

POLIANA AMANDA OLIVEIRA SILVA

POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS AO  
MTA NA SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA E NOS PROCESSOS REPARATIVOS DO  
COMPLEXO DENTINO-PULPAR

BRASÍLIA, 2021

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

POLIANA AMANDA OLIVEIRA SILVA

POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS AO  
MTA NA SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA E NOS PROCESSOS REPARATIVOS DO  
COMPLEXO DENTINO-PULPAR

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

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende  
Co-orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA  
2021

POLIANA AMANDA OLIVEIRA SILVA

POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS AO  
MTA NA SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA E NOS PROCESSOS REPARATIVOS DO  
COMPLEXO DENTINO-PULPAR

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

Aprovado em de 05 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Taia Maria Berto Rezende (Presidente)  
Universidade de Brasília - UnB

Ana Paula Dias Ribeiro  
Universidade de Brasília - UnB

Marco Antonio Hungaro Duarte  
Universidade de São Paulo - USP

Marina Angélica Marciano da Silva  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

*Dedico este trabalho a minha família e amigos,  
que me incentivaram em cada momento  
durante essa jornada.  
Eu amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** por me abençoar em sua eterna bondade com saúde e persistência durante toda a minha caminhada.

À orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taia Maria Berto Rezende**, por tratar seus orientados com tanto carinho. Dispondo de palavras amigas quando necessitamos de uma direção. E também por confiar e acreditar que a nossa ciência poderia ganhar o mundo. Obrigada pela paciência em moldar uma pequena cirurgiã-dentista em cientista, que sempre sonhou em levar a endodontia baseada em evidência científica pelo mundo. Obrigada por fazer parte da minha história.

Ao co-orientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, pela oportunidade e incentivo. Por acreditar em pesquisas e pesquisadores multidisciplinares. E por mostrar ao mundo a grandeza e qualidade de estudos nacionais.

Aos membros da banca avaliadora, **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Dias Ribeiro, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Angélica Marciano da Silva e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Evelyn Mikaela Kogawa** pela disponibilidade e contribuição no trabalho realizado. Além da oportunidade de aprender tanto com a sabedoria de todos vocês.

Apreendi tanto durante essa fase, não somente ensinamentos teóricos, como qual material é melhor ou pior. Mas, ensinamentos de vida. Apreendi o quanto o trabalho em equipe e a união é importante para a pesquisa brasileira. Obrigada **Cristiano Castro Lacorte** e **José Raimundo Corrêa** por dispor do tempo e laboratório de microscopia da Embrapa e UNB. Professora **Rosangela Andrade**, nunca me esquecerei dos seus ensinamentos e disposição em tentar resolver os problemas que apareciam, obrigada por pegar na mão e ensinar a metodologia!

A equipe que me acolheu com tanto carinho e permitiu que pudesse passar o conhecimento adquirido durante esse tempo de mestrado e doutorado e principalmente por me ensinar a lecionar. Obrigada **equipe Master**, por confiar no trabalho dessa jovem endodontista.

Ao amigo de todas as horas que o laboratório me deu, **Danilo César Martins**. Obrigada por me aproximar mais de Deus. Obrigada pelo seu companheirismo. Por não me deixar sozinha no laboratório nas madrugadas, finais de semana, feriado! Obrigada por estar sempre do lado, nos incontáveis e intermináveis qPCRs. Apreendi que a bondade sempre vale a pena. Obrigada por tanto ensinamento!

Aos amigos de laboratório, que viraram amigos para toda vida. **Stella Maris, Ingrid Aquino, Ana Paula Cantuária, Nelson Júnior, Mirna Freire, Arthur**, toda essa jornada não teria graça sem vocês. Obrigada pelas sessões de comilança e desabafos. Agradeço eternamente por sempre que precisei estarem do lado.

Aos colegas do **grupo Biodonto**, obrigada pelo aprendizado mutuo. **Jade, Mauricio e alunos de iniciação científica** obrigada pelos socorros laboratoriais. Que a jornada científica de vocês seja linda e que trilhem caminhos brilhantes.

Aos meus pais **Sandra e Rogério** obrigada pela força, companheirismo e amor. Obrigada pelos ensinamentos e incentivo que sempre me deram. E por nunca medirem esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. A minha irmã **Larissa Cristina**, por sempre estar à disposição quando eu precisava só de um colo.

Ao meu marido **Eduardo** por todo carinho, amor e paciência durante esse tempo. Por nunca questionar minhas escolhas e sempre me incentivar. Por me esperar durante horas, para não me deixar comer sozinha. Obrigada por me ensinar o que é o amor mais genuíno.

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

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

À **CAPES, CNPq, FAPDF, FUNDECT** pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

As terapias pulpares conservadoras representam formas terapêuticas, em algumas situações de exposição pulpar, sendo o MTA, o material mais indicado. Aditivos para controle da inflamação pulpar vêm sendo estudados, uma vez que o sucesso destas terapias depende da qualidade tecidual, da idade do paciente e do material utilizado. Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs), além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, são antimicrobianos, podendo desempenhar importantes funções no processo de reparo do complexo dentino-pulpar. Este estudo avaliou o potencial dos PDHs IDR1018, DJK6 e a ação conjunta dos peptídeos com MTA, em cultura pulpar primária humana. Inicialmente, a concentração dos peptídeos e do MTA a ser testada foi definida por meio de ensaios antibacterianos e antibiofilme de *S. mutans* e ensaio de viabilidade e migração de células pulpares. Em seguida, a união dos PDHs ao MTA foi avaliada por ensaios antibiofilme de *S. mutans* em microscopia confocal; capacidade imunomoduladora, pela produção de IL-6 e TNFRSF, por qPCR; toxicidade, por ensaio de MTT; morfologia celular, por microscopia eletrônica de varredura (MEV); proliferação e a capacidade de migração, por ensaio de azul de tripan e método de *scratch*; diferenciação odontogênica e biomineralização, pela expressão do gene DSPP, TGF- $\beta$ , atividade de ALP e coloração de vermelho de alizarina. Resultados demonstraram que a combinação de PDHs com MTA foi capaz de reduzir o biofilme de *S. mutans*. IDR1018, MTA e combinação de PDHs e MTA diminuiu a expressão de IL-6. Os materiais testados não foram citotóxicos nas culturas de polpa e promoveram a presença de agregados na superfície celular. IDR1018 levou a maior proliferação celular em comparação ao controle e MTA. O IDR1018 combinado com o MTA causou maior migração em 48h. Em relação aos produtos de diferenciação e mineralização celular, a combinação de IDR1018 e MTA levou a maior expressão de DSPP, atividade de ALP e produção de nódulos de calcificação. Desta forma, a combinação do IDR1018 com o MTA foi capaz de auxiliar no processo de reparo, atuando na redução de biofilme, no processo de imunomodulação e nos processos de diferenciação e mineralização celular.

Palavras-chave: reparo; peptídeos; agregado trióxido mineral; biomateriais; atividade antimicrobiana; bioatividade.

