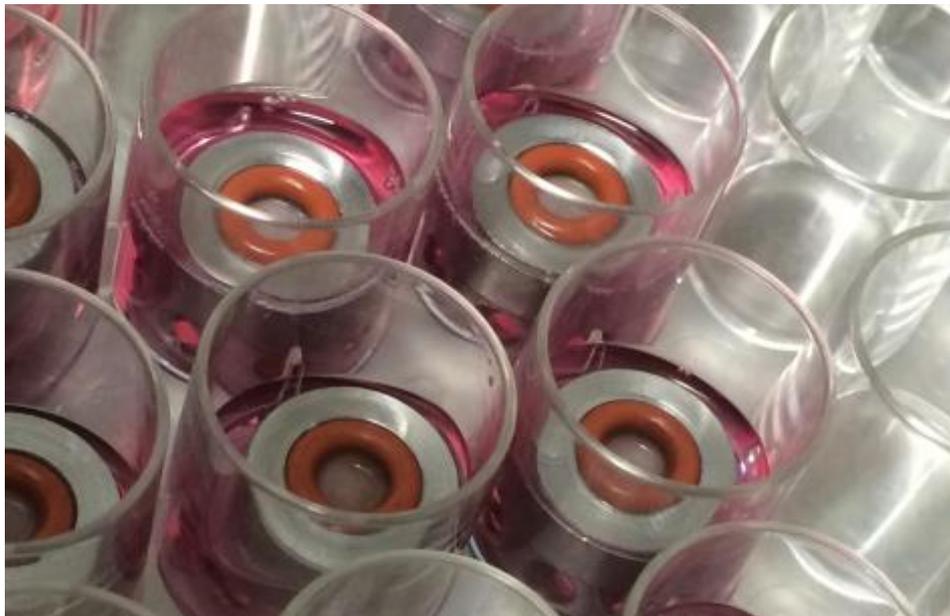


Figura 5: Aspecto final da placa de 24 poços após plantio das células pulpares no discos de dentina e dispositivos CPAs.



Figura 6: Fotos demonstrativas da aplicação e lavagem do condicionamento ácido no disco de dentina. Irrigação e aspiração simultânea da água destilada com uso de pipetas.

4.5 Análise do metabolismo celular

O metabolismo celular foi analisado com base na avaliação colorimétrica da reação mitocondrial das células expostas ao sal de *brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)*. Quando expostas ao sal de MTT, desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando o meio em um composto de coloração arroxeada, resultante dos cristais de formazan [69].

4.5.1 Teste Direto

Após os diferentes períodos de exposição do ESU, o meio de cultura foi removido e em seguida, foram colocados 90 µl de D-MEM, ao qual foram adicionados 10 µl de solução de MTT (Sigma Chemical Co., EUA), em uma concentração de 5 mg/ml, com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de quatro horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi removida e substituída por 60 µl da solução DMSO (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), a qual apresenta como objetivo dissolver os cristais violeta resultantes da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis [69].

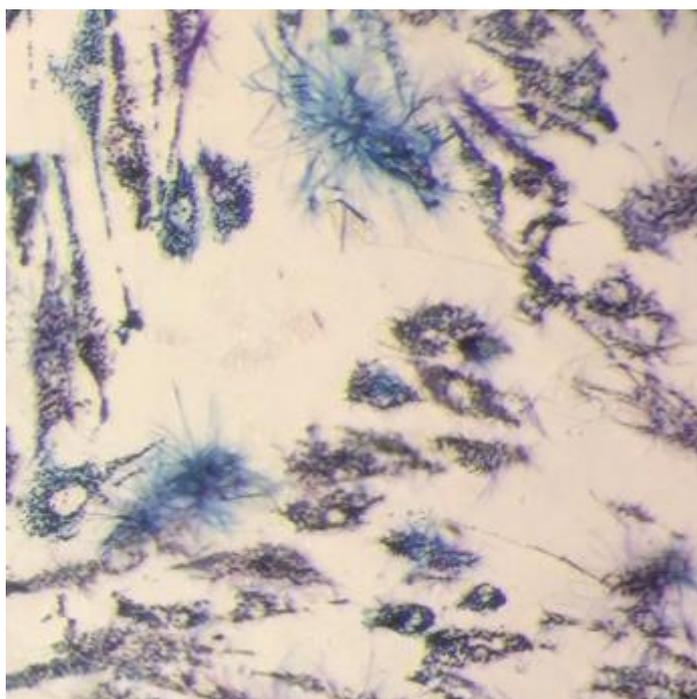


Figura 7. Foto em microscópio invertido de mesa mostrando a formação dos cristais de formazan que dão a coloração arroxeadada ao teste MTT.

4.5.2 Teste Indireto

Após os períodos de experimento, o meio dos poços foi completamente removido, os discos foram removidos das CPAs com auxílio de pinça estéril e foram transferidos para uma nova placa de 24 poços. Em cada poço foi colocado um disco e foram adicionados 450 μ l de D-MEM e 50 μ l de solução de MTT (Sigma Chemical Co., EUA), em uma concentração de 5 mg/ml. Transcorridas 4h de armazenamento em estufa, a solução de MTT foi removida e substituída por 300 μ l de DMSO. A solução foi ressuspensa sobre o disco e passados 100 μ l para três poços de uma placa de 96.

Em ambos experimentos a viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 595 nm em leitor de ELISA (EON; Thermoplate, Shenzhen, China). Os resultados foram calculados por meio da média em valores numéricos das alíquotas de cada poço. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos à análise estatística. Cada experimento foi realizado em duplicata, em momentos diferentes, com n=5.

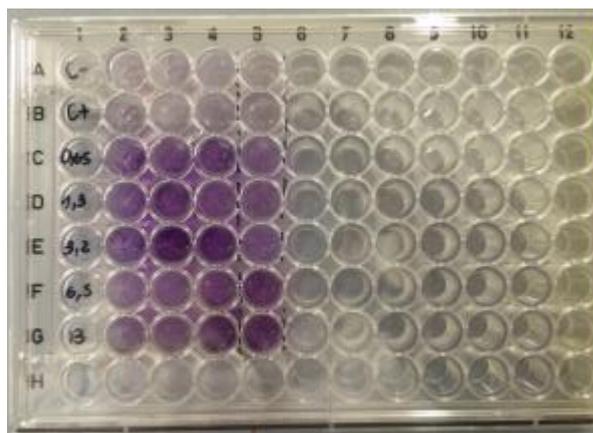


Figura 8: Placa demonstrativa do teste colorimétrico de viabilidade celular MTT. A cor arroxeadada evidencia maior viabilidade, proporcional a produção de desidrogenase sucínica

4.6 Análise da produção de Óxido Nítrico

Para análise de estresse oxidativo foi utilizada a taxa de produção de óxido nítrico. O teste é uma avaliação colorimétrica da reação entre os radicais livres de óxido nítrico e uma solução reveladora. Para tanto, é feita uma curva padrão de nitrito de sódio através de uma diluição seriada, que em contato com a solução reveladora forma uma escala de amarelo claro até roxo [70].

Utilizando o meio removido das placas do ensaio anterior de viabilidade, 100 µl do sobrenadante de cada amostra foram passados para outra placa de 96 poços, nos tempos de 24 e 72h após exposição direta ao extrato. A cada poço foram adicionados 100µl de solução reveladora. A leitura é determinada pela absorbância em leitor de ELISA à 490nm (EON; Thermoplate, Shenzhen, China).

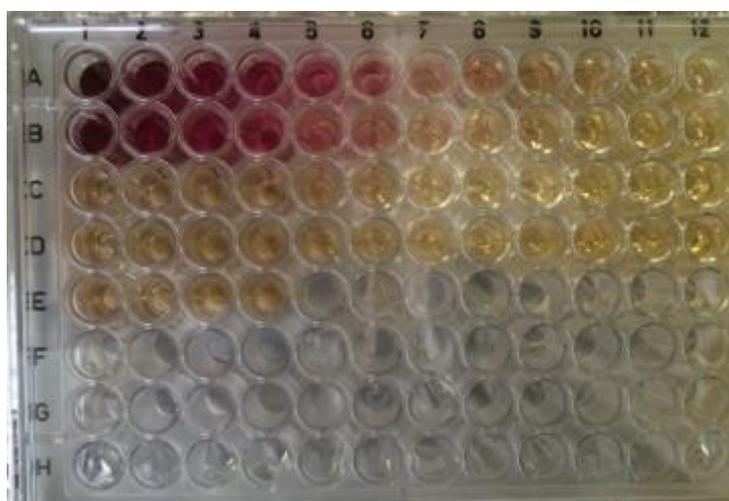


Figura 9: Placa demonstrativa do teste colorimétrico de produção de Óxido Nítrico. As linhas A e B representam a curva padrão de colorimetria para referência dos valores de absorvância, durante a leitura, enquanto as linhas C,D e E, de coloração clara demonstram que não foi evidenciada produção significativa de óxido nítrico no experimento realizado.

4.7 Análise da Morfologia Celular por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Dois espécimes de cada grupo foram destinados para a avaliação da morfologia das células em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7001F Field Scanning Electron Microscope, JEOL, EUA). Para isso, no teste direto foram utilizadas lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA), posicionadas na base dos compartimentos da placa de 24 poços antes do cultivo das células. Posicionadas as lamínulas, a placa de cultivo celular foi preenchida com 1 mL de meio de cultura D-MEM suplementado com 10% de SFB, viabilizando o plantio das células como no início do experimento. O meio de cultura foi substituído pelos extratos obtidos como descrito anteriormente, mantido em contato com as células nos tempos determinados pelos grupos. Decorrido esse período, os extratos foram removidos e as células aderidas às lamínulas de vidro. No teste de contato indireto, o próprio disco de dentina foi utilizado como anteparo aderente de células.

Tanto as lamínulas de vidro quanto os discos de dentina foram fixadas por vinte e quatro horas em glutaraldeído 2,5% com pH ajustado em 7.2. Posteriormente à fixação inicial das células, estas foram submetidas a lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (cinco minutos cada lavagem), seguida de lavagem por duas vezes em 1 mL de água destilada (quinze minutos cada lavagem), e desidratação em 1mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (trinta minutos em cada solução). Finalmente, a última solução foi desprezada e as amostras contendo as células foram removidas do fundo dos compartimentos e por meio de pinça cirúrgica e sonda exploradora, fixadas em stubs. Estes foram mantidos por quarenta e oito horas no dessecador e , após isso, foram metalizados e analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7001F; Field Emission Scanning Electron Microscope)

5. RESULTADOS

5.1 Teste Direto

5.1.1 Fase 1: Experimentos de Concentração resposta

Ensaio MTT

Para os experimentos de concentração resposta, as seguintes concentrações foram avaliadas 6,5%; 0,65%, 0,065% e 0,0065% em um tempo de contato de 1 hora. Todos os valores obtidos de absorbância foram transformados em porcentagem considerando a media do grupo controle como 100% de viabilidade celular. Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos, Kruskal Wallis e Mann-Whitney, foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p < 0.0001$).

