

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**OS EFEITOS BIOESTIMULATÓRIOS DOS AGENTES CROSSLINKERS RICOS
EM PROANTOCIANIDINAS E DA ALGA *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM* SOBRE
CÉLULAS DA POLPA**

BRASÍLIA

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**OS EFEITOS BIOESTIMULATÓRIOS DOS AGENTES CROSSLINKERS RICOS
EM PROANTOCIANIDINAS E DA ALGA *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM* SOBRE
CÉLULAS DA POLPA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

Co-orientador: Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia

BRASÍLIA

2018

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**OS EFEITOS BIOESTIMULATÓRIOS DOS AGENTES CROSSLINKERS RICOS
EM PROANTOCIANIDINAS E DA ALGA *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM* SOBRE
CÉLULAS DA POLPA**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 14 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro (Presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Alex José Souza dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. João Paulo Lyra e Silva
Faculdade ICESP - ICESP

Prof. Dr. Flávia Marques Borba Modesto
Universidade Paulista - UNIP

Dedico este trabalho aos meus professores, pelo exemplo e pelas valiosas lições recebidas, aos amigos, pelas contribuições e horas despendidas e, principalmente, aos meus familiares por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e por serem socorro sempre na hora da angústia. Sem vocês muitos dos meus sonhos não se realizariam.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília**, na pessoa da Reitora, **Profa. Dra. Márcia Abrahão Moura**.

À **Faculdade de Ciências da Saúde**, na pessoa do Diretor, **Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ao **Coordenador**, aos **professores e funcionários**.

Ao Instituto de Ciências Biológicas – **Universidade de Brasília**, representada pelo **Prof. Dr. Ricardo Bentes Azevedo**, por permitir a utilização das dependências do Departamento de Genética e Morfologia, possibilitando a realização de grande parte desse experimento.

Ao **Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo**, por sempre me receber com muita tranquilidade e atenção, permitindo, através da sua ajuda e conhecimento que eu chegasse até aqui.

À **Profa. Dra. Taia Rezende** por disponibilizar a infraestrutura do **Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas (CAPB) – Universidade Católica de Brasília (UCB)** para a realização da parte experimental desta pesquisa.

A **Profa. Dra. Daniela Abreu de Moraes**, pela orientação e pela contribuição científica desta pesquisa. A você, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

A todos os amigos que fiz durante as bancadas que percorri nestes 4 anos, **Vitor, Maria, Henrique, Camila, Davi, Paulo Vitor**. A história de cada um de vocês sempre me motivou a ir além, a tentar superar os meus limites. Obrigada pelas conversas prazerosas e também momentos de desabafo.

As minhas queridíssimas amigas, **Alessandra Reis, Flávia Modesto e Paula Sampaio**, por me ajudarem e sempre torcerem por mim. Pelo convívio dentro e fora da Universidade, pelos desabafos e por todo apoio nos momentos de ansiedade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades. Agradeço-Lhe por mais esta vitória!

Ao meu pai **Paulo César Luciano** e principalmente a minha mãe **Angela Maria Fabro Luciano** pelo sólido exemplo, formação moral, amor e apoio incondicional durante esta longa e árdua conquista. Meus amores, nunca esquecerei o que fizeram por mim!

Ao meu marido **Alzeir Costa dos Santos**, que mesmo diante da distância, me fazia esquecer todas as dificuldades que apareceram durante esta caminhada quando estávamos juntos. Esses momentos me trouxeram paz e tranquilidade para que pudesse alcançar o meu objetivo.

A minha irmã **Juliana Fabro Luciano** que compartilhou comigo todos os momentos, foi muito amiga, me transmitindo a todo momento muita força, foco e sempre sendo o meu maior exemplo de determinação. As suas palavras fizeram com que eu me sentisse segura para continuar.

À minha orientadora **Ana Paula Dias Ribeiro**, que nesses anos de convivência aprendi a admirá-la pela sua capacidade intelectual, pelo entusiasmo de pesquisar, pelas suas conquistas tanto pessoais quanto profissionais, por ser essa pessoa do bem, de alma leve, porém, inquieta. Muito obrigada, primeiramente pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação e orientação, mesmo enfrentando mudanças na sua vida, além da amizade e principalmente pela confiança depositada!

Ao **Prof. Dr. Alex José Souza dos Santos**, por ter marcado a minha vida, provocando algo especial em mim, o amor à docência. Você é um verdadeiro mestre! Despertou a minha admiração de modo único, se tornando uma inspiração para mim. A você, toda a minha gratidão e carinho!

O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.
(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade direta e o potencial dentinogênico dos agentes crosslinkers ricos em proantocianidinas (extrato da semente da uva e ácido tânico) e do cimento obtido a partir do extrato da alga *Lithothamnium calcareum* sobre cultura primária de células pulpares humanas. Células pulpares foram obtidas a partir de terceiros molares de adultos com idades entre 18 e 30 anos. Culturas primárias foram estabelecidas e cultivadas até a obtenção do número adequado de células. Os agentes crosslinkers e remineralizantes foram diluídos previamente ao início de cada experimento. Extrato da semente da uva (GSE) e ácido tânico (TA) foram dissolvidos em água obtendo duas concentrações (0,65% e 0,0065%) e avaliados nos períodos 1 hora, 7, 14 e 21 dias para os testes de metiltetrazolium (MTT) e análise da produção de óxido nítrico (NO). Alga e hidróxido de cálcio, juntamente com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 0,2% e 0,02%, nos tempos imediato e 24 horas, foram avaliados utilizando os mesmos testes. Após 21 dias de diferenciação osteogênica, foram realizadas as análises de proteína total (PT), fosfatase alcalina (FA) e Alizarin Red para GSE/DMSO a 0,65% e 0,0065%. Para compor a análise de citotoxicidade, a viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de produção de desidrogenase succínica e o estresse oxidativo foi avaliado por meio do ensaio de óxido nítrico. Para avaliar o potencial dentinogênico, as análises de proteína total (PT), fosfatase alcalina (FA) e formação de nódulos de mineralização foram realizadas após 21 dias de contato com os extratos. Coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina foi realizado para ilustrar os efeitos dos agentes crosslinkers (GSE e TA) sobre as células da polpa. Os resultados foram avaliados por testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney; $\alpha=0,05$). De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que na análise de viabilidade celular para os agentes crosslinkers, houve um comportamento dependente da concentração utilizada, porém não de forma linear. A menor concentração de extrato de uva testada (0,0065%) apresentou resultados favoráveis tanto para a viabilidade celular em todos os períodos analisados, quanto a produção de NO, não havendo diferença significativa do controle negativo para todos os tempos. Os agentes remineralizantes foram capazes de aumentar a viabilidade celular após 1 horas de contato, sendo que apenas o grupo do hidróxido cálcio 0,2% diferiu significativamente dos demais. Não houve diferença significativa entre os grupos para a produção de óxido nítrico. O GSE e TA não diferiram do grupo controle quanto a produção de proteína total e fosfatase alcalina. Foram capazes de produzir nódulos de mineralização porém sem diferença estatisticamente significativa do controle positivo. Os agentes crosslinkers e remineralizantes apresentam efeitos biológicos sobre as células da polpa.

Palavras-chave: Biomodificação. Remineralização. Proantocianidinas. Alga *Lithothamnium calcareum*. Células Pulpares.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate in vitro the direct cytotoxicity and dentinogenic potential of crosslinker agents which are rich in proanthocyanidin (grape seed extract and tannic acid) and the cement obtained from the extract of the algae *Lithothamnium calcareum* on primary culture of human pulp cells. Pulp cells were obtained from third molars of adults between the ages 18 and 30 years. Primary cultures were established and cultured until adequate numbers of cells were obtained. The crosslinkers and remineralizing agents were diluted prior to the beginning of each experiment. Grape seed extract (GSE) and tannic acid (TA) were dissolved in water obtaining two concentrations (0.65% and 0.0065%) and evaluated them in the periods 1 hour, 7, 14 and 21 days for the methyltetrazolium test (MTT) and analysis of the production of nitric oxide (NO). Algae and calcium hydroxide together with DMSO at concentrations of 0.2% and 0.02%, at the immediate times and 24 hours, were evaluated using the same tests. After 21 days of osteogenic differentiation, the analyzes of total protein (PT), alkaline phosphatase (FA) and Alizarin Red for GSE/DMSO were carry out at 0.65% and 0.0065%. To compose the cytotoxicity analysis, cell viability was evaluated by means of the succinic dehydrogenase production test and oxidative stress was evaluated by the nitric oxide assay. To evaluate the dentinogenic potential, total protein (PT), alkaline phosphatase (FA) and mineralization nodule formation were executed after 21 days of contact with the extracts. Ethidium bromide/acridine orange staining was performed to illustrate the effects of crosslinking agents (GSE and TA) on pulp cells. The results were evaluated by non-parametric tests (Kruskall-Wallis and Mann-Whitney; $\alpha = 0.05$). According to the data obtained, it was possible to observe that in the cellular viability analysis for the crosslinkers agents, there was a behavior dependent of the concentration used, but not in a linear way. The lowest concentration of grape extract tested (0.0065%) presented favorable results for both cell viability in all analyzed periods, as well as NO production, with no significant difference of the negative control for all times. The remineralizing agents were able to increase cell viability after 1 hour of contact, and only the 0.2% calcium hydroxide group differed significantly from the others. There was no significant difference between groups for the production of nitric oxide. GSE and TA did not differ from the control group for total protein and alkaline phosphatase production. They were able to produce mineralization nodules but with no statistically significant difference of the positive control. The crosslinkers and remineralizing agents have biological effects on pulp cells.

Keywords: Biomodification. Remineralization. Proanthocyanidins. Algae *Lithothamnium calcareum*. Pulp cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
C=O	grupo carbonilo
Ca ²⁺	cálcio
COOH	c terminal
EDC	carboiimida hidrociorada
FTIR	espectroscopia de infravermelho
GA	glutaraldeído
GSE	extrato da semente de uva
h	horas
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MMPs	metaloproteinases da matriz
N-H	grupo amina
NH ₂	n terminal
nm	nanômetros
PA	proantocianidina
TA	ácido tânico
UVA	ultravioleta
vol.	volume
α	alfa
α ¹	alfa um
α ²	alfa dois
n ^o	número
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
mg	miligrama
mL	mililitro
°C	graus Celsius
cm ²	centímetro quadrado
SFB	soro fetal bovino
IU	unidades internacionais
µg	micrograma
mmol	mmolar

L	Litro
CO ₂	gás carbônico
PBS	solução tampão
EA	extrato da alga
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
CaCO ₃	carbonato de cálcio
DMSO	dimetilsulfóxido
H ₂ O	água
g	grama
mM	milimolar
β	beta
nM	nanomolar
PT	proteína total
FA	fosfatase alcalina
μl	microlitros
MTT	metiltetrazolium
NO	óxido nítrico
BE/LA	brometo de etídio/laranja de acridina
pH	potencial hidrogênionico
p	probabilidade
<	menor
IQR	distância interquartil
n	amostras por grupo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem demonstra as unidades mais abundantes de proantocianidina nos extratos da semente de uva	26
Figura 2. Esquema ilustrando as ligações cruzadas promovidas pelos agentes crosslinkers. (A) ligações cruzadas entre fibrilas de colágeno, (B) visão detalhada da área da linha tracejada em A, mostrando moléculas individuais de colágeno reticuladas pelos agentes crosslinkers.....	27
Figura 3. Representa a molécula de ácido tânico (TA).....	30
Figuras 4 e 5. Remoção do tecido pulpar de dentes terceiros molares humanos em fluxo laminar	36
Figura 6. Foto em microscópio de mesa invertido da cultura primária de células da polpa humana.....	37
Figura 7. Morfologia das células da polpa humana analisada em microscópio invertido.....	38
Figuras 8 e 9. Soluções de GSE preparadas neste estudo.....	39
Figura 10. Filtragem em fluxo laminar das soluções obtidas a partir dos agentes crosslinkers e remineralizantes utilizados neste estudo.....	39
Figura 11: Esquema representando os tratamentos realizados neste estudo.....	40
Figuras 12 e 13. Placas utilizadas no teste colorimétrico do metabolismo celular (MTT). Na esquerda têm-se os agentes crosslinkers e à direita os agentes remineralizantes.....	43
Figura 14. Placa demonstrativa da análise do estresse oxidativo por meio da produção de óxido nítrico.....	44
Figura 15. Imagem obtida pela coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina	45
Figura 16. Placa demonstrativa da produção de fosfatase alcalina avaliada neste estudo	46
Figuras 17 e 18. Placas obtidas durante a quantificação de proteína total.	47
Figura 19. Placa demonstrativa da formação dos nódulos de mineralização.....	47
Figuras 20 e 21. Imagens aproximadas dos grupos controle e experimental após avaliação da matriz mineralizada por Vermelho de Alizarina.....	48
Figura 22. Placa demonstrativa da análise quantitativa dos nódulos de mineralização.....	48
Figura 23. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental – GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - GSE a 0,65%	58
Figura 24. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental – GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - TA a 0,0065%; E: controle positivo – DMEM + ÁGUA; F: grupo experimental – GSE a 0,0065% e G: grupo experimental – TA a 0,0065%	60

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Composição dos biomateriais utilizados neste estudo38
- Quadro 2.** Divisão dos grupos experimentais de acordo com os agentes crosslinkres, o solvente e os testes (MTT e NO) utilizados neste estudo 40
- Quadro 3.** Divisão dos grupos experimentais de acordo com os agentes remineralizantes, o solvente e os testes (MTT e NO) utilizados neste estudo.....41
- Quadro 4.** Divisão dos grupos experimentais de acordo com o agente crosslinker, o solvente e os testes (PT, FA e Alizarin Red) utilizados neste estudo41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Ilustração dos tratamentos realizados neste estudo	41
Gráfico 2. Absorbância obtida no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos: imediato, 7d, 14d e 21d.	51
Gráfico 3. Absorbância obtida no teste de NO para os diferentes grupos nos períodos: 7,14 e 21 dias	52
Gráfico 4. Absorbância obtida no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos: imediato e 24 horas	53
Gráfico 5. Absorbância obtida no teste de NO para os diferentes grupos nos períodos imediato e 24 horas	54
Gráfico 6. Absorbância obtida no teste de PT para os diferentes grupos.....	55
Gráfico 7. Absorbância obtida no teste de Fosfatase alcalina	56
Gráfico 8. Absorbância obtida no teste de alizarin	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Absorbância do teste de MTT realizado após diferentes períodos de avaliação	50
Tabela 2. Absorbância do teste de NO realizado após 24 horas de contato.....	51
Tabela 3. Absorbância do teste de MTT realizado após diferentes períodos de avaliação	53
Tabela 4. Absorbância do teste de NO realizado após os períodos imediato e 24 horas	54
Tabela 5. Absorbância do teste de PT	55
Tabela 6. Absorbância do teste de FA	56
Tabela 7. Absorbância do teste de alizarin.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	A DENTINA E OS DESAFIOS DA SUA ADESÃO.....	21
2.2	BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA.....	23
2.3	AGENTES CROSSLINKERS	24
2.3.1	Proantocianidinas.....	25
2.3.2	Ácido tânico	29
2.4	REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA.....	31
2.4.1	Extrato da alga <i>Lithothamnium calcareum</i>	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MÉTODOS	36
4.1	CULTIVO CELULAR.....	36
4.2	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	37
4.3	PREPARO DOS BIOMATERIAIS	38
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	39
4.5	ENSAIO MTT.....	42
4.6	ENSAIO NO.....	43
4.7	COLORAÇÃO PELO BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA	44
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA	45
4.9	FORMAÇÃO DOS NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO	47
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS	50
5.1	SOLVENTE ÁGUA E AGENTES CROSSLINKERS (GSE e ácido tânico) ...	50
5.1.1	Ensaio MTT	50

5.1.2	Ensaio NO	51
5.2	SOLVENTE DMSO E AGENTES REMINERALIZADORES (alga e hidróxido de Cálcio)	52
5.2.1	Ensaio MTT	52
5.2.2	Ensaio NO	54
5.2.3	Proteína Total	54
5.2.4	Fosfatase alcalina	55
5.3	ALIZARIN RED	56
5.3.1	Análise Quantitativa	56
5.3.2	Análise Qualitativa	57
5.3.3	Coloração pelo Brometo de Etídio e Laranja de Acridina	58
6	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	73
	ANEXO A –DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	73
	ANEXO B –ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AOS EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO	74

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia adesiva contemporânea, apesar de suas grandes melhorias, ainda tem deficiências específicas para ligações resina-dentina (1). Essa união depende da penetração efetiva do adesivo na matriz de colágeno desmineralizada para a formação adequada da camada híbrida. Em face das propriedades do substrato dentinário e das limitações dos procedimentos adesivos, é improvável que a infiltração uniforme seja um padrão encontrado (2).

A camada híbrida pode ser considerada como o elo fraco nas adesões resina-dentina (2). Isto se deve a vários fatores como, a estrutura tubular e o gradiente de umidade da dentina (3), os componentes poliméricos e a lixiviação de monômeros (4), a degradação hidrolítica e enzimática (5-6) e outros fatores em cascata, resultando em manchas nas margens da restauração (7-8-9) e dano pulpar irreversível (10-11) a longo prazo.

Atualmente, algumas estratégias, como a biomodificação e a remineralização da dentina têm sido estudadas para reduzir as limitações com os quais os procedimentos restauradores atuais ainda se deparam (12-13-14). Estas visam melhorar as características do tecido, modificando e aprimorando as propriedades biomecânicas e bioquímicas (13-15).

A biomodificação atua no fortalecimento mecânico do colágeno existente e também controlando as taxas de biodegradação dos componentes da matriz extracelular (13), enquanto que a remineralização propõe o restabelecimento das condições normais do conteúdo mineral da dentina desmineralizada reduzindo, assim, a ação de enzimas, além de fornecer um aumento na durabilidade das restaurações adesivas (15).

Na última década grande atenção tem sido dada aos agentes crosslinkers por terem a capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas inter e intra moleculares do colágeno, melhorando as suas propriedades (16). Yamauchi (2000) relatou que essas ligações são a base para estabilidade, resistência à tração e viscoelasticidade das fibrilas de colágeno. Ao atuarem no colágeno, principalmente por alterarem o número de ligações cruzadas, proporcionam à matriz de colágeno melhores propriedades mecânicas e menores taxas de degradação enzimática. Estas duas propriedades são desejáveis para se obter a estabilidade da interface

adesiva (16-18).

Diferentes agentes têm sido propostos, como glutaraldeído, formaldeído, compostos epóxidos e carbodiimida (19-20). No entanto, os agentes acima mencionados apresentam desvantagens como toxicidade, dificuldade em controlar a taxa e velocidade de reticulação e instabilidade (21). Assim, compostos mais biocompatíveis trariam benefícios para as interações biológicas decorrentes da união adesiva. Enquadram-se nestas características os agentes derivados da natureza como a genipina, a proantocianidina (PA) e o ácido tânico (TA) (13).

As proantocianidinas são polifenóis de fontes renováveis, a partir do extrato da semente de uva (GSE) (*Vitis vinifera*) com alto potencial de reticulação para o colágeno, proporcionando-lhe bioestabilidade (22). Estes, provem de uma categoria conhecida como taninos condensados (21). Outro polifenol natural que tem a capacidade de modificar quimicamente o colágeno é o ácido tânico (TA). Esse agente de ligação cruzada é uma forma comercial de taninos condensados e consiste de uma mistura complexa de ester poligaloilglicose (18).

O processo de remineralização, assim como a biomodificação da dentina são tratamentos conservadores, ou seja, minimamente invasivos através da utilização de biomaterias. Neste, a matriz orgânica atua como um alicerce orientando a deposição, acúmulo e cristalização dos cristais minerais (23). De acordo com Melo (2009), a utilização do extrato da alga *Lithothamnium calcareum* tem se mostrado uma fonte alternativa de minerais na remineralização dos tecidos duros.

Durante a execução dos procedimentos de biomodificação e remineralização da dentina, ocorre a manipulação do complexo dentina-polpa e a incorporação de materiais que podem interferir em diversas funções celulares, produção de citocinas, processos de mineralização, diferenciação celular e estresse oxidativo, podendo atuar sobre a regeneração e manutenção da vitalidade pulpar (25).

Assim, além de apresentarem o potencial para estabilizar a camada híbrida, a proantocianidina, o ácido tânico e o extrato da alga *Lithothamnium calcareum* podem desempenhar um papel bioestimulatório e proteger as células da polpa dentária. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico direto de diferentes concentrações desses biomateriais em cultura de células pulpares. A hipótese nula testada foi que esses biomateriais não alteram o metabolismo celular, a produção de óxido nítrico, a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização quando comparados ao grupo controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DENTINA E OS DESAFIOS DA SUA ADESÃO

A tecnologia dos adesivos se desenvolveu rapidamente desde que foi introduzida há mais de 50 anos, e o principal desafio para os adesivos dentais é o de fornecerem uma aderência igualmente efetiva a dois tecidos duros de diferentes naturezas. Já se provou que a aderência ao esmalte é durável, enquanto que à dentina é mais intrincada e dependente de suas características (26).

As particularidades da dentina são um aspecto fundamental do procedimento restaurador, uma vez que a dentina constitui o maior volume da estrutura do dente. Esta, por sua vez, é um tecido mineralizado complexo disposto em uma elaborada estrutura tridimensional composta de túbulos que se prolongam a partir da polpa para a junção dentina-esmalte, dentina intertubular e dentina peritubular (16).

O colágeno tipo I tem um papel importante na substituição da estrutura dentária perdida, é o componente do dente que proporciona retenção micromecânica de materiais à base de resina e também suporte para a remineralização do tecido (13). É formado por 3 cadeias α , sendo 2 cadeias α^1 e 1 cadeia α^2 que se enrolam entre si para formar uma estrutura chamada tripla hélice. Nas duas extremidades dessa região helicoidal há uma não helicoidal que são peptídeos C-terminal (COOH) e N-terminal (NH₂). Ligações cruzadas intra e intermoleculares são a base para a estabilidade, resistência à tração, e viscoelasticidade das fibrilas de colágeno (17-27).

O mecanismo fundamental da aderência ao esmalte e à dentina baseia-se, essencialmente, num processo de troca no qual os minerais removidos dos tecidos duros dentários são substituídos pelos monômeros resinosos que, sob a polimerização, se tornam micromecanicamente interligados nas porosidades criadas (26).

A dentina mineralizada é composta por, aproximadamente, 50 vol.% de fase mineral, 30 vol.% de colágeno e 20 vol.% de água. Durante o processo de condicionamento ácido, todos os 50 vol.% da superfície e da subsuperfície de minerais são solubilizados, extraídos e substituídos pela água do enxágue, o que, quando combinado com os 20 vol.% da água pré-existente na dentina, leva a um

conteúdo de 70 vol.% envolvendo os 30 vol.% das fibrilas colágenas que permanecem ancoradas a dentina mineralizada subjacente. Em seguida, esses 70 vol.% de água deveriam, idealmente, ser completamente substituídos por 70 vol.% de co-mônômeros resinosos que se polimerizam para produzirem um biocompósito hibridizado de resina, reforçado pelas fibrilas colágenas, conhecido como camada híbrida ou zona de interdifusão resina-dentina (28). Esta estrutura é responsável pela retenção micromecânica das restaurações resinosas e sua funcionalidade depende diretamente da integridade das fibrilas de colágeno e da qualidade da matriz polimérica que a compõe (29).

A infiltração uniforme desses monômeros em toda a dentina desmineralizada raramente é um padrão encontrado (30) porque depende de vários fatores, tais como a agressividade do ácido, a condição da umidade da superfície dentinária após condicionamento, o tipo de adesivo e a difusibilidade dele dentro dos microporos expostos na rede de colágeno, os quais tornam a utilização do adesivo uma técnica sensível (31).

A penetração incompleta da resina nas matrizes de fibrilas colágenas pode ser causada pelo procedimento de condicionamento ácido, quando a dentina é condicionada em excesso ou durante a secagem do substrato dentinário (32). Além disso, outros fatores tais como o alto peso molecular, a baixa hidrofília de alguns monômeros resinosos presentes nos adesivos dentinários, a presença residual de solvente e o gradiente de umidade da dentina também podem interferir. (33). Dessa forma, a substituição da água pela resina nunca é ideal, podendo gerar pequenos bolsões localizados dentro da camada híbrida polimerizada que são ricos em água e pobres em resina (28). Essa falha na união dentina-resina, resulta na diminuição da força de adesão (32).

Além destes fatores imediatos, fibrilas de colágeno podem ser expostas devido à degradação hidrolítica do componente polimérico e lixiviação dos monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular a longo prazo (4). Ainda, durante o estabelecimento da camada híbrida, a remoção do conteúdo mineral superficial da dentina, além de expor fibrilas de colágeno, também libera proteases aprisionadas no processo de mineralização do tecido dentinário, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) (29).

As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, aprisionadas dentro da matriz dentinária mineralizada durante o desenvolvimento dos dentes na

forma inativa. A ativação dessas enzimas pode ocorrer após a exposição do colágeno por causa da quebra das ligações de zinco e cálcio e é considerada uma das principais causas de falha entre os materiais resinosos e a dentina (27).

Estas enzimas hidrolisam o colágeno não protegido pelo sistema adesivo no interior da camada híbrida, levando à redução da resistência de união entre restauração e dentina (29). Pashley *et al.* (2011) relataram que a dentina desmineralizada contém metaloproteinases -2, -3, -8, -9 e -20 (MMPs) e catepsinas ligadas à sua matriz que, uma vez ativadas pelo condicionamento ácido, podem vagorosamente degradar as fibrilas colágenas da camada híbrida.