## ABSTRACT

Conservative pulp therapies represent therapeutic forms for some situations of pulp exposure, being MTA, the most suitable material. Additives to control pulp inflammation have been studied since the success of these therapies still depends on tissue quality, patient age, and used material. Host defence peptides (HDPs) are molecules with antimicrobial potential in addition to having anti-inflammatory and immunomodulatory properties. In this sense, the HDPs can play an essential role in the repair process of the pulp-dentin complex. This study evaluated the potential of HDPs IDR1018, DJK6, and the association of peptides with MTA in human primary pulp culture. Initially, the concentration of peptides and MTA was defined through antibacterial and antibiofilm assays for *S. mutans* and pulp cell viability and migration assay. Then, the association of HDPs to MTA was evaluated by *S. mutans* antibiofilm assays under confocal microscopy. The IL-6 and TNFRSF production were verified by qPCR to evaluate the immunomodulatory capacity. The toxicity was verified by MTT assay; the cell morphology was analysed by scanning electron microscopy (SEM); proliferation and cell migration was verified by trypan blue exclusion test and scratch assay; odontogenic differentiation and biomineralization were evaluated by DSPP, TGF- $\beta$ , ALP activity, and alizarin red staining. Results showed that the combination of HDPs with MTA was able to reduce the biofilm of *S. mutans*. IDR1018, MTA, and a combination of HDPs and MTA decreased IL-6 expression. The tested materials were not cytotoxic for pulp cultures and promoted the presence of aggregates on the cell surface. IDR1018 led to more significant cell proliferation compared to control and MTA-tested groups. IDR1018 combined with MTA caused the most remarkable migration after 48h. Regarding cell differentiation and mineralization products, the combination of IDR1018 and MTA led to greater expression of DSPP, ALP activity, and calcification nodules production. Thus, the combination of IDR1018 with MTA was able to assist the repair process, acting in the reduction of biofilm, the immunomodulation process, and the processes of cell differentiation and mineralization.

Keywords: repair; peptides; mineral trioxide aggregate; biomaterials; antimicrobial activity; bioactivity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adaptação de Rosa *et al.* (1). (A) corresponde a formação de dentina terciária reacionária. (B) demonstra o processo formador de dentina reparativa.....26

Figura 2 - Esquema representativo do desenvolvimento da pesquisa.....43

Figura 3 - Viabilidade do biofilme jovem de *S. mutans* após exposição dos peptídeos DJK-6 (A), IDR1018 (B) e do biomaterial MTA (C). O controle positivo foi representado pela cultura bacteriana na presença do cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\delta$ ) em relação a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\gamma$ ) em relação a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\Delta$ ) em relação ao MTA (1:1). Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....64

Figura 4 - Viabilidade do biofilme jovem de *S. mutans* após exposição dos peptídeos DJK-6 (A), IDR1018 (B), em conjunto com MTA. O controle positivo foi representado pela cultura bacteriana na presença do cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\delta$ ) em relação a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\gamma$ ) em relação a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\Delta$ ) em relação ao MTA (1:1). Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....65

Figura 5 - Média de absorvância do biomaterial MTA avaliado em conjunto com peptídeos DJK-6 e IDR1018 contra o microrganismo *S. mutans in vitro*. Análise comparativa com o biomaterial MTA na concentração de 1:1. O controle positivo foi representado por cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença

estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\delta$ ) em relação a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\gamma$ ) em relação a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\Delta$ ) em relação ao MTA (1:1). Todos os gráficos representam médias e erro-padrão da absorbância de três réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....66

Figura 6 - (A) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo DJK-6, por 24h. (B) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo DJK-6, por 72h. (C) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo IDR1018, por 24h. (D) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo IDR1018, por 72h. (E) Viabilidade celular após exposição celular ao extrato de MTA, por 24h. (F) Viabilidade celular após exposição celular ao extrato de MTA, por 72h. Todos os gráficos representam médias e erro-padrão da absorbância de três réplicas biológicas em triplicatas. (\*) representam diferenças estatísticas entre os grupos em comparação com o grupo de célula pulpar, quando  $p < 0.05$ . Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....68

Figura 7 - Avaliação do comportamento migratório de cultura de células pulpares primárias exposta ao peptídeo DJK-6. (A) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida utilizando o peptídeo DJK-6, nas concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , no tempo de 24h. (B) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida após 48h.  $p < 0,05$  foi representado por (\*), comparado com o grupo de célula pulpar sem estímulo. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....70

Figura 8 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com peptídeo DJK-6, em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.....71

Figura 9 - Avaliação do comportamento migratório de célula pulpar primária quando exposto ao peptídeo IDR1018.  $p < 0,05$  foi representado por (\*), comparado com o grupo de célula pulpar sem estímulo. (A) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida utilizando o peptídeo IDR1018 nas concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 24h. (B) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida no tempo de 48h. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....72

Figura 10 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com peptídeo IDR1018, em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.....73

Figura 11 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com peptídeo IDR1018, em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.....74

Figura 12 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária. Através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com extrato de MTA, em diluições 1:1, 1:2 e 1:4, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.....75

Figura 13 - (A) Viabilidade celular de *S. mutans* após 24h de exposição aos peptídeos, MTA e combinação de ambos em biofilme jovem pré-formado em placas de 96 poços de fundo de U. (B) Biovolume total ( $\mu\text{m}^3$ ) de células vivas do biofilme maduro de *S. mutans* em discos de dentina após 7 dias, seguido por peptídeos, MTA e combinação de ambas as exposições por 24h, avaliadas por microscopia confocal. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,001$  em relação ao controle e # $p < 0,001$  em relação ao MTA, por ANOVA *one-way* e pós-Tukey. O controle positivo para (A) e (B) foi representado pela bactéria *S. mutans* em meio BHI. (C) Imagens de microscopia confocal do biofilme de *S. mutans*. Imagens verdes representam células vivas e imagens vermelhas representam células mortas. Barra de escala - 10  $\mu\text{m}$ .....77

Figura 14 - (A) Avaliação da viabilidade celular após exposição por 24h dos estímulos LPS, IFN- $\gamma$  e antígenos de *S. mutans* nas concentrações de  $10^6$  a  $10^8$ . (B) Avaliação da viabilidade celular após exposição por 72h dos estímulos LPS, IFN- $\gamma$  e antígenos de *S. mutans* nas concentrações de  $10^6$  a  $10^8$ . \* $p < 0,05$ , indica diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Tukey, com o grupo controle.....79

Figura 15 – Definição do estímulo necessário para reprodução do sistema inflamatório *in vitro*. Expressão do gene TNF- $\alpha$  nas amostras de culturas de células pulpares primárias, expostas à LPS, IFN- $\gamma$ , LPS + IFN- $\gamma$ , antígeno *HK-S. mutans* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL $^{-1}$ ) e a combinação dos antígenos com IFN- $\gamma$  após 24h de incubação. \* $p < 0,05$ , indica diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's, com o grupo controle. ....80

Figura 16 - (A) Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 24h de incubação (B). Expressão de TNFRSF-1. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística entre o controle e os grupos, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's. #  $p < 0,05$  representa diferença estatística entre MTA e os demais grupos, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....81

Figura 17 - Viabilidade celular pulpar por MTT, após exposição de HDPs (DJK-6 e IDR1018), MTA e combinação de ambos após 24h, 48h e 72h em cultura de celulose pulpar. \* $p < 0,05$  em relação ao controle, pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's. # $p < 0,05$  em relação ao MTA Reparo HP, pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's.....83

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura representativa das células de cultura pulpar, após exposição ao meio DMEM, avaliado como controle negativo. Peptídeos DJK-6, IDR1018 e biomaterial MTA, avaliados de forma isolada. Avaliação da combinação dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 com MTA. Cada linha representa o

aumento utilizado para análise das amostras. A primeira linha representa ampliação de 300x; a segunda linha, ampliação de 1.500x; e a terceira linha, ampliação de 3000x. O material empregado para análise está representado nas colunas.....85

Figura 19 - (A) Proliferação de células pulpares pelo método *trypan blue*, após 24h e 48h de HDPs, MTA e combinação de ambas as exposições. As barras representam a diferença estatística entre o controle e os grupos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao MTA Reparo HP, verificadas pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's. (B) Comportamento migratório das células pulpares quando expostas a HDPs, MTA e combinação de ambos. O gráfico representativo indica a porcentagem de células migradas para a ferida em 24h e 48h. (C) Imagem representativa do teste de migração celular, usando o método *scratch*. Os pontos denotam a presença de células dentro da ferida. As linhas verticais correspondem ao local inicial onde a ferida foi realizada no ponto inicial. O teste foi realizado por 24h e 48h. As colunas representaram cada material testado.....87