A Tabela 3 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas.

Tabela 3: Valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas

Grupo	Mediana (%)	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	105,3 ^a	85-114
2- ESU 6,5%	144,7 ^b	118-162
3- ESU 0,65%	94,4 ^a	90-104
4- ESU 0,065%	73,3 ^c	66-87
5- ESU 0,0065%	134,4 ^b	115-164
6-Controle positivo (Peroxido)	16,5 ^d	5,7-24,2

Observa-se que tanto o extrato de uva na concentração de 6.5% apresenta os valores mais elevados de viabilidade celular. Esses valores foram influenciados pela capacidade desse agente em colorir e interferir nos valores de absorbância, ainda que um controle sem célula tenha sido utilizado para subtração. A maioria das concentrações utilizadas não reduziram a viabilidade celular de forma significativa,

exceto a concentração de ESU 0.065% apresentou os menores valores quando comparadas as demais concentrações ($p < 0.05$).

Observa-se que houve um comportamento dependente da concentração utilizada, porém não de forma linear, ou seja, diretamente proporcional. Tanto a maior concentração utilizada quanto a menor concentração apresentaram os maiores valores de viabilidade celular, indicando o potencial do extrato de uva em aumentar o metabolismo celular na menor concentração (0.0065%). O Controle positivo apresentou os menores valores de MTT, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0.05$).

A tabela 4 apresenta os dados de MTT avaliados após 72 horas de contato com as soluções de agente *crosslinker*.

Tabela 4: valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 72 horas

Grupo	Mediana (%)	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	104,2 ^a	98-112
2- ESU 6.5%	108,9 ^a	95-153
3- ESU 0.65%	91,8 ^b	79-100
4- ESU 0.065%	91,5 ^b	85-96
5- ESU 0.0065%	100,9 ^c	90-122
6-Controle positivo (Peroxido)	13,6 ^d	7-21

Da mesma forma como observado no período de 24 horas, as concentrações de ESU a 6.5% apresentam os maiores valores de MTT. Diferentemente, observa-se que duas concentrações de ESU reduziram o metabolismo celular (0.65 e 0.065%) de forma significativa quando comparado ao controle.

Ainda que essas diferenças sejam observadas entre os períodos de 24 e 72 horas, observa-se o mesmo comportamento dos agentes *crosslinkers* como demonstrado na figura 10.

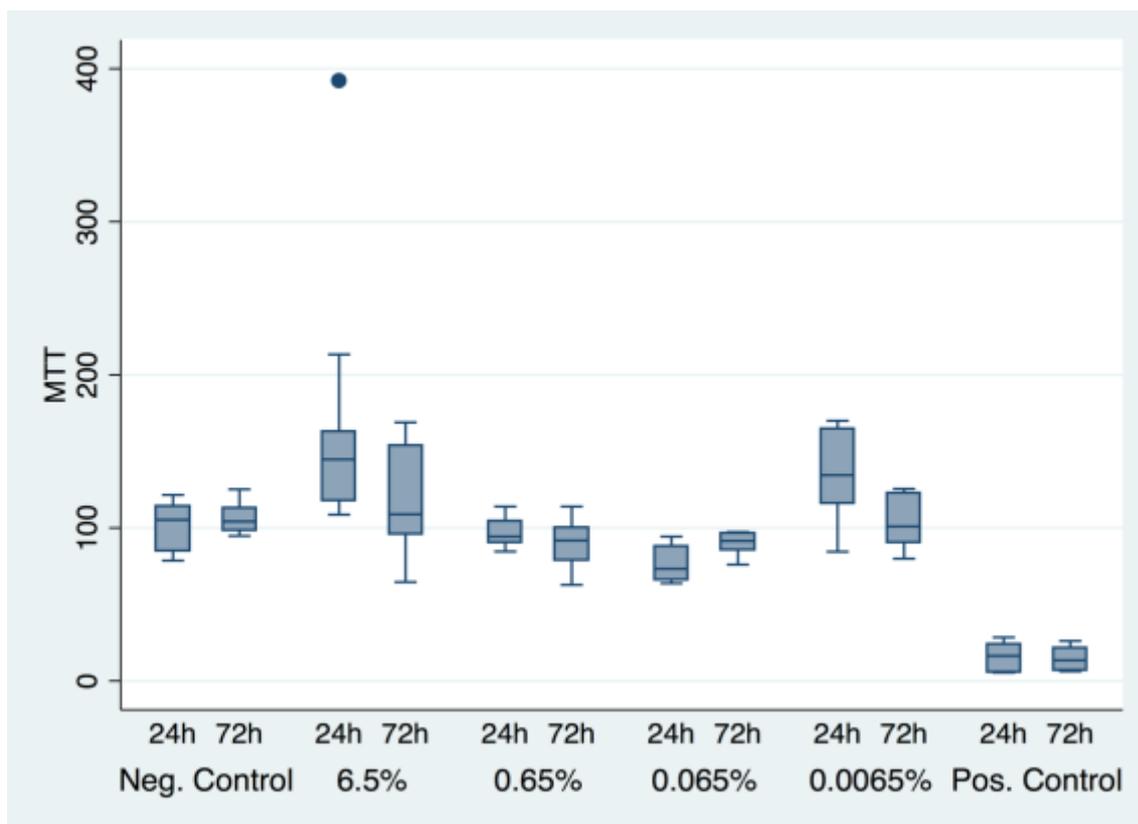


Figura 10: Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de media, mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância obtidos no teste de MTT em porcentagem para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

Ensaio ON

Utilizando a metodologia descrita por GREEN (1982), o ensaio de ON foi realizado utilizando o sobrenadante. Com auxílio da curva padrão, uma função linear foi obtida a fim de quantificar ON produzido. Os níveis produzidos foram baixos, levando a valores negativos devido a limitação do próprio leitor ELISA em quantificar níveis mínimos de ON [70].

A Tabela 5 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorbância de ON realizado após 24 horas.

Tabela 5: Valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância do teste de ON realizado após 24 horas de contato

Grupo	Mediana	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	0,01 ^a	0,002-0,012
2- ESU 6.5%	0,15 ^{b,d}	0,084-0,21
3- ESU 0.65%	-0,0055 ^c	-0,01-0,007
4- ESU 0.065%	0,006 ^a	0,002-0,013
5- ESU 0.0065%	0,0095 ^a	0,004-0,012
6-Controle positivo (Peróxido)	0,2 ^d	0,17-0,23

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p < 0.001$). O teste de Mann Whitney indicou que os grupos que produziram concentrações significativamente superiores ao controle negativo foram ESU 6.5% e controle positivo (peróxido de hidrogênio), sendo que ESU 6.5% não foi diferente do controle positivo ($p > 0.05$).

A Tabela 6 apresenta os valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância de ON realizado após 72 horas.

Tabela 6: Valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância do teste de ON realizado após 72 horas de contato

Grupo	Mediana	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	0,027 ^a	0,014-0,039
2- ESU 6.5%	0,22 ^b	0,18-0,23
3- ESU 0.65%	0,027 ^a	0,05-0,088
4- ESU 0.065%	0,008 ^{c,d}	0,005-0,09
5- ESU 0.0065%	0,006 ^{c,d}	-0,004-0,018
6-Controle positivo (Peroxido)	0,27 ^b	0,23-0,34

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p < 0.0001$). O teste de Mann Whitney indicou que os grupos que produziram concentrações significativamente superiores ao controle negativo foram ESU 6.5% e controle positivo (peróxido de hidrogênio), sendo que ESU 6.5% não foi diferente do controle positivo ($p > 0.05$), assim como observado para o período de 24 horas. Em

geral, o período de 72 horas apresenta valores superiores de ON devido ao maior tempo espera para coleta do sobrenadante.

Ainda que diferenças sejam observadas entre os períodos de 24 e 72 horas, observa-se o mesmo comportamento dos agentes *crosslinkers* como demonstrado na figura 11.

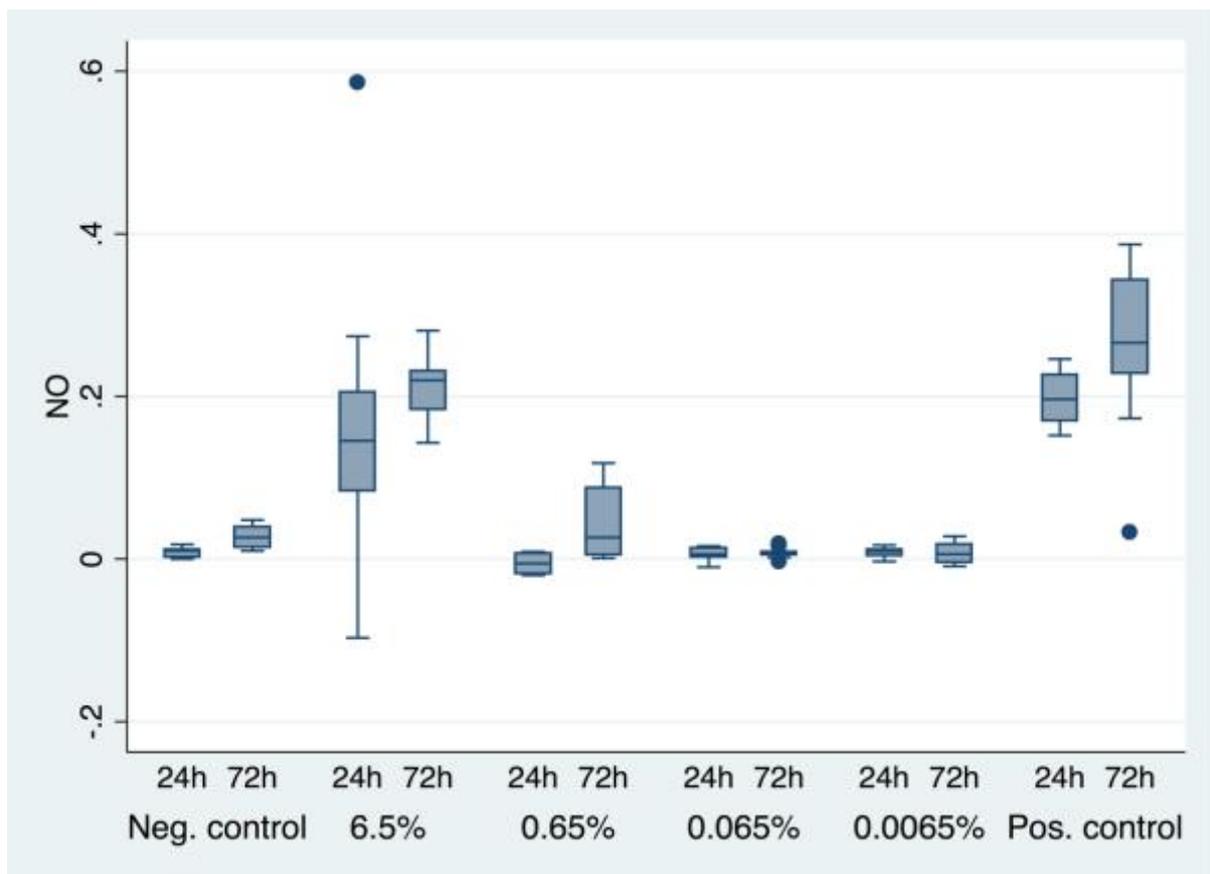


Figura 11: Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância obtidos no teste de ON para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