Armstrong *et al.* (2004) comprovaram a degradação do colágeno por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A observação mais importante desse estudo foi que as METs das adesões resina-dentina sem esforço não exibiram degradação das camadas híbridas dos espécimes de 48 h, porém uma extensa degradação dos 44 espécimes de 44 meses. Cerca de metade do volume da camada híbrida não exibiu as imagens dos metais pesados que as fibrilas colágenas normalmente capturam. Essa foi a primeira indicação de que as fibrilas colágenas podem se degradar na camada híbrida. Essa observação foi confirmada por Pashley *et al.* (2004) e, mais tarde, por Hebling *et al.* (2005).

Diante dessas evidências que reduzem a longevidade das restaurações de resina, justifica-se a necessidade de novas estratégias de tratamento para reforçar a estrutura dentinária (13).

2.2 BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA

Uma vantagem da dentina sobre o esmalte é a presença de um suporte baseado em colágeno que provê fonte de células-livres para reparação e regeneração do tecido. Esse fato, permite avançar em novos conceitos de engenharia tecidual para o tratamento da perda severa do tecido. Recentemente, a biomodificação da dentina tem sido investigada como uma terapia biomimética estratégica para melhorar as características do tecido, modificando e aprimorando as propriedades biomecânicas e bioquímicas. Essa estratégia visa fortalecer mecanicamente o colágeno existente e também controlar as taxas de biodegradação dos componentes de matriz extracelular (13).

O termo "ligação cruzada" nas ciências biológicas refere-se à ligação química entre as cadeias laterais de aminoácidos dentro das moléculas de colágeno. As ligações cruzadas intrínsecas estabilizam o arranjo molecular dentro das fibrilas de colágeno, aumentando suas propriedades biomecânicas. Assim, a biomodificação da matriz dentinária por reticulação extrínseca do colágeno tem sido proposta para melhorar a resistência fibrilar contra a degradação enzimática, bem como aumentar as propriedades biomecânicas da matriz dentinária através da criação de ligações cruzadas inter e intramoleculares adicionais (37).

Na Odontologia, essa abordagem contemporânea visa quebrar o ciclo da perda dentária, conservando a estrutura através de biomateriais e procedimentos minimamente invasivos (38). Assim, qualquer mudança de uma Odontologia restauradora para uma Odontologia reparadora/regeneradora dependerá de uma melhor compreensão da bioquímica do tecido, estrutura, e as implicações para a biomecânica do dente (13).

Essas abordagens terapêuticas têm sido propostas a fim de reduzir ou prevenir a degradação da camada híbrida (39). A influência positiva sobre as propriedades dentinárias e união adesiva repercute na resistência à tração, resistência à desmineralização/biodegradação e módulo de elasticidade, proporcionando bioestabilidade (22). Desta forma, aumentar a resistência do colágeno à hidrólise, por meio da biomodificação desta proteína, pode ser uma alternativa eficaz para melhorar a estabilidade da interface adesiva (29).

2.3 AGENTES CROSSLINKERS

Vários produtos químicos sintéticos e naturais têm a capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas inter e intra moleculares do colágeno e afetar as suas propriedades (16). Agentes sintéticos bem conhecidos como os agentes químicos (glutaraldeído e carboimidato hidrocloreto), agentes derivados da natureza (genipina, proantocianidina, ácido tânico) e também métodos físicos (foto-oxidativo) têm mostrado interagir eficazmente com colágeno tipo I (13-16-40).

Dentre a classe dos aldeídos, o glutaraldeído (GA) é o agente mais amplamente conhecido. É um dialdeído com alta afinidade para os grupos amino primários livres dos aminoácidos. Tem sido associado com uma diminuição na taxa de degradação do colágeno e melhora das propriedades do colágeno da dentina,

entretanto, a sua alta toxicidade limita a sua aplicabilidade clínica (13-41-42). Carboimidato hidrocloreto (EDC) é conhecida pela sua capacidade de promover ligação cruzada de peptídeos sem a introdução de grupos de ligação adicionais. Embora o potencial de ligação cruzada seja limitado, EDC é menos tóxico do que o GA (13).

A maioria das biomodificações sintéticas usam a exposição à luz, especialmente a radiação ultravioleta (365nm). Essa radiação associada ao uso da riboflavina (Vitamina B12), que é um dos produtores mais potentes de radicais de oxigênio resulta em oxigênio livre indutor de ligações químicas de união covalente, ligando grupos amina (N-H) de glicina de uma cadeia com grupos carbonilo (C=O) de hidroxiprolina e de prolina em cadeias adjacentes (13-42). Embora comprovadamente eficaz no laboratório como método de foto-ativação de riboflavina, as questões de segurança em relação ao uso dos raios UVA e sua praticidade para o uso dental precisam ser consideradas (13).

As características químicas e estruturais de cada agente crosslinker determina a sua capacidade de interagir e modificar a matriz dentinária e o consequente impacto sobre a estabilidade do colágeno, a vulnerabilidade das interfaces de degradação adesiva e seu potencial citotóxico (42). Na última década grande atenção tem sido dada aos agentes polifenóis extraídos de plantas, mais precisamente as proantocianidinas (PA) por apresentarem bioatividade promissora, biocompatibilidade, recurso renovável/sustentável, baixo custo, fácil obtenção e aplicações aumentadas quando comparadas a outros agentes (13).

2.3.1 Proantocianidinas

As proantocianidinas são metabólitos naturais, compostas por subunidades de flavan-3-ol unidas por ligações de C4-C8, provenientes de plantas, largamente encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e caules, sendo prevalentes em extratos de casca de pinheiros, ulmeiros e sementes de uva (29), (Figura 1). Dentre as fontes de obtenção de PA, o extrato de semente de uva (GSE) tem sido preferido por possibilitar uma concentração de até 95% de PA (43).

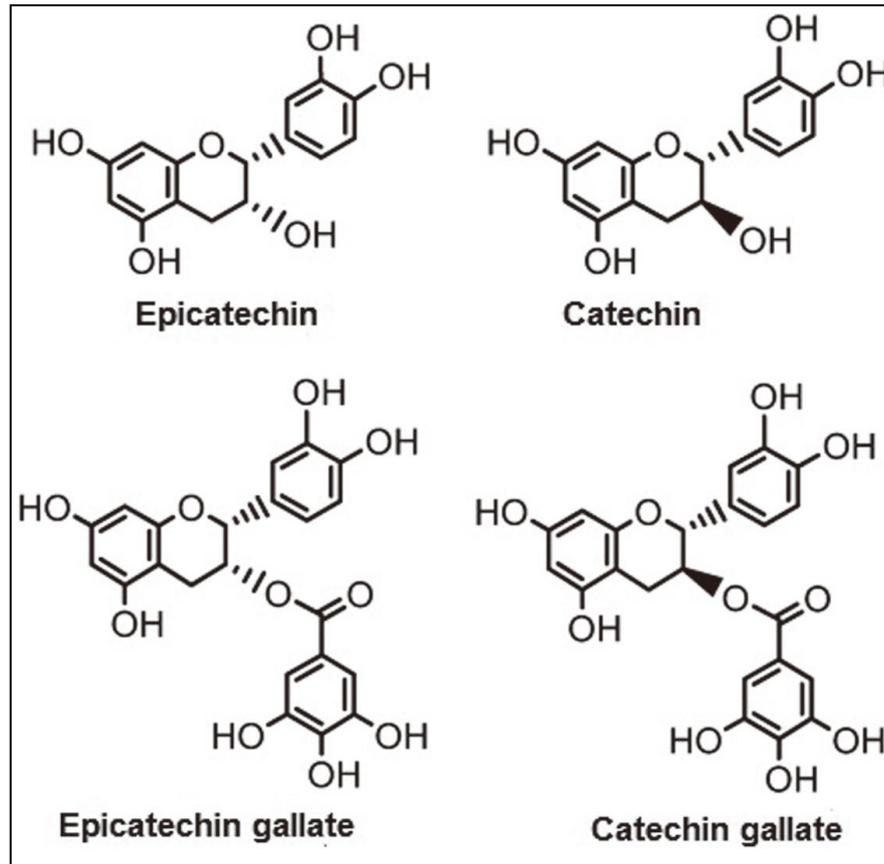


Figura 1. Imagem demonstra as unidades mais abundantes de proantocianidina nos extratos da semente de uva

As proantocianidinas são bioflavonóides constituintes de um grupo específico de compostos polifenólicos e provem de uma categoria conhecida como taninos condensados (21). São polifenóis naturais amplamente utilizados como suplementos alimentares (42). Possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (44). Quatro mecanismos de interação entre PA e proteínas já foram postulados, dentre eles interações covalentes, interações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (21-42). As proteínas ricas em prolina como o colágeno tem alta afinidade com as proantocianidinas, produzindo ligações fortes (42), (Figura 2). Esta interação ocorre principalmente através da formação de pontes de hidrogênio entre o carbonilo da amida da proteína e o grupo hidroxilo fenólico dos agentes crosslinkers em adição a uniões covalentes e hidrofóbicas (1-13-29-42).

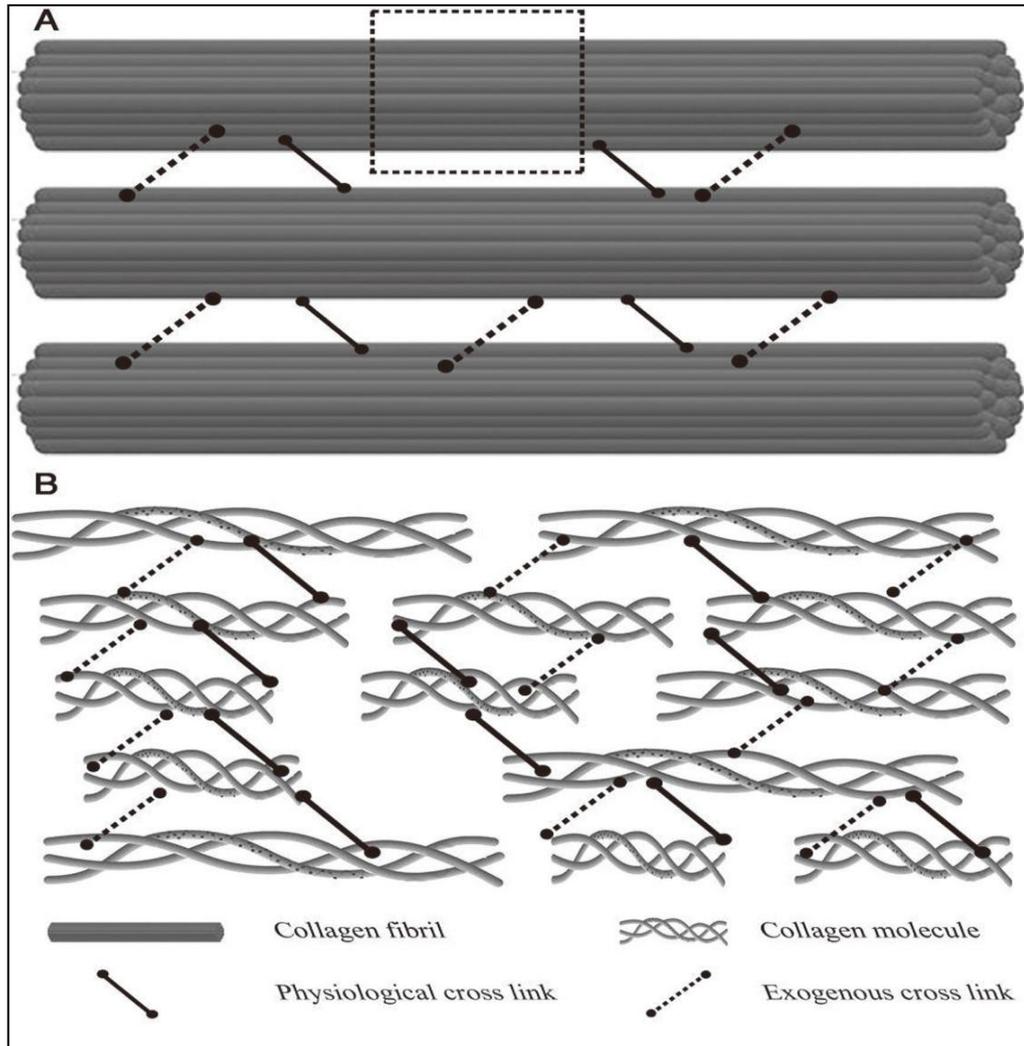


Figura 2. Esquema ilustrando as ligações cruzadas promovidas pelos agentes crosslinkers. (A) ligações cruzadas entre fibrilas de colágeno, (B) visão detalhada da área da linha tracejada em A, mostrando moléculas individuais de colágeno reticuladas pelos agentes crosslinkers.

A falta de citotoxicidade das proantocianidinas já foi demonstrada em outros estudos (21-42-45). Han *et al.* (2003) demonstraram num ensaio de citotoxicidade utilizando fibroblastos que PA são 120 vezes menos tóxicas que o glutaraldeído. A elevada afinidade das PA à matriz orgânica do colágeno pode ser eficaz, sem que haja a produção de moléculas citotóxicas residuais, tornando-a um produto seguro para uso nos procedimentos de adesão da dentina (42).

Bedran-Russo *et al.* (2014) relataram que as propriedades mecânicas da camada de dentina subjacente e híbrida são significativamente melhoradas e em grande parte atribuída ao agente-mediador de colágeno não-enzimática da ligação cruzada. Estabilidade a longo prazo também foi relatada e atribuída a irreversibilidade do colágeno de cross-linking, além da redução da biodegradação da matriz dentinária.

Biomodificação de matrizes de dentina por PA induz resistência notável contra a degradação de colagenase bacteriana ou proteases endógenas como MMPs (13). Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos por Hass *et al.* (2016), no qual, todos os agentes de ligação cruzada estudados (glutaraldeído, riboflavina, PA) reduziram ou eliminaram as atividades das MMPs na interface resina-dentina. Sendo o primeiro estudo *in situ* que demonstrou um papel tão grande de inibição para os agentes testados. Dentre esses agentes de ligação cruzada, as PAs foram os agentes mais eficazes na redução da atividade das MMPs. Ainda, a interação química muito eficaz das PAs e alta capacidade de ligação ao longo do comprimento de todo o colágeno tornaram-se muito significativos. Além disso, a desidratação das fibrilas de colágeno e o efeito hidrofóbico produzido pela PA resulta em menos água e absorção de fluidos, melhor infiltração adesiva e consequentemente menos fibrilas não envoltas pelo adesivo dentro da camada híbrida (42). O mecanismo de ação por trás da capacidade das proantocianidinas em inibir proteases ainda não está bem definido; ou seja, seu efeito é inespecífico, podendo envolver diversos mecanismos (13-29).

A incorporação de PA nos sistemas adesivos permite que esta esteja nas proximidades da camada híbrida, mantendo a liberação constante do composto ativo por um longo período de tempo (1). Green *et al.* (2010) incorporaram GSE rico em PA em um sistema adesivo semelhante ao Single Bond (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) e as amostras de dentina desmineralizadas foram hibridizadas e submetidas a ação da colagenase 0,1% em 0, 1 e 6 dias. Sabe-se que quase todas as fibrilas de colágeno são digeridas após 1 dia de exposição à colagenase, porém após 6 dias de tratamento, as amostras em que foi utilizado o adesivo incorporado com PA apresentaram fibrilas colágenas com dimensões normais. Por outro lado, a qualidade da camada híbrida formada por esse adesivo foi menor que o adesivo puro. A análise por espectroscopia por infravermelho (FTIR) mostrou que o grau de conversão do adesivo puro foi de 86% enquanto que o adesivo experimental foi de 68%, ambos dentro da faixa aceitável para a comercialização dos adesivos. Os autores acreditam que a incorporação de PA no sistema adesivo provocou um menor encapsulamento das fibrilas colágenas, porém a PA teve a capacidade de reforçar essas fibrilas ao ponto de resistirem as ações líticas da colagenase. Balalaide *et al.* (2017) relataram que o decréscimo do grau de conversão pode ser reparável através da modificação do tipo e concentração dos foto-iniciadores.

A porcentagem de PA presente no sistema adesivo também influencia na formação da camada híbrida. Epasinghe *et al.* (1999) observaram que 3% PA pode diminuir a polimerização da resina e exercer alguns efeitos adversos sobre a força de adesão, devido a maior densidade de suas moléculas. Estas atrapalham a formação da cadeia linear, essencial para a reação de polimerização da resina. Relatam que concentrações até 2% não apresentam qualquer efeito adverso sobre a interface resina-dentina.

A PA usada como um pré-condicionador tem mostrado efeitos na biomodificação dentinária. Nesta técnica, o agente é enxaguado antes da aplicação do adesivo, apresentando pouca ou nenhuma interferência sobre ele, porém adiciona uma etapa para os procedimentos adesivos. Entretanto, os prováveis benefícios obtidos devem ser considerados (1).

As PAs também 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 (12).

2.3.2 Ácido tânico

Outro polifenol natural que tem a capacidade de modificar quimicamente o colágeno é o ácido tânico (TA). Esse agente de ligação cruzada é uma forma comercial de taninos condensados e consiste de uma mistura complexa de ester poligaloilglicose. O conteúdo fenólico do TA é normalmente expresso pelo número de grupos galoiil ligado a molécula de glucose (18), (Figura 3).

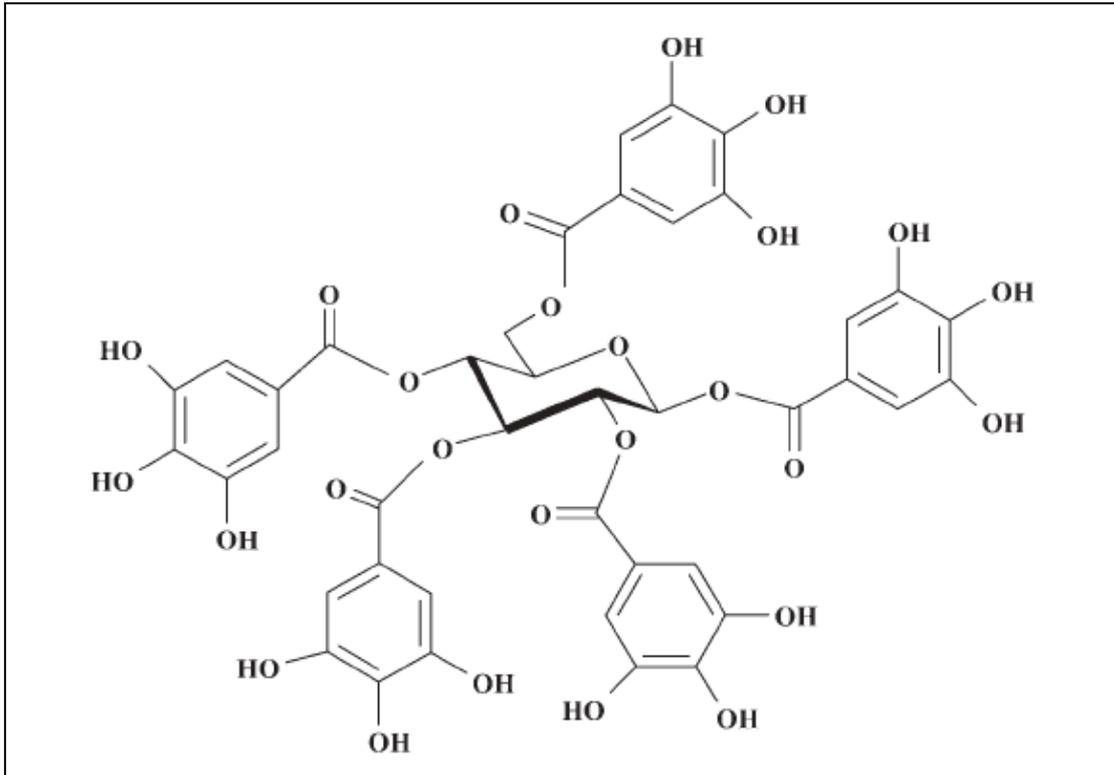


Figura 3. Representa a molécula de ácido tânico (TA)

O TA tem sido utilizado na geração de produtos biocompatíveis com aplicações biomédicas (48-49). Ultimamente, tem atraído a atenção por apresentar excelente solubilidade em água (nem todos os polifenóis exibem solubilidade em água), biocompatibilidade e interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (48-50). ZHOU *et al.* (2018) indicaram ainda outras propriedades como anti-oxidante, anti-bacteriano, anti-inflamatório e anti-carcinogênico.

Ele atua no colágeno principalmente por alterar o número de ligações cruzadas, proporcionando à matriz de colágeno melhores propriedades mecânicas e menores taxas de degradação enzimática. Estas duas propriedades são desejáveis para se obter a estabilidade da interface adesiva (16-18).

Na Odontologia, existem alguns relatos do uso do ácido tânico como agente de dessensibilização, tratamento adstringente, de superfície para remoção de smear layer e agente de ligação cruzada (16). Bedran-Russo *et al.* (2009) avaliaram esse último emprego do ácido tânico, uma vez que, exploraram o potencial desse agente em causar modificações bioquímicas nas estruturas do dente sobre o comportamento da dentina e da interface de união resina-dentina. Esse agente promoveu o aumento das propriedades mecânicas da dentina, reduziu a degradação enzimática das fibrilas de colágeno e aumentou a resistência de união resina-

dentina, demonstrando a utilidade de incorporar a engenharia de tecidos/abordagens biomiméticas na Odontologia Restauradora. Já que a maioria dos esforços para melhorar as propriedades mecânicas e das interfaces ligadas à dentina estão voltadas para a melhoria dos materiais e técnicas restauradoras.

Mudanças estruturais e dinâmicas nas interações entre o colágeno e o TA foram caracterizadas por espectroscopia de infra-vermelho em pericárdio estabilizado por TA. Mostraram que as ligações de hidrogênio são formadas entre grupo NH_2 amida do colágeno e o grupo hidroxila do TA (18).

O aumento no número de ligações peptídicas intra e intermoleculares, e microfibrilar de colágeno, ou seja, a biomodificação dessa proteína produzida pelo TA através de ligações de hidrogênio justifica os resultados obtidos por Bedran-Russo *et al.* (2009), no qual o tratamento com TA inibiu a ação da colagenase. A resistência à digestão da colagenase é uma propriedade da matriz de colágeno-TA, uma vez que indica um aumento na estabilidade e, possivelmente, um mecanismo de proteção contra a degradação durante um longo período de tempo. Acredita-se que o TA mascare os locais de clivagem ou diminua a atividade enzimática da colagenase bacteriana que é uma potente enzima que tem a capacidade de clivar moléculas de colágeno em locais diferentes. Pashley, em observações não publicadas, relatou que as MMPs endógenas também poderiam ser inibidas pelo TA (16).

2.4 REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA

A estrutura dentária alterna-se entre os processos de desmineralização e remineralização, de modo que o equilíbrio entre estes dois processos se relaciona diretamente com a saúde bucal (51). A cárie está entre as doenças mais comuns em todo o mundo e as forças de adesão imediatas a dentina afetada por cárie são comumente 20 a 50% menor do que a dentina hígida. O restabelecimento das condições normais do conteúdo mineral da dentina afetada por cárie reduz a ação de enzimas além de fornecer um aumento na durabilidade das restaurações adesivas. A dentina afetada por cárie é composta de cerca de 14-53% de água em comparação com a dentina hígida, que exhibe um valor muito menor. Desta forma, a substituindo a água por minerais na interface adesiva, aumenta as propriedades mecânicas e inibe a hidrólise relacionada à água (15).

O processo de remineralização da dentina revela-se mais complexo do que o esmalte por apresentar menos núcleos de apatita, alto conteúdo orgânico e umidade. Esse processo pode ocorrer pela incorporação espontânea de íons cálcio, fosfato ou flúor nos cristais remanescentes que foram acometidos por cárie ou pela desmineralização causada pelo condicionamento ácido nos procedimentos restauradores ou através de tratamentos que incorporam os mesmos íons a partir de fontes externas (52).

Atualmente, várias terapias têm por objetivo remineralizar o tecido dentinário, em consonância com as tendências observadas nas ciências da saúde. Essas terapias regenerativas mimetizam os processos biológicos inatos do organismo (12-14). A matriz orgânica atua como um alicerce orientando a deposição, acúmulo e cristalização dos cristais minerais (23). A remineralização biomimética é capaz de induzir um processo de remineralização intra e interfibrilar, de modo a atuar como um reforço na camada híbrida, aumentando a longevidade das ligações resina-dentina. Desta forma, é vista como uma alternativa vantajosa por reduzir as limitações com os quais os procedimentos restauradores atuais ainda se deparam (14-15).

Essas técnicas têm mostrado resultados promissores na recuperação do tecido dentinário (15-23-53) evidenciando um potencial uso clínico para o reparo de doenças relacionadas à dentina, como cárie, erosão, desgaste e hipersensibilidade dentinária (23). A utilização do extrato da alga *Lithothamnium calcareum* mostra-se uma fonte alternativa de minerais na remineralização dos tecidos duros (24).

2.4.1 Extrato da alga *Lithothamnium calcareum*

Lithothamnium calcareum é uma alga vermelha da família *Corallinacea* (54-55) cuja principal característica é a formação de precipitado de carbonato de cálcio nas paredes celulares (55). Essas algas apresentam mais de 20 oligoelementos como o ferro, manganês, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio e estrôncio, variando apenas nas concentrações (54).