Figura 20 - (A) Expressão do gene DSPP nas amostras de culturas de células pulpares primárias cultivadas em meio osteogênico, expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 14 dias de incubação (B). Expressão de TGF- $\beta$  nas amostras de culturas de células pulpares cultivadas em meio osteogênico, expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 14 dias de incubação. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle e #  $p < 0,05$ , quando comparado com o MTA, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....88

Figura 21 - (A) Atividade da fosfatase alcalina celular (ALP) em cultura de células pulpares em condições osteogênicas, expostas aos peptídeos DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018, por 14 dias. A atividade de ALP (mMol p-nitrofenol/por minuto) foi normalizada pela quantidade total de proteína por proteína. Representação gráfica de duas réplicas biológicas independentes. (B) Avaliação da concentração de fosfato do sobrenadante celular, após exposição dos peptídeos DJK-6, IDR1018,

MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 por 14 dias. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de duas réplicas biológicas em triplicata técnicas. \* $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle e #  $p < 0,05$ , quando comparado com o MTA, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.....89

Figura 22 - (A) Avaliação quantitativa de três réplicas biológicas independentes de deposição da matriz mineral após exposição dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA em cultura de células pulpares, coradas com Vermelho de Alizarina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da absorbância em comparação com o controle. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao MTA *Repair HP*, por *one -way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (B) Imagem representativa da matriz mineralizada em placa de 6 poços após 14 dias de peptídeos, MTA e combinação de ambas as exposições. (C) Imagem representativa da deposição de matriz mineralizada por coloração com vermelho de alizarina em condições de diferenciação odontogênica e exposição de peptídeos, MTA e combinação de ambos. O controle representou a cultura de células pulpares em meio odontogênico por 14 dias.....90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos IDR1018, DJK-6 e do biomaterial MTA contra o microrganismo *S. mutans in vitro*. Os controles positivos foram cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) estão representadas em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ /  $\mu\text{M}$ . ND – não detectado na maior proporção testada (1:1).....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – fosfatase alcalina

APD - *antimicrobial peptide database* (banco de dados de peptídeos antimicrobianos)

BHI - *brain heart infusion* (infusão de cérebro e coração)

BM2 – *basal medium 2* (meio basal 2)

BMP2 – *bone morphogenetic protein 2* (proteína morfogenética 2)

Ca(OH)<sub>2</sub> – hidróxido de cálcio

CaCl – cloreto de cálcio

CAPB - centro de análises proteômicas e bioquímicas

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CHX - clorexidina

CIMB - concentração inibitória mínima de biofilme

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CXCL – quimiocina pro-inflamatória motivo ligante

DMEM - *meio eagle modificado por dulbecco*

DMP1 - *dentin matrix acidic phosphoprotein 1* (fosfoproteína ácida de matriz de dentina 1)

DMSO - dimetilsulfóxido

D.O. – densidade óptica

DPP – *dentin phosphophoryn* (fosfoproteína dentinária)

DPSCs - células estaminais da polpa dentária humana

DSPP - *dentin sialophosphoprotein* (dentina sialofosfoproteína)

ECM – matrix extracelular

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ERK - *extracellular signal-regulated kinases* (quinases reguladas por sinal extracelular)

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos-2

GAPDH - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

GH - *growth hormone* (hormônio do crescimento)

HaCat – queratinócitos humanos

hDPCs - *human dental pulp cells* (células da polpa dental humana)

IBSP - sialoproteína de ligação a integrina

IDRs - reguladores da defesa inata

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IGF - fator de crescimento semelhante a insulina

IL – interleucina

ISO - organização internacional de standardização

JNK - *c-Jun N-terminal cinase*

KpC - *Klebsiella pneumoniae*

LPS – lipopolissacarídeo

MAE - monômero de amônio quaternário

MALDI-TOF - *matrix assisted laser desorption ionization - time of flight* - ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo

MALDI - *matrix-assisted laser desorption/ionization* (ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

MAP Kinases – *mitogen activated protein kinases* (proteínas quinases ativadas por mitogênio)

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos 1

MEPE - fosfoglicoproteína extracelular de matriz

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MIC - concentração inibitória mínima

MBC – concentração bactericida mínima

MTA – agregado trióxido mineral ou mineral trióxido agregado

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NaOCl - hipoclorito de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NCCLS - *national committee for clinical laboratory standards*

NO – óxido nítrico

OPN - osteopontina

OST – osteostatina

PAMs - peptídeos antimicrobianos

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

PC - cimento portland

PCR - *polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)

PDGF - fator crescimento derivado de plaquetas

PDHs - peptídeos de defesa do hospedeiro

PGs - fosfatidilgliceróis

(p) ppGpp - guanosina tetra e penta fosfato

PRF - fibrina rica em plaquetas

PTHrP - proteína relacionada ao hormônio da tireoide

qPCR – *real time polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia em tempo real)

rIFN  $\gamma$  – recombinante interferon gama

RNA - Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor beta* (fator de crescimento transformante beta)

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TLR - receptores semelhantes a *toll*

TNF - fator de necrose tumoral

TNFRSF1 – receptor do fator de necrose tumoral 1

UCB - Universidade Católica de Brasília

UFC - unidades formadoras de colônias

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 POTENCIAL DE REPARO DO COMPLEXO DENTINO PULPAR.....	24
2.2 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO .....	26
2.3 MATERIAIS INDICADOS PARA CAPEAMENTO .....	28
2.3.1 Hidróxido de cálcio.....	28
2.3.2 Cimentos a base de silicato de cálcio .....	29
2.3.2.1 Agregado de trióxido mineral (MTA).....	29
2.4 PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO .....	33
2.4.1 Peptídeos e odontologia .....	35
2.4.1.1 IDR1018 .....	37
2.4.1.2 DJK-6.....	39
3. OBJETIVOS .....	41
3.1 OBJETIVO GERAL .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
4. METÓDOS .....	43
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	43
4.2 Amostras Populacionais.....	44
4.2.1 Critérios de inclusão .....	44
4.2.2 Critérios de exclusão .....	44
4.3 OBTENÇÃO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA DOS DENTES EXTRAÍDOS.....	44
4.3.1 Cultura primária de célula pulpar – técnica explant/outgrowth.....	45
4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS E MTA.....	46
4.5 PREPARO DO EXTRATO DE MTA.....	46
4.5.1 Manipulação do peptídeo adicionado ao MTA.....	47
4.6 FASE I - DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ESCOLHIDOS .....	47
4.6.1 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos e do MTA .....	47
4.6.2 Avaliação da curva de crescimento e determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria <i>S. mutans</i> .....	48
4.6.3 Concentração inibitória mínima dos peptídeos e do MTA.....	48
4.6.4 Avaliação da viabilidade do biofilme jovem dos PDHs DJK-6, IDR1018, MTA e ação conjunta dos peptídeos com MTA.....	49
4.6.5 Ensaio da viabilidade por MTT de células pulpares após exposição dos PDHs e MTA.....	49