5.1.2 Fase 2: Experimentos Tempo resposta

Ensaio MTT

Para os experimentos de tempo resposta, os seguintes tempos foram avaliados os tempos de 1, 10, 30 e 60 minutos na concentração de 0.0065%, uma vez que essa concentração previamente testada apresentou-se com resultados satisfatórios para cultura de células pulpares. A opção por avaliar a menor concentração baseou-se na tentativa de avaliar se mesmo com pouco tempo de contato, essa concentração manteria sua capacidade de estimular o metabolismo celular, como observado nos experimentos de concentração-resposta. Todos os valores obtidos de absorvância foram transformados em porcentagem considerando a media do grupo controle como 100% de viabilidade celular. Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p < 0.0001$).

A Tabela 7 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas para os experimentos de tempo-resposta.

Tabela 7: valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas

Grupo	Mediana (%)	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	102,5 ^a	99-105
2-1 min	115,6 ^a	72-118
3-10min	101,4 ^a	95-106
4-30min	109,9 ^a	61-112
5-60 min	102,1 ^a	77-105
6-Controle positivo (Peroxido)	7,6 ^b	6,2-13

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p < 0.0005$). O teste de Mann Whitney indicou que todos os grupos contendo o extrato da uva não foram diferentes do controle negativo ($p > 0.05$), porém diferentes do controle positivo (peróxido; $p < 0.05$). Não houve diferença entre os tempos testados, indicando não haver uma relação tempo dependente para o metabolismo celular.

A Tabela 8 apresenta os valores da mediana e distancia interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 72 horas para os experimentos de tempo-resposta.

Tabela 8: valores da mediana e distância interquartil dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 72 horas

Grupo	Mediana (%)	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	97,3 ^a	86-128
2-1 min	80,9 ^a	71-150
3-10min	127 ^a	89-158
4-30min	111,5 ^a	97-140
5-60 min	111,5 ^a	110-133
6-Controle positivo (Peroxido)	10,8 ^b	6,5-15

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p < 0.0005$). O teste de Mann Whitney indicou que todos os grupos contendo o extrato da uva não foram diferentes do controle negativo ($p > 0.05$), porem diferentes do controle positivo (peroxido; $p < 0.05$) também para o período de 72 horas. Uma relação tempo dependente para o metabolismo celular também não foi observada para o período de 72 horas.

A Figura 12 apresenta um gráfico do tipo box-plot com os valores de media, mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância obtidos no teste de MTT no experimento de tempo-resposta para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

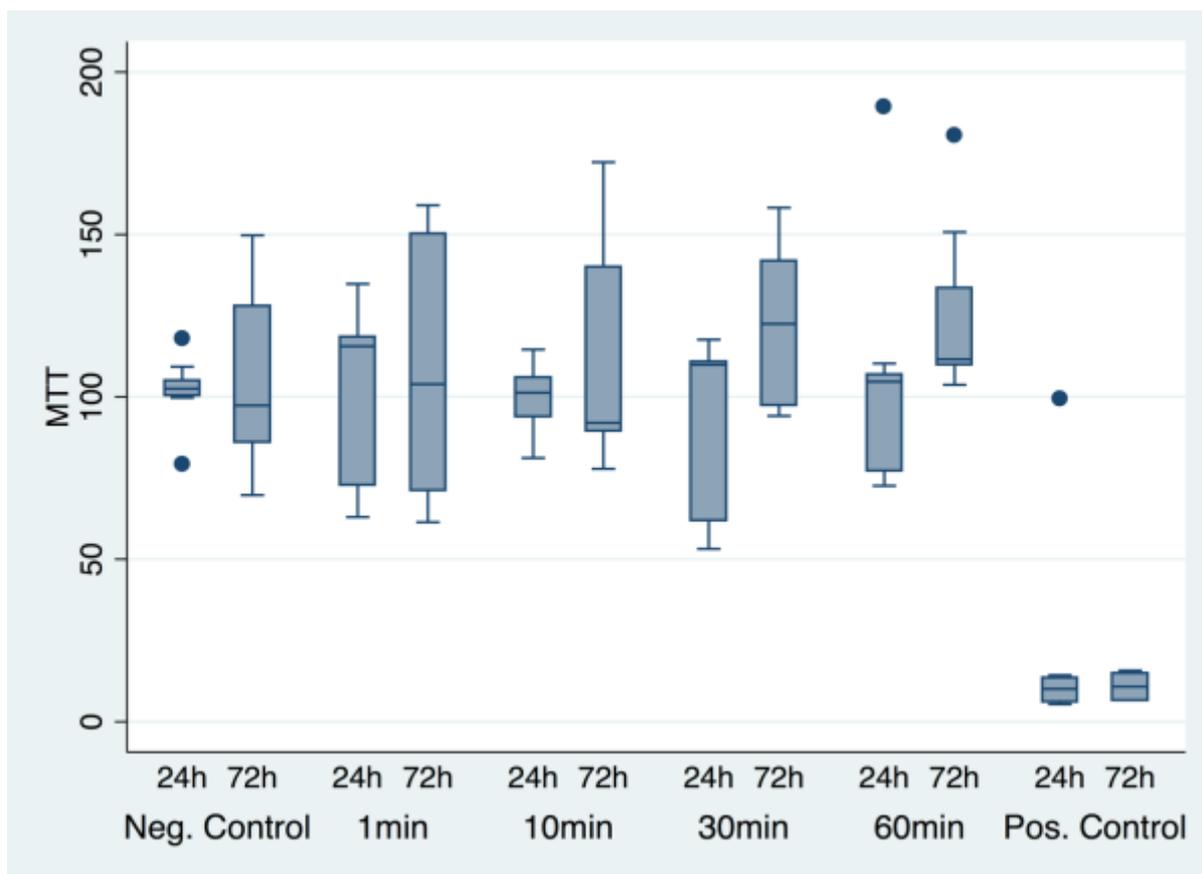


Figura 12: Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorbância obtidos no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas.

Ensaio ON

Os níveis produzidos foram baixos, levando a valores negativos devido a limitação do próprio leitor ELISA em quantificar níveis mínimos de ON, da mesma forma como observado no experimento para concentração-resposta.

A Tabela 9 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorbância de ON realizado após 24 horas.

Tabela 9: valores da mediana e distancia interquartil dos valores em porcentagem do teste de ON realizado após 24 horas

Grupo	Mediana	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	0,005 ^{a,c}	,003-,007
2-Controle positivo (Peroxido)	0,036 ^b	0,014-0,051
3-1 min	0,013 ^c	0,005-0,013
4-10min	0,002 ^{a,d}	-0,005-0,011
5-30min	0,005 ^{a,d}	-0,007-0,015
6-60 min	-0,003 ^d	-0,004-0,001

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p=0,005$). O teste de Mann Whitney indicou que os grupos contendo o extrato da uva não foram diferentes do controle negativo ($p>0,05$), exceto o tempo de 60 minutos que apresentou valores menores que o grupo controle. Todos os grupos produziram menos ON do que o grupo controle positivo (peroxido; $p<0,05$).

A Tabela 10 apresenta os valores da mediana e distancia interquartil dos valores de absorbância de ON realizado após 72 horas.

Tabela 10: valores da mediana e distancia interquartil dos valores em porcentagem do teste de ON realizado após 72 horas

Grupo	Mediana	IQR
1-Controle negativo (Hepes)	0,024 ^a	,011-0,032
2-Controle positivo (Peroxido)	0,333 ^b	0,21-0,43
3-1 min	0,0095 ^{c,d,e}	-0,005-0,017
4-10min	0,0005 ^{d,e}	-0,005-0,003
5-30min	0,015 ^{a,c,e}	0-0,021
6-60 min	0,006 ^e	0-0,007

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença entre os grupos ($p=0,0001$). O teste de Mann Whitney indicou que os grupos contendo o extrato da uva foram diferentes do controle negativo ($p<0,05$), exceto o tempo de 30

minutos. Todos os grupos produziram menos ON do que o grupo controle positivo (peróxido; $p < 0,05$).

A Figura 13 apresenta os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorvância obtidos no teste de ON para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas para o experimento de tempo resposta.