O extrato rico em minerais derivado da alga *Lithothamnium calcareum* representa uma estratégia promissora no que tange à remineralização do tecido dentinário. Os relatos de sua utilização remetem à Antiguidade, sendo ainda hoje utilizados como fonte de matérias-primas, como na formulação de cosméticos,

suplementos alimentares, implantes para cirurgia óssea, nutrição animal, fertilizantes e cal para tratamento do solo, entre outros (56-57).

Na Odontologia, o uso desse extrato pode ser benéfico não apenas na recuperação do tecido dentinário perdido, na área da Dentística Restauradora, mas também como estratégia terapêutica para reparação de estruturas ósseas nos procedimentos de Implantodontia, Periodontia e Cirurgia Oral.

Os polissacarídeos presentes na constituição biológica destas algas são distintos daqueles observados em outras algas e apresentam, além das funções de suporte e reserva energética, propriedades antioxidantes, antivirais, antiinflamatórias, antitumorais e anticoagulantes. De fato, alguns estudos já mostraram que os polissacarídeos sulfatados isolados destas algas apresentam atividades anti-inflamatórias em modelos *in vitro* e *in vivo* da inflamação da pele em humanos (58).

Este fato pode ser explicado devido à alta diversidade estrutural desses polímeros em virtude das posições de ligações químicas. Em razão desta alta variedade estrutural, são encontradas inúmeras atividades biológicas específicas para cada polímero. Dentre estes polímeros, pode-se citar o ácido algínico, um componente incomum nas demais espécies. Acredita-se que este polímero exerça uma importante participação no processo de mineralização, uma vez que apresenta a capacidade de interagir com íons cálcio. A precipitação de cristais de calcita é orientada pelas cadeias de polissacarídeos, que atuam como matrizes para o processo de calcificação (59).

Segundo Costa Neto (2010), já foi observado o efeito da suplementação com a alga *Lithothamnion calcareum* na consolidação da falha óssea cortical na tíbia de cães. Em pesquisa realizada em ratos, o uso da farinha de algas calcáreas apresentou resultados favoráveis no crescimento do osso fêmur e na biodisponibilidade de cálcio. Foi comprovado que esse extrato poderia ser utilizado como um suplemento dietético para a prevenção da perda óssea em camundongos (54).

Aslam *et al.* (2010) realizaram um estudo em 60 camundongos submetidos a três tipos de dieta. Um grupo recebeu uma dieta hipocalórica, o segundo grupo recebeu uma dieta com alto teor de gordura e o terceiro foi alimentado com a mesma dieta rica em gordura suplementado com o extrato rico em minerais derivado da alga durante 15 meses. As autópsias revelaram pólipos do cólon em 20% dos

animais com dieta rica em gordura e nenhum em animais dos outros dois grupos. Além dos pólipos grosseiramente visíveis, áreas de hiperplasia na mucosa do cólon e focos inflamatórios ao longo do trato gastrointestinal foram observadas histologicamente em animais com dieta hiperlipídica. Ambos foram significativamente reduzidos em animais com a dieta de baixo teor de gordura e animais com a dieta suplementada com o extrato. Estes dados sugerem que o extrato de algas rico em minerais pode fornecer uma nova abordagem para a quimioprevenção no cólon.

A proliferação e a diferenciação de células do carcinoma do cólon humano foram avaliados em resposta a um extrato rico em minerais derivado das algas marinhas *Lithothamnion calcareum*. Os pesquisadores observaram que o extrato apresentou a mesma eficácia que o Ca^{2+} na supressão do crescimento e indução da diferenciação das células do carcinoma do cólon. Ainda sendo capaz de reduzir esses efeitos nas células resistentes ao Ca^{2+} (61). No mesmo ano, um estudo em animais para avaliação histomorfológica do efeito da alga no processo de neoformação óssea demonstrou que a presença da *Lithothamnion calcareum* no interior das lojas ósseas favoreceu o processo de reparo ósseo sem o surgimento de necroses ou rejeições teciduais, sendo que também foi observado maior grau de osteogênese em relação aos sítios cirúrgicos do grupo controle (62).

Em virtude dessa riqueza mineral, esta alga apresenta significativo potencial como fonte alternativa de minerais, podendo assim ser utilizada na remineralização de tecidos duros.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade direta e o potencial dentinogênico dos agentes crosslinkers ricos em proantocianidinas (GSE e TA) e do cimento obtido a partir do extrato da alga *Lithothamnium calcareum* sobre cultura primária de células pulpares humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

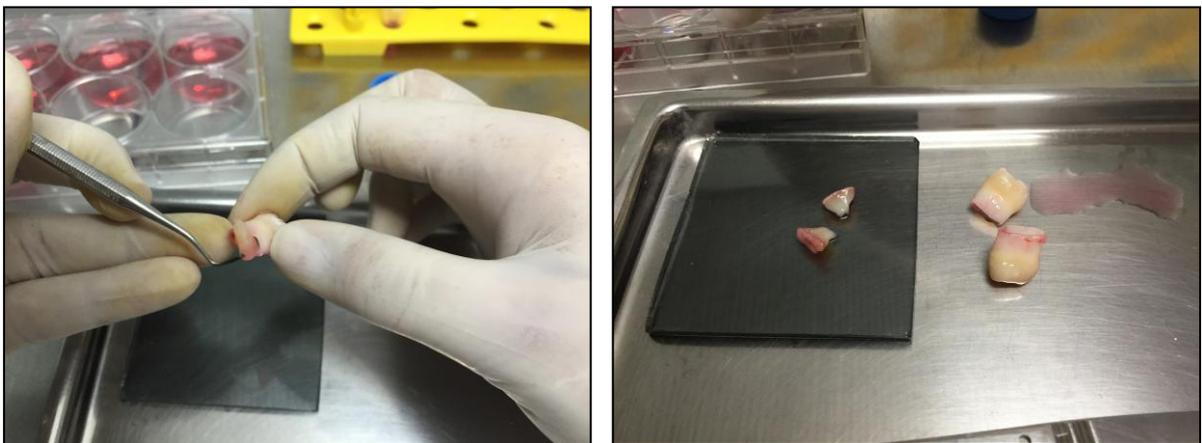
- a) Avaliar a citotoxicidade direta desses biomateriais por meio:
 - da análise do metabolismo celular utilizando o ensaio metiltetrazolium (MTT);
 - da dosagem do estresse oxidativo através da produção de óxido nítrico (NO).
- b) Avaliar o potencial desses biomateriais em promover a diferenciação celular e estimular a biomineralização por meio:
 - da análise de produção total de proteínas (PT) e fosfatase alcalina (FA);
 - da avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo teste Alizarin-Red.
- c) Avaliar a presença de células viáveis e células em processo de morte por necrose ou apoptose através de microscopia de fluorescência.

4 MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília CEP/FS - UnB, protocolo 023507/2015 CAAE nº 43353515.0.0000.0030 (ANEXO 1), em razão de utilizar células tronco mesenquimais de polpa de dentes terceiros molares humanos de pacientes adultos entre 18 a 30 anos.

O tecido pulpar foi removido com pinças e instrumentos endodônticos estéreis (Figuras 4 e 5), foi picotado com auxílio de lâmina de bisturi e imerso em uma solução contendo DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e as enzimas colagenase tipo 1 (3 mg mL^{-1}) e dispase (4 mg mL^{-1}) por 1 h em 37°C em estufa, conforme descrito por Wang *et al.* 2007. Em seguida, a solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet celular cultivado em garrafas plásticas de 75 cm^2 (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 na temperatura de 37°C . Dessa forma, obtendo-se uma cultura primária de células da polpa (Figura 6). Essas células foram subcultivadas a cada 3 dias, até que o número de células fosse suficiente para a conclusão do experimento.



Figuras 4 e 5. Remoção do tecido pulpar de dentes terceiros molares humanos em fluxo laminar



Figura 6. Foto em microscópio de mesa invertido da cultura primária de células da polpa humana

4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Células pulpare humanas, em passagem 3 foram plaqueadas em duplicata, em placas de cultura de 24 poços (5×10^4 células/poço). Após a concentração celular atingir a confluência de 70%, o meio foi removido e as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 15 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS, coradas com o Kit Instant Prov (NewProv, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante e lavadas por 5 vezes com PBS para remover o excesso do corante. Após serem lavadas, 0,5ml de solução tampão (PBS) foi deixado nos poços e as células foram analisadas e fotografadas ao microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) com objetiva de 32x e sistema de captura digital (Figura 7). Esta análise permite avaliar a forma celular, a presença de vacúolos, descontinuidade de membrana, característica do citoplasma e outras características e indicam morte ou inviabilidade celular.

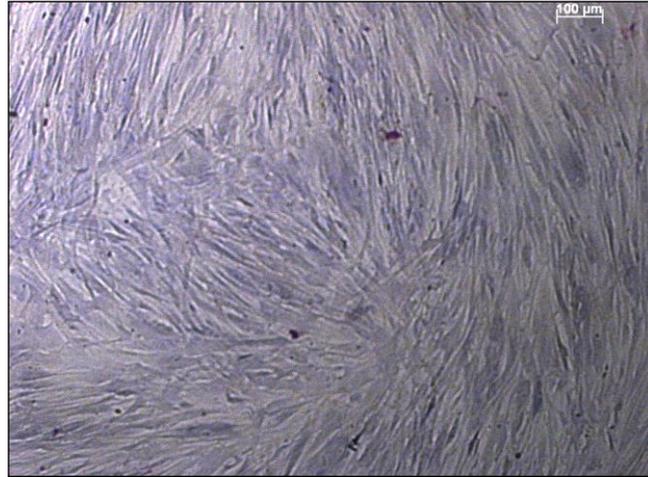


Figura 7. Morfologia das células da polpa humana analisada em microscópio invertido

4.3 PREPARO DOS BIOMATERIAIS

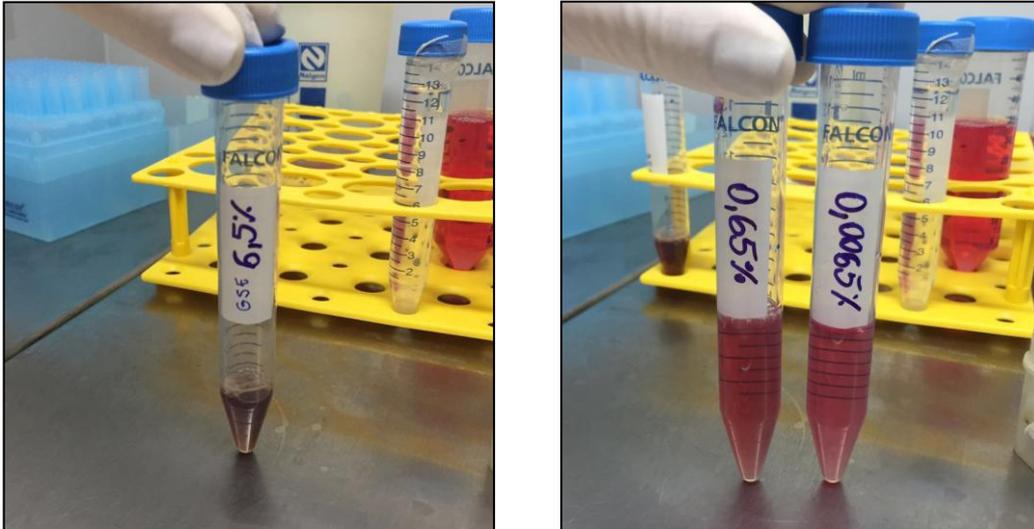
Quatro biomateriais, sendo dois agentes crosslinkers, GSE e ácido tânico, e dois agentes remineralizantes, extrato da alga *Lithothamnium calcareum* (EA) e hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ foram avaliados nesse estudo (Quadro 1). Os agentes crosslinkers foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Biomateriais Dentários e Interfaces da Universidade de Illinois em Chicago e o extrato da alga *Lithothamnium calcareum* pelo Instituto Unibam.

Quadro 1. Composição dos biomateriais utilizados neste estudo

Biomateriais	Composição
GSE	6,5% extrato de semente de uva
Ácido Tânico	95% ácido tânico
Extrato da alga	87% CaCO_3
Hidróxido de cálcio	80% $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Dois solventes foram utilizados neste estudo, o dimetilsulfóxido (DMSO) e a água (H_2O), variando, desta forma, o tempo de contato da solução com as células pulpares. Inicialmente, soluções de GSE e ácido tânico em meio de cultura DMEM-Baixa-Glucose (Gibco by Life Technologies) suplementado com 10% de SFB (Gibco by Life Technologies), 100/ml de penicilina (Gibco by Life technologies), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina (Gibco by Life Technologies), acrescido dos agentes indutores da diferenciação osteogênica, 50 g/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corp.), 10mM de β - glicerofosfato (Sigma-Aldrich Corp.) e 10nM de dexametasona (Sigma-Aldrich Corp) foram preparadas a 6,5% (Figura 8). Em seguida, foram realizadas diluições para se obter as concentrações avaliadas de 0,65% e 0,0065% (Figura 9). As soluções do extrato da alga *Lithothamnium calcareum* e do hidróxido de cálcio (pró-

análise) foram obtidas a 2% e analisadas a 0,2% e 0,02%. Estas concentrações foram definidas a partir de um projeto piloto realizado previamente aos experimentos. As soluções foram filtradas previamente a cada experimento visando barrar solutos que não tenham sido dissolvidos, uma vez que, podem interferir nos resultados caso entrem em contato com as células pulpares (Figura 10).



Figuras 8 e 9. Soluções de GSE preparadas neste estudo.



Figura 10. Filtragem em fluxo laminar das soluções obtidas a partir dos agentes crosslinkers e remineralizantes utilizados neste estudo.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização deste estudo foram estabelecidos grupos experimentais acordo com os biomateriais, os solventes e os testes realizados (Quadro 2, 3 e 4).

Quadro 2. Divisão dos grupos experimentais de acordo com os agentes crosslinkres, o solvente e os testes (MTT e NO) utilizados neste estudo

TESTES: MTT E NO		
Grupo experimental	Biomaterial	Sistema de solvente
Controle -	Controle negativo (condições ideais de cultivo convencional)	Meio de cultura (DMEM-Baixa-Glucose)
Controle +	Controle positivo (condições ideais de mineralização)	Meio indutor + H ₂ O
GSE 0.65%	Proantocianidina	
GSE 0.0065%		
TA 0.65%	Ácido tânico	
TA 0.0065%		

Neste estudo, a citotoxicidade dos agentes foi o primeiro teste a ser realizado para assegurar a viabilidade de seu emprego para os testes de diferenciação celular que, neste caso, apresentou duração de 21 dias. Os resultados obtidos dos projetos piloto nos mostraram que o uso contínuo de DMSO em meio de cultura por 21 dias causou uma severa redução no metabolismo celular e consequente redução no número de células disponíveis. Desta forma, um contato de apenas 24 horas com as células foi programado para o uso do DMSO. Assim, outro solvente (H₂O) foi avaliado na tentativa de estender o contato dos extratos com as células pulpares.

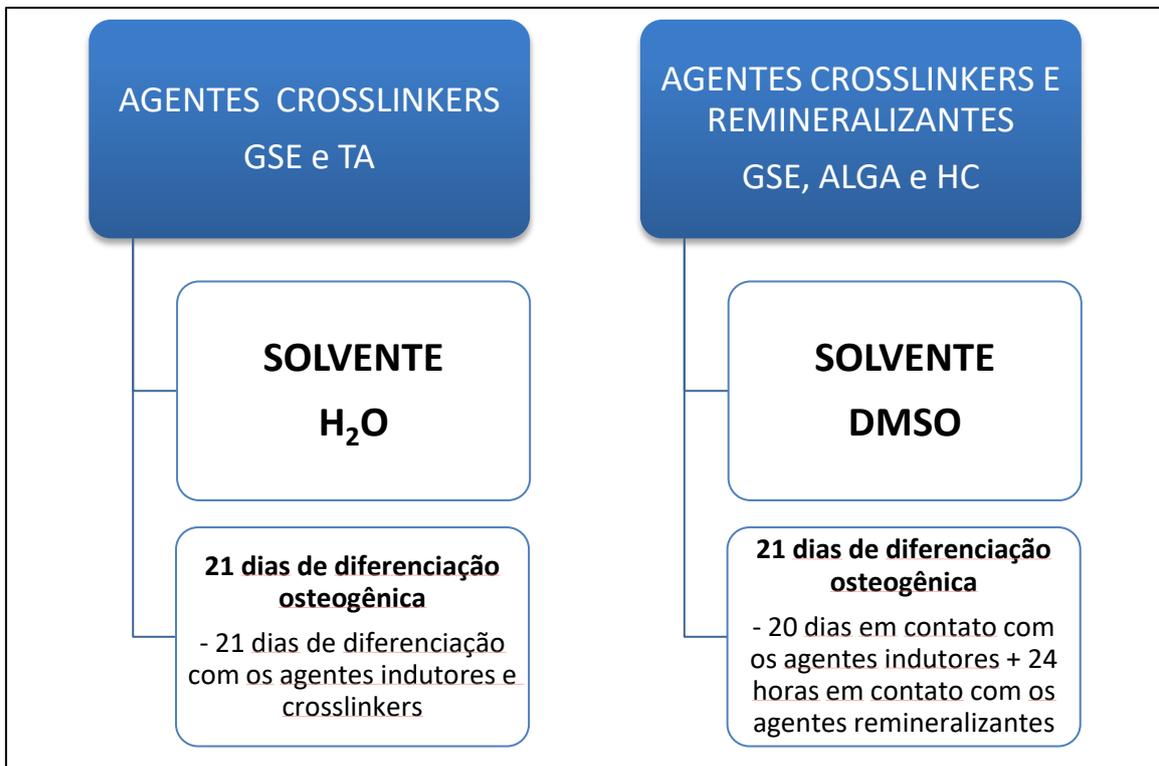


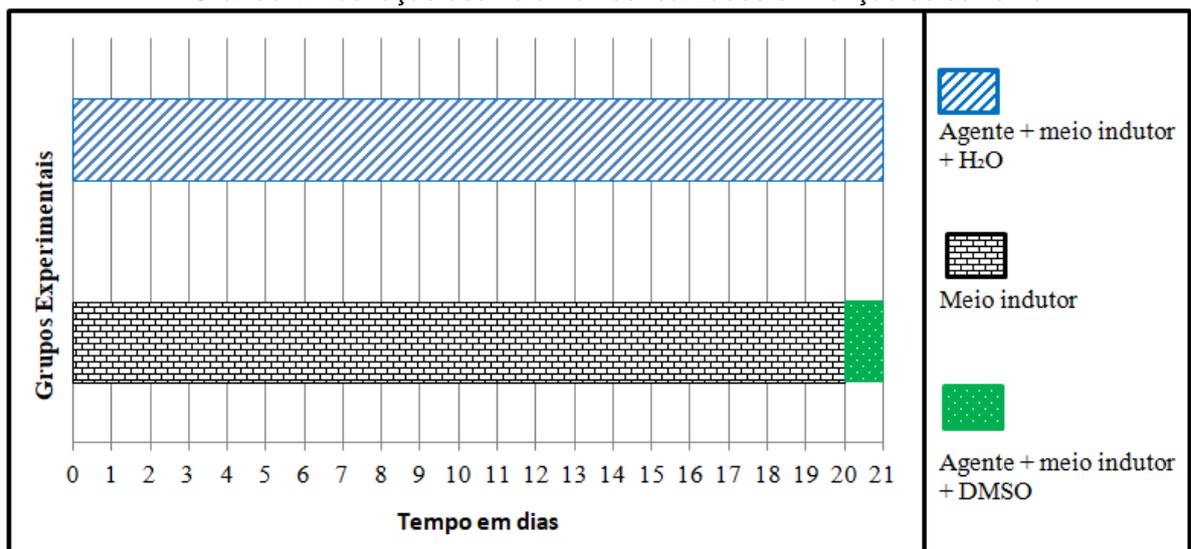
Figura 11: Esquema representando os tratamentos realizados neste estudo.

Quadro 3. Divisão dos grupos experimentais de acordo com os agentes remineralizantes, o solvente e os testes (MTT e NO) utilizados neste estudo

TESTES: MTT E NO		
Grupo experimental	Biomaterial	Sistema de solvente
Controle -	Controle negativo (condições ideais de cultivo convencional)	Meio de cultura (DMEM-Baixa-Glucose)
Controle +	Controle positivo (condições ideais de mineralização)	Meio indutor + H ₂ O
Alga 0.2%	Extrato alga <i>Lithothamnion calcaireum</i>	
Alga 0.02%		
Hidróxido de cálcio 0.2%	Hidróxido de cálcio	
Hidróxido de cálcio 0.02%		

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada através da avaliação do metabolismo celular e visualizada através da caracterização por imunofluorescência, enquanto que os padrões de diferenciação foram analisados pela produção total de proteína (PT), fosfatase alcalina (FA) e formação de matriz mineralizada por Vermelho de Alizarina. O gráfico 1 mostra que os biomateriais que foram dissolvidos pela água permaneceram em contato com as células durante os 21 de tratamento. Quando o DMSO foi utilizado, as células foram estimuladas pelo meio indutor durante 20 dias e apenas no último dia foi realizado a aplicação do extrato.

Gráfico 1. Ilustração dos tratamentos realizados em função do solvente



Quadro 4. Divisão dos grupos experimentais de acordo com o agente crosslinker, o solvente e os testes (PT, FA e Alizarin Red) utilizados neste estudo

TESTES: PT, FA e Alizarin Red		
Grupo experimental	Biomaterial	Sistema de solvente
Controle -	Controle negativo (condições	Meio de cultura (DMEM-Baixa-Glucose)

TESTES: PT, FA e Alizarin Red		
Grupo experimental	Biomaterial	Sistema de solvente
	ideais de cultivo convencional)	
Controle +	Controle positivo (condições ideais de mineralização)	Meio indutor + DMSO
GSE 0.65%	Proantocianidina	
GSE 0.0065%		

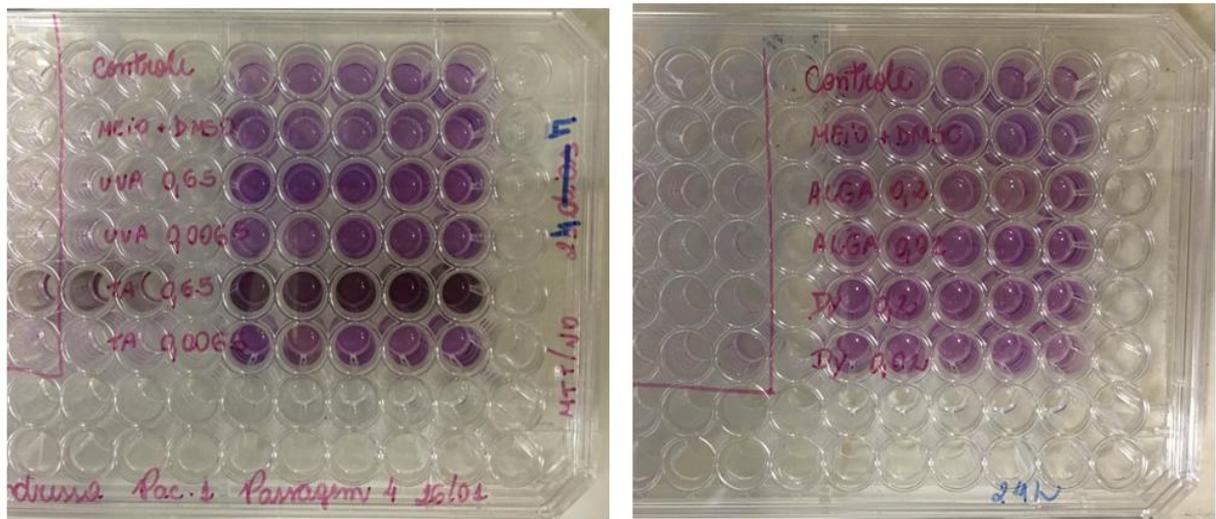
4.5 ENSAIO MTT

Para a avaliação do metabolismo celular, os agentes crosslinkers e remineralizantes avaliados foram diluídos em meio indutor na concentração adequada, previamente ao início dos experimentos.

Cinco mil células em meio de cultura DMEM completo foram semeadas em placas de 96 poços. Após 48 horas, o meio contendo os agentes crosslinkers/H₂O foi colocado em contato com as células pelos períodos imediato (1 hora), 7, 14 e 21 dias e os agentes remineralizantes/DMSO permaneceram em contato por 1 hora e 24 horas. Assim, os grupos experimentais para os agentes crosslinkers foram: G1: controle negativo (DMEM); G2: controle positivo (DMEM+H₂O); G3: GSE+H₂O 0,65%; G4: GSE+H₂O 0,0065%; G5: TA+H₂O 0,65%; G6: TA+H₂O 0,0065%. Para os agentes remineralizantes foram: G1: controle negativo (DMEM); G2: controle positivo (DMEM+DMSO); G3: ALGA+DMSO 0,2%; G4:ALGA+DMSO 0,02%; G5: HC+DMSO 0,2%; G6: HC+DMSO 0,02%. A troca de meio foi realizada a cada 2 dias. A placa foi mantida em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C em estufa.

Cinco amostras de cada grupo foram utilizadas para avaliação do metabolismo celular (Figuras 12 e 13). Após os diferentes períodos de exposição aos agentes estudados, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. Em seguida, foram colocados 90 µl de DMEM, ao qual foram adicionados 10 µl de solução 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 cuidadosamente e substituída por 60 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), 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. O metabolismo celular foi avaliado de maneira proporcional à absorbância determinada a 595 nm em leitor de ELISA (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China). Os resultados foram calculados usando a absorbância média de cada poço. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos a análise estatística. Cada experimento foi realizado em duplicata, em momentos diferentes, com n=5.