4.6.6 Ensaio de migração celular – método <i>scratch</i> .....	50
4.7 FASE II - EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO PEPTÍDEOS E MTA NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA APÓS CONCENTRAÇÃO DEFINIDA..	51
4.7.1 Atividade em biofilme jovem .....	51
4.7.2 Atividade em biofilme maduro.....	51
4.8 FASE III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS E DO MTA .....	52
4.8.1 Preparo dos antígenos microbianos mortos pelo calor.....	52
4.8.2 Definição dos estímulos utilizados para reprodução de sistema inflamatório.....	53
4.8.2.1 Viabilidade celular – MTT .....	53
4.8.2.2 Dosagem de óxido nítrico (NO).....	53
4.8.2.3 Análise da expressão gênica do marcador inflamatório – TNFRSF-1 por qPCR.....	54
4.9 FASE IV – EFEITOS DA RESPOSTA CELULAR APÓS COMBINAÇÃO DO MTA E PEPTÍDEOS .....	55
4.9.1 Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos, MTA e do peptídeo em conjunto com extratos do MTA em células pulpares - MTT .....	55
4.9.2 Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	55
4.9.3 Efeito dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA na proliferação e migração de células pulpares.....	56
4.9.3.1 Proliferação de células pulpares.....	56
4.10 FASE V - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS, MTA E PEPTÍDEOS EM CONJUNTO COM MTA NA DIFERENCIAÇÃO ODONTO/OSTEOGÊNICA E BIOMINERALIZAÇÃO .....	57
4.10.1 Análise da expressão gênica de marcadores de biomineralização.....	57
4.10.1.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total .....	57
4.10.1.2 Quantificação e pureza do RNA total .....	58
4.10.1.3 Síntese de cDNA .....	58
4.10.1.4 PCR em tempo real .....	59
4.10.2 Produção de fosfatase alcalina.....	59
4.10.4 Avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo método de <i>Alizarin-red</i> .....	60
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	61
5 RESULTADOS .....	62
5.1 DETERMINAÇÃO DA ESCOLHA DOS PEPTÍDEOS E DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS CELULARES.....	62

5.1.2	Avaliação da CIM e CBM dos peptídeos DJK-6, IDR1018 e do biomaterial MTA .....	62
5.1.3	Avaliação da viabilidade do biofilme em diversas concentrações dos PDHs DJK-6, IDR1018, do biomaterial MTA e ação conjunta dos PDHs com MTA .....	63
5.1.4	Viabilidade celular após exposição de diferentes concentrações dos PDHs e do MTA .....	67
5.1.5	Ensaio de migração na presença do peptídeo DJK-6, IDR1018 e do extrato do biomaterial MTA analisados de forma independente .....	69
5.1.6	Ensaio de migração na presença do peptídeo DJK-6 .....	69
5.1.7	Ensaio de migração na presença do peptídeo IDR1018 .....	72
5.1.8	Ensaio de migração na presença de extratos do MTA .....	74
5.2	EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO PEPTÍDEOS E MTA NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	76
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS E DO MTA .....	78
5.3.1	Definição da concentração de antígenos .....	78
5.3.1.1	Viabilidade celular .....	78
5.3.1.2	Dosagem de óxido nítrico – NO .....	79
5.3.1.3	Expressão do gene TNFRSF-1 .....	79
5.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS PEPTÍDEOS, MTA E DO PEPTÍDEO EM CONJUNTO COM EXTRATOS DO MTA CAUSAR CITOTOXIDADE EM CÉLULAS PULPARES .....	82
5.4.1	Ensaio de viabilidade celular .....	82
5.4.2	Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura em amostras encubadas com os peptídeos DJK-6 e IDR1018, MTA e da combinação destes peptídeos com extrato do MTA .....	83
5.5	EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E MTA NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PULPARES .....	86
5.6	EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E MTA NA DIFERENCIAÇÃO ODONTOGÊNICA E BIOMINERALIZAÇÃO .....	88
5.6.1	Expressão dos genes DSPP e TGF- $\beta$ .....	88
5.6.2	Produção de fosfatase alcalina – ALP e concentração de fosfato .....	89
5.6.3	Avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo método de <i>Alizarin-red</i> .....	90
6	DISCUSSÃO .....	91
7	CONCLUSÕES .....	99
8	REFERÊNCIAS .....	100
9	ANEXOS .....	109

## 1. INTRODUÇÃO

Diferentes agressões, como físicas, químicas e biológicas podem acometer o complexo dentino-pulpar ao longo do tempo. Dependendo da intensidade e duração da agressão aplicada, o tecido pulpar responderá de modo reversível ou irreversível (2). Dentre os tipos de agressões, a mais frequente corresponde a biológica, representada por microrganismos provenientes da cárie dentária (3). Ademais, outra condição frequente na população refere-se ao traumatismo dentário (4). O trauma, assim como a cárie dentária, pode desencadear respostas celulares e moleculares na polpa através de eventos inflamatórios e / ou regenerativos (5).

A manutenção da vitalidade pulpar é importante para conservação da estrutura e preservação da função fisiológica dos dentes (6). Em adição, durante o período de rizogênese, a manutenção do tecido pulpar pode garantir a contínua formação radicular (7). Um método para a preservação do tecido pulpar após sua exposição, consiste na realização do capeamento pulpar direto (8). Esta técnica visa a utilização de biomateriais, que atuam como barreira de exposição ao meio, além de estimular a cura e reparo do tecido perdido, através da produção de dentina reparadora (9).

Para o início deste processo de reparo, uma série de eventos fisiológicos e celulares devem ocorrer. Durante a invasão bacteriana inicial, o reconhecimento de patógenos realizado por odontoblastos, através dos receptores TLRs 1-6 e 9 ativa uma rede de sinalização, ocasionando a liberação de quimiocinas, citocinas, bem como peptídeos, que atuam em conjunto com a finalidade de neutralização do agente agressor (10). Após alcançar uma homeostase entre a resposta inflamatória e a presença de patógenos, processos de cicatrização e regeneração se iniciam (11). Assim, com o controle da infecção, citocinas como: TGF- $\beta$ 1, IGF-1 e -2, FGF-2 e adrenomedulina atuam em células indiferenciadas para estimular o recrutamento / quimiotaxia, proliferação, diferenciação e atividade sintética e secretora dentinária, auxiliando no processo de reparo (12).

Para que o processo de reparo ocorra, a utilização de biomateriais para realização de técnicas como capeamento pulpar auxiliam no sucesso para preservação do tecido pulpar. Deste modo, propriedades antibacterianas, imunomoduladoras e capacidade de induzir formação de tecido mineralizado são desejáveis para este biomaterial (8, 13, 14). Atualmente, materiais relacionados a

formulações do hidróxido de cálcio e MTA, são os materiais mais utilizados para proteção pulpar (6). Sendo, a taxa de sucesso geral de 80,5% após uso do MTA, quando comparado ao hidróxido de cálcio (taxa de sucesso de 59%), em até 123 meses (8). O sucesso da terapia utilizando os biomateriais existentes ainda depende da duração da exposição pulpar ao meio externo, tamanho da exposição ocorrida e idade do paciente. Em geral, o capeamento pulpar direto é indicado quando o tamanho da polpa dentária exposta tem menos de 1 mm de diâmetro e o controle da hemorragia é conquistado (15). Portanto, a busca por novos biomateriais com melhores propriedades físico-mecânicas e que potencialize propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana e imunomoduladoras, ainda persiste (6, 9, 16-18).