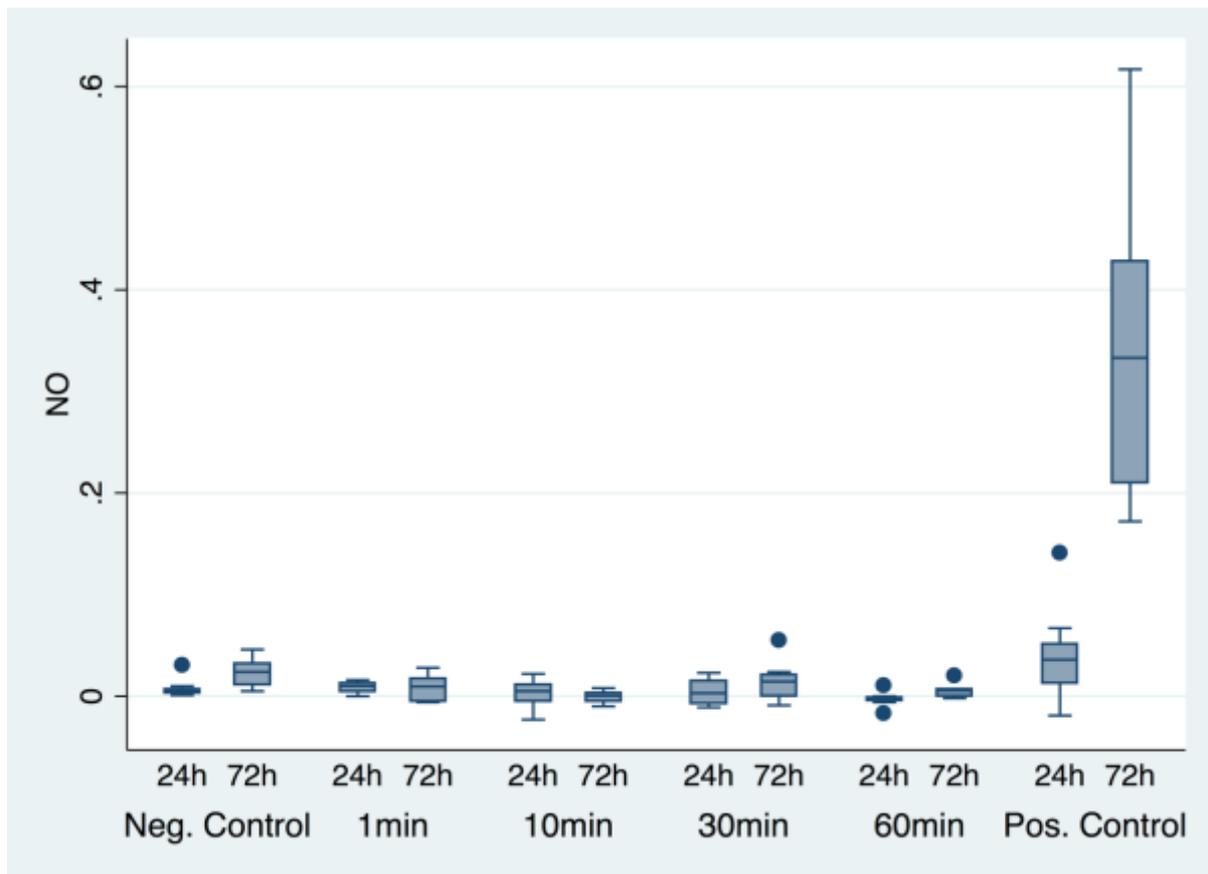


Figura 13: Gráfico do tipo box-plot apresentando os valores de média, mediana e distância interquartil dos valores de absorvância obtidos no teste de ON para os diferentes grupos nos períodos de 24 e 72 horas para o experimento de tempo resposta.

5.2 Teste Indireto - Experimentos com barreira dentinária

Ensaio MTT

Para os experimentos com barreira dentinária, uma vez que a concentração mais baixa testada do extrato de uva apresentou comportamento favorável

(0,0065%), optou-se por trabalhar com a concentração de 0,65% de concentração resposta, pois a própria barreira de dentina impede a difusão completa dos produtos aplicados sobre sua superfície.

A Tabela 11 apresenta os valores da média e desvio-padrão dos valores em porcentagem do teste de MTT realizado após 24 horas. A média do grupo controle negativo HEPES foi considerada com 100% de metabolismo celular e os demais valores foram obtidos em porcentagem tendo essa média como referência.

Tabela 11: Valores de média e desvio-padrão do teste de MTT com barreira dentinária

Grupo	Média	DP
1-Controle negativo (meio)	91,91 ^a	35,17
2-Controle negativo (HEPES)	100,92 ^a	25,04
3- ESU 0.65%	123,53 ^a	37,72
6-Controle positivo (Peróxido)	0,98 ^b	1,64

De acordo com o teste de ANOVA, foi observada diferença entre os grupos ($p=0.005$). O teste de Tukey indicou que não houve diferença entre os grupos controle negativo e o grupo experimental ($p>0.05$). Somente o grupo controle positivo (peróxido de hidrogênio) foi diferente dos demais grupos ($p<0.05$).

A Figura 14 apresenta os valores de média obtidos no teste de MTT para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

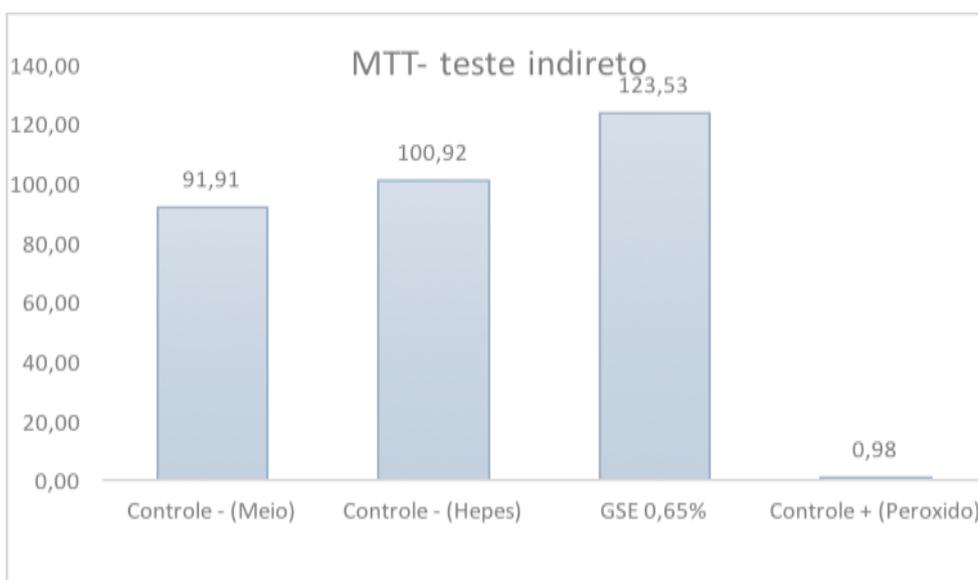


Figura 14: Gráfico de barras apresentando os valores de média obtidos no teste de MTT para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

Ensaio ON

A Tabela 12 apresenta os valores da média e desvio padrão dos valores absolutos de ON realizado após 72 horas.

Tabela 12: Valores de media e desvio-padrão do teste de ON com barreira dentinária

Grupo	Media	DP
1-Controle negativo (meio)	0,22 ^a	0,023
2-Controle negativo (Hepes)	0,23 ^a	0,024
3- ESU 0.65%	0,24 ^a	0,023
6-Controle positivo (Peroxido)	0,35 ^b	0,14

De acordo com o teste de ANOVA, foi observada diferença entre os grupos ($p < 0.05$). O teste de Tukey indicou haver diferença estatística apenas entre o controle positivo e os demais grupos controle negativo e experimental ($p < 0.05$). Não

foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle negativo (Meio e Hepes) e o grupo com extrato de uva ($p>0.05$).

A Figura 15 apresenta os valores de média no teste de ON para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

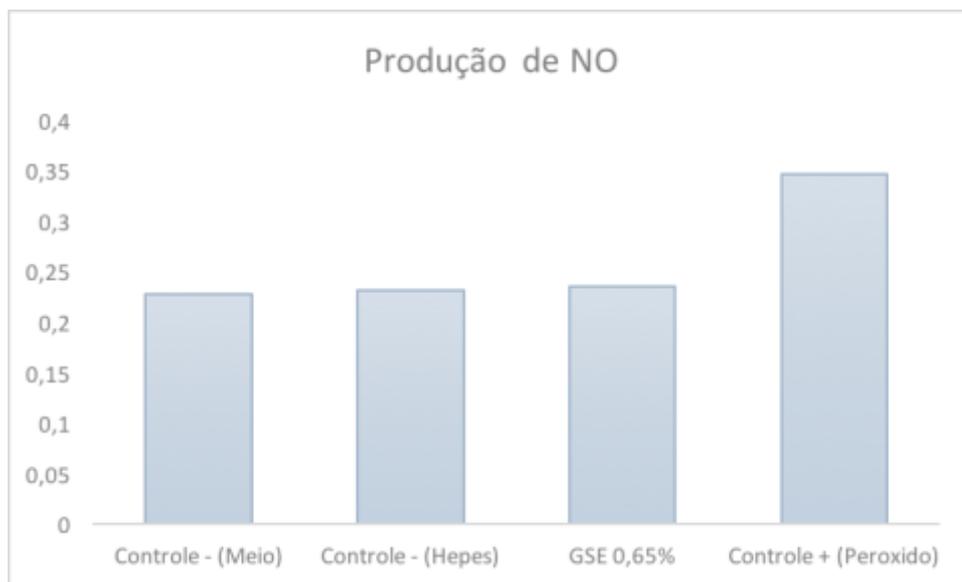


Figura 15: Gráfico de barra apresentando os valores de média no teste de ON para os diferentes grupos experimentais na presença de barreira dentinária após 72 horas de contato.

5.3 Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

5.3.1 Teste Direto

A Figura 16.A é representativa do grupo controle negativo, no qual, as células pulpares foram expostas somente ao meio de cultura ao longo do experimento. Um grande número de células pulpares pode ser observado no aumento de 100X. Ao aproximar a imagem (aumento de 1000X), observa-se a morfologia celular característica da cultura primária de polpa com formato alongado com delgados filamentos citoplasmáticos recobrimdo o substrato de vidro (Figura 16B).