Figuras 12 e 13. Placas utilizadas no teste colorimétrico do metabolismo celular (MTT). Na esquerda têm-se os agentes crosslinkers e à direita os agentes remineralizantes.

4.6 ENSAIO NO

Para análise do estresse oxidativo foi utilizada a taxa de produção de óxido nítrico de acordo com o método de Griess (63). Nele, analisa-se a reação entre os radicais livres de óxido nítrico e uma solução reveladora, através de uma avaliação colorimétrica. A placa demonstrativa da análise de NO pode ser vista na figura 14. Os mesmos grupos avaliados no teste de MTT foram avaliados quanto a produção de óxido nítrico. Para isso, 100 µl do sobrenadante de cada amostra do ensaio anterior de metabolismo celular foi transferido para outra placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100µl de solução reveladora composta por sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5% e N-(1-naftil)etilenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5% (1 : 1, v : v). A produção de NO foi determinada por meio de comparação com uma curva padrão de nitrito de sódio (1,5625-200 µmol L⁻¹) em meio de cultura celular, obtido por diluição seriada formando uma escala de amarelo

claro até roxo. A leitura foi determinada pela absorbância em leitor de ELISA à 490nm (EON; Thermoplate, Shenzhen, China).

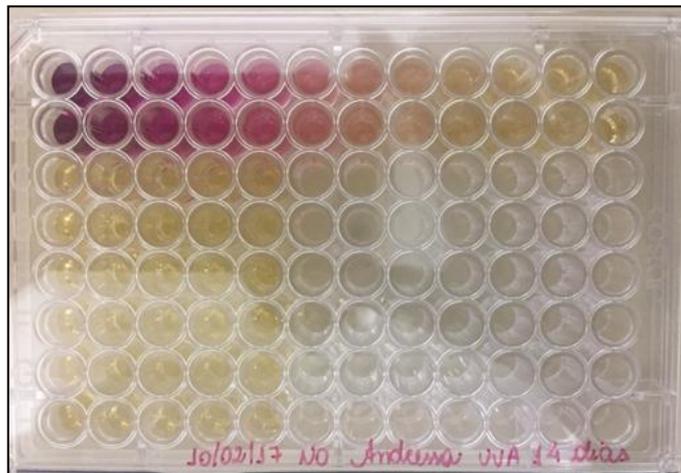


Figura 14. Placa demonstrativa da análise do estresse oxidativo por meio da produção de óxido nítrico.

4.7 COLORAÇÃO PELO BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA

A coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis de células em processo de morte por apoptose ou necrose através de microscopia de fluorescência, com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (64) (Figura 15).

Para esse ensaio, 1×10^4 células/poço, em triplicata, foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 horas, os tratamentos foram realizados. Para esta análise, os agentes crosslinkers (GSE e TA) e os dois solventes (DMSO/H₂O) na menor concentração (0,0065%) foram avaliados. Formando os seguintes grupos: G1: controle negativo (DMEM); G2: controle positivo (DMEM + DMSO); G3: grupo GSE+DMSO 0,0065%; G4: TA+DMSO 0,0065%; G5: controle positivo (DMEM +H₂O); G6: GSE+H₂O 0,0065% e G7: TA+H₂O 0,0065%. Ao final, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos. A seguir, elas foram lavadas três vezes com PBS gelado e adicionou-se em cada poço 10 µl da solução corante (1:1) de BE (100 µg/mL)/LA (100 µg/mL) por 5 minutos. Foram lavadas novamente com PBS gelado por 2 vezes antes da análise em microscópio de fluorescência (Olympus do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília).

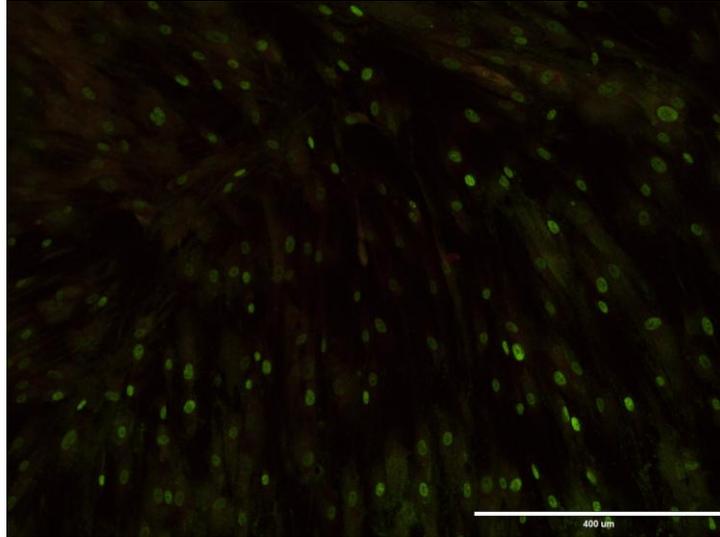


Figura 15. Imagem obtida pela coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA

Para cada agente e controles, 3 compartimentos das placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) foram destinados a estas análises. O protocolo de diferenciação durou 21 dias com mudança do meio de diferenciação a cada 2 dias para os grupos experimentais. Para o grupo controle negativo, o meio convencional também foi trocado a cada 2 dias. Células entre as passagens 3 e 4 foram usadas, e o experimento foi realizado em triplicata em dois diferentes momentos ($n = 6$). O GSE/DMSO em duas concentrações (0,65% e 0,0065%) foram analisados. Desta forma, os grupos para esses testes foram: G1: controle negativo (DMEM); G2: controle positivo (DMEM+DMSO); G3: GSE+DMSO 0.65% e G4: GSE+DMSO 0.0065%.

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada segundo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, foi possível realizar a medida direta do produto de hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida espectrofotometricamente.

As células foram lisadas com 1,050 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de cada compartimento foi transferido para tubos de ensaio contendo 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit), mantidos previamente em banho-maria a 37°C. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado 2 mL de Reagente de Cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit) em cada tubo. A absorbância dos tubos testes e branco foi determinada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 590 nm. A placa utilizada para esta análise pode ser vista na figura 16.

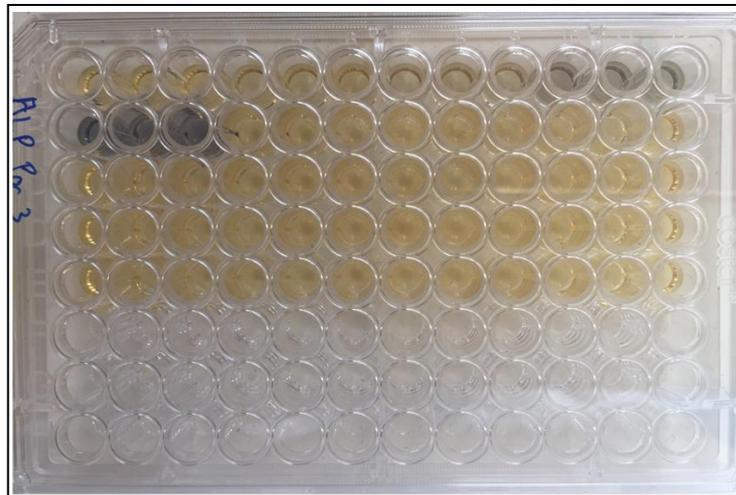
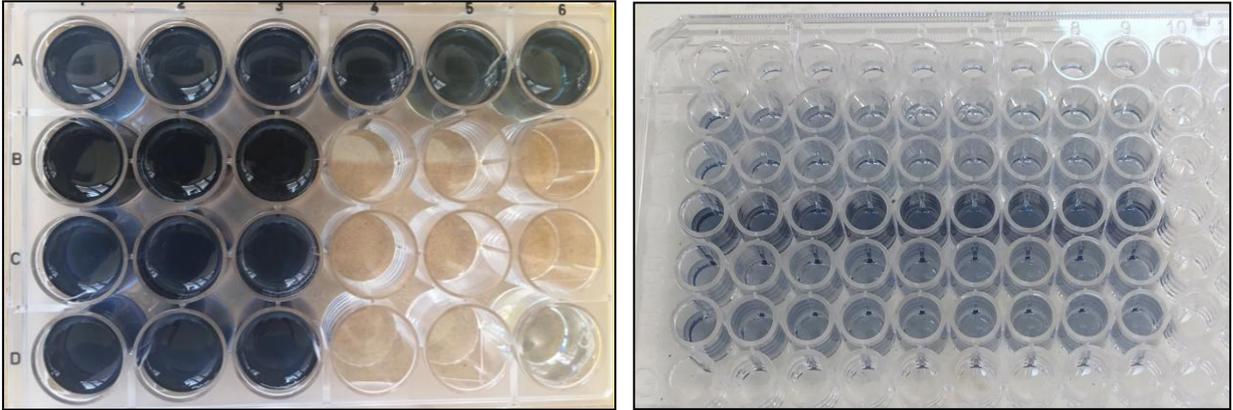


Figura 16. Placa demonstrativa da produção de fosfatase alcalina avaliada neste estudo

Para normalização da fosfatase alcalina, foi realizada dosagem da proteína total. Ao restante da amostra de cada compartimento (1 mL), foram adicionados 1 mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) a qual permaneceu em contato por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 500 µL de Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich, St Louis, USA), como pode ser visto na figura 17. Trinta minutos após, três alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA (Figura 18). A dosagem de fosfatase alcalina e proteína total foram calculadas a partir de uma curva-padrão.



Figuras 17 e 18. Placas obtidas durante a quantificação de proteína total.

4.9 FORMAÇÃO DOS NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

Para avaliar a formação dos nódulos de mineralização, passado o período de 21 dias, os extratos foram removidos e as células foram lavadas 2 vezes com 0,5ml de solução tampão fosfato (PBS). As células aderidas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas em PBS por 3 vezes, coradas com vermelho de Alizarina 40 mM (1 grama em 5ml de água destilada) em pH 4,2 (Sigma-Aldrich Corp.), durante 20 minutos e cuidadosamente lavadas com água destilada por 3 vezes. Após a remoção da água destilada, foi colocado 0,5ml de PBS. O precipitado de cálcio presente foi corado em vermelho, revelando os nódulos de mineralização (Figuras 19), que foram examinados ao microscópio invertido de fase (análise qualitativa) (Figuras 20 e 21) e contados (análise quantitativa) (Figura 22).

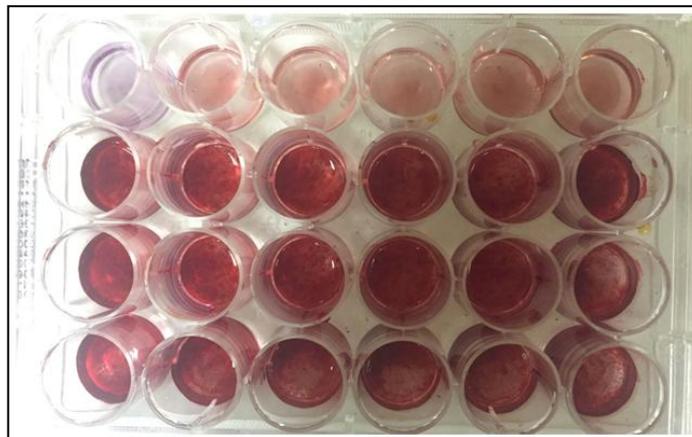
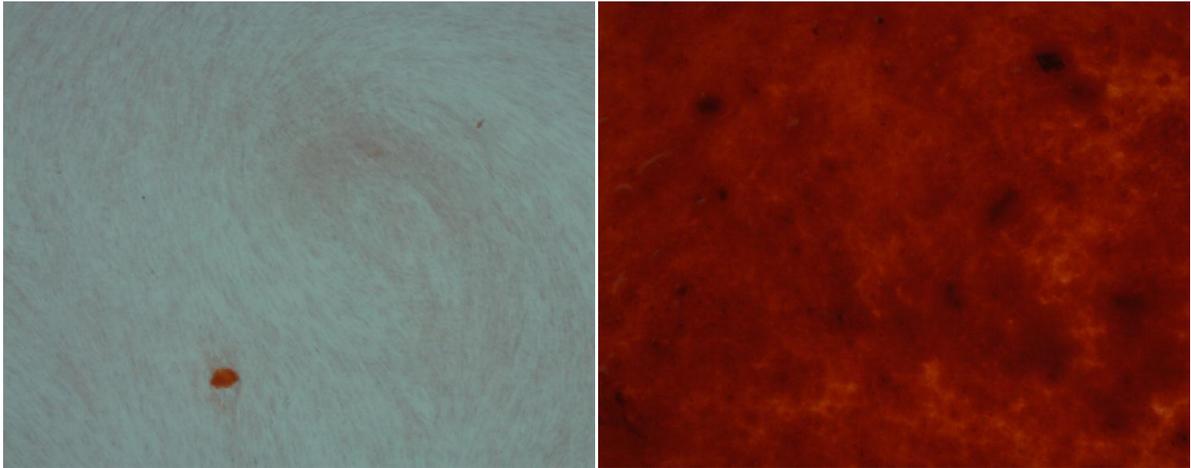


Figura 19. Placa demonstrativa da formação dos nódulos de mineralização.



Figuras 20 e 21. Imagens aproximadas dos grupos controle e experimental após avaliação da matriz mineralizada por Vermelho de Alizarina.

Na análise qualitativa foram feitas capturas de imagens pela câmera digital para microscópio invertido de fase (Axiovert 100, Zeiss – Germany), identificando nódulos de mineralização. Para análise quantitativa, 100ul de cloreto de cetilpiridíneo 10% (Sigma- Aldrich Corp.) em fosfato de sódio 10nM ph 7 foi colocado em cada poço e transferido para um placa de 96 compartimentos (Figura 22). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China), utilizando um comprimento de onda de 570nm.

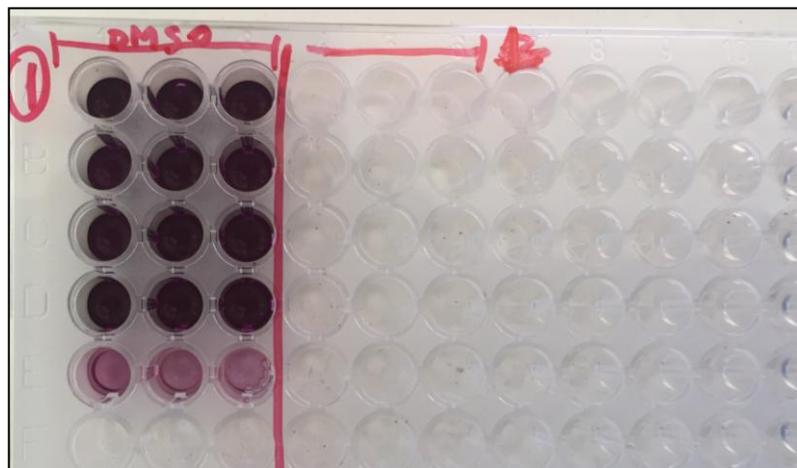


Figura 22. Placa demonstrativa da análise quantitativa dos nódulos de mineralização.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados para a normalidade e homogeneidade usando os testes Shapiro-Wilk e Levene's. Como os dados não apresentaram distribuição normal, testes não paramétricos como Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística. O nível de

significância foi 0,05 e a análise estatística foi realizada usando STATA version 13.0 (StataCorp LLC., College Station, TX, USA).

5 RESULTADOS

5.1 SOLVENTE ÁGUA E AGENTES CROSSLINKERS (GSE e ácido tânico)

5.1.1 Ensaio MTT

Para os experimentos de MTT com o solvente água, foram utilizadas duas concentrações de extrato de uva e ácido tânico (0,65% e 0,0065%) durante 4 diferentes períodos de avaliação (imediate, 7 dias, 14 dias e 21 dias). Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p < 0,0001$).

A Tabela 1 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorvância do teste de MTT realizado para todos os períodos.

Tabela 1. Absorvância do teste de MTT realizado após diferentes períodos de avaliação.

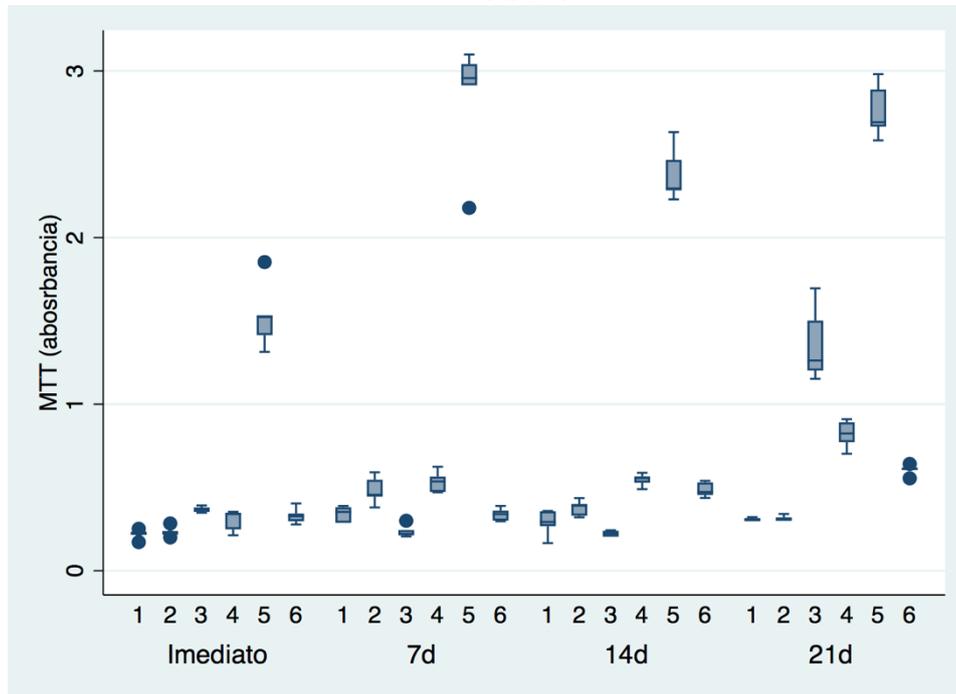
Grupo	Mediana (IQR) imediate	Mediana (IQR) 7 dias	Mediana (IQR) 14 dias	Mediana (IQR) 21 dias
1-Controle negativo	0.22 (0.22-0.23) ^a	0.35 (0.29-0.38) ^a	0.29 (0.27-0.36) ^a	0.31 (0.3-0.31) ^a
2-Controle meio +água	0.23 (0.2-0.23) ^a	0.46 (0.45-0.54) ^b	0.39 (0.33-0.4) ^b	0.31 (0.3-0.32) ^a
3-GSE 0.65%	0.37 (0.35-0.38) ^b	0.22 (0.21-0.24) ^c	0.22 (0.2-0.24) ^c	1.26 (1.2-1.5) ^b
4-GSE 0.0065%	0.34 (0.25-0.35) ^b	0.54 (0.47-0.56) ^b	0.55 (0.53-0.57) ^d	0.82 (0.77-0.89) ^c
5-Ácido tânico 0.65%	1.52 (1.4-1.5) ^c	2.95 (2.91-3.04) ^d	2.29 (2.28-2.47) ^e	2.69 (2.66-2.89) ^d
6- Ácido tânico 0.0065%	0.33 (0.29-0.34) ^b	0.34 (0.3-0.36) ^a	0.47 (0.45-0.53) ^d	0.61 (0.6-0.64) ^e

Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Visualiza-se que tanto o extrato de uva quanto o ácido tânico nas concentrações de 0,65% apresentam valores altos de viabilidade celular, sendo o ácido tânico sempre superior. Esses valores foram influenciados pela capacidade desses agentes colorir e interferir nos valores de absorvância, ainda que um controle sem célula tenha sido utilizado para subtração. Somente a concentração 0,65% no período de 7 e 14 dias reduziu a viabilidade celular de forma significativa (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Observa-se, ainda, que houve um comportamento dependente da concentração utilizada, porém não de forma linear, ou seja, diretamente proporcional. O Gráfico 2 evidencia o comportamento das concentrações ao longo dos períodos analisados.

Gráfico 2. Absorbância obtida no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos: imediato, 7d, 14d e 21d.



5.1.2 Ensaio NO

Utilizando a metodologia descrita por Green *et al.* (1982), o ensaio de NO foi realizado utilizando o sobrenadante. Com auxílio da curva padrão, uma função linear foi obtida a fim de quantificar NO produzido. Os níveis produzidos foram baixos, levando a valores negativos devido à limitação do próprio leitor ELISA em quantificar níveis mínimos de NO.

A Tabela 2 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorbância de NO realizado nos períodos de 7 dias, 14 dias e 21 dias.

Tabela 2. Absorbância do teste de NO realizado após 24 horas de contato.

Grupo	Mediana (IQR) 7 dias	Mediana (IQR) 14 dias	Mediana (IQR) 21 dias
1-Controle negativo	0.16(0.14-0.17) ^a	0.18 (0.17-0.19) ^a	0.18 (0.17-0.19) ^a
2-Controle meio +água	0.16 (0.15-0.17) ^a	0.17 (0.16-0.18) ^a	0.18 (0.17-0.19) ^a
3-GSE 0.65%	0.18 (0.18-0.19) ^a	0.18 (0.17-0.19) ^a	0.57 (0.56-0.59) ^b
4-GSE 0.0065%	0.18 (0.17-0.19) ^a	0.18 (0.17-0.18) ^a	0.19 (0.18-0.2) ^a
5-Ácido tânico 0.65%	0.24 (0.22-0.25) ^b	0.25 (0.22-0.3) ^b	0.28 (0.25-0.29) ^c
6- Ácido tânico 0.0065%	0.18 (0.17-0.19) ^a	0.17 (0.17-0.18) ^a	0.18 (0.17-0.19) ^a

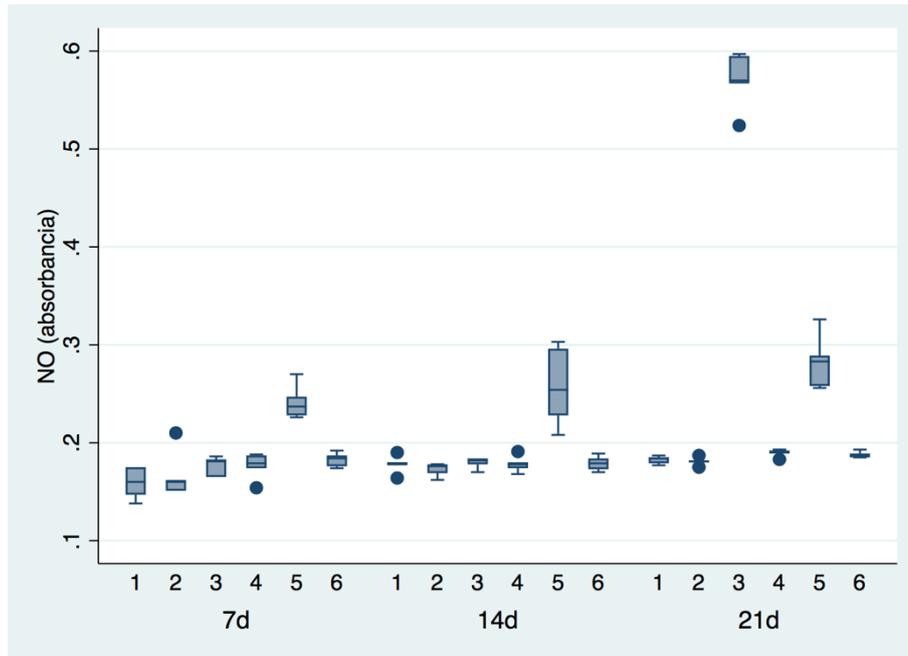
Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

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 GSE 0,65% no período de 21 dias apenas, e o ácido tânico na concentração de 0,65% durante os três períodos de avaliação (7,14 e 21 dias).

Ainda que diferenças sejam observadas entre os períodos, verifica-se o mesmo comportamento dos agentes crosslinkers como demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3. Absorbância obtida no teste de NO para os diferentes grupos nos períodos: 7,14 e 21 dias



5.2 SOLVENTE DMSO E AGENTES REMINERALIZADORES (alga e hidróxido de Cálcio)

5.2.1 Ensaio MTT

Para os experimentos de MTT com o solvente DMSO, foram utilizadas duas concentrações de alga e hidróxido de cálcio (0,2% e 0,02%) durante 2 diferentes períodos de avaliação (imediato e 24 horas). Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p < 0,0001$).