Assim, Peptídeos de Defesa do Hospedeiro (PDHs) são investigados na área médica e odontológica em função de suas propriedades antimicrobianas, antibiofilme, antivirais, antifúngico, antiparasitários, quimiotáticos, entre outras aplicações (19). Os PDHs além de participarem ativamente na imunidade inata, também modulam a resposta do sistema imune para promover a depuração de agentes patogênicos, além de diminuir efeitos deletérios da inflamação (20). Do mesmo modo, também podem regular a transição para a imunidade adaptativa e promover cicatrização de feridas (20). Usando a sequência de Bac2a como modelo, sequência de 12 aminoácidos foi gerada através de substituições pontuais, embaralhamento e exclusões, dando origem ao peptídeo IDR1018 (21). O PDH IDR1018 é relatado na literatura como um agente com ampla gama de atividades biológicas, incluindo funções pró e anti-inflamatórias (21), atividades citotóxicas e atividade hemolítica mínimas, além de uma potente atividade antibiofilme (22, 23). Observando características importantes do IDR1018, em 2015 foi criada uma versão D-enantiômera derivada desse peptídeo e de peptídeos anti-biofilmes mais ativos, dando origem ao PDH DJK-6 (24). Desta forma, observando nos peptídeos algumas características relacionadas ao reparo e sabendo as propriedades desejáveis para um biomaterial, esse trabalho objetivou avaliar o potencial dos PDHs IDR1018, DJK-6 e a ação conjunta dos PDHs com extrato de MTA, em cultura de células pulpares humanas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POTENCIAL DE REPARO DO COMPLEXO DENTINO PULPAR

Diferentes agressões podem acometer o complexo dentino-pulpar, sendo estes físicos, químicos e biológicos. Dependendo da intensidade e duração da agressão aplicada, os tecidos responderão de modo reversível ou irreversível (2). A agressão mais frequente corresponde a biológica, representada por microrganismos provenientes da cárie dentária (3). Porém, outra condição frequente na população refere-se ao traumatismo dentário (4). O trauma, assim como processo referente a cárie dentária, pode desencadear respostas celulares e moleculares na polpa que podem aparecer como eventos inflamatórios e / ou regenerativos nos níveis tecidual e celular (5).

Durante invasão bacteriana, condição que ocorre tanto em lesões cariosas, mas também em traumatismos dentários, reconhecimento de patógenos iniciados por odontoblastos é realizado. Devido aos receptores TLRs 1-6 e 9 dispostos na membrana dos odontoblastos, uma rede de sinalização pode ser ativada, ocasionando a liberação de agentes autócrinos e parácrinos, tais como quimiocinas, citocinas, bem como peptídeos, que atuam em conjunto com a finalidade de neutralização do agente agressor (10).

Após alcançar uma homeostase, um processo de cicatrização e reparação se iniciam (11). O processo de reparo é mediado pela deposição de dentina terciária (25). A dentinogênese terciária é um processo mediado por odontoblastos e pode ser categorizado em 2 tipos, reacionário e reparativo (26). A dentinogênese reacionária corresponde ao processo pelo qual a dentina é secretada em resposta a um estímulo local que reativa os odontoblastos em repouso, ocasionando a formação de dentina por odontoblastos pré-existentes (27). Neste processo, a dentina é formada com semelhanças anatômicas, bioquímicas e funcionais com a dentina primária e secundária, na intenção de proteger o tecido pulpar contra agentes irritantes (28). No entanto, a célula responsável pela secreção desta dentina é o odontoblasto que foi comprometido. Essa injúria dos odontoblastos, é responsável pela linha cálcio-traumática que delinea a matriz dentinária secretada após lesão dentinária, delimitando o início da dentina mais desorganizada, quando comparada com a dentina

primária e secundária (29). Com o aumento da intensidade da agressão, a morte odontoblástica ocorrerá, com isso acontece a liberação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 por odontoblastos, o que podem induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos-*like* e assim, ocasionar uma sintetização de matriz dentinária e sua posterior mineralização, resultando na formação de dentina reparadora (30, 31). Entretanto, estudos demonstram que além das proteínas TGF, odontoblastos também podem liberar fator de crescimento semelhante à insulina-1 e 2 (IGF-1 e -2), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), adrenomedulina e vários fatores de crescimento angiogênicos, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento endotelial vascular (PDGF) e (VEGF) (32, 33). Assim, com o controle da infecção, TGF- $\beta$ 1, IGF-1 e -2, FGF-2 e adrenomedulina atuam em células indiferenciadas para estimular o recrutamento / quimiotaxia, proliferação, diferenciação e atividade sintética e secretora dentinária, correspondendo aos eventos de mineralização (12). Além de células mesenquimais indiferenciadas, estudos investigam a capacidade dos fatores de crescimento induzirem a diferenciação de células subodontoblásticas, fibroblastos e pericitos derivados de paredes vasculares, em células semelhantes a odontoblastos, para realizar a formação de dentina terciária reparadora (25, 34). Posteriormente, esta organização de eventos levará a formação da ponte de dentina no local da lesão, ocasionando o reestabelecimento da atividade funcional do dente (12).

Alguns materiais existentes no mercado, possui como objetivo a preservação do tecido pulpar, após a exposição desse tecido, seja por iatrogenia, lesões cariosas ou fratura dentárias (35). Vários estudos documentam a importância dos sinais de "dano" liberados por odontoblastos, não só por patógenos, oriundos do processo carioso, mas também por materiais restauradores, incluindo hidróxido de cálcio, agregado de trióxido mineral (MTA), e EDTA, que não só promovem formação de dentina terciária, mas também os processos associados de reparação da angiogênese e neurogênese (36, 37).

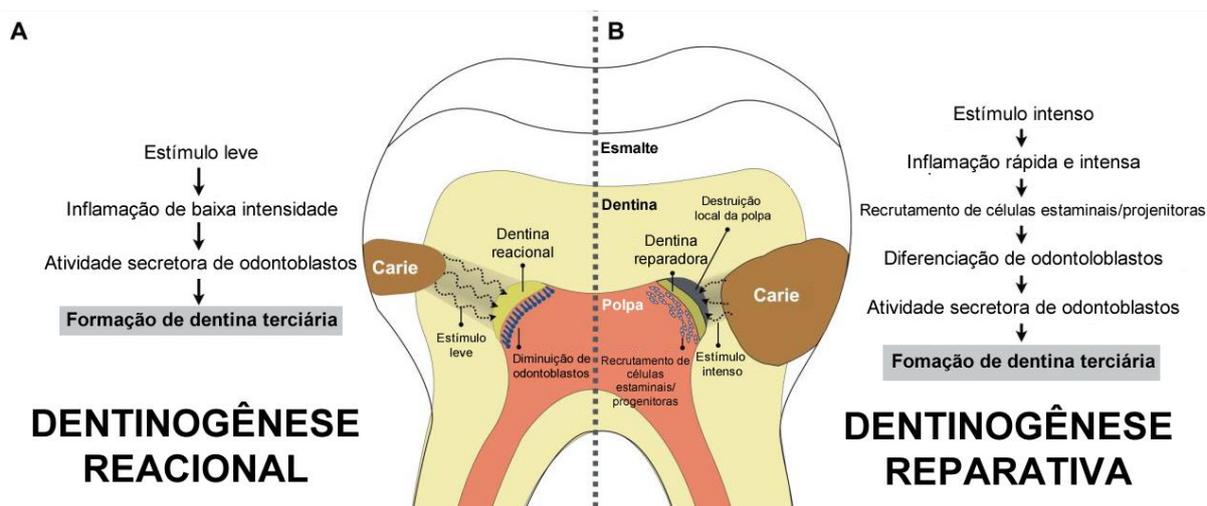


Figura 1 – Adaptação de Rosa *et al.* (1). (A) corresponde a formação de dentina terciária reacionária. (B) demonstra o processo formador de dentina reparativa.