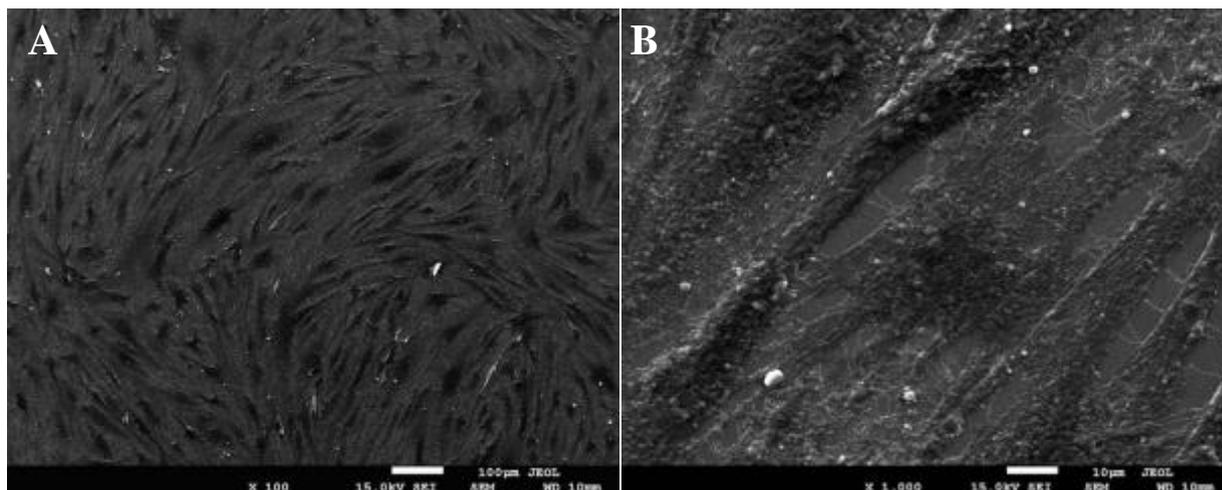


Figura 16: Imagem representativa do grupo controle exposto apenas ao meio de cultura DMEM. (A) aumento de 100X; (B) aumento de 1000X.

A Figura 17 apresenta imagens do grupo controle negativo o qual durante o periodo de tratamento experimental, foi exposto apenas a solução diluente (Hepes). Observa-se que o próprio meio de diluição foi capaz de alterar a morfologia celular, levando a uma redução no numero de prolongamentos citoplasmáticos responsáveis pela adesão da mesma a lamínula de vidro.

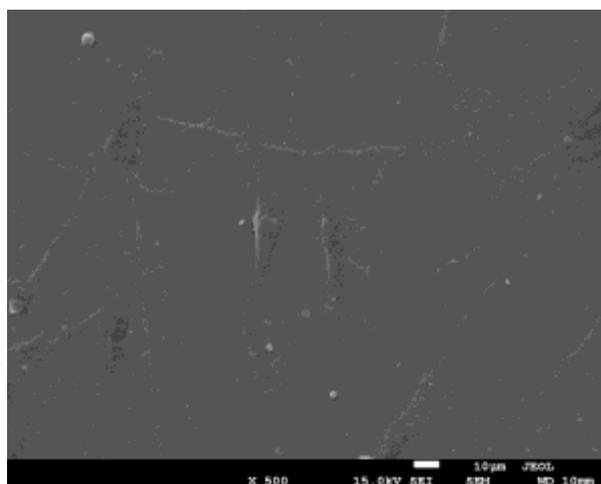


Figura 17: Imagem representativa do grupo controle negativo exposto apenas a solução Hepes em aumento de 500X.

A Figura 18 apresenta imagens do grupo experimental exposto a 0.0065% do extrato de uva por 60 minutos. Observa-se que algumas alterações na morfologia celular, como redução do volume citoplasmático e redução do numero de

prolongamentos citoplasmáticos responsáveis pela adesão da mesma a lamínula de vidro. A formato alongado característico de cultura pulpar foi mantido.

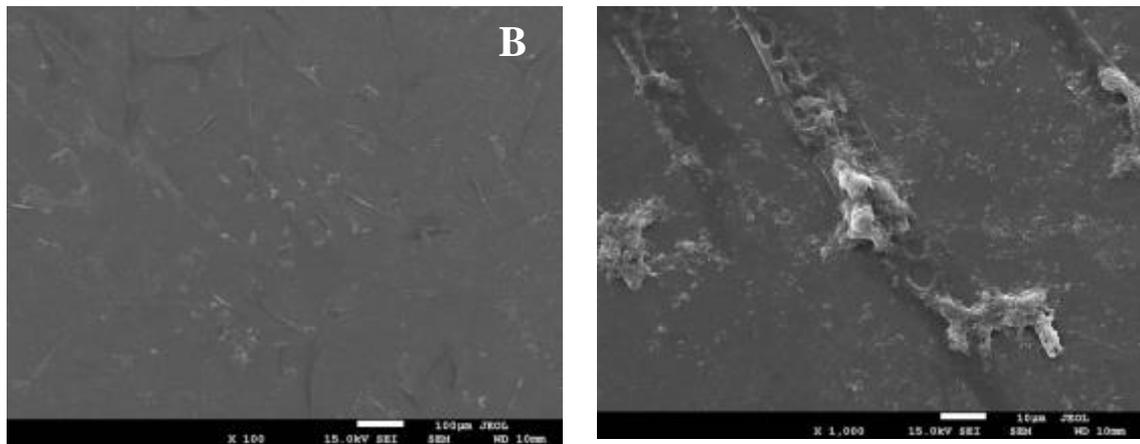


Figura 18: Imagem representativa do grupo experimental exposto a 0.0065% do extrato de uva por 60 minutos em aumento de 100X(A) e 1000X(B).

A figura 19 apresenta a imagem do grupo controle positivo, o qual foi exposto a solução de peróxido de hidrogênio. Observa-se a ausência de células aderidas, indicando que a redução do metabolismo celular ocorreu devido a morte das mesmas. A lamínula de vidro encontra-se com presença de restos de membrana citoplasmática.

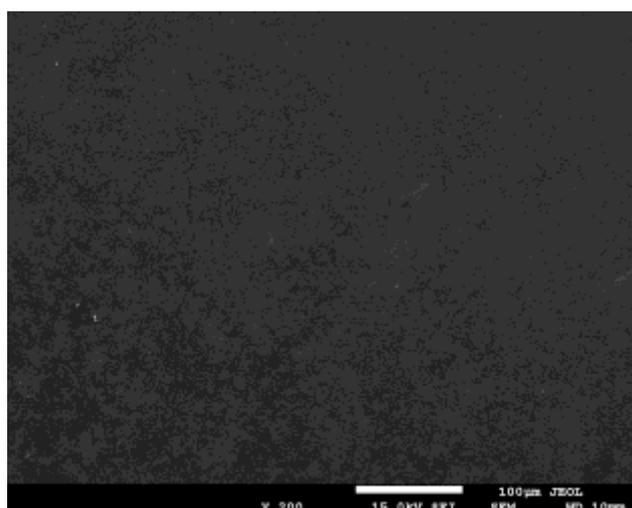


Figura 19: Imagem representativa do grupo controle positivo, exposto a solução de peróxido de hidrogênio em aumento de 200X.

5.3.1 Teste Indireto ou com barreira dentinária

A figura 20 apresenta um painel com as imagens representativas dos grupos: A- controle negativo exposto ao meio de cultura DMEM; B- controle negativo exposto a solução diluente HEPES; C- extrato de uva a 0.65% e D- controle positivo (peróxido de hidrogênio). Para ambos os controles negativos, observa-se ao fundo da imagem o substrato dentinário com a presença dos túbulos dentinários abertos, devido ao tratamento com ácido fosfórico por 15 segundos. Sobre esse substrato, é possível observar a presença de células com formato alongado, cobrindo a maior parte do substrato dentinário. Semelhante ao descrito para os grupos controle negativo, foi observado para o grupo exposto ao extrato de uva na concentração 0.65%, evidenciando a manutenção da morfologia celular. Já para o grupo controle positivo (peróxido de hidrogênio), observa-se o substrato dentinário sem a cobertura pelas células pulpares, somente a presença de alguns restos celulares, indicando o despreendimento das mesmas e consequente morte celular.

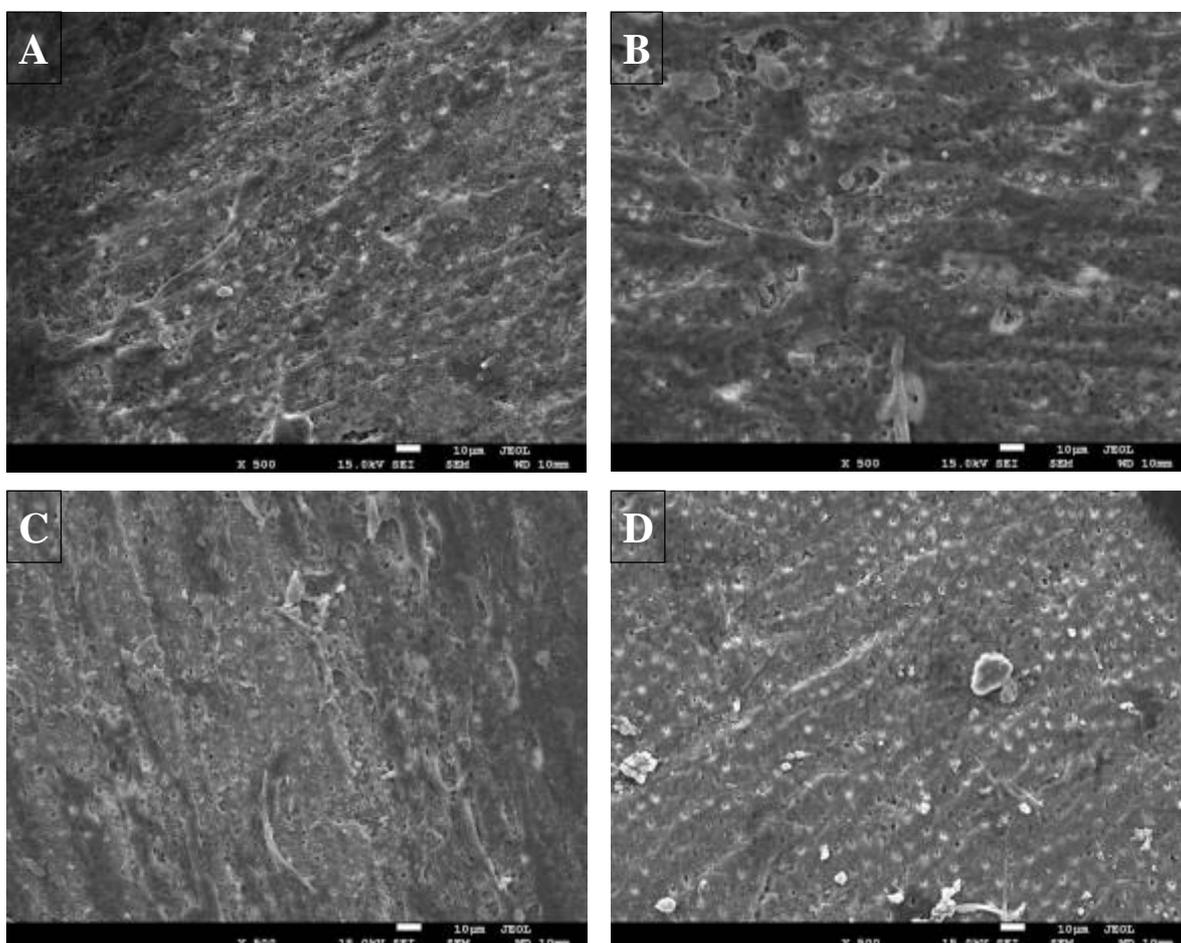


Figura 20: Imagens representativas dos grupos: (A) controle negativo exposto ao meio de cultura DMEM em aumento de 500X; (B) controle negativo exposto a solução diluente Hepes com aumento de 500X; (C) extrato de uva a 0.65% com aumento de 500X e (D) controle positivo (peróxido de hidrogênio) com aumento de 500X.