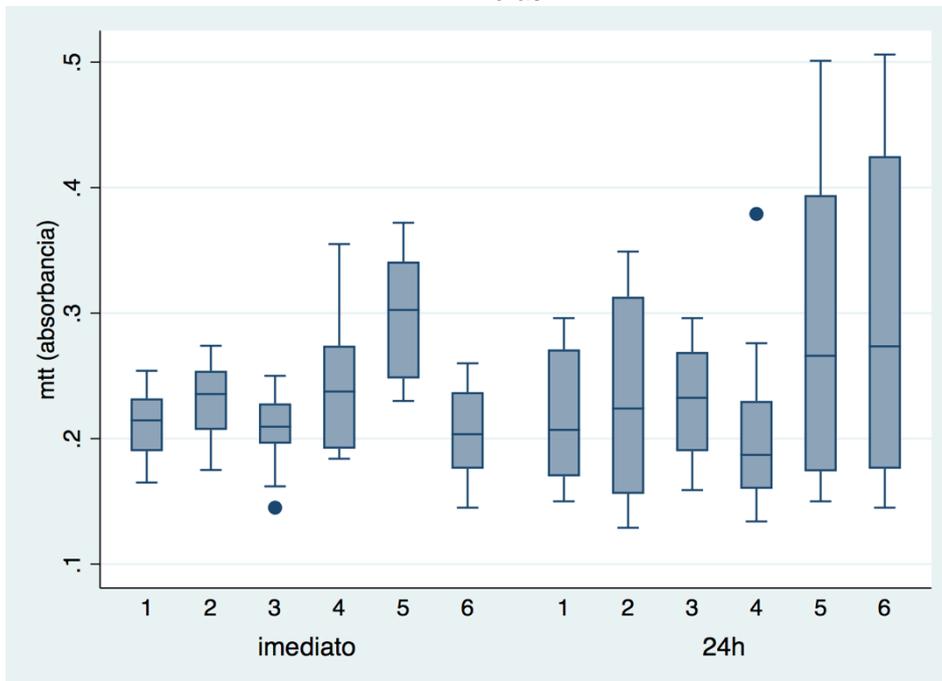
A Tabela 3 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorbância do teste de MTT realizado para todos os períodos.

Tabela 3. Absorbância do teste de MTT realizado após dois períodos de avaliação.

Grupo	Mediana (IQR) imediatO	Mediana (IQR) 24 horas
1-Controle negativo	0.21 (0.19-0.23) ^a	0.20 (0.17-0.27) ^a
2-Controle meio +DMSO	0.24 (0.21-0.25) ^a	0.22 (0.15-0.31) ^a
3-Alga 0.2%	0.21 (0.19-0.23) ^a	0.23 (0.19-0.27) ^a
4-Alga 0.02%	0.24 (0.19-0.27) ^{a,b}	0.19 (0.16-0.23) ^a
5-CaOH ₂ 0.2%	0.30 (0.25-0.34) ^b	0.27 (0.17-0.39) ^a
6- CaOH ₂ 0.02%	0.20 (0.17-0.24) ^a	0.27 (0.17-0.42) ^a

Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$).

Para o período imediato, o teste de Kruskal Wallis identificou diferença entre os grupos ($p=0.002$). Observa-se que o grupo do hidróxido de cálcio a 0.2% apresentou valores significativamente mais altos de viabilidade celular do que o grupo controle. O Grupo da alga também apresentou valores superiores ao do controle, porém não houve diferença estatística ($p>0.05$). No período de 24 horas, não houve diferença estatística entre os grupos (Kruskall Wallis, $p=0.5$). O Gráfico 4 evidencia o comportamento das concentrações de alga e hidróxido de cálcio ao longo dos períodos analisados.

Gráfico 4. Absorbância obtida no teste de MTT para os diferentes grupos nos períodos: imediato e 24 horas.

5.2.2 Ensaio NO

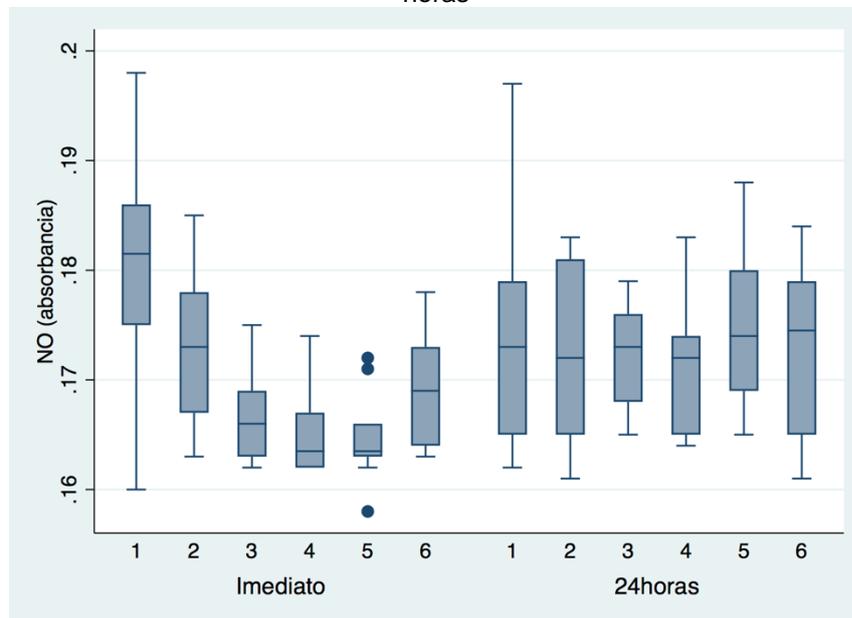
A Tabela 4 apresenta os valores da mediana e distância interquartil dos valores de absorbância de NO realizado nos períodos imediato e 24 horas para os agentes remineralizantes.

Tabela 4. Absorbância do teste de NO realizado após os períodos imediato e 24 horas

Grupo	Mediana (IQR) imediato	Mediana (IQR) 24 horas
1-Controle negativo	0.18 (0.17-0.19) ^a	0.17 (0.16-0.18) ^a
2-Controle meio +DMSO	0.17 (0.16-0.18) ^a	0.17 (0.16-0.18) ^a
3-Alga 0.2%	0.16 (0.16-0.17) ^a	0.17 (0.17-0.18) ^a
4-Alga 0.02%	0.16 (0.16-0.17) ^a	0.17 (0.17-0.18) ^a
5-CaOH ₂ 0.2%	0.16 (0.16-0.17) ^a	0.17 (0.17-0.18) ^a
6- CaOH ₂ 0.02%	0.17 (0.16-0.17) ^a	0.17 (0.16-0.18) ^a

De acordo com o teste de Kruskal Wallis, não foi observada diferença entre os grupos ($p > 0,05$). O Gráfico 5 indica o comportamento dos agentes remineralizantes ao longo dos períodos avaliados.

Gráfico 5. Absorbância obtida no teste de NO para os diferentes grupos nos períodos imediato e 24 horas



5.2.3 Proteína Total

Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p=0,01$). A Tabela 5

apresenta os valores da mediana e distância interquartil, assim como de média e desvio-padrão dos valores de absorbância do teste de proteína total.

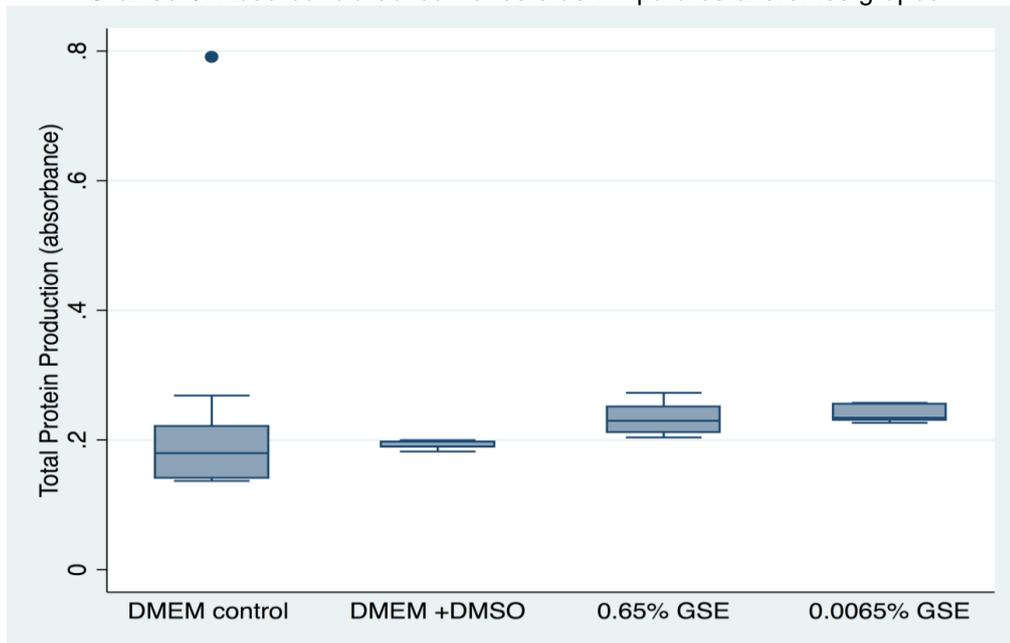
Tabela 5. Absorbância do teste de PT

Grupo	Mediana (IQR)	Média (DP)
1-Controle negativo	0.15 (0.09-0.20) ^a	0.19 (0.19)
2-Controle meio +DMSO	0.19 (0.11-0.19) ^a	0.15 (0.06)
3-GSE 0.65%	0.21 (0.12-0.25) ^a	0.18 (0.08)
4-GSE 0.0065%	0.23 (0.13-0.25) ^a	0.19 (0.08)

Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

O teste de Kruskal Wallis não identificou diferença entre os grupos ($p > 0,05$). A produção de proteína total foi similar para todos os grupos experimentais, conforme observado no Gráfico 6.

Gráfico 6. Absorbância obtida no teste de PT para os diferentes grupos



5.2.4 Fosfatase alcalina

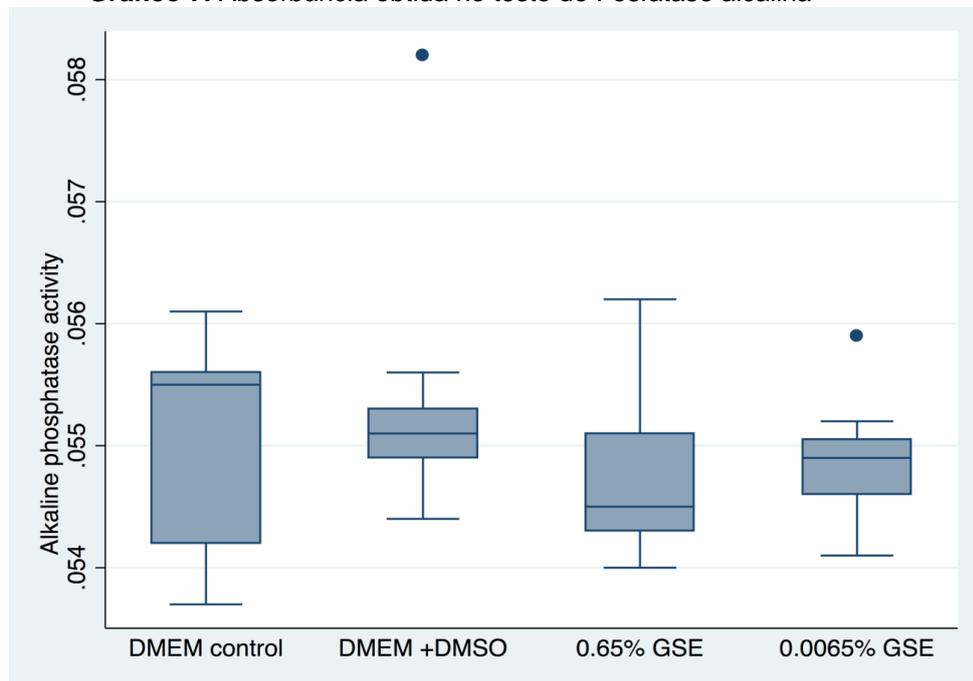
Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p = 0,01$). A Tabela 6 apresenta os valores da mediana e distância interquartil, assim como de média e desvio-padrão dos valores de absorbância do teste de fosfatase alcalina.

Tabela 6. Absorbância do teste de FA

Grupo	Mediana (IQR)	Média (DP)
1-Controle negativo	0.06 (0.05-0.06) ^a	0.054 (0.0009)
2-Controle meio +DMSO	0.06 (0.05-0.06) ^a	0.053 (0.001)
3-GSE 0.65%	0.05 (0.05-0.06) ^a	0.055 (0.0007)
4-GSE 0.0065%	0.05 (0.05-0.06) ^a	0.055 (0.0005)

Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

O teste de Kruskal Wallis não identificou diferença entre os grupos ($p > 0,05$), como observado no Gráfico 7.

Gráfico 7. Absorbância obtida no teste de Fosfatase alcalina

5.3 ALIZARIN RED

5.3.1 Análise Quantitativa

Como os dados de alizarin não apresentaram normalidade, testes não paramétricos foram utilizados para realizar a análise estatística (Shapiro Wilk, $p=0.01$). A Tabela 7 apresenta os valores da mediana e distância interquartil, assim como de média e desvio-padrão dos valores de absorbância do teste de alizarin red.

Tabela 7. Absorbância do teste de alizarin

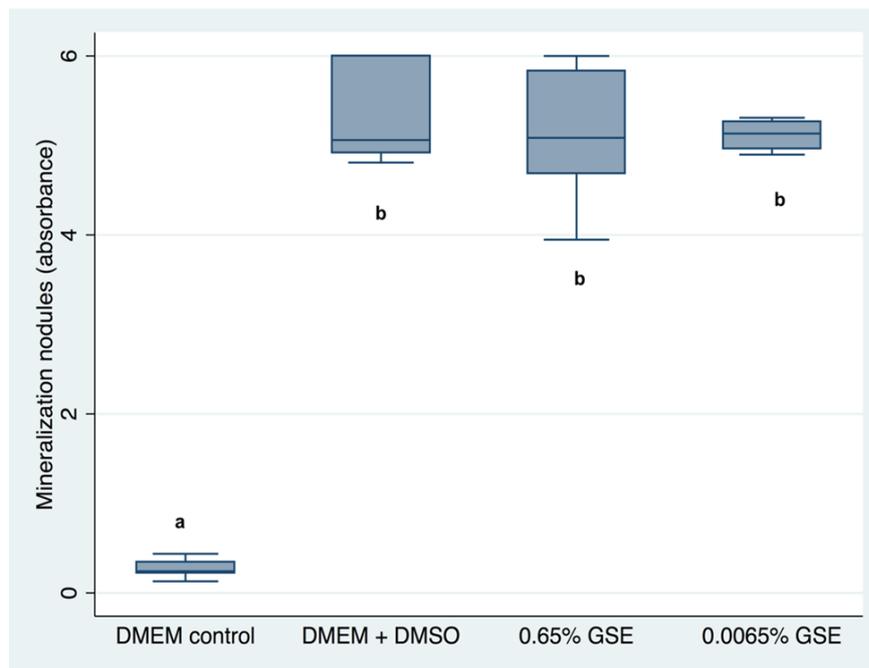
Grupo	Mediana (IQR)	Média (DP)
1-Controle negativo	0.24 (0.20-0.37) ^a	0.27 (0.11)
2-Controle meio +DMSO	5.06 (4.89-6.00) ^b	5.31 (0.55)

Grupo	Mediana (IQR)	Média (DP)
3-GSE 0.65%	5.08 (4.50-5.87) ^b	5.11 (0.75)
4-GSE 0.0065%	5.13 (4.95-5.28) ^b	5.12 (0.17)

Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

O teste de Kruskal Wallis identificou diferença entre os grupos ($p=0.003$), como observado no Gráfico 8. Diferenças não foram observadas entre os grupos experimentais ($p > 0.05$).

Gráfico 8. Absorbância obtida no teste de alizarin



5.3.2 Análise Qualitativa

Na análise qualitativa foram feitas capturas de imagens pela câmera digital para microscópio invertido de fase (Axiovert 100, Zeiss – Germany), identificando, desta forma, os nódulos de mineralização. Na Figura 23, pode ser observado imagens de culturas celulares tratadas por Alizarina Vermelha após 21 dias do experimento. Os nódulos de mineralização estão marcados em vermelho. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental – GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - GSE a 0,65%.

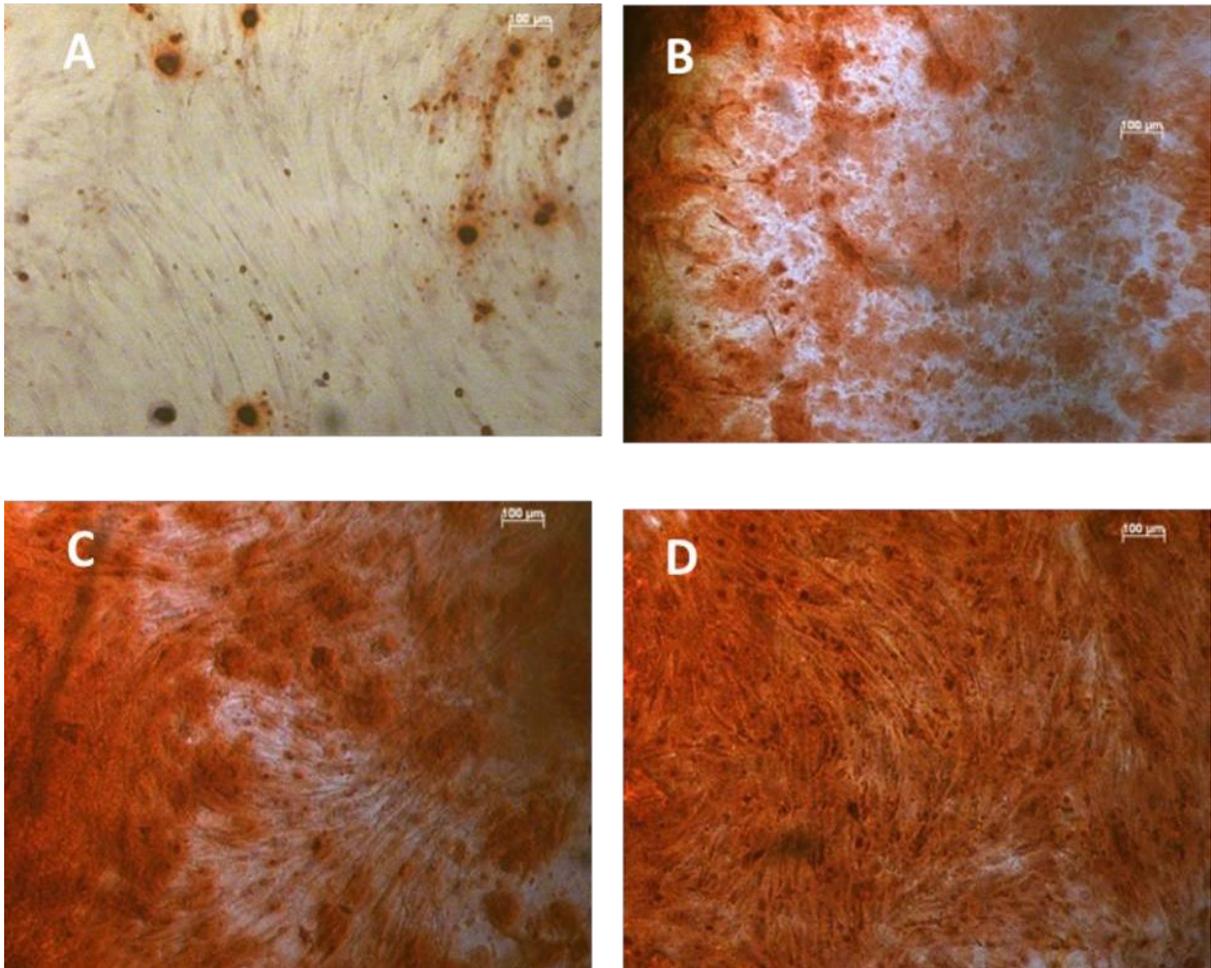
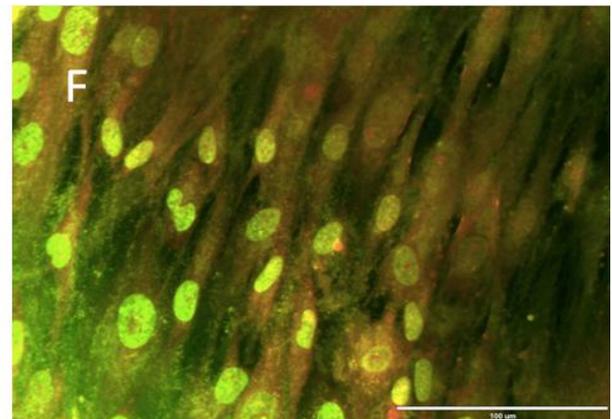
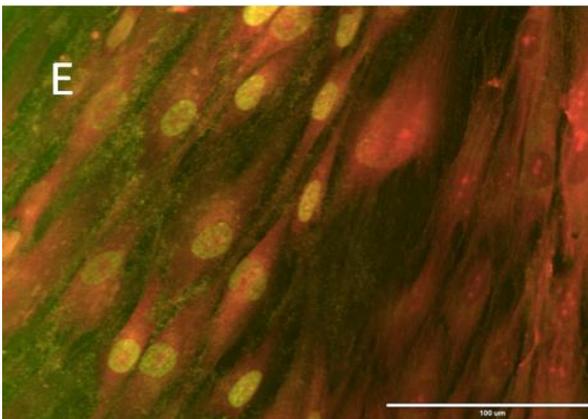
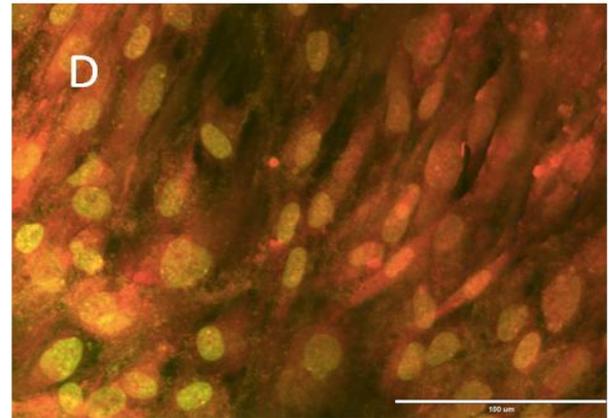
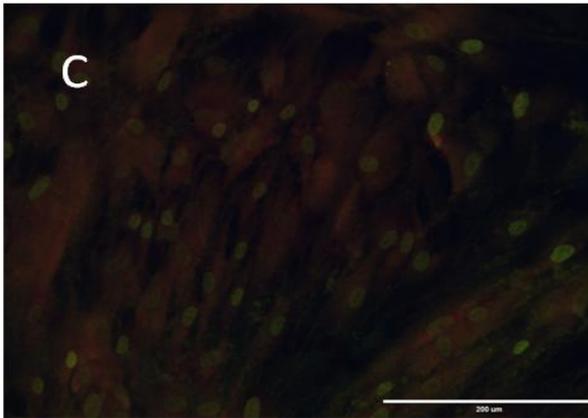
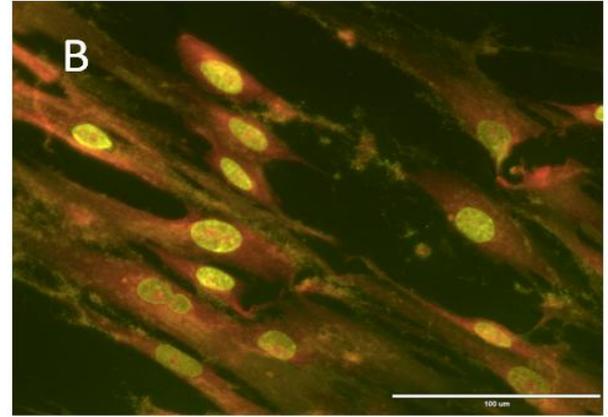
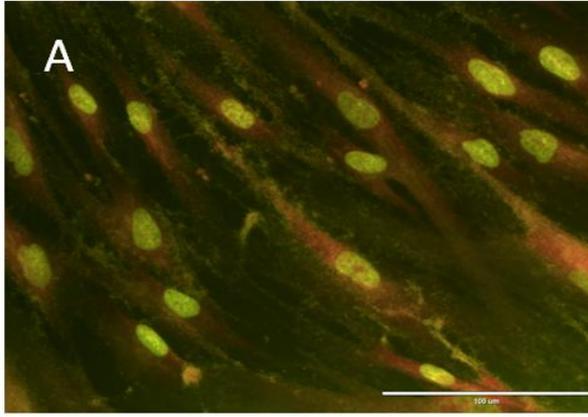


Figura 23. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental – GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - GSE a 0,65%

5.3.3 Coloração pelo Brometo de Etídio e Laranja de Acridina

A coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis de células em processo de morte por apoptose ou necrose através de microscopia de fluorescência, com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (64). Essas imagens (Figura 24) foram obtidas após 24 horas de contato dos tratamentos com a cultura de células da polpa. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental – GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - TA a 0,0065%; E: controle positivo – DMEM + ÁGUA; F: grupo experimental – GSE a 0,0065% e G: grupo experimental – TA a 0,0065%. As Figuras 24A, 24B e 24C mostram o controle negativo, positivo e o grupo experimental – GSE/DMSO 0,0065% respectivamente, onde ocorre o predomínio de células viáveis, coradas em verde. Nas figuras 24D, 24E e 24F houve a presença de células necróticas, coradas em vermelho, porém a

predominância é de células viáveis. Já a Figura 24G, em que foi realizado o tratamento com ácido tânico dissolvido em água houve um predomínio de células necróticas.