## 2.2 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO

A manutenção da vitalidade pulpar é importante para manutenção da estrutura e preservação da função fisiológica dos dentes (6). Um método para a preservação do tecido pulpar após sua exposição, consiste na realização do capeamento pulpar direto (8). Esta técnica visa a utilização de biomateriais, que atuam como barreira de exposição ao meio, além de estimular a cura e reparo do tecido perdido, através da produção de dentina reparadora (9). No entanto, o sucesso da terapia também dependerá da duração da exposição pulpar ao meio externo, tamanho da exposição ocorrida e idade do paciente. Em geral, o capeamento pulpar direto é indicado quando o tamanho da polpa dentária exposta tem menos de 1 mm de diâmetro, o controle da hemorragia é conquistado e taxas maiores de sucesso são observadas em pacientes jovens (15, 38). Estudo realizado em dentes de cães, demonstra que a realização do procedimento conservador, nas primeiras 48h, pode resultar em uma taxa de sucesso de 88,2%, após controle de 36 meses (39). Porém, a maior incidência de insucessos, são referidas em processo de cárie profunda. Assim, a presença de bactéria é considerada o principal motivo de falhas do capeamento pulpar (40).

Deste modo, as propriedades desejáveis para um biomaterial com a função de capeamento pulpar, devem consistir em excelentes propriedades antibacterianas e capacidade de induzir formação de tecido mineralizado (8, 13, 14). Entretanto, além dessas características citadas, sabe-se que para reparação do complexo dentino-pulpar, os pesquisadores devem considerar a adaptação de vários aspectos, incluindo

revascularização, inervação, interações célula-matriz, incorporação de fator de crescimento, biodegradação controlada, remineralização e controle de contaminação (41). Atualmente, materiais relacionados a formulações do hidróxido de cálcio e MTA, são os materiais mais utilizados como materiais para proteção pulpar (6). Porém, algumas desvantagens são atreladas a esses materiais como o tempo necessário para o reparo, as características do tecido formado e presença de defeitos nos nódulos de mineralização (8, 25, 42). Desta forma, a busca por novos biomateriais que englobem todas as propriedades desejáveis e que apresentem propriedades antimicrobiana e imunomoduladoras permanece (6, 9, 16-18). Assim, pode-se encontrar na literatura estudos que visam o desenvolvimento de novos biomateriais para realização de capeamento pulpar. Entre os estudos, pode-se avaliar a proposta de materiais a base de resina, como avaliado por Yu *et al.* (16), o qual desenvolve um material a base de monômero de amônio quaternário MAE-DB e PC16, com o propósito de aumentar a atividade antimicrobiana do biomaterial (6, 16). Além disso, a união de dois materiais também pode ser observada na literatura. Exemplo disso, Lee *et al.* (43), relatam que a união da sinvastatina e da matriz derivada do esmalte (*Endogain*) pode influenciar significativamente o crescimento e diferenciação odontoblástica em cultura de células pulpares. Resultado semelhante foi encontrado por Karanxha *et al.* (9). Ainda observando estudos que demonstram a junção de dois materiais para adquirir propriedades importantes relacionadas ao capeamento pulpar, observa-se o estudo de Han *et al.* (18), o qual demonstra que a união de MTA com a proteína relacionada ao hormônio paratireoide (107-111), conhecida como osteostatina (OST) pode promover diferenciação odontogênica e mineralização através da ativação da via de sinalização ERK. Outro estudo prévio também demonstrou aumento de propriedades de adesão celular, proliferação celular, diferenciação odontoblástica e angiogênese em células da polpa dentária humana, após união do hormônio do crescimento (GH) ao MTA (44).

## 2.3 MATERIAIS INDICADOS PARA CAPEAMENTO

### 2.3.1 Hidróxido de cálcio

O  $\text{Ca(OH)}_2$  foi introduzido como material para capeamento pulpar a aproximadamente 100 anos, cujo os primeiros estudos para esse fim demonstraram que o processo de reparo era superior quando utilizado o  $\text{Ca(OH)}_2$ , em comparação com um material inerte (45). O  $\text{Ca(OH)}_2$  possui elevada alcalinidade, propriedade que induz a formação de uma camada de necrose por coagulação quando em contato direto com o tecido pulpar (35). Além disso, o elevado pH também induz a liberação de fatores de crescimento dentinário, além de produzir um efeito favorável à ativação da fosfatase alcalina, uma enzima diretamente ligada ao processo de mineralização (46). A partir do pH alcalino, o material pode desempenhar papel na formação de pontes dentinárias reparadoras (47). O  $\text{Ca(OH)}_2$  também neutraliza o ácido láctico segregado pelos osteoclastos e assim pode prevenir a destruição do tecido mineral (48). Estudo realizado por Chen *et al.* (47) demonstra que a via proteíno-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases* – MAP Kinase) estava envolvida na proliferação induzida por  $\text{Ca(OH)}_2$ , além da migração, osteogênese, diferenciação e mineralização em células pulpares humanas. Estas propriedades altamente desejáveis, no entanto, parecem estar interligadas com o efeito adverso da degradação da matriz de colágeno dentro da dentina mineralizada, resultando na redução da resistência à flexão da dentina adjacente (49).

Estudos retrospectivos demonstram que a taxa de sucesso de 5 anos após o capeamento pulpar direto com  $\text{Ca(OH)}_2$  variou de 13% a 82%, sendo que a terapia em pacientes jovens se apresentou mais eficaz (8). Exame clínico mais detalhado sobre capeamento pulpar direto com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou seus compostos revelam que as taxas de sucesso diminuem à medida que os períodos de acompanhamento aumentam (50). Estudos clínicos relatam que 1 a 2 anos após a terapia de polpa vital, taxas de sucesso de mais de 90% podem ser alcançado (50, 51). Depois de 2 a 5 anos, as taxas de sucesso caem de 81,8% para 37% (8, 50). Dez anos após a terapia de polpa vital com uma pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ , o resultado do tratamento é considerado bem sucedido em apenas 13% dos casos (52).

Algumas explicações sobre a diminuição da taxa de sucesso relacionado ao tratamento para capeamento pulpar utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$ , está relacionada com solubilidade, falta de qualidades adesivas, degradação após o ataque ácido e a presença de túneis na ponte dentinária, que permitem que a polpa possa ficar infectada ou necrótica ao longo do tempo (42, 48). Em relação as deficiências relacionadas a baixa aderência a dentina e defeitos na formação, estudo clássico realizado por Cox *et al.* (42) foi avaliado que após a realização de capeamento direto em macacos, 89% das pontes dentinárias apresentavam múltiplos tuneis, porosidade, padrão de crescimento celular aleatório e estrutura desorganizada. Deste modo, os autores concluíram que esses defeitos dentinários não permitiam um selamento eficaz, facilitando um processo de contaminação bacteriana posteriormente (42).

### **2.3.2 Cimentos a base de silicato de cálcio**

Cimentos à base de silicato de cálcio, estão disponíveis como alternativas para o  $\text{Ca(OH)}_2$ . Entre os materiais disponíveis e indicados para capeamento pulpar, à base de silicato de cálcio estão o MTA, Biodentine, cimento Portland (PC), BioAggregate, Endocem e mais dezenas de outros, como citado por Pairokh *et al.* (2018). Entretanto, o mais estudado corresponde ao MTA (53).

#### 2.3.2.1 Agregado de trióxido mineral (MTA)

Dentre os materiais a base de silicato de cálcio, o MTA é o material que se torna cada dia mais difundido na prática endodôntica conservadora (54, 55). O cimento foi introduzido por Torabinejad na década de 1990 e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* para ser usado nos Estados Unidos em 1997 (53). Considerado um cimento endodôntico bioativo, sua composição envolve os elementos silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido de silicato, óxido de bismuto e ainda pequenas quantidades de outros óxidos que modificam as propriedades químicas e físicas (56). Devido a quantidades expressivas de silicato e cálcio, o mecanismo de ação do MTA pode se iniciar, devido ao contato desses materiais com fluidos fisiológicos, ocasionando a formação de hidroxiapatita, fator que pode guiar um

processo de mineralização (14, 57). A presença de íons cálcio, pode desempenhar sua função no processo de mineralização modulando níveis de OPN e proteína morfogenética-2. Estudo prévio demonstrou *in vitro* que os íons de cálcio liberados do MTA desempenham importante papel na diferenciação odontoblástica de HDPCs via modulação de ERK e ativação JNK (58). Outra premissa do mecanismo de ação do MTA corresponde ao fato de hidrólise e troca iônica (59). A hidratação das partículas de silicato tricálcico leva à troca rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  com íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  da solução aquosa da mistura para formar uma interface sólido-líquido. A reação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  com íons  $\text{OH}^-$  derivados da água resulta na formação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , criando um ambiente altamente alcalino (59).