5.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados a fim de verificar a normalidade e homogeneidade dos dos mesmos (Shapiro Wilk). Uma vez confirmado esse pressuposto, testes paramétricos foram utilizados para análise dos dados (ANOVA one-way e Tukey). Caso os dados apresentassem uma distribuição não normal, testes não paramétricos, Kruskal Wallis e Mann-Whitney, foram utilizados para realizar a análise estatística. Para dados de distribuição normal foi utilizada a média, enquanto para dados de distribuição não normal, a mediana. Essa escolha visou o não mascaramento dos dados comparativos finais. O nível de significância adotado foi de 0.05 e a análise estatística foi realizada utilizando o programa STATA versão 13.0.

6. DISCUSSAO

O presente estudo se propôs a avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações e tempos de contato do extrato de semente de uva (ESU) rico em proantocianidinas em cultura células pulpares por meio de testes de contato direto e na presença de barreira dentinária. A avaliação biológica de um novo material odontológico deve passar por estágios que vão desde estudos iniciais in vitro, seguidos por estudos in vivo em animais, e por fim, estudos clínicos. Os estudos in vitro utilizando células em cultura são limitados, porém proporcionam um controle maior das variáveis de confundimento permitindo uma análise inicial do potencial citotóxico de um novo material ou mesmo uma nova aplicação. Os testes com a barreira dentinária, ainda, permitem uma aproximação do encontrado clinicamente, uma vez que as células pulpares ficam em contato direto com a dentina, entrando em contato com o novo material apenas por meio difusão. No presente estudo, uma barreira dentinária de 0.5mm foi utilizada, a qual é biologicamente capaz de proteger a polpa dentária da toxicidade de matérias dentários [71], simulando situações de cavidades profundas. O uso de células pulpares primárias se deu por representarem o tecido com o qual o extrato de uva rico em proantocianidina irá entrar em contato primeiramente quando utilizado para fins da Odontologia Adesiva. Além disso, a cultura primária pulpar contém um grande número de células mesenquimais indiferenciadas [67], o que permite avaliar o potencial anti-inflamatório, antioxidante e biocompatível desse extrato e inferir sobre sua atuação no reparo pulpar e produção de matriz mineralizada.

A citotoxicidade de agentes *crosslinkers* tem sido alvo de estudos recentes devido ao maior número de ligações cruzadas adicionais ao colágeno dentinário criadas por esses agentes e sua eficácia em aumentar a longevidade da união resina-dente [18, 19, 38-41]. O uso desses agentes tanto como etapa posterior ao condicionamento ácido para tratamento dentinário ou mesmo a incorporação nos sistemas adesivos pode ser danoso a regeneração e manutenção da vitalidade pulpar, caso comprovada a toxicidade dos mesmos. A literatura tem reportado estudos controversos quanto a toxicidade do glutaraldeído, um dos agentes *crosslinkers* mais conhecidos [41, 72]. Enquanto alguns artigos encontraram que o glutaraldeído nas concentrações de 2.5%, 5% e 10% não apresentou danos

transdentinários a cultura de células odontoblastóides [41], um estudo mais recente encontrou que esse mesmo agente na concentração de 5% reduziu a viabilidade celular de fibroblastos [72]. Outro agente que apresenta dados conflitantes na literatura é o DMSO [73-75]. Enquanto alguns encontraram uma redução significativa do metabolismo celular de células tronco embrionárias na presença de DMSO [73], outro estudo não encontrou efeitos citotóxicos desse agente em cultura de células odontoblastóides [75]. É sabido que a resposta aos materiais é célula-dependente [74, 75], o que evidencia a importância em se escolher o tipo celular mais adequado para avaliar a citotoxicidade de novos materiais de acordo com a função que o mesmo irá desempenhar.

Em vista da toxicidade dos agentes *crosslinkers* sintéticos, o grupo das proantocianidinas vem sendo alvo de investigações para uso na Odontologia adesiva devido ao seu potencial estabilizador da camada híbrida e também sua potencial biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar. No presente estudo, diferentes concentrações exponenciais do extrato de uva (0.0065% à 6.5%) resultaram em diferentes comportamentos quanto ao metabolismo das células pulpares após 24 e 72 horas do contato de 1 hora com o extrato, o que rejeita a hipótese nula apresentada. Enquanto as concentrações de 6.5% e 0.0065% aumentaram o metabolismo celular de forma significativa após 24 horas, esse aumento não foi mantido ao longo das 72 horas, quando já não se observa diferença entre esses grupos e o controle negativo. Por outro lado, as concentrações de 0.65 e 0.065% apresentaram uma redução do metabolismo após 72 horas do contato, inferior a 10%, o que não é considerada grave. O aumento observado para a concentração de 6.5% é possivelmente justificado pela capacidade do extrato em pigmentar, já que a cor do ESU é marrom avermelhada, e mesmo após as lavagens decorrentes do processo experimental, possa interferir nos valores de absorvância, ainda que um controle sem célula tenha sido utilizado para subtração dessa interferência. Para os resultados de tempo resposta, também não foram observadas diferenças entre os tempos de exposição (1, 10, 30 e 60 min) utilizando a concentração de 0.0065%, indicando não haver uma relação diretamente proporcional entre o tempo e o metabolismo celular. Diante dos resultados de MTT com contato direto, observa-se que o extrato de uva não interferiu no metabolismo celular em longos prazos de avaliação.

Ao avaliar os dados de MTT obtidos pelo presente estudo na presença de barreira

dentínaria, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle negativo e o grupo tratado com extrato de uva a 0.65%, dados confirmados pelas imagens da MEV na presença de barreira dentínaria, em que houve a manutenção da morfologia celular para o grupo tratado. Achados semelhantes foram observados no estudo de Hass et al. (2016), em que um primer contendo 6.5% de proantocianidina obtida do ESU foi aplicado sobre um disco de dentina de 0.6mm previamente condicionado com ácido fosfórico e nenhuma alteração no metabolismo celular de fibroblastos foi observada [72]. Os autores acreditam que a alta afinidade da proantocianidina com a matriz orgânica do colágeno pode ter sido efetiva na ação de *crosslinker* reduzindo a quantidade de agente que chegaria até as células e promoveria algum dano ou estimulação. Um outro estudo recente [76] observou que o extrato natural de casca crua de *Pinus massoniana* rico em proantocianidinas foi capaz de aumentar a proliferação celular utilizando um método similar ao MTT. Entretanto o modelo de co-cultura (dentina/célula) proposto com a presença de dentina foi diferente do utilizado em nosso estudo. Um palito de dentina foi tratado com o extrato após condicionamento ácido por 1 minuto. Em seguida, o mesmo foi lavado com água destilada e colocado sobre uma membrana de policarbonato acima da cultura de células pulpares [76]. Dessa forma, o contato celular não foi direto com a dentina tratada e não permitiu que apenas o extrato difundido através dos túbulos dentinários entrasse em contato com a cultura celular. Esse efeito proliferador pode ser resultado até mesmo de proteínas não colagenosas presentes na dentina desmineralizada tais como BMPs, fatores de crescimento, entre outros, os quais são capazes de não somente aumentar a proliferação celular como induzir o processo de diferenciação celular e produção de componentes de matriz extracelular mineralizada [77].

Um outro fator metodológico de grande importância é o meio de diluição dos extratos e agentes *crosslinkers*. A opção de diluição do extrato em solução tampão HEPES foi preferida à diluição em meio de cultura D-MEM por evidência de que a estrutura molecular das proantocianidinas que desempenha função antioxidante conhecida, foi bastante instável em meio Eagle (alpha-MEM), acelerando a sua epimerização, mudança molecular para uma forma não ativa, com uma meia-vida menor que 15 minutos [78]. Ainda, a solução tampão HEPES, foi capaz também de dissolver o extrato por completo, nas concentrações utilizadas, não sendo observada a presença de sedimentos após a diluição e tem sido amplamente

utilizada para diluição desse extrato tanto para testes mecânicos [61] quanto para testes em cultura celular [76]. Outro veículo utilizado pode ser um primer adesivo, como no estudo de Hass et al. (2016), o qual não necessariamente permite contato puro das proantocianidinas com as células, uma vez que parte do conteúdo de PAs pode ficar preso no rede polimérica [72]. No estudo de Kurauchi et al. (2014), fibroblastos humanos foram expostos a condições ambientais críticas, que incluíram: contato com água pura por até 16 minutos, contato com solução salina por 1 a 3 horas, e contato por até 72 horas com meio de cultura sem suplementação com soro fetal bovino na presença e ausência de proantocianidinas [79]. Os resultados indicaram que o pré-tratamento com PA na concentração de 1mg/mL foi capaz de aumentar a viabilidade celular quando comparado ao grupo não tratados em todas as situações hostis citadas. Ainda, o contato por 1 hora com a solução salina foi suficiente para reduzir a viabilidade celular de forma significativa, o que demonstra o quanto a cultura celular é desafiada na ausência do meio de cultura completa [79]. As imagens de microscopia do teste direto deste trabalho corroboram com esses achados, em que as células somente expostas a solução diluente Hepes por 1 hora tiveram redução do volume citoplasmático e redução do número de prolongamentos citoplasmáticos responsáveis pela adesão da mesma a lamínula de vidro quando comparado ao grupo tratado com meio de cultura completo, ainda que o formato alongado característico de cultura pulpar foi mantido. Para o grupo tratado com extrato de uva, não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle tratado com Hepes

Com relação aos dados obtidos pela análise da produção de Óxido Nítrico (ON), observou-se que as diferentes concentrações avaliadas se comportaram diferente, confirmando a rejeição da hipótese nula. A maior concentração avaliada (6.5%) aumentou os valores de ON tanto no período de 24 quanto de 72 horas. Da mesma forma que o MTT, a análise de produção de ON foi realizada por meio de teste colorimétrico, o qual pode ter sido influenciado pela capacidade de pigmentação do extrato, mesmo com a subtração do branco. Por outro lado, as concentrações de 0.065 e 0.0065% demonstraram ser capazes de reduzir a produção de ON quando comparado ao controle negativo Hepes, indicando uma possível ação antioxidante do extrato. Essa ação foi também confirmada pelos testes de tempo resposta, em que na avaliação de 72 horas, o pré-tratamento com o extrato de uva já levou a uma ação antioxidante a partir de 1 minuto de contato.