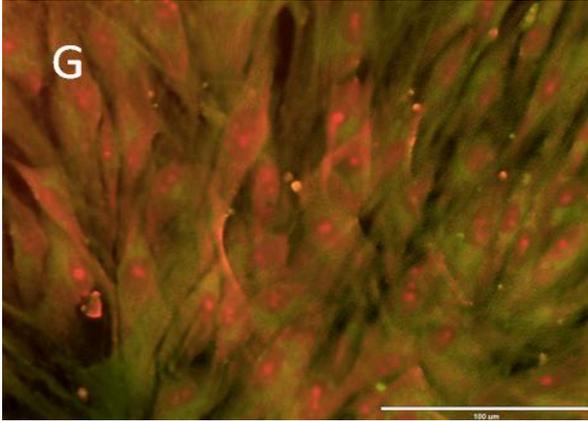


Figura 24. A: controle negativo - DMEM; B: controle positivo - DMEM + DMSO; C: grupo experimental - GSE a 0,0065%; D: grupo experimental - TA a 0,0065%; E: controle positivo - DMEM + ÁGUA; F: grupo experimental - GSE a 0,0065% e G: grupo experimental - TA a 0,0065%

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade direta e o potencial dentinogênico de agentes crosslinkers e remineralizantes, uma vez que estes tem promovido melhoras nas propriedades mecânicas da dentina, aumento da resistência da união resina-dentina, redução das taxas de biodegradação do colágeno desmineralizado e, conseqüentemente, estendendo a longevidade das restaurações adesivas (22-42-65).

A avaliação biológica de um novo material odontológico é extremamente importante porque entra em contato com o complexo dentino-pulpar, podendo apresentar efeitos em muitos sistemas biológicos. Sabe-se que os odontoblastos são as primeiras células a entrarem em contato com os biomateriais que se difundem através dos túbulos dentinários (66). Hebling *et al.* 2015 destacam a importância de escolher o tipo de célula mais adequada para avaliar os novos materiais de acordo com o papel que desempenham. As células da polpa foram utilizadas neste estudo, justamente por representarem o tecido com o qual os agentes crosslinkers e remineralizantes irão 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 biocompatibilidade dos biomateriais e inferir sobre sua atuação no reparo pulpar e produção de matriz mineralizada.

A citotoxicidade desses agentes de reticulação tem sido alvo de estudos recentes, uma vez que, estes podem ser empregados em etapa posterior ao condicionamento ácido para tratamento dentinário como na incorporação nos sistemas adesivos, podendo ser danosos para a regeneração e a manutenção da vitalidade pulpar (42).

Neste estudo, a citotoxicidade dos agentes foi o primeiro teste a ser realizado para assegurar a viabilidade de seu emprego para os testes de diferenciação celular que, neste caso, apresentou duração de 21 dias. Os resultados obtidos dos projetos piloto nos mostraram que o uso contínuo de DMSO em meio de cultura por 21 dias causou uma severa redução no metabolismo celular e conseqüente redução no número de células disponíveis. Desta forma, um contato de

apenas 24 horas com as células foi programado para o uso do DMSO. Assim, outro solvente (H₂O) foi avaliado na tentativa de estender o contato dos extratos com as células pulpaes.

Duas concentrações (0,65% e 0,0065%) dos agentes crosslinkers (GSE e TA) dissolvidos em água foram avaliadas em quatro períodos, 1 hora, 7, 14 e 21 dias. A análise de MTT foi realizada nestes períodos, visando avaliar o comportamento citotóxico dos agentes crosslinkers para determinar a viabilidade de seu emprego para os testes de diferenciação celular.

Foi observado que tanto o extrato de uva quanto o ácido tânico nas concentrações de 0,65% apresentaram altos valores de viabilidade celular, sendo o ácido tânico sempre superior. Esses valores foram influenciados pela capacidade desses agentes colorir e interferir nos valores de absorbância, ainda que um controle sem célula tenha sido utilizado para subtração dessa interferência. Diferenças na estrutura química e solubilidade podem explicar os valores mais altos de viabilidade obtidos pelo ácido tânico a 0,65%. Castellan *et al.* (2011) relataram que a água pura não dissolve os polímeros de alto peso molecular do GSE. Talvez, o ácido tânico apresente uma solubilidade maior em água o que poderia explicar esses resultados.

Lu *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade das PAs sobre diferentes condições de pH e meio de cultura comum. Foi observado que as PAs são instáveis em meio de cultura (b-DMEM), apresentando uma meia-vida <15 minutos, ou seja, sua concentração diminui muito rapidamente. Após 24 horas, apenas 6% de PAs foi detectado no meio de cultura. As PAs produziram um pico 1 assim que foram adicionadas ao meio, atingindo a concentração máxima nesse pico em 30 min, diminuindo rapidamente até 60 min. Essa redução ocorreu de forma lenta até 8 horas, permanecendo no mesmo nível durante 24 horas, que foi o tempo de incubação. O pico 1 foi responsável por apenas 20% do total de proantocianidinas no meio de cultura. Essa instabilidade dos agentes crosslinkers em meio de cultura podem justificar o comportamento não linear dos resultados obtidos nos testes de MTT e NO. A presença de compostos insolúveis, os polímeros de alto peso molecular podem ser os responsáveis pela redução estatisticamente significativa da viabilidade celular nos períodos de 7 e 14 dias dos dois extratos avaliados na maior concentração.

Desta forma, esse estudo confirma o que alguns estudos já indicaram, que os compostos podem sofrer degradação, autooxidação ou epimerização em meio de

cultura (68-69). Como os agentes crosslinkers (GSE e TA) foram capazes de alterar o metabolismo celular e a produção de óxido nítrico, a hipótese nula, nesta análise foi rejeitada.

Para os experimentos de MTT dos agentes remineralizantes com o solvente DMSO, duas concentrações de alga e hidróxido de cálcio (0,2% e 0,02%) foram utilizadas durante 2 diferentes períodos de avaliação (imediate e 24 horas). Este é um dos solventes mais comumente utilizados para dissolver substâncias insolúveis em água (70).

Os tempos de contato avaliados foram 1 hora e 24 horas porque os testes piloto demonstraram a inviabilidade do uso contínuo de DMSO em meio de cultura. A análise após 1 hora de contato foi baseada no trabalho de Lu *et al.* (2011) em que observaram que a concentração das PAs reduziu muito rapidamente em meio de cultura b-DMEM.

Na análise imediata, o grupo do hidróxido de cálcio a 0,2% apresentou valores significativamente mais altos de viabilidade celular do que o grupo controle, e o grupo da alga também apresentou valores superiores ao do controle, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O hidróxido de cálcio, na maior concentração, pode ter apresentado uma solubilidade maior quando em contato com o DMSO em relação a alga, desta forma, um maior número de compostos estiveram disponíveis para agir sobre as células pulpares, resultando no aumento da viabilidade celular com diferenças estatísticas. Esse comportamento não foi repetido para as análises a 0,02% possivelmente porque a concentração estabelecida não foi suficiente para produzir efeitos biológicos sobre as células da polpa. Assim, a hipótese nula foi parcialmente rejeitada, uma vez que, apenas o hidróxido de cálcio 0,2% interferiu na viabilidade das células pulpares.

Uma função linear foi obtida com auxílio da curva padrão a fim de quantificar ON produzido. Os níveis produzidos foram baixos, levando a valores negativos, possivelmente devido a limitação do próprio leitor ELISA em quantificar níveis mínimos de ON. Com relação aos dados obtidos nesta análise, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, assim, os agentes remineralizantes não alteraram a produção de óxido nítrico. Neste caso, a hipótese nula foi aceita.

Para os dados de proteína total, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização, não houve diferença entre o grupo submetido ao protocolo de

diferenciação celular (controle positivo), em que foi utilizado o meio de cultura alfa-DMEM e o solvente, neste caso o DMSO e os grupos expostos ao extrato, GSE em duas concentrações (0,65% e 0,0065%). Estes experimentos tiveram duração de 21 dias, visto que as culturas celulares foram expostas a reagentes que promovem a diferenciação osteogênica. Apenas no último dia de tratamento é que os agentes crosslinkers dissolvidos em DMSO permaneceram em contato com as células da polpa. Portanto, pode-se especular que um contato contínuo com o extrato de uva poderia alterar o padrão observado no presente estudo. Já foi demonstrado que os agentes crosslinkers ricos em PAs são tempo e concentração dependentes (12-44).

Neste estudo, imagens foram obtidas através da coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laraja de Acridina (BE/LA) que permite diferenciar células viáveis de células em processo de morte por apoptose ou necrose através de microscopia de fluorescência.

A identificação do tipo de morte (necrose e apoptose) é importante na análise da citotoxicidade de biomateriais (71), pois estes interferem especificamente nas diversas funções celulares (72). A morte celular por necrose é considerada mais agressiva, uma vez que ocorre o rompimento da membrana celular, causando a exposição de todas as organelas essenciais para a sua sobrevivência, o que pode dar início a um processo de inflamação tecidual. Por outro lado, a morte por apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que pode estar presente não só durante o desenvolvimento normal mas também na patologia de algumas enfermidades e agentes tóxicos (73). Evidências atuais sugerem fortemente que o mecanismo por trás dessas respostas celulares específicas é a geração do estresse oxidativo.

Este tipo de análise foi utilizada neste estudo apenas para ilustrar as possíveis alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas provocadas pelos agentes crosslinkers (GSE e TA) dissolvidos em DMSO e água quando em contato com as células pulpares por 24 horas. As Figuras 24A, 24B e 24C mostram o controle negativo, positivo e o grupo experimental – GSE/DMSO 0,0065% respectivamente, onde ocorre o predomínio de células viáveis, coradas em verde. Assim, esses tratamentos não foram capazes de alterar a morfologia celular, confirmando os resultados obtidos no teste MTT, no qual, também não foram capazes de alterar o metabolismo celular. Nas figuras 24D, 24E e 24F houve a presença de células necróticas, coradas em vermelho, porém a predominância é de

células viáveis. Esses grupos experimentais produziram morte por apoptose, um tipo de morte programada que não causam alterações celulares capazes de serem detectadas no teste de MTT, por isso, esses tratamentos não alteraram o metabolismo celular. Esse fato também pode ser na Figura 24G, em que foi realizado o tratamento com ácido tânico dissolvido em água. Houve um predomínio de células em processo de morte que não puderam ser sensíveis ao teste de MTT. Neste teste, apenas as células em processo de morte por necrose são capazes de alterar a viabilidade celular e produzir efeitos colorimétricos detectáveis ao espectrofotômetro.

No presente estudo, foram realizadas análises de extratos purificados da semente da uva, do ácido tânico, da alga *Lithothamnium calcareum* e do hidróxido de cálcio. Almeida *et al.* (2012) revelaram que uma das principais características das algas *L. calcareum* é a alta concentração de carbonato de cálcio, CaCO_3 , em sua composição, que podem chegar a 80% (55), porém também contém níveis mensuráveis de 72 elementos acumulados da água do mar ao longo da vida dessas algas. Como exemplo de alguns desses elementos, têm-se manganês, selênio, zinco, cobre e é improvável que o extrato seja simplesmente uma mistura de cálcio com outros elementos inertes (61), mostrando-se uma das limitações desse estudo. Em um artigo recente em que monômeros e polímeros ativos de um extrato de *Pinus massoniana* foram utilizados em culturas de células da polpa, foi observada a capacidade desses agentes ativos em aumentar a expressão gênica de reguladores de mineralização e diferenciação odontogênica (65). Desta forma, a avaliação dos efeitos biológicos podem ser dificultados por não se isolar o componente ativo dos agentes crosslinkers e remineralizadores. Sugere-se que mais estudos com os componentes ativos e diferentes meios de veiculação sejam realizados a fim de estabelecer a viabilidade, o potencial biomodulador e bioestimulador para o tecido pulpar.

7. CONCLUSÕES

Comportamentos distintos foram observados para as várias concentrações dos agentes crosslinkers, porém não de forma linear. A menor concentração de extrato de uva apresentou resultados favoráveis tanto para a viabilidade celular em todos os períodos analisados, quanto para produção de ON. Os agentes remineralizantes foram capazes de aumentar a viabilidade celular após 1 hora de contato, sem gerar estresse oxidativo. O GSE e TA não expressaram a produção de proteína total e fosfatase alcalina, porém foram capazes de produzir nódulos de mineralização. Assim, os agentes crosslinkers e remineralizantes apresentam efeitos biológicos sobre as células da polpa.

REFERÊNCIAS

1. Balalaie A, Rezvani MB, Mohammadi Basir M. Dual function of proanthocyanidins as both MMP inhibitor and crosslinker in dentin biomodification: A literature review. *Dent Mater J* 2017. DOI:104012/dmj.2017-062.
2. Stape THS, Tjäderhane L, Abuna G, Sinhoreti MAC, Martins LRM, Tezvergil-Mutluay A. Optimization of the etch-and-rise technique: New perspectives to improve resin-dentin bonding and hybrid layer integrity by reducing water using dimethyl sulfoxide pretreatments. *Dent Mater* 2018. DOI:10.1016/j.dental.2018.03.010.
3. Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010;26:24-37.
4. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003;24:3795-803.
5. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *J Dent* 2010;38:635-40.
6. Carrilho MR. Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation? *J Dent Res* 2012;91:1099-102.
7. Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2004;4:301-7.
8. Corder R, Warburton RC, Khan NQ, Brown RE, Wood EG, Lees DM. The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction. *Clin Sci* 2004;107:513-7.
9. Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dent Mater J* 2004;23:67-74.
10. Alani AH, Toh CG. Detection of microleakage around dental restorations: a review. *Oper Dent* 1997;22:173-85.
11. van Dijken JW, Sunnegardh-Gronberg K, Sorensson E. Clinical bonding of a singlestep self-etching adhesive in noncarious cervical lesions. *J Adhes Dent* 2007;2(Suppl.):241-3.
12. Xu CS, Sathishkumar M, Mun SP. Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere* 2007;67(8):1618-27.
13. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine MC, Castellan CS, Phansalkar RS, *et al.* Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater* 2014;30:62-76.

14. Pashley DH, Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, *et al.* Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater* 2014;30(2):227-33.
15. Barbosa-Martins LF, de Sousa JP, Alves LA, Davies RPW, Puppim-Rontanti RM. Biomimetic mineralizing agents recover the microtensile bond strength of demineralized dentin. *Materials* 2018. DOI: 10.3390/ma11091733.
16. Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic acid-treated dentin matrix. *J Dent Res* 2009;88:807-11.
17. Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview. *Advances in Tissue Banking* World Scientific Publishing 2002;55.
18. Jastrzebska M, Zalewska-Rejda J, Wrzalik R, Kocot A, Mroz I, Barwinski B, *et al.* Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. *Wiley InterScience*. 2006. DOI: 10.1002/jbm.a.30717.
19. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* 2008;86:330-4.
20. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* 2009;91:419-24.
21. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A* 2003;65:118-24.
22. Moreira MA, Souza NO, Sousa RS, Freitas DQ, Lemos MV, De Paula DM, *et al.* Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dent Mater* 2017.
23. Han M, Li Q, Cao Y, Fang H, Xia R, Zhang Z. In vivo remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system. *Nature*. 2017. DOI: 10.1038/srep41955.
24. Melo TV, Moura A. A Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Archivos de zootecnia*. 2009;58(1):99-107.
25. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 2007;23:688-95.
26. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011;27(1):17-28.
27. Trindade TF, Barbosa AFS, Castro-Raucci LMS, Silva-Sousa YTC, Colucci V, Raucci-Neto W. Chlorhexidine and proanthocyanidin enhance the long-term bond strength of resin-based endodontic sealer. *Braz Oral Res* 2018; 32-44.

28. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, *et al.* State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;27(1):1-16.
29. Delgado CL, Scheffel DLS, Scheffel RH, Pashley D, Hebling J. Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina. *Rev Odontol UNESP* 2015;44(6):355-359.
30. Sato M, Miyazaki M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesive systems. *J Dent* 2005;33(6):475-84.
31. Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of dentin adhesives. *J Dent* 1998;26:1-20.
32. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997;25:355-72.
33. Perdigão J. Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010. DOI.10.1016/j.dental.2009.11.149.
34. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, *et al.* Resin-dentin interfacial and microtensile bond strength after five-year water storage. *Oper Dent* 2004;29:705-12.
35. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, *et al.* Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-21.
36. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-6.
37. Parise Gré C, Pedrollo Lise D, Ayres AP, De Munck J, Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, *et al.* Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness? *Dent Mater* 2018. DOI. 10.1016/j.dental.2018.08.303.
38. dos Santos AF, Pacheco JM, Silva PAO, Bedran-Russo AK, Rezende TMB, Pereira PNR, *et al.* Direct and transdental biostimulatory effects of grape seed extract rich in proanthocyanidin on pulp cells. *Int Endod J* 2018. DOI: 10.1111/iej.13019.
39. Park J, Ye Q, Topp EM, Misra A, Kieweg SL, Spencer P. Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured bisGMA/HEMA dental resin. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(4): 1245-51.
40. Kwon YS, Lim ES, Kim HM, Hwang YC, Lee KW, Min KS. Genipin, a crosslinking agent, promotes odontogenic differentiation of human dental cells. *J Endod* 2015;41:501-7.
41. Young-Sun K, Eun-Sun L, Hye-Min K, Yun-Chan H, Kwang-Won L, Kyung-San M. Genipin, a cross-linking agent, promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2015;(41):501-7.

42. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, *et al.* 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* 2016;32:732-41.
43. Macedo GV, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res* 2009;88(12):1096-100.
44. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Sachin K, Pereira PNR. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4:1343-50.
45. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol* 2002;(40):599-607.
46. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusrvich V, Walker MP. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent* 38:908-15.
47. Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF, Tay FR, King NM. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *J Dent* 2012;40(3):173-80.
48. Chowdhury P, Nagesh PKB, Hatami E, Wagh S, Dan N, Tripathi MK, *et al.* Tannic acid-inspired paclitaxel nanoparticles for enhanced anticancer effects in breast cancer cells. *J Colloid Interface Sci* 2018. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.09.072.
49. Zhou L, Fan L, Yi X, Zhou Z, Liu C, Fu R, *et al.* Soft conducting polymer hydrogels crosslinked and doped by tannic acid for spinal cord injury repair. *ACSNano* 2018. DOI: 10.1021/acsnano.8b04609.
50. Tanaka T, Matsuo Y, Saito Y. Solubility of tannins and preparation of oil-soluble derivatives. *J Oleo Sci* 2018;67(10):1179-87.
51. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, *et al.* Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* 2014;30:77-96.
52. Islam SM, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. *J Dent* 2012;40(12):1052-9.
53. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res* 2009;88(8):719-24.
54. Aslam MN, Kreider JM, Paruchuri T, Bhagavathula N, da Silva M, Zernicke RF, *et al.* A mineral-rich extract from the red marine algae *Lithothamnion calcareum* preserves bone structure and function in female mice on a western-style diet. *Calcif Tissue Int* 2010;86:313-24.

55. Almeida F, Schiavo LV, Vieira AD, Araújo GL, Queiroz-Junior CM, Teixeira MM, *et al.* Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnium calcareum* algae. *Food and Chem Toxicol* 2012;50:1399-04.
56. Lima LML, Fernandes DL, Souza MWR, Melo PC, Teodoro REF, Luz JMQ, *et al.* Doses de *Lithothamnium calcareum* sobre o desenvolvimento de plantas de pimentão. *Hortic Bras* 2002; 20(2): 347.
57. Melo PC, Furtini Neto AE. Avaliação do *Lithothamnium* como corretivo da acidez do solo e fonte de nutrientes para o feijoeiro. *Cienc Agrotec* 2003;27(3):508-19.
58. Matsui MS, Muizzuddin N, Arad S, Marenus K. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl Biochem Biotechnol* 2003;104:13-22.
59. Mota, C. Estudo químico da alga *Lithothamnium calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
60. Costa Neto JM, Teixeira RG, Sá MJC, Lima AE, Jacinto-Aragão GS, Teixeira MW, *et al.* Farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. *Rev Bras Saúde Prod An* 2010;11(1):217-30.
61. Aslam MN, Bhagavathula N, Paruchuri T, Hu X, Chakrabarty S, Varani J. Growth-inhibitory effects of a mineralized extract from the red algae, *Lithothamnium calcareum*, on Ca(2+)-sensitive and Ca(2+)-resistant human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009;283:186-192.
62. Herbst, P. Avaliação histomorfológica da efetividade do material *Lithothamnium calcareum* no processo de neoformação óssea. Trabalho de conclusão do curso. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.
63. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-38.
64. McGahon AJ, Martin SM, Bissonnette *et al.* The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Meth in Cell Biol* 1995;46:153-85.
65. Kulakowski D, Leme-Kraus AA, Nam JW, McAlpine J, Chen SN, Pauli GF, *et al.* Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response. *Acta Biomater* 2017;55:262-70.
66. Hebling J, Bianchi L, Basso FG, Scheffel DL, Soares DG, Carrilho MRO, *et al.* Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dent Mat* 2015;31:399-405.
67. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, *et al.* Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol* 202;57:1231-40.

68. Lu WC, Huang WT, Kumaran A, Ho CT, Hwang LS. Transformation of proanthocyanidin A2 to its isomers under different physiological pH conditions and common cell culture medium. *J Agric Food Chem* 2011;59:6214-20.
69. Sang S, Lee MJ, Hou Z, Ho CT, Yang CS. Stability of tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* 2005;53:9478–84.
70. Rajarshi P, Murali KM, Anjan KD, Ramesh B. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch Toxicol* 2012;86:651-61.
71. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013:1-10.
72. Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 2012; 33(21):5177-86.
73. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85(10):870-7.

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Plataforma Brasil

http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/g...

Saúde

 principal
  central de suporte
  sair

Andressa Fabro - Pesquisador | V2.21

Cadastros

Sua sessão expira em: 38min 55

Você está em: Pesquisador > Gerir Pesquisa > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

Dados do Projeto de Pesquisa

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade transdientária dos sistemas adesivos universais.
 Pesquisador: Andressa Fabro
 Área Temática:
 Versão: 1
 CAAE: 22374413.0.0000.0030
 Submetido em: 10/10/2013
 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília
 Situação: Aprovado
 Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Documentos Postados do Projeto

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Postagem
Parecer Consubstanciado do CEP	A	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_461663.pdf	20/11/2013 12:29:40
Informações Básicas do Projeto	A	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_223744.pdf	10/10/2013 16:46:11
Interface REBEC	A	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	10/10/2013 16:46:11
Outros	A	CV do CBMF.docx	10/10/2013 16:45:27
Vínculo Instituições Participantes	A	CONC_HMAB_13.docx	27/09/2013 09:05:57
Vínculo Instituição Responsável Promotora	A	CONC_UNB_13.docx	27/09/2013 09:03:48
TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	A	TCLE_1.doc	27/09/2013 09:00:30
Projeto Detalhado	A	PROJETO_CEP.docx	27/09/2013 08:59:58
Folha de Rosto	A	FOLHA_DE_ROSTO.jpg	27/09/2013 08:45:37

[Listar Todos »](#)

Tramitação:

CEP Trâmite	Situação	Data Trâmite	Parecer	Informações
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Submetido para avaliação do CEP	27/09/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Rejeição do PP	30/09/2013		Por Favor, Anexar Todos os Curriculum Lattes dos P... Ver mais>>
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Submetido para avaliação do CEP	10/10/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Aceitação do PP	16/10/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Parecer liberado	20/11/2013		

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

[Voltar](#)
[Enviar Notificação](#)

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AOS EXPERIMENTOS
REALIZADOS DURANTE O DOUTORADO

Direct and transdental biostimulatory effects of grape seed extract rich in proanthocyanidin on pulp cells

A. F. dos Santos¹, J. M. Pacheco¹, P. A. O. Silva², A. K. Bedran-Russo³,
T. M. B. Rezende² , P. N. R. Pereira⁴ & A. P. D. Ribeiro⁴ 

¹Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ³Department of Restorative Dentistry, UIC College of Dentistry, Chicago, IL, USA; and ⁴Department of Restorative Dental Sciences, College of Dentistry, University of Florida, Gainesville, FL, USA

Abstract

dos Santos AF, Pacheco JM, Silva PAO, Bedran-Russo AK, Rezende TMB, Pereira PNR, Ribeiro APD. Direct and transdental biostimulatory effects of grape seed extract rich in proanthocyanidin on pulp cells. *International Endodontic Journal*.

Aim To evaluate the potential biostimulatory effects of grape seed extract (GSE) on a primary culture of human pulp cells.

Methodology Human molars were used to obtain the primary pulp cell culture and 0.5-mm dentine discs. For GSE direct exposure, dose–response (0.0065–6.5%) and time response (1–60 min of contact) were examined. For transdental exposure, 0.65% of GSE was tested for 24 h. Cellular metabolism, nitric oxide and collagen production, and cell morphology alterations were assessed at periods of 24 and 72 h. After cell differentiation and direct exposure to GSE, the total protein production (TP), alkaline phosphatase activity (ALP) and formation of mineralization nodules (MN) were assessed. The results were analysed by parametric tests or non-parametric tests ($\alpha = 0.05$).

Results The lower concentration of GSE tested (0.0065%) was associated with an increase in cellular metabolism, a reduction in the production of nitric oxide and an increase in extracellular matrix synthesis (collagen). Distinct behaviours were observed for the different concentrations, without a reduction of cellular metabolism >10% compared with the control, either when applied directly or transdentally. SEM revealed no significant change in cell morphology, except for the positive control (H₂O₂). There was no difference in TP, ALP or MN between the control group and the group exposed to GSE.

Conclusions Treatment with grape seed extract, even at the highest concentration and longest period, caused neither direct nor transdental cytotoxic effects on human pulp cells. Grape seed extract components may play a biostimulatory role and protect dental pulp cells when in direct contact.

Keywords: crosslinking agents, cytotoxicity, dentine, grape seed extract, proanthocyanidin, pulp cells.