Com esse mecanismo, o MTA desempenha propriedades capazes de facilitar a proliferação e diferenciação de células da polpa dentária em células semelhantes a odontoblastos, induzindo a secreção de proteínas morfogenéticas e fatores de crescimento tais como BMP-2 e TGF- $\beta$ 1, podendo ocasionar um processo de reparo e formação de dentina (56). O MTA pode ser utilizado em várias situações na prática endodôntica, devido a sua citocompatibilidade (55), bioatividade (60), resistência à fuga bacteriana e vedamento (61), além da biomineralização (56). Rodrigues *et al.* (56) demonstraram que o MTA não se apresentou citotóxico, desencadeou processos de mineralização *in vitro* e induziu a expressão de marcadores osteogênicos. Em um estudo clínico, o qual incluiu crianças e adultos de 7 a 45 anos, foi utilizado o MTA para capeamento direto após exposição pulpar por lesões cariosas. Neste grupo, foi observado que a taxa de sobrevivência da polpa foi de 95%, após controle de 5 anos (13). Utilizando um padrão de comparação, estudos demonstram uma superioridade do MTA em relação ao  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (8, 54, 62), assim como demonstrado em estudo retrospectivo, em que o MTA foi utilizado para capeamento pulpar e obteve uma taxa de sobrevivência significativamente maior (80%) do que o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , após um tempo médio de 42 meses (8).

Apesar de inúmeras vantagens atreladas ao MTA, era possível observar algumas desvantagens em relação a primeira geração desse material (8, 13). As principais desvantagens do MTA de primeira geração incluíam um potencial de descoloração dentinária, presença de elementos tóxicos na composição do material, dificuldades no manuseio, tempo longo para presa, alto custo e ausência de um solvente conhecido para este material, o que pode causar uma dificuldade de remoção após presa (14, 63). O MTA contém muitos elementos derivados do cimento portland,

o que inclui arsênico, composto que pode levar significativa toxicidade (14). Porém investigações demonstram que a quantidade de arsênio liberado pelo MTA é muito baixa (64, 65). Devido ao prejuízo estético que o MTA causava quando utilizado em capeamento pulpar direto, indireto e pulpotomias, o fabricante introduziu nova formulação do MTA com coloração esbranquiçada (62). Porém, mesmo após reformulação estudos continuaram demonstrando descoloração dentária após a utilização do material MTA-branco para pulpotomias (62, 66) e estudo *in vitro* demonstra a descoloração dentinária após 3 dias em contato com MTA-branco (67). Marciano *et al.* (2014) demonstraram a capacidade do colágeno em contato com radiopacificadores, como óxido de bismuto ocasionar alteração de cor em estudo *in vitro* (68). Outra importante desvantagem do MTA consiste em seu elevado custo, o que inviabiliza a utilização no sistema público de saúde, não abrangendo grande parte da população (14).

Entretanto, a utilização do MTA está cada vez mais difundida nas práticas de capeamento pulpar (8, 69). Apesar dos resultados satisfatórios com a utilização deste biomaterial, o mesmo passou por evoluções no decorrer dos anos, com aprimoramento de sua manipulação, remoção de componentes que ocasionavam alterações cromáticas dentinárias, como óxido de bismuto (68, 70). Um exemplo disso, corresponde ao biomaterial *MTA Repair HP*, que apresenta como características sua facilidade na manipulação devido presença do plastificador, além de apresentar o tungstato de cálcio, como agente radiopacificador, o que reduz a capacidade de pigmentação dentinária (70). Com a evolução do material, a redução do tamanho de suas partículas, favoreceram ao surgimento de materiais pronto para uso, surgindo o *MTA Putty* (71). Essas novas formulações do MTA ainda são consideradas recentes no mercado e para comparações com outros materiais já consagrados na endodontia, necessitam de mais tempo para estudos.

Afim de superar as desvantagens do MTA, uma série de cimentos endodônticos bioativos têm sido desenvolvidos, por diferentes fabricantes, alegando características semelhantes ao MTA, e incorporação de componentes para redução das deficiências do MTA original (53). Com objetivo de melhora nas propriedades físicas ou como tentativa de diminuir a resposta inflamatória após o tratamento reabilitador, pesquisadores testam a utilização do MTA com outros materiais (6, 9, 43, 72). Estudo prévio *in vivo*, em ratos, foi observado que a combinação do extrato placentário humano ao MTA, levou a um aumento no crescimento celular, na atividade de

fosfatase alcalina, nos nódulos mineralizados, no aumento da migração celular, na formação e expressão gênica angiogênica em comparação com a utilização do MTA sozinho (72). Resultados favoráveis também foram encontrados quando o MTA foi utilizado juntamente com fibrina rica em plaquetas (PRF). Um estudo *in vitro* demonstrou que a união destes compostos promoveram a diferenciação de hDPCs em células semelhantes a odontoblastos através da ativação da via de sinalização BMP, podendo contribuir para regeneração dentinária (58).

Além de observar a junção de dois materiais existentes, também foi observado na literatura a utilização do MTA combinado ao laser CO<sub>2</sub> (73). Estudo realizado *in vitro*, demonstrou que a manipulação do MTA, seguida por aplicação do laser CO<sub>2</sub> foi capaz de aumentar a liberação de íons e diminuir o tempo de presa do material, além de estimular a diferenciação odontogênica em hDPCs (73). Porém, investigação realizada *in vivo*, utilizando cães, comparando a combinação de irradiação laser de baixa potência e capeamento direto com MTA ProRoot, relataram que a irradiação com laser não melhorou respostas ao ProRoot MTA em termos de formação de tecido duro e diminuição de reações inflamatórias (74).

Com o avanço da biotecnologia, a literatura começa a demonstrar pesquisas unindo materiais existentes a biomoléculas, que possuem propriedades importantes no aprimoramento de materiais utilizados para capeamento pulpar. Estudos anteriores relatam o envolvimento da proteína relacionada ao hormônio da tireoide (PTHrP) na formação óssea, o que pode estar atrelado ao seu domínio terminal-N PTHrP (107-111), também conhecido como osteostatina (OST) (75). Com a identificação da propriedade osteogênica da OST os autores Han *et al.* (18) demonstraram a união da OST ao MTA (18). Tal estudo demonstrou que a união do MTA a OST atua promovendo um efeito sinérgico nas hDPCs em comparação com o MTA sozinho. Podendo regular positivamente a expressão gênica odontogênica (18).

Assim, observa-se objetivos incessantes na literatura em busca de um material que aumente as vantagens do MTA ou que atue de forma superior ao MTA, principalmente em aspectos antimicrobianos e que auxiliem na regeneração do complexo dentino-pulpar.