Estudos anteriores demonstraram o potencial antioxidante do extrato de uva rico em PAs [59, 80]. Ignea et al. (2014) observaram o efeito antioxidante de diferentes concentrações (5 a 50 μ M) de extrato de uva em cultura de células fúngicas cujos sistemas para controle de estresse oxidativo eram deficientes [80]. Na avaliação de ON para o teste com presença de barreira dentinária, não foram observadas diferenças entre os grupos controle negativo quanto à produção de ON. Somente o grupo submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio revelou maior produção de ON, indicando presença de estresse oxidativo. Esses dados foram confirmados tanto pelos dados de MTT, no qual se observou sempre uma redução significativa do metabolismo celular, assim como as micrografias da MEV, nas quais observou-se a presença de restos celulares e completo rompimento da membrana citoplasmática das células tanto no contato direto com o peróxido quanto na presença de barreira dentinária.

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que a menor concentração de extrato de uva testada (0.0065%) apresentou resultados favoráveis tanto para o metabolismo celular, com um aumento no período de 24 horas, quanto na produção de óxido nítrico, com redução dessa produção no período de 72 horas. Ainda que comportamentos distintos tenham sido observados para as diferentes concentrações, nenhuma resultou em redução do metabolismo celular maior que 10% do controle, indicando a não toxicidade desse extrato tanto aplicado diretamente sobre a cultura primária de células pulpares quanto na presença de barreira dentinária. De acordo com as limitações do presente estudo que incluem o uso de um extrato purificado e não da forma primária das proantocianidinas ou de seu componente ativo o que pode dificultar avaliar o potencial biomodulador do mesmo, sugere-se que mais estudos com os componentes ativos e diferentes meios de veiculação sejam realizados a fim de confirmar não somente a não citotoxicidade desse agente, como também o seu potencial biomodulador e bioestimulador para o tecido pulpar.

7. CONCLUSÃO

Com base na metodologia descrita, o ESU foi capaz de estimular o metabolismo celular sem elevar o estresse oxidativo nas concentrações testadas e pelos períodos avaliados, caracterizando a não toxicidade deste extrato, tanto em exposição direta à cultura primária de células pulpares, assim como na presença de barreira de dentina.

8. REFERÊNCIAS

- [1] D.H. Pashley, E.J. Swift, Jr., Dentin bonding, *J Esthet Restor Dent* 20(3) (2008) 153-4.
- [2] T.K. Vaidyanathan, J. Vaidyanathan, Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88(2) (2009) 558-78.
- [3] N. Nakabayashi, K. Kojima, E. Masuhara, The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates, *J Biomed Mater Res* 16(3) (1982) 265-73.
- [4] R. Van Noort, G.E. Cardew, I.C. Howard, S. Noroozi, The effect of local interfacial geometry on the measurement of the tensile bond strength to dentin, *J Dent Res* 70(5) (1991) 889-93.
- [5] Y. Wang, P. Spencer, M.P. Walker, Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy, *J Biomed Mater Res A* 81(2) (2007) 279-86.
- [6] J. Perdigao, Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment, *Dent Mater* 26(2) (2010) e24-37.
- [7] M. Hashimoto, H. Ohno, H. Sano, M. Kaga, H. Oguchi, In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy, *Biomaterials* 24(21) (2003) 3795-803.
- [8] M. Toledano, R. Nieto-Aguilar, R. Osorio, A. Campos, E. Osorio, F.R. Tay, M. Alaminos, Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine, *J Dent* 38(8) (2010) 635-40.
- [9] M.R. Carrilho, Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation?, *J Dent Res* 91(12) (2012) 1099-102.
- [10] A.H. Alani, C.G. Toh, Detection of microleakage around dental restorations: a review, *Oper Dent* 22(4) (1997) 173-85.
- [11] J.W. van Dijken, K. Sunnegardh-Gronberg, A. Lindberg, Clinical long-term retention of etch-and-rinse and self-etch adhesive systems in non-cariou cervical lesions. A 13 years evaluation, *Dent Mater* 23(9) (2007) 1101-7.
- [12] J. Park, Q. Ye, E.M. Topp, A. Misra, S.L. Kieweg, P. Spencer, Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured bisGMA/HEMA dental resin, *J Biomed Mater Res A* 93(4) (2010) 1245-51.
- [13] J. Hebling, D.H. Pashley, L. Tjaderhane, F.R. Tay, Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo, *J Dent Res* 84(8) (2005) 741-6.
- [14] M.R. Carrilho, R.M. Carvalho, M.F. de Goes, V. di Hipolito, S. Geraldeli, F.R. Tay, D.H. Pashley, L. Tjaderhane, Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro, *J Dent Res* 86(1) (2007) 90-4.
- [15] D.H. Pashley, F.R. Tay, R.M. Carvalho, F.A. Rueggeberg, K.A. Agee, M. Carrilho, A. Donnelly, F. Garcia-Godoy, From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer, *Am J Dent* 20(1) (2007) 7-20.
- [16] A.K. Bedran-Russo, K.J. Yoo, K.C. Ema, D.H. Pashley, Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix, *J Dent Res* 88(9) (2009) 807-11.
- [17] A.K. Bedran-Russo, C.M. Vidal, P.H. Dos Santos, C.S. Castellan, Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 94(1) (2010) 250-5.

- [18] A. Al-Ammar, J.L. Drummond, A.K. Bedran-Russo, The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91(1) (2009) 419-24.
- [19] B. Han, J. Jauregui, B.W. Tang, M.E. Nimni, Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices, *J Biomed Mater Res A* 65(1) (2003) 118-24.
- [20] Y. Katsuda, Y. Niwano, T. Nakashima, T. Mokudai, K. Nakamura, S. Oizumi, T. Kanno, H. Kanetaka, H. Egusa, Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential, *PLoS One* 10(8) (2015) e0134704.
- [21] V. Houde, D. Grenier, F. Chandad, Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens, *J Periodontol* 77(8) (2006) 1371-9.
- [22] C.Y. Yen, M.F. Hou, Z.W. Yang, J.Y. Tang, K.T. Li, H.W. Huang, Y.H. Huang, S.Y. Lee, T.F. Fu, C.Y. Hsieh, B.H. Chen, H.W. Chang, Concentration effects of grape seed extracts in anti-oral cancer cells involving differential apoptosis, oxidative stress, and DNA damage, *BMC Complement Altern Med* 15 (2015) 94.
- [23] A. Aghbali, S.V. Hosseini, A. Delazar, N.K. Gharavi, F.Z. Shahneh, M. Orangi, A. Bandehagh, B. Baradaran, Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma, *Bosn J Basic Med Sci* 13(3) (2013) 186-91.
- [24] N. Yahara, I. Tofani, K. Maki, K. Kojima, Y. Kojima, M. Kimura, Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats, *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5(2) (2005) 162-9.
- [25] M. Ishikawa, K. Maki, I. Tofani, K. Kimura, M. Kimura, Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle, *Eur J Oral Sci* 113(1) (2005) 47-52.
- [26] K. Kojima, K. Maki, I. Tofani, Y. Kamitani, M. Kimura, Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle, *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4(3) (2004) 301-7.
- [27] R. Corder, R.C. Warburton, N.Q. Khan, R.E. Brown, E.G. Wood, D.M. Lees, The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction, *Clin Sci (Lond)* 107(5) (2004) 513-7.
- [28] M. Gunjima, I. Tofani, Y. Kojima, K. Maki, M. Kimura, Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats, *Dent Mater J* 23(2) (2004) 67-74.
- [29] Y. Kamitani, K. Maki, I. Tofani, Y. Nishikawa, K. Tsukamoto, M. Kimura, Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats, *Oral Dis* 10(1) (2004) 27-31.
- [30] W.N. Ghonmode, O.D. Balsaraf, V.H. Tambe, K.P. Saujanya, A.K. Patil, D.D. Kakde, Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* - An in vitro study, *J Int Oral Health* 5(6) (2013) 61-6.
- [31] B. Shrestha, M.L. Theerathavaj, S. Thaweboon, B. Thaweboon, In vitro antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants, *Asian Pac J Trop Biomed* 2(10) (2012) 822-5.
- [32] T. Mageshwaran, A.R. Ebenezer, M. Madhanamadhubala, S. Kavitha, S. Mahalaxmi, Counteraction of reactive oxygen species and determination of antibacterial efficacy of proanthocyanidin and lycopene when mixed with calcium