Received 29 January 2018; accepted 19 September 2018

Introduction

Biomimetics is a contemporary approach that seeks to imitate nature to improve the characteristics of animals, systems and devices (Niu *et al.* 2014). In dentistry, this approach aims to break the cycle of tooth loss, conserving tooth structure through minimally invasive procedures and biomaterials. Although Restorative Dentistry with resin

Correspondence: Ana Paula Dias Ribeiro, Restorative Dental Sciences, College of Dentistry, University of Florida, 1395 Center Dr., Gainesville, FL 32606, USA (Tel.: +1-(352)-294-8285; e-mail: aribeiro@dental.ufl.edu).

composites and adhesive systems has evolved, adhesive stability to dentine is challenging, as it fails to provide longevity for both restorative materials and maintenance of pulp health (Perdigão *et al.* 2013, Sabatini & Pashley 2014).

The characteristics of dentine, such as the gradient of moisture and tubular structure (Perdigão 2010), polymer components and leaching of monomers (Hashimoto *et al.* 2003), hydrolytic and enzymatic degradation (Toledano *et al.* 2010, Carrilho 2012) and other factors in cascade can compromise the stability of the hybrid layer, resulting in staining at restoration margins (Corder *et al.* 2004, Gunjima *et al.* 2004, Kojima *et al.* 2004) and irreversible pulpal damage (Alani & Toh 1997, van Dijken *et al.* 2007) in the long term.

Moreover, the manipulation of the dentine–pulp complex and the incorporation of materials that interfere with various cellular functions, production of cytokines, mineralization processes, cell differentiation and oxidative stress (Schweikl *et al.* 2007), may be harmful to the regeneration and maintenance of pulpal health.

The use of crosslinking agents to provide a greater number of additional crosslinks to dentine collagen has been shown to be effective in increasing the longevity of resin–tooth bonding (Bedran-Russo *et al.* 2007, Aguiar *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014). Various agents have been proposed, such as glutaraldehyde, formaldehyde, epoxide compounds and carbodiimide (Bedran-Russo *et al.* 2008, Al-Ammar *et al.* 2009). However, the above-mentioned agents have disadvantages such as toxicity, difficulty in controlling the rate and speed of crosslinking and instability (Han *et al.* 2003). Thus, more biocompatible compounds would bring benefits to both the dental and tissue engineering fields.

Proanthocyanidins (PACs) have been investigated in the areas of medical and nutritional health for various biological effects, such as antioxidant capacity (Houde *et al.* 2006, Katsuda *et al.* 2015), apoptotic effects in tumour cells (Aghbali *et al.* 2013, Yen *et al.* 2015) and effects on bone metabolism (Ishikawa *et al.* 2005, Yahara *et al.* 2005). In dentistry, the antibacterial capacity of PACs has been assessed in endodontics (Ghonmode *et al.* 2013) and periodontics (Houde *et al.* 2006, Mageshwaran *et al.* 2012) and more recently as a crosslinker (Bedran-Russo *et al.* 2009, 2010) in Restorative Dentistry. Grape seed extract has been preferred as a source of PACs, because it allows a concentration of up to 95% of PACs.

Thus, in addition to its potential to stabilize the hybrid layer as a crosslinker agent, PACs may play a biostimulatory role and protect dental pulp cells. The present study aimed to evaluate biostimulatory effect of various concentrations of proanthocyanidin from a rich grape seed extract (GSE) on pulp cell culture. The null hypothesis tested was that GSE does not alter cellular metabolism, cellular morphology, nitric oxide production, collagen production, alkaline phosphatase activity and mineralized nodule formation when compared to negative and positive control groups. All these biological end-points are used to investigate the dentinogenic and protective effects of biomaterials when in contact with pulp cells.

Material and methods

Culture of human pulp cells

This project was submitted to and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences – UnB, CAE no. 43353515.0.0000.0030. Forty third molars were used to obtain the dentine discs and pulp tissue. Dental pulp was obtained from third molars extracted intact from adult patients between 18 and 25 years. The pulp tissue was removed with clinical tweezers and sterile endodontic files and immersed in a solution containing DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and the enzymes collagenase type 1 (3 mg mL^{-1}) and dispase (4 mg mL^{-1}) for 1 h at 37°C , as described previously (Wang *et al.* 2007). Then, the solution was centrifuged, the supernatant discarded and the cell pellet cultured in 75 cm^2 plastic flasks (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) in DMEM culture medium containing 10% foetal bovine serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 IU mL^{-1} and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, of penicillin and streptomycin, and 2 mmol L^{-1} glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA), in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at a temperature of 37°C . These cells were subcultured every 3 days, until the number of cells was sufficient for the completion of the experiment.

Crosslinking agent preparation

The GSE was diluted in several solvents, such as DMEM, PBS and HEPES. After 24-h sedimentation tests, the best solvent capable of producing a homogeneous solution without decanting of extract particles during the time of

the experiment was the HEPES buffer. The GSE containing 95% proanthocyanidins (*Vitis vinifera*, Mega-Natural® grape seed extract, Batch 13682503-01, Polyphenolics, Madera, CA, USA) along with its active fractions was diluted in HEPES buffer solution (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) in a proportion of 0.0047 g for each 10 mL of Milli-Q® sterilized water. The solutions were prepared and filtered prior to each experiment. The assays used in the present study are displayed in Figure 1.

Direct contact test

For the direct test, the GSE was diluted in HEPES buffer, and the pH of the solution was adjusted to 7.2 prior to the experiment by adding NaOH to raise the pH or HCL to lower the pH. Ten thousand cells per well in 96-well plates were plated 24 h before the experiment.

Two analysis phases were followed for a screening of the optimum concentration and time of direct contact of the extract with the cells. In the first phase, concentrations of 6.5%, 0.65%, 0.065% and 0.0065% were evaluated with an exposure time of 1 h. In the second phase, to evaluate the time of exposure, a concentration of 0.0065% was evaluated for 1, 10, 30 and 60 min. For both phases, after the exposure time, the solution containing the agent was replaced by complete culture medium, and cells were

kept in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at a temperature of 37 °C for 24 and 72 h. Each experiment was performed in triplicate, at different times, with $n = 9$. Means and standard deviations were used to represent the assay results.

Indirect contact test

The crowns of the same third molars used for pulp collection were stored in distilled water with thymol 0.9% at 4 °C. The crowns were cut using a diamond disc cutting machine to provide 0.5-mm-thick slices in the transverse direction of the crown in the region above the pulp horns and short of the dentine-occlusal enamel junction. A disc of each tooth was obtained, and those with the presence of enamel or pulp horns were discarded. The discs were treated with 0.5 mol L⁻¹ EDTA for 60 s for both sides and then washed abundantly with distilled water, in order to remove the smear layer formed in the cutting process and allow the randomization of the discs and their distribution within the experimental groups according to their permeability.

Dentine permeability was measured three times using a machine to determine the hydraulic conductance, and measurements were made according to the instrument manufacturer's manual (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Luzerna, SC, Brazil). From these data, the discs were randomized in

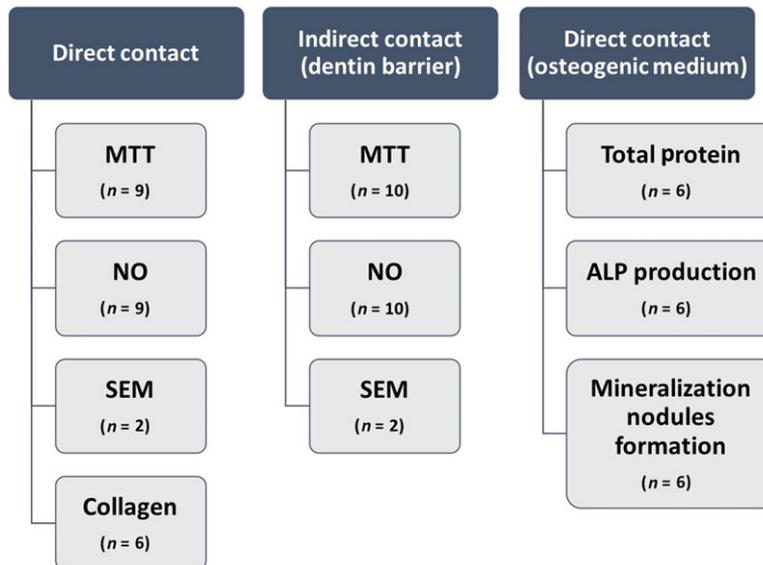


Figure 1 Flow chart of the assays used in the direct and transdental methodologies. ALP, alkaline phosphatase assay; MTT, methyl tetrazolium assay; n, final number of data points; NO, nitrous oxide assay; SEM, scanning electronic microscopy assay.

order to generate similar groups, which was verified by Kruskal–Wallis test ($P > 0.05$). Discs with outliers for permeability values were discarded. Dentine discs were individually placed in artificial pulp chambers. The assembled devices were sent for sterilization with ethylene oxide gas (Acecil Central de Esterilização Comercial Ltda, Campinas, SP, Brazil).

The chambers were placed in an inverted position in the wells of the plate. Then, 2 mL complete medium was added to each well, and 50 000 cells were seeded per disc. The plate was maintained for 24 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. After this period, the chambers were inverted with the help of tweezers and clinical probe, simulating the internal area where the cells adhered to the pulp, and the top side of the disc, simulating the floor of the cavity.

The discs were conditioned with 37% phosphoric acid (Condac, FGM) for 15 s and washed abundantly with 1 mL of distilled water with the aid of pipettes. After the conditioning of all samples, the following groups remained for 24 h in contact with the GSE: G1: negative cell control (DMEM); G2: a negative treatment control (HEPES); G3: 0.65% of GSE; G4: hydrogen peroxide control (H₂O₂ at 20%). Each experiment was performed in duplicate, at different times, with $n = 10$. Means and standard deviations were used to represent the assay results.

Analysis of cellular metabolism

Assessment of cellular metabolism was performed based on the colorimetric assessment of the mitochondrial reaction of cells exposed to the salt of *methyl [3-(4,5-dimethylthiazol-2WT)-2,5-diphenyl tetrazolium* (MTT). For the direct test, after various periods of exposure to GSE, the culture medium was removed and placed with 90 µL of DMEM, to which 10 µL of MTT solution was added (Sigma Chemical Co.), at a concentration of 5 mg mL⁻¹, to identify the viable cells by enzymatic cleavage of the tetrazolium rings. The cells in contact with the MTT solution were incubated in a humidified incubator at a temperature of 37 °C for 4 h. After this period, the MTT solution was removed and replaced with 60 µL of DMSO (Sigma Chemical Co.) to dissolve the violet crystals resulting from the enzymatic cleavage of the methyl tetrazolium salt by the mitochondrial enzyme succinic dehydrogenase of viable cells. For the indirect test, after the experimental exposure, the medium was completely removed, and discs were removed from the APCs with the aid of sterile tweezers and

transferred to a new 24-well plate. A disc was placed in each well, and 450 µL of DMEM and 50 µL of MTT solution (Sigma Chemical Co.), at a concentration of 5 mg mL⁻¹, were added. After 4-h incubation in a chamber, the MTT solution was removed and replaced with 300 µL of DMSO. The solution was resuspended on the disc and 100 µL passed to three wells of a 96-well plate.

Cell viability was assessed according to the absorbance determined at 595 nm in an ELISA reader (EON; Thermoplate, Shenzhen, China). The results were calculated using the mean absorbance of each well. The final values obtained for each experimental group and control were submitted to statistical analysis.

Analysis of the nitric oxide production

Oxidative stress was analysed by measuring the rate of nitric oxide production according to the Griess reaction (Green *et al.* 1982). Using the centrifuged medium removed from the plates from the previous cell viability assay, 100 µL of the supernatant from each sample was passed to another 96-well plate. To each well, 100 µL of a solution of sulphanilamide 1% in phosphoric acid 2.5% and N-(1-naphthyl)ethylenediamine 1% in phosphoric acid 2.5% (1 : 1, v : v) was added. The NO production was determined by comparing with a standard curve of sodium nitrite (1.5625–200 µmol L⁻¹) with cell culture medium. The reading was determined by an ELISA absorbance reader at 490 nm (EON; Thermoplate).

Analysis of cell morphology by scanning electron microscopy (SEM)

Two specimens from each group were assigned for the evaluation of cell morphology under scanning electron microscopy (JSM-7001F Field Scanning Electron Microscope, JEOL, Peabody, MA, USA). For this purpose, 12-mm-diameter glass coverslips (Fisher Scientific, Suwanee, GA, USA) were placed in the bottom of 24-well plate compartments prior to culturing the cells in the direct test. After the coverslips were placed, the well was filled with 1 mL of DMEM culture medium supplemented with 10% FBS, allowing the planting of the cells as at the beginning of the experiment. The culture medium was replaced by the extracts obtained as described above, held in contact with the cells at the times determined by the groups. After this period, the extracts were removed, and the cells adhered to the glass coverslips. In the indirect

contact test, the dentine disc itself was used as the adherent substrate of the cells.

Both the glass coverslips and dentine discs were fixed for 24 h in glutaraldehyde 2.5% with pH adjusted to 7.2 (adding NaOH to raise the pH or HCL to lower the pH). After the initial fixation of the cells, they were washed three times with 1 mL of PBS (5 min every wash), followed by two times in 1 mL of distilled water (15 min each wash), and dehydration in 1 mL of ethanol 30%, 50% and 70%, 2 × 95% and 2 × 100% (30 min in each solution). Finally, the last solution was discarded, and the samples containing cells were removed from the bottom of the wells and by means of a surgical clamp and probe, fixed in the stubs. These were kept for 48 h in the desiccator and, after this, were metallized and analysed in a scanning electronic microscope (JEOL JSM-7001F; Field Emission Scanning Electron Microscope).

Analysis of collagen production

Picrosirius staining is used in histology as specific for collagen, increasing the birefringence of this material (Montes & Junqueira 1982). To perform the staining of the collagen produced by the cells after contact with the GSE, 500 µL of the supernatant from the cells was mixed with the same volume of Sirius Red (Direct Red 80, Sigma Chemical Co.). After 1-h incubation at 25 °C with stirring at 18 g-force, the samples were centrifuged at 16 128 g-force to separate the supernatant. 750 µL of 0.1 mol L⁻¹ HCl and 250 µL of 0.5 mol L⁻¹ NaOH were added, repeating the centrifugation between each solution. The remaining mixture was flipped and transferred to 96-well plate for absorbance reading at 555 nm in ELISA reader (EON; Thermoplate).

Quantification of total protein and alkaline phosphatase production and formation of mineralization nodules

In order to quantify total protein and alkaline phosphatase activity, as well as formation of mineralization nodules, cellular differentiation was induced according to the protocol described below using an osteogenic medium. Fifty thousand cells in complete DMEM culture medium were seeded in 24-well plates, at a cell density of approximately 26 000 cells cm⁻². The induction of differentiation was performed through induction medium composed of DMEM, low glucose (Gibco,

Carlsbad, CA, USA), culture medium supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco), 100 µg mL⁻¹ penicillin (Gibco), 100 µg mL⁻¹ streptomycin (Gibco), 50 g mL⁻¹ of ascorbic acid (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), 10 mmol L⁻¹ of β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich Corp) and 10 nmol L⁻¹ of dexamethasone (Sigma-Aldrich Corp).

The differentiation protocol lasted for 21 days with change of the differentiation medium every 2 days for the experimental groups. For the control group, the conventional medium was also changed every 2 days. Cells between the passages 3 and 4 were used, and the experiment was performed in triplicate in two different moments (*n* = 6).

The analysis of the alkaline phosphatase activity was performed according to the protocol of the alkaline phosphatase test kit (End Point, Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). The cells were lysed with 1.050 mL of sodium lauryl sulphate 0.1% (Sigma-Aldrich Corp) for 40 min at room temperature. Then, 50 µL of each well was transferred to test tubes containing 50 µL of substrate (thymolphthalein monophosphate 22 mmol L⁻¹ – reagent no. 1 of the test kit) and 500 µL of buffer (300 mmol L⁻¹, pH 10.1 – reagent no. 2 of the test kit), held previously in a water bath at 37 °C. After 10-min incubation, 2 mL of Color Reagent was added (sodium carbonate 94 mmol L⁻¹ and sodium hydroxide 250 mmol L⁻¹ – reagent no. 3 of the test kit) in each tube. The absorbance of the test tubes and control was determined in an ELISA reader, at a wavelength of 590 nm. Normalization of alkaline phosphatase activity was held with total protein. 1 mL of Lowry reagent solution (Sigma-Aldrich Corp) was added to the rest of the sample in each compartment and incubated for 20 min at room temperature. After this period, 500 µL of Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Corp) was added. Thirty minutes later, three aliquots of 100 µL of each tube were transferred to a 96-well plate, and the absorbance of the solutions was measured at a wavelength of 655 nm in an ELISA reader. The activity of alkaline phosphatase and amount of total protein were calculated from a standard curve.

For the testing of formation of mineralization nodules, after the 21-day period, the extracts were removed and the cells were washed two times with 0.5 mL of phosphate buffer solution (PBS). The adhered cells were fixed with paraformaldehyde 4% for 15 min. Then, the samples were washed in PBS three times, stained with alizarin red 40 mmol L⁻¹ (1 g in

5 mL of distilled water) at pH 4.2 (Sigma-Aldrich Corp), or 20 min and washed thoroughly with distilled water three times. After the removal of the distilled water, 0.5 mL of PBS was added. The calcium precipitate present was stained in red, revealing the presence of mineralization nodules, which were examined under an inverted phase microscope (qualitative analysis) and counted (quantitative analysis).

In the qualitative analysis, screenshots of images were taken using a digital camera for an inverted phase microscope (Axiovert 100, Zeiss, Göttingen, Germany), to identify mineralization nodules. For quantitative analysis, 100 μL of cetylpyridinium chloride 10% (Sigma-Aldrich Corp) in sodium phosphate 10 nmol L^{-1} pH 7 was placed in each well and transferred to a 96-well plate. The absorbance was measured in a spectrophotometer (Tp Reader; Thermoplate), using a wavelength of 570 nm.

Statistical analysis

Data obtained were assessed for normality and homogeneity using Shapiro–Wilk and Levene's tests. As the data presented a non-normal distribution, non-parametric tests, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used to perform the statistical analysis. The level of significance was 0.05, and the statistical analysis was performed using Stata version 13.0 (StataCorp LLC., College Station, TX, USA).

Results

Cell metabolism for direct contact test

Figure 2a presents the median and interquartile distance absorbance obtained in the MTT test in percentage for the different groups, for 24 and 72 h with the concentration response experiments. Most of the concentrations used did not reduce cell viability significantly, except the 0.065% concentration of GSE which had the lowest values when compared to the other concentrations ($P < 0.05$). There was a concentration-dependent response, but not in a linear manner, that is directly proportional. Both the highest concentration and the lowest concentration used displayed the greatest cell viability, indicating the potential of the grape extract to increase cell metabolism at the lower concentration (0.0065%). The positive control had the lowest values of MTT, being significantly different from the other groups ($P < 0.05$). As observed during the

24-h period, the concentrations of GSE at 6.5% displayed the highest values of MTT. In contrast, two concentrations of GSE (0.65% and 0.065%) reduced cell metabolism significantly when compared to the control group.

Figure 2b shows the median and interquartile distance values of absorbance obtained in the MTT assay for the groups at 24 and 72 h for the time-dependent response. In accordance with the Kruskal–Wallis test, the groups were significantly different ($P < 0.0005$). The Mann–Whitney test indicated that all groups containing the grape extract were not different from the negative control ($P > 0.05$), but were different from the positive control (hydrogen peroxide; $P < 0.05$). There was no difference between the times tested, indicating that there is no time-dependent relationship for cell metabolism at 24 and 72 h.

Cell metabolism test with dentine barrier

For the experiments with a dentine barrier, since the lowest concentration tested of the grape extract displayed a favourable behaviour (0.0065%), a concentration of 0.65% of the concentration response was chosen because the dentine barrier prevents the complete diffusion of products applied on its surface.

Table 1 presents the mean and standard deviations of the values in percentage of MTT test performed after 24 h. The mean negative control group HEPES was considered as 100% of cellular metabolism, and the other values were obtained in percentage after normalizing to this reference. According to the Kruskal–Wallis test, the groups were significantly different ($P = 0.001$). The Mann–Whitney test revealed that there was no difference between the control groups (medium and HEPES) ($P = 0.9$). The experimental group (GSE 0.65%) was associated with a significant increase in cell metabolism when compared to both controls ($P < 0.05$). Also, the positive control group (hydrogen peroxide) was significantly inferior when compared to the other groups ($P < 0.05$).

Production of nitric oxide

With the help of the standard curve, a linear function was obtained in order to quantify the NO produced. The levels produced were low, leading to negative values due to limitation of the ELISA reader in quantifying minimum levels of NO. Figure 3a shows the median and interquartile range of the absorbance values after 24 and 72 h for the concentration response

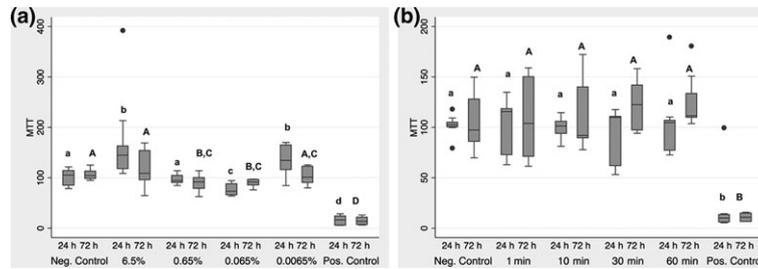


Figure 2 (a) Box-plot graphic representation of MTT data obtained from the concentration response experiments; (b) Box-plot graphic representation of MTT data obtained from the time response experiments. $n = 9$. Blue circles represent outliers values, which were not considered in the statistical analysis. Groups were compared in the same period (lower case for 24 h and upper case for 72 h). Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 1 Mean values and standard deviations of the MTT test with dentine barrier

Group	Mean	SD
1-Negative control (medium)	91.91 ^a	35.17
2-Negative control (HEPES)	100.92 ^a	25.04
3-GSE 0.65%	123.53 ^b	37.72
6-Positive control (hydrogen peroxide)	0.98 ^c	1.64

Groups identified with the same letters do not differ significantly (Mann–Whitney, $P > 0.05$). $n = 10$.

experiments. At 24 h, the GSE 6.5% and the positive control (hydrogen peroxide) groups produced significantly higher concentrations of NO than the negative control, whilst the GSE 6.5% group was not significantly different from the positive control ($P > 0.05$). At 72 h, the groups that produced significantly higher concentrations of NO than the negative control were GSE 6.5% and the positive control (hydrogen peroxide), whilst GSE 6.5% was not significantly different from the positive control ($P > 0.05$), as observed at 24 h. The concentrations of 0.065 and

0.0065% GSE displayed the lowest NO values ($P < 0.05$), indicating a protective and antioxidant effect of the extract.

Figure 3b shows the medians and interquartile ranges of the absorbance measured after 24 and 72 h for the time response experiments. After 24-h contact with the extract, the groups containing the GSE were not significantly different from the negative control (Mann–Whitney test; $P > 0.05$), except for 60 min which had lower values than the control group (Mann–Whitney test; $P < 0.05$). After 72-h contact with GSE, the Mann–Whitney test indicated that the groups containing the extract were significantly different from the negative control ($P < 0.05$), except at 30 min. All groups produced less NO than the positive control group (hydrogen peroxide; $P < 0.05$).

For the test in the presence of a dentine barrier, the Mann–Whitney test indicated that there was a significant difference between the positive control and the other negative and experimental control groups ($P < 0.05$). No significant differences were observed

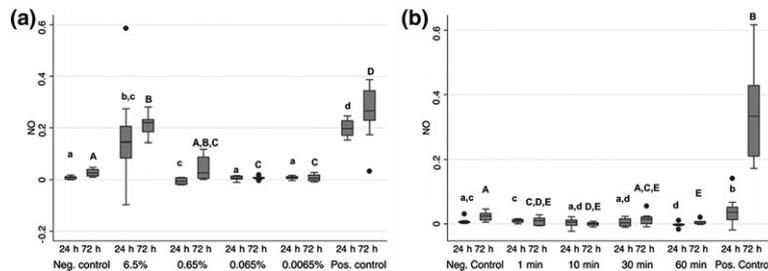


Figure 3 (a) Box-plot graphic representation of NO data obtained from the concentration response experiments; (b) Box-plot graphic representation of NO data obtained from the time response experiments. $n = 9$. Blue circles represent outliers values, which were not considered in the statistical analysis. Groups were compared in the same period (lower case for 24 h and upper case for 72 h). Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 2 Values of means and standard deviations of the NO test with dentine barrier

Group	Mean	SD
1-Negative control (medium)	0.22 ^a	0.023
2-Negative control (HEPES)	0.23 ^a	0.024
3-GSE 0.65%	0.24 ^a	0.023
6-Positive control (hydrogen peroxide)	0.35 ^b	0.14

Groups identified with the same letters do not differ significantly (Mann–Whitney, $P > 0.05$). $n = 10$.

between the negative control groups (medium and HEPES) and the group with grape extract ($P > 0.05$) as observed in Table 2, which displays the means and standard deviations of the absolute values of NO produced after 72 h.

Cell morphology by scanning electron microscopy

From SEM images obtained for the direct contact assay, there were a large number of pulp cells adhered to coverslips at the lowest amplification for the control group in contact with the culture medium. At the highest amplification, a cellular morphology characteristic of a primary pulp culture with elongated shape and slender cytoplasmic filaments covering the glass substrate was observed. For the control group exposed to the HEPES buffer solution, the dilution medium was able to change the cell morphology, leading to a reduction in the number of cytoplasmic extensions responsible for the adherence to the coverslips. For the positive control group, there is an absence of adhered cells, indicating that the reduction of cellular metabolism occurred due to cell death. The glass coverslip displayed remains of cytoplasmic membrane. Some changes in cell morphology, such as reduction in intracytoplasmic volume and reduction in the number of cytoplasmic extensions responsible for adherence to the coverslip, were observed for the group exposed to 0.0065% of the GSE for 1 h, but the characteristic elongated shape of pulp cells was maintained.