- hydroxide and chlorhexidine mixture: An in vitro comparative study, *J Conserv Dent* 15(4) (2012) 337-41.
- [33] L. Breschi, A. Mazzoni, A. Ruggeri, M. Cadenaro, R. Di Lenarda, E. De Stefano Dorigo, Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface, *Dent Mater* 24(1) (2008) 90-101.
- [34] D.H. Pashley, F.R. Tay, L. Breschi, L. Tjaderhane, R.M. Carvalho, M. Carrilho, A. Tezvergil-Mutluay, State of the art etch-and-rinse adhesives, *Dent Mater* 27(1) (2011) 1-16.
- [35] A.K. Bedran-Russo, G.F. Pauli, S.N. Chen, J. McAlpine, C.S. Castellan, R.S. Phansalkar, T.R. Aguiar, C.M. Vidal, J.G. Napolitano, J.W. Nam, A.A. Leme, Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications, *Dent Mater* 30(1) (2014) 62-76.
- [36] M. Yamauchi, M. Sricholpech, Lysine post-translational modifications of collagen, *Essays Biochem* 52 (2012) 113-33.
- [37] L. Tjaderhane, F.D. Nascimento, L. Breschi, A. Mazzoni, I.L. Tersariol, S. Geraldeli, A. Tezvergil-Mutluay, M.R. Carrilho, R.M. Carvalho, F.R. Tay, D.H. Pashley, Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins, *Dent Mater* 29(1) (2013) 116-35.
- [38] V. Charulatha, A. Rajaram, Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes, *Biomaterials* 24(5) (2003) 759-67.
- [39] A.K. Bedran-Russo, P.N. Pereira, W.R. Duarte, J.L. Drummond, M. Yamauchi, Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80(1) (2007) 268-72.
- [40] A.K. Bedran-Russo, D.H. Pashley, K. Agee, J.L. Drummond, K.J. Miescke, Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86(2) (2008) 330-4.
- [41] D.L. Scheffel, L. Bianchi, D.G. Soares, F.G. Basso, C. Sabatini, C.A. de Souza Costa, D.H. Pashley, J. Hebling, Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells, *Oper Dent* 40(1) (2015) 44-54.
- [42] A. Mazzoni, F.M. Apolonio, V.P. Saboia, S. Santi, V. Angeloni, V. Checchi, R. Curci, R. Di Lenarda, F.R. Tay, D.H. Pashley, L. Breschi, Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding, *J Dent Res* 93(3) (2014) 263-8.
- [43] D.J. Epasinghe, C.K. Yiu, M.F. Burrow, N. Hiraishi, F.R. Tay, The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases, *J Dent* 41(9) (2013) 832-9.
- [44] A. Tezvergil-Mutluay, K.A. Agee, T. Hoshika, T. Uchiyama, L. Tjaderhane, L. Breschi, A. Mazzoni, J.M. Thompson, C.E. McCracken, S.W. Looney, F.R. Tay, D.H. Pashley, Inhibition of MMPs by alcohols, *Dent Mater* 27(9) (2011) 926-33.
- [45] A. Mazzoni, P. Scaffa, M. Carrilho, L. Tjaderhane, R. Di Lenarda, A. Polimeni, A. Tezvergil-Mutluay, F.R. Tay, D.H. Pashley, L. Breschi, Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9, *J Dent Res* 92(1) (2013) 82-6.
- [46] L. Breschi, A. Mazzoni, F. Nato, M. Carrilho, E. Visintini, L. Tjaderhane, A. Ruggeri, Jr., F.R. Tay, S. Dorigo Ede, D.H. Pashley, Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study, *Dent Mater* 26(4) (2010) 320-5.
- [47] R. Gendron, D. Grenier, T. Sorsa, D. Mayrand, Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine, *Clin Diagn Lab Immunol* 6(3) (1999) 437-9.
- [48] C.J. Soares, C.A. Pereira, J.C. Pereira, F.R. Santana, C.J. do Prado, Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin, *Oper Dent* 33(2) (2008) 183-8.

- [49] E.A. Campos, G.M. Correr, D.P. Leonardi, F. Barato-Filho, C.C. Gonzaga, J.C. Zielak, Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing, *J Dent* 37(2) (2009) 108-14.
- [50] L. Breschi, F. Cammelli, E. Visintini, A. Mazzoni, F. Vita, M. Carrilho, M. Cadenaro, S. Foulger, G. Mazzoti, F.R. Tay, R. Di Lenarda, D. Pashley, Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study, *J Adhes Dent* 11(3) (2009) 191-8.
- [51] J. Zhou, J. Tan, L. Chen, D. Li, Y. Tan, The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro, *J Dent* 37(10) (2009) 807-12.
- [52] R. Stanislawczuk, R.C. Amaral, C. Zander-Grande, D. Gagler, A. Reis, A.D. Loguercio, Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds, *Oper Dent* 34(4) (2009) 481-90.
- [53] A.D. Loguercio, R. Stanislawczuk, L.G. Polli, J.A. Costa, M.D. Michel, A. Reis, Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability, *Eur J Oral Sci* 117(5) (2009) 587-96.
- [54] D.T. Cheung, N. Perelman, E.C. Ko, M.E. Nimni, Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues, *Connect Tissue Res* 13(2) (1985) 109-15.
- [55] M. Ryu, T. Kobayashi, E. Kawamukai, G. Quan, T. Furuta, Cytotoxicity assessment of residual high-level disinfectants, *Biocontrol Sci* 18(4) (2013) 217-20.
- [56] J.B. Calixto, Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Braz J Med Biol Res* 33(2) (2000) 179-89.
- [57] W.S. Pierpoint, o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides, *Biochem J* 112(5) (1969) 609-16.
- [58] W.D. Loomis, Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles, *Methods Enzymol* 31 (1974) 528-44.
- [59] C.S. Ku, M. Sathishkumar, S.P. Mun, Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I, *Chemosphere* 67(8) (2007) 1618-27.
- [60] T. De Bruyne, L. Pieters, M. Witvrouw, E. De Clercq, D. Vanden Berghe, A.J. Vlietinck, Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols, *J Nat Prod* 62(7) (1999) 954-8.
- [61] A.K. Bedran-Russo, C.S. Castellan, M.S. Shinohara, L. Hassan, A. Antunes, Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies, *Acta Biomater* 7(4) (2011) 1735-41.
- [62] G.V. Macedo, M. Yamauchi, A.K. Bedran-Russo, Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding, *J Dent Res* 88(12) (2009) 1096-100.
- [63] C.S. Castellan, P.N. Pereira, R.H. Grande, A.K. Bedran-Russo, Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction, *Dent Mater* 26(10) (2010) 968-73.
- [64] G. Francis, P.V. Donnelly, N. Di Ferrante, Abnormally soluble collagen produced in fibroblasts cultures, *Experientia* 32(6) (1976) 691-3.
- [65] R. Kuttan, P.V. Donnelly, N. Di Ferrante, Collagen treated with (+)-catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase, *Experientia* 37(3) (1981) 221-3.
- [66] S.J. Kim, M.H. Lim, I.K. Chun, Y.H. Won, Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast, *Skin Pharmacol* 10(4) (1997) 200-5.

- [67] X. Wang, X.J. Sha, G.H. Li, F.S. Yang, K. Ji, L.Y. Wen, S.Y. Liu, L. Chen, Y. Ding, K. Xuan, Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells, *Arch Oral Biol* 57(9) (2012) 1231-40.
- [68] C. Lanza, S. Morando, A. Voci, L. Canesi, M.C. Principato, L.D. Serpero, G. Mancardi, A. Uccelli, L. Vergani, Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo, *J Neurochem* 110(5) (2009) 1674-84.
- [69] A.A. van de Loosdrecht, E. Nennie, G.J. Ossenkoppelle, R.H. Beelen, M.M. Langenhuijsen, Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study, *J Immunol Methods* 141(1) (1991) 15-22.
- [70] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 126(1) (1982) 131-8.
- [71] C.T. Hanks, R.G. Craig, M.L. Diehl, D.H. Pashley, Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device, *J Oral Pathol* 17(8) (1988) 396-403.
- [72] V. Hass, I.V. Luque-Martinez, M.F. Gutierrez, C.G. Moreira, V.B. Gotti, V.P. Feitosa, G. Koller, M.F. Otuki, A.D. Loguercio, A. Reis, Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition, *Dent Mater* 32(6) (2016) 732-41.
- [73] R. Pal, M.K. Mamidi, A.K. Das, R. Bhonde, Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells, *Arch Toxicol* 86(4) (2012) 651-61.
- [74] S. Adler, C. Pellizzer, M. Paparella, T. Hartung, S. Bremer, The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation, *Toxicol In Vitro* 20(3) (2006) 265-71.
- [75] J. Hebling, L. Bianchi, F.G. Basso, D.L. Scheffel, D.G. Soares, M.R. Carrilho, D.H. Pashley, L. Tjaderhane, C.A. de Souza Costa, Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells, *Dent Mater* 31(4) (2015) 399-405.
- [76] D. Kulakowski, A.A. Leme-Kraus, J.W. Nam, J. McAlpine, S.N. Chen, G.F. Pauli, S. Ravindran, A.K. Bedran-Russo, Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response, *Acta Biomater* 55 (2017) 262-270.
- [77] S. Asgary, H. Nazarian, A. Khojasteh, N. Shokouhinejad, Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials, *J Endod* 40(3) (2014) 387-92.
- [78] W.C. Lu, W.T. Huang, A. Kumaran, C.T. Ho, L.S. Hwang, Transformation of proanthocyanidin A2 to its isomers under different physiological pH conditions and common cell culture medium, *J Agric Food Chem* 59(11) (2011) 6214-20.
- [79] M. Kurauchi, Y. Niwano, M. Shirato, T. Kanno, K. Nakamura, H. Egusa, K. Sasaki, Cytoprotective effect of short-term pretreatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions, *PLoS One* 9(11) (2014) e113403.
- [80] C. Ignea, C.M. Dorobantu, C.P. Mintoff, N. Branza-Nichita, M.R. Ladomery, P. Kefalas, V.S. Chedea, Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts, *Food Chem* 141(4) (2013) 3967-76.

9. ANEXOS – Documento de aprovação no Comitê de Ética da Universidade de Brasília.



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro do potencial dentinogênico e antiinflamatório de agentes crosslinkers ricos em proantocianidinas

Pesquisador: Andressa Fabro

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 43353515.0.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.524.338

Apresentação do Projeto:

De acordo com o resumo apresentado na Plataforma Brasil (PB): "O objetivo deste estudo é de avaliar a citotoxicidade de agentes crosslinkers ricos em proantocianidinas quando aplicados diretamente sobre células pulpares e com interposição de barreira dentinária. Para isso, serão avaliadas a atividade metabólica celular usando o ensaio metiltetrazolium (MTT) e a morfologia celular por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Será avaliado o potencial que esses agentes tem em promover a diferenciação celular e estimular a biomineralização por meio da análise de produção total de proteínas e fosfatase alcalina, a quantificação relativa da expressão dos genes, os marcadores de diferenciação de odontoblastos ALP, DSPP, DMP-1, colágeno tipo I e fibronectina por meio da técnica de PCR em tempo real e avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo teste Alizarin-red. Será investigada a possível ação anti-inflamatória dos agentes crosslinkers em cultura de células de polpa humana quando estimulados por LPS por meio da análise de expressão gênica de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo pela citometria de fluxo e microscopia de fluorescência".

A pesquisadora afirma que "a polpa dentária será obtida a partir de terceiros molares inclusos, com 2/3 da raiz formada, extraídos de pacientes que tenham entre 18 e 30 anos". A pesquisadora acrescenta que "Serão coletados os primeiros sessenta dentes terceiros molares de pacientes

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com