Figure 4 shows a panel with images representing the experimental groups with the presence of the dentine barrier: (i) negative control exposed to DMEM culture medium; (ii) negative control exposed to HEPES dilution solution; (iii) GSE at 0.65% and (iv) positive control (hydrogen peroxide). For both the negative controls, one can observe at the bottom of the image the dentine substrate with the presence of open dentinal tubules, due to treatment with phosphoric acid for 15 s. It is possible to observe the

presence of cells with elongated shape, covering the major part of the dentine substrate. For the group exposed to grape extracts at the concentration 0.65%, the cellular morphology was maintained similar to the negative control group. As for the positive control group (hydrogen peroxide), the dentine substrate is not covered by pulp cells, only the presence of some cellular remains is observed, indicating cell detachment and consequent cell death.

Collagen production

Figure 5 presents the medians and interquartile ranges of the collagen production in all control and experimental groups. The statistical analysis revealed that the 6.5% GSE group produced the greatest amount of collagen, and this group was significantly different from the others (Mann–Whitney, $P < 0.05$). Whilst the 0.0065% was significantly different from the positive control group ($P < 0.05$), no difference was observed amongst the negative control group and other GSE concentrations ($P > 0.05$).

Total protein production

The means, medians and interquartile ranges of the total protein production in all experimental groups can be seen in Fig. 6. The production of total protein was similar for all experimental groups ($P > 0.05$, Kruskal–Wallis test).

Alkaline phosphatase activity

The alkaline phosphatase activity *t* 21 days in all experimental groups can be observed in Fig. 7. No differences were observed between the experimental groups ($P > 0.05$).

Formation of mineralization nodules

Figure 8 displays the formation of mineralization nodules showing the mean absorbance of experimental groups at 21 days. No differences were observed between the experimental groups ($P > 0.05$), and only the group of cells not exposed to the cell differentiation medium (DMEM group) did not produce mineralization nodules compared to the other groups ($P < 0.05$).

Figure 9 displays a panel with the images obtained by alizarin red of all experimental groups *t* 21 days.

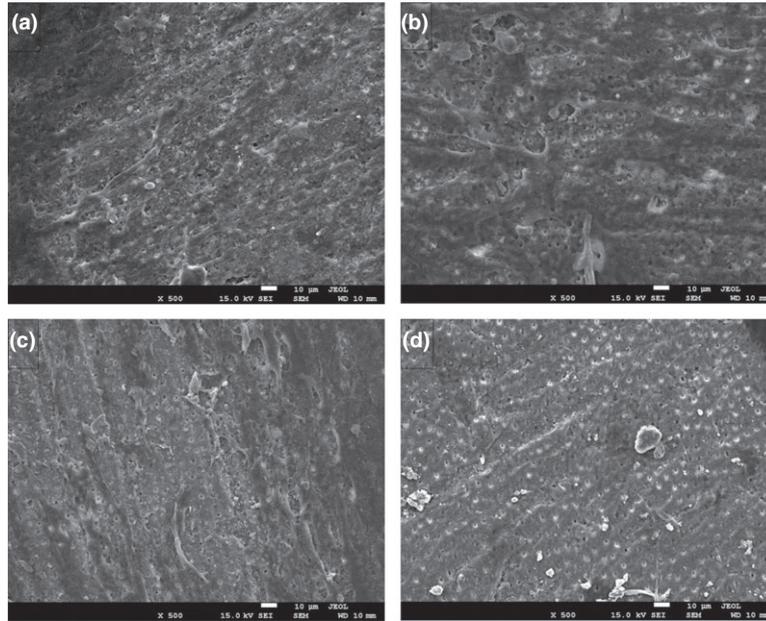


Figure 4 SEM micrographs obtained from transderinary contact experiments. Representative images of the groups: (a) DMEM negative control – 500× amplification; (b) HEPES negative control – 500× amplification; (c) 0.65% GSE experimental group – 500× amplification; (d) hydrogen peroxide positive control group – 500× magnification.

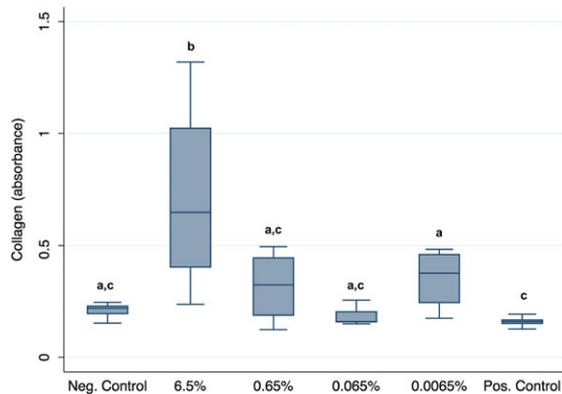


Figure 5 Medians and interquartile ranges of the collagen production in all control and experimental groups of collagen production. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Reddish mineralization nodules are observed in with different densities in the experimental groups.

Discussion

The present study aimed to evaluate the cytotoxicity of several concentrations and contact times with an extract of grape seed (GSE) rich in proanthocyanidins in pulp cells by means of direct contact tests and in

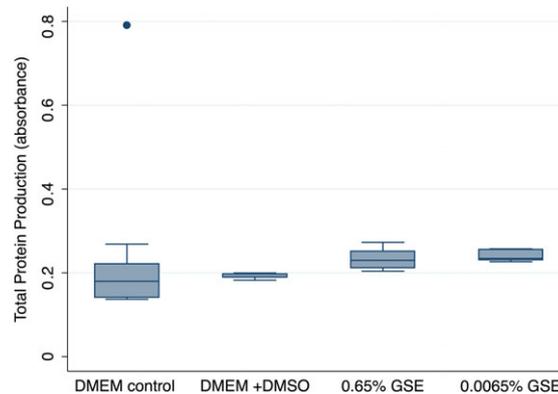


Figure 6 Box-plot graphic representation of the expression of total protein by pulp cells after 24 h in contact with the extract containing crosslinking agents. No differences were observed between the experimental groups ($P > 0.05$).

the presence of a dentine barrier. The biological evaluation of new dental material usually pass through stages ranging from initial laboratory studies, followed by *in vivo* studies in animals, and finally, clinical studies. *In vitro* studies using cells in culture enable the control of most of the variables allowing for an initial analysis of the potential cytotoxic reactions of new

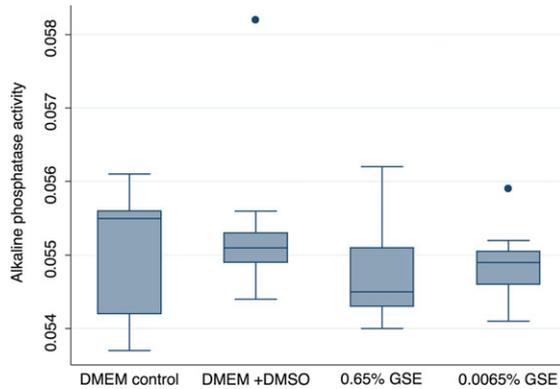


Figure 7 Box-plot graph graphic representation of the alkaline phosphatase activity of pulp cells after 24 h in contact with the extract containing the crosslinking agent. No differences were observed between the experimental groups ($P > 0.05$).

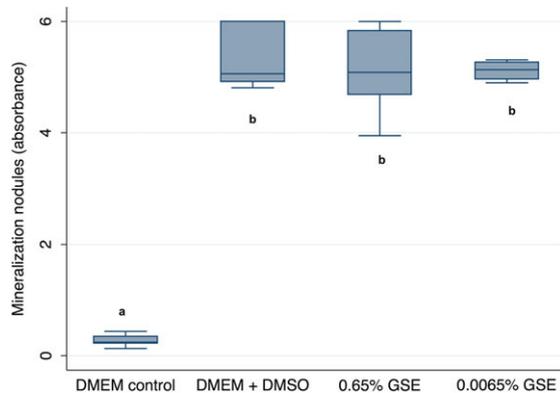


Figure 8 Box-plot graph graphic representation of the quantitative assay to determine the formation of mineralization nodules by PULP cells after 24 h in contact with the extract containing the crosslinking agent. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

material or even a new application. The tests with the dentine barrier, furthermore, allow an approximation of the clinically encountered situation, because the pulp cells are in direct contact with the dentine, approaching the new material only through diffusion. In the present study, a 0.5-mm dentine barrier was used, which is biologically capable of protecting the dental pulp from the toxicity of dental materials (Hanks *et al.* 1988) simulating situations of deep cavities. Primary pulp cells were used because they represent the tissue with which the grape extract rich in proanthocyanidins will first come into contact when used for the purposes of adhesive dentistry. In addition, primary pulp cultures contain a large number of

undifferentiated mesenchymal cells (Wang *et al.* 2007) which permits the assessment of the anti-inflammatory, antioxidant and biocompatible potential of this extract and its performance in pulp repair and production of mineralized matrix to be inferred.

The cytotoxicity of crosslinking agents has been the target of recent studies due to the greater number of crosslinks in addition to dentine collagen created by these agents and its effectiveness in increasing the longevity of the resin-tooth bond (Han *et al.* 2003, Bedran-Russo *et al.* 2007, 2008). These agents can be harmful to the regeneration and maintenance of pulp vitality, if their toxicity is confirmed. The literature has reported controversial studies on the toxicity of glutaraldehyde and DMSO (Adler *et al.* 2006, Pal *et al.* 2012, Scheffel *et al.* 2014, 2015, Hebling *et al.* 2015, Hass *et al.* 2016). Whilst other studies found that glutaraldehyde was not associated with transdental damage (Scheffel *et al.* 2015), a more recent study found that this same agent at a concentration of 5% reduced the cell viability of fibroblasts (Hass *et al.* 2016). Regarding DMSO, a significant reduction in cellular metabolism of stem cells was found (Pal *et al.* 2012), whilst another study found no cytotoxic effects of this agent on odontoblast cells (Hebling *et al.* 2015). It is well known that the response to materials is cell-dependent (Adler *et al.* 2006, Hebling *et al.* 2015), which highlights the importance of choosing the most adequate cell type to evaluate the cytotoxicity of new materials in accordance with the role that it will play.

Given the toxicity of synthetic crosslinking agents, the proanthocyanidin group has been the subject of investigations for use in adhesive dentistry due to its potential stabilization of the hybrid layer and also its biocompatibility with the dentine–pulp complex. In the present study, different concentrations of grape extract (0.0065–6.5%) resulted in different behaviours regarding the metabolism of pulp cells 24 or 72 h after a 1-h contact with the extract, which rejects the null hypothesis presented. Whilst the concentrations of 6.5% and 0.0065% significantly increased cellular metabolism after 24 h, this increase was not maintained over 72 h, when there was no difference between these groups and the negative control. On the other hand, concentrations of 0.65% and 0.065% led to a reduction in metabolism after 72 h of contact, $<10\%$, which is not considered serious. The increase observed for the 6.5% concentration is possibly due to the ability of the extract to pigment, since the colour of the GSE is reddish brown, and even after the washes resulting from the experimental process, it

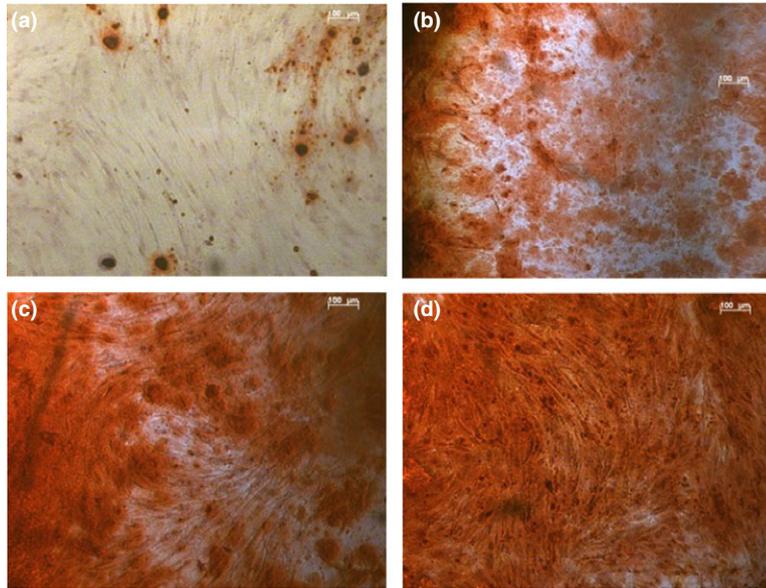


Figure 9 Images of cell cultures treated by alizarin red at 21 days of the experiment. The calcium nodules are marked in red. (a) DMEM negative control; (b) DMEM + DMSO positive control; (c) 0.0065% GSE experimental group; (d) 0.65% GSE experimental group.

interfered with the absorbance values, although a cell-free control was used to subtract this interference. For the time response results, differences between the different times (1, 10, 30 and 60 min) were also not observed using a concentration of 0.0065%, indicating that there was no directly proportional relationship between time and cell metabolism.

When in the presence of a dentine barrier, a significant increase was observed in the MTT data between both control groups and the group treated with GSE at 0.65%, confirming the direct assay data. Moreover, no changes in cell morphology were observed as confirmed by SEM images in the presence of a dentine barrier. A recent study (Kulakowski *et al.* 2017) found that the natural bark extract of *Pinus massoniana* rich in proanthocyanidins increased cell proliferation, measured using a method similar to MTT. The co-culture (dentine/cell) model proposed with the presence of dentine was different from that used in the present study. A dentine beam was treated with the extract after acid conditioning for 1 min. Thereafter, it was washed with distilled water and placed on a polycarbonate membrane above the pulp cell culture (Kulakowski *et al.* 2017). Thus, the cell contact was not direct with the treated dentine and did not allow only the extract to diffuse through the dentine tubules to come into contact with the cell culture

(Asgary *et al.* 2014). In another study (Hass *et al.* 2016), in which a primer with 6.5% of proanthocyanidin obtained from grape extract was applied on a 0.6-mm dentine disc previously conditioned with phosphoric acid, no changes in the cellular metabolism of fibroblasts were observed. The authors believed that the high affinity of proanthocyanidin to the organic matrix of collagen may have been important in the crosslinking by reducing the quantity of agent that would contact the cells and promote any damage or stimulation (Hass *et al.* 2016). In the present study, the 0.65% GSE solution allowed the GSE to diffuse through the dentine despite its interaction with the organic matrix of dentine collagen, which resulted in a cell stimulus with an increase in cell metabolism.

Another methodological factor of great importance is the dilution medium of the extracts and crosslinking agents. The option of diluting the extract in HEPES was preferred to the dilution in DMEM culture medium due to the evidence that the proanthocyanidins form an epimer molecular structure which plays a known antioxidant function, unstable in the Eagle medium (alpha-MEM), accelerating its epimerization, changing to a non-active molecular form, with a half-life of less than 15 min (Lu *et al.* 2011). Moreover, the HEPES buffer solution was able to dissolve the extract in full, at the concentrations used, without the presence of

sediments after dilution and has been widely used for dilution of the extracts for both mechanical tests (Bedran-Russo *et al.* 2011) and cell culture tests (Kulakowski *et al.* 2017). Another vehicle used may be an adhesive primer, as in the study by Hass *et al.* (2016), which does not necessarily allow pure contact of proanthocyanidins with cells, since part of the content of the extract can get stuck in a polymeric network (Hass *et al.* 2016). In the study of Kurachi *et al.* (2014), human fibroblasts were exposed to harsh environmental conditions, which included contact with pure water up to 16 min, contact with saline solution for 1–3 h and contact with culture medium without supplementation with foetal bovine serum up to 72 h in the presence and absence of proanthocyanidins (Kurachi *et al.* 2014). The results revealed that pre-treatment with GSE at a concentration of 1 mg mL^{-1} was able to increase cellular viability when compared with the untreated group in all harsh situations. Furthermore, the 1-h contact with the saline solution was enough to reduce the cellular viability significantly, which indicates how much the cell culture is challenged in the absence of complete culture medium (Kurachi *et al.* 2014). The microscopy images of the direct test corroborate these findings, in which cells exposed only to the HEPES solution for 1 h reduced intracytoplasmic volume and the number of cytoplasmic extensions responsible for adhesion to the coverslip glass, when compared to the group treated with culture medium, even though the elongated shape characteristic of pulp culture was maintained. For the group treated with grape extract, no differences were observed in comparison with the control group treated with HEPES.

With respect to the data obtained by the analysis of the production of nitric oxide (NO), it was observed that the different concentrations evaluated had a distinct behaviour, confirming the rejection of the null hypothesis. The greatest concentration assessed (6.5%) increased the values of NO both after 24 and 72 h. As with the MTT test, the analysis of NO production was performed by a colorimetric test, which may have been influenced by the ability of pigmentation of the extract, even with the subtraction of the control. On the other hand, concentrations of 0.065% and 0.0065% were able to reduce the production of NO when compared to the HEPES negative control, indicating a possible antioxidant action of the extract. This action was also confirmed by the time response assessment; at 72 h, the pre-treatment with the grape extract led to an antioxidant action from 1 min of contact, even though

in a small scale when compared to the negative control group. Previous studies have demonstrated the antioxidant potential of a grape extract rich in PACs (Ku *et al.* 2007, Ignea *et al.* 2013). Ignea *et al.* (2013) observed an antioxidant effect of different concentrations ($5\text{--}50 \mu\text{mol L}^{-1}$) of grape extract in fungal cells deficient in oxidative stress protection. In the evaluation of NO for the test with the presence of dentine barrier, no differences were observed between the negative control groups in the production of NO. Only the group undergoing treatment with hydrogen peroxide showed a greater production of NO, indicating the presence of oxidative stress. These data were confirmed both by the MTT data, in which a significant reduction in cellular metabolism was always observed, and the SEM micrographs, in which the presence of cell debris and complete rupture of the cytoplasmic membrane was observed, both in direct contact with the peroxide and in the presence of a dentine barrier.

From the collagen production data, the GSE 6.5% group, was associated with a greater production of this protein when compared to the control group and other experimental groups. As discussed earlier, the Picrosirius staining assay, when used *in vitro*, is also based on the absorbance reading. The 6.5% GSE concentration may have interfered in the reading due to the amount of agent diluted. However, the potential of increasing the amount of collagen production was still observed for the lower concentration (0.0065%), although not significantly different from the negative control, suggesting the effectiveness of the extract in increasing the extracellular matrix synthesis. This cellular effect has previously been investigated in cultures of fibroblasts from the skin of patients with Ehlers–Danlos type V, a hereditary disease in which the formation of collagen fibrils with diminished resistance occurs. These bioflavonoids have shown potential in inhibiting the catabolism of soluble collagen, stimulating the proliferation of normal skin fibroblasts, and increasing extracellular matrix synthesis, including collagen and fibronectin (Kuttan 1981, Kim *et al.* 1997).

For the data of total protein, production of alkaline phosphatase and mineralization nodules, there was no difference between the group submitted to the cellular differentiation protocol (control) and the group exposed to the extract. The contact time with the grape extract occurred only on the last day of differentiation, since pilot tests demonstrated that the continuous use of DMSO in culture medium for 21 days caused a severe reduction in cellular metabolism and consequent reduction in the number of available cells.

Therefore, one can speculate that a continuous contact with the grape extract could alter the pattern observed in the present study. Moreover, an extract was used in the present study and not the active and purified components, which can restrict their access to the interior of the cells, which would result in a change of cellular functions. In a recent article in which active monomers and polymers from an extract of *Pinus massoniana* were used on pulp cell cultures, the ability of these active agents in increasing the gene expression of mineralization regulators and odontogenic differentiation such as BMPs and DSPP was observed (Kulakowski et al. 2017).

According to the limitations of the present study that include the use of a purified extract and not of the primary form of the proanthocyanidins or of its active component, which can make it difficult to evaluate the biomodulator potential of the extract, more studies with the active components and different delivery media should be performed in order to confirm not only the non-cytotoxicity of this agent but also its biomodulating and biostimulating potential towards pulp tissue.

Conclusion

Distinct behaviours were observed for the various concentrations of GSE and none resulted in a reduction of cellular metabolism >10% compared to the negative control either applied directly over the primary pulp cells or in the presence of a dentine barrier. Also, an increase in the cell metabolism and collagen synthesis were observed indicating that GSE components may play a biostimulatory role and protect dental pulp cells when in direct contact.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq through the Chamada Universal (Process: 477949/2013-4) and Demanda espontânea FAPDF (Edital 03/2015).

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflict of interests in connection with this article.

References

Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S (2006) The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicology In Vitro* **20**, 265–71.

- Aghbali A, Hosseini SV, Delazar A et al. (2013) Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosnian Journal of Basic Medical Science* **13**, 186–91.
- Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS et al. (2014) Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *Journal of Dental Research* **93**, 417–22.
- Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK (2009) The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **91**, 419–24.
- Alani AH, Toh CG (1997) Detection of microleakage around dental restorations: a review. *Operative Dentistry* **22**, 173–85.
- Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N (2014) Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *Journal of Endodontics* **40**, 387–92.
- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M (2007) Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **80**, 268–72.
- Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ (2008) Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **86**, 330–4.
- Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH (2009) Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *Journal of Dental Research* **88**, 807–11.
- Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS (2010) Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **94**, 250–5.
- Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A (2011) Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomaterialia* **7**, 1735–41.
- Carrilho MR (2012) Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation? *Journal of Dental Research* **91**, 1099–102.
- Corder R, Warburton RC, Khan NQ, Brown RE, Wood EG, Lees DM (2004) The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction. *Clinical Science* **107**, 513–7.
- Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde DD (2013) Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. faecalis* – an in vitro study. *Journal of International Oral Health* **5**, 61–6.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and

- [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* **126**, 131–8.
- Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M (2004) Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dental Materials Journal* **23**, 67–74.
- Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME (2003) Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **65**, 118–24.
- Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH (1988) Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *Journal of Oral Pathology* **17**, 396–403.
- Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H (2003) In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* **24**, 3795–803.
- Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF et al. (2016) Collagen cross-linkers on dentin bonding: stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dental Materials* **32**, 732–41.
- Hebling J, Bianchi L, Basso FG et al. (2015) Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dental Materials* **31**, 399–405.
- Houde V, Grenier D, Chandad F (2006) Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *Journal of Periodontology* **77**, 1371–9.
- Ignea C, Dorobantu CM, Mintoff CP et al. (2013) Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chemistry* **4**, 3967–76.
- Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M (2005) Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *European Journal of Oral Science* **113**, 47–52.
- Katsuda Y, Niwano Y, Nakashima T et al. (2015) Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential. *PLoS One* **10**, e0134704.
- Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY (1997) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmetic Science* **6**, 299–307.
- Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M (2004) Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* **4**, 301–7.
- Ku CS, Sathishkumar M, Mun SP (2007) Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere* **67**, 1618–27.
- Kulakowski D, Leme-Kraus AA, Nam JW et al. (2017) Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response. *Acta Biomaterialia* **55**, 262–70.
- Kurachi M, Niwano Y, Shirato M et al. (2014) Cytoprotective effect of short-term pretreatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions. *PLoS One* **9**, e113403.
- Kuttan R (1981) Characterization of activatable form of prolyl hydroxylase in L929 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **2**, 243–50.
- Lu WC, Huang WT, Kumaran A, Ho CT, Hwang LS (2011) Transformation of proanthocyanidin A2 to its isomers under different physiological pH conditions and common cell culture medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6214–20.
- Mageshwaran T, Ebenezar AR, Madhanamadhubala M, Kavitha S, Mahalaxmi S (2012) 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. *Journal of Conservative Dentistry* **15**, 337–41.
- Montes GS, Junqueira LC (1982) Biology of collagen. *Revue Canadienne de Biologie Expérimentale* **41**, 143–56.
- Niu LN, Zhang W, Pashley DH et al. (2014) Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials* **30**, 77–96.
- Pal R, Mamidi MK, Das AK, Bhonde R (2012) Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Archives of Toxicology* **86**, 651–61.
- Perdigão J (2010) Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials* **26**, 24–37.
- Perdigão J, Reis A, Loguercio AD (2013) Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *Journal of Esthetic Restorative Dentistry* **25**, 219–41.
- Sabatini C, Pashley DH (2014) Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *American Journal of Dentistry* **27**, 203–14.
- Scheffel DL, Estrela RP, Pires PM et al. (2014) Effect of time between adhesive application and photoactivation on adhesion and collagen exposure. *American Journal of Dentistry* **27**, 330–4.
- Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG et al. (2015) Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Operative Dentistry* **40**, 44–54.
- Schweickl H, Hartmann A, Hiller KA et al. (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dental Materials* **23**, 688–95.
- Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R et al. (2010) Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *Journal of Dentistry* **38**, 635–40.
- van Dijken JW, Sunnegardh-Gronberg K, Sorensson E (2007) Clinical bonding of a single-step self-etching

- adhesive in noncarious cervical lesions. *Journal of Adhesive Dentistry* **9**(Suppl. 2), 241–3.
- Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R *et al.* (2014) Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomaterialia* **10**, 3288–94.
- Wang Y, Spencer P, Walker MP (2007) Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **81**, 279–86.
- Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M (2005) Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* **5**, 162–9.
- Yen CY, Hou MF, Yang ZW *et al.* (2015) Concentration effects of grape seed extracts in anti-oral cancer cells involving differential apoptosis, oxidative stress, and DNA damage [abstract]. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15**, 94.