## 2.4 PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Peptídeos antimicrobianos ou peptídeos de defesa do hospedeiro são biomoléculas capazes de participar da defesa imune inata de diversos organismos (76). Os PDHs são produzidos por todos animais complexos, insetos e plantas e geralmente, possuem uma ação direta contra uma gama de microrganismos (77). São moléculas representadas pelas classes:  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , estrutura alongada e de *loop* (76). Os PDHs são, em sua maioria, pequenos (menos de 50 resíduos de aminoácidos), anfipáticos, catiônicos (carga líquida média +3) e com um conteúdo hidrofóbico médio de 42% (78, 79). Os peptídeos também podem ser classificados em naturais ou sintéticos. Como os peptídeos naturais têm uma meia-vida curta, devido à sua rápida degradação causada por cerca de 600 proteases diferentes no corpo humano (80), várias estratégias têm sido utilizadas para produzir análogos estabilizados, preservando as atividades biológicas das moléculas originais. Assim, peptídeos sintéticos estão se tornando mais populares em estudos científicos (81, 82). Este fato se justifica pela capacidade de produzir modificações em suas sequencias, aumentando sua capacidade antimicrobiana, imunomodulatória, ou até mesmo melhora na sua resistência contra degradação (83). Peptídeos sintéticos também podem ser expressos em outros organismos, através das técnicas de expressão heteróloga, permitindo diversas alternativas para as aplicações biotecnológicas destas biomoléculas (84).

De acordo com o banco de dados de peptídeos antimicrobianos - *Antimicrobial Peptide Database* (APD), atualmente 3054 peptídeos naturais e sintéticos foram identificados. Esses peptídeos podem apresentar propriedades antimicrobianas, antibiofilme, antivirais, antifúngico, antiparasitários, quimiotáticos, entre outras aplicações (19). Os PDHs além de participarem ativamente na imunidade inata, também modulam a resposta do sistema imune para promover a depuração de agentes patogênicos, além de diminuir efeitos deletérios da inflamação (20). Do mesmo modo, também podem regular a transição para a imunidade adaptativa e promover cicatrização de feridas (20). Em humanos, as células epiteliais da pele, trato intestinal e saliva produzem numerosos PDHs e proteínas antimicrobianas, para ajudar a proteger contra a contínua exposição a microrganismos ambientais, auxiliando na homeostase da microbiota hospedeira (85, 86).

Dentre os prováveis mecanismos de ação dos peptídeos, a cationicidade e hidrofobicidade são predominantemente observadas. Esses, são dois elementos críticos para a geração de uma estrutura anfipática frequentemente observada, o que permite que os PDHs catiônicos segmentem preferencialmente membranas bacterianas aniônicas ricas em fosfatidilgliceróis (PGs), que leva a uma quebra rápida na função da membrana e subsequente morte celular (79, 87, 88). Diversos mecanismos demonstram que a segmentação de membrana também pode ocorrer através de modelos *carpet*, *barrel-stave* e *toroidal pore*, sendo que o conjunto desses modelos também podem ocorrer respectivamente (89). Outro mecanismo relatado, demonstra que os peptídeos são capazes de se translocar através da membrana e difundir no citoplasma para alcançar alvos intracelulares (23). Esses alvos, podem incluir proteínas, ácidos nucleicos e organelas celulares. Podendo levar a inibição do dobramento de proteínas, atividade enzimática, atividade da mitocôndria e síntese proteica, além de ativar enzimas como autolisinas e acarretar na indução de morte autolítica (90, 91). Em relação as atividades antibiofilme atribuídas a alguns peptídeos, os possíveis mecanismos de ação relacionados a essa característica, correspondem a (a) ruptura ou degradação de membranas das células incorporadas ao biofilme; (b) interrupção dos sistemas de sinalização celular bacteriana; (c) degradação do polissacarídeo e matriz de biofilme; (d) inibição do sistema de sinalização para evitar a resposta rigorosa bacteriana; (e) diminuição da regulação de genes responsáveis pela formação de biofilme e transporte de proteínas de ligação (92).

Anteriormente, todos os PDHs também eram conhecidos como peptídeos antimicrobianos (PAMs). Entretanto, percebe-se que muitos PDHs perdem suas propriedades antimicrobianas em condições fisiológicas, mas contribuem com ações imunomoduladoras, avaliadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (93). Hancock *et al.* (77), relatam que as funções do PDHs vão muito além de proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores, correlacionando que os PDHs, na verdade apresentam papéis essenciais nos eventos de sinalização que ocorrem durante as respostas imunes. Assim, o potencial biotecnológico dos PDHs tem sido estudado como forma de modular resposta a infecções, patologias e regeneração de tecidos, além de possuir um amplo espectro contra microrganismos (94). Desta forma, estas biomoléculas podem ser adotadas como novas possibilidades farmacológicas em muitas áreas de saúde (88).

### 2.4.1 Peptídeos e odontologia

Entre as principais causas que podem levar a perda dentária, lesões cariosas são a principal razão (76). A progressão de tal patologia é motivada pela virulência e proliferação dos microrganismos envolvidos (95). Assim, o controle efetivo das bactérias cariogênicas e do biofilme são de fundamental importância para prevenção do avanço da patologia pulpar, assim levando ao tratamento adequado (96). Diante da capacidade antibacteriana e imunomoduladora dos PDHs, estudos direcionados para odontologia têm sido desenvolvidos, observando um crescente aumento desde 2003 (97). Percebe-se que tais estudos estão concentrados principalmente no processo da cárie dentária e doença periodontal (97).

Vários PDHs naturais foram avaliados no controle de bactérias cariogênicas, entre elas  $\alpha$ -defensina,  $\beta$ -defensina, catelicidina LL-37, histatina 5, lactoferrina humana, nisina e pleurocidina (79, 97-99). Como exemplo,  $\beta$ -defensinas são expressas no epitélio gengival e glândulas e ductos salivares.  $\alpha$ -defensinas podem ser avaliadas em neutrófilos e no fluido crevicular, e também, a LL-37 pode ser observada no epitélio inflamado, nas glândulas submandibulares e na saliva, a qual já foi avaliada por contribuir para a regeneração do complexo dentino-pulpar e nos possíveis processos regenerativos endodônticos (76, 100). A nisina, corresponde a um polipeptídeo com 34 resíduos de aminoácidos, a qual foi demonstrada atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas orais, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecalis* (99). No entanto, a maioria dos PDHs naturais demonstram várias desvantagens para uso clínico, entre eles seu tamanho grande que os tornam difíceis e caros de serem preparados, alta citotoxicidade e propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas deficientes (23). Para contornar esse problema, vários grupos estudam análogos sintéticos ou fragmentos de PDHs naturais, como forma de melhorar capacidades antibacterianas e até mesmo propriedades imunomoduladoras, de uma forma eficiente e menos onerosa (96). Elucidando tal afirmação, Wang *et al.* (96) projetam e sintetizam uma série de peptídeos  $\alpha$ -helicoidais anfipáticos com perspectivas de serem mais curtos, menos citotóxicos e mais potentes do que os existentes contra bactérias cariogênicas.

Em situações onde não é contido o processo de invasão bacteriana na região dentinária, a capacidade de recuperação do tecido pulpar fica prejudicada, podendo ser ocasionada a necrose do tecido (101). O canal radicular necrótico representa um nicho ecológico rigoroso para o crescimento microbiano, devido à diminuição de oxigênio e à disponibilidade de tecidos hospedeiros e fluidos teciduais como fonte primária de nutrientes (102). Diferentes espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Campylobacter*, *Enterococcus* e *Tannerella* são possivelmente encontradas na infecção endodôntica primária (103, 104). Levando em consideração a progressão da patogênese pulpar, estudos com a intenção de melhorar as opções de tratamento e auxiliar na desinfecção do canal radicular vem sendo desenvolvidos. Com esse propósito, Lima *et al.* (105), avaliam a atividade antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora dos PDHs, clavanina A, clavanina A modificada (MO) e LL-37, a qual demonstrou que a LL-37 revelou melhor potencial antibacteriano, contra *E. faecalis*. Outro artigo, demonstra a capacidade dos peptídeos sintéticos VSL2 e VS2 agir contra bactérias disponíveis no canal radicular, como *E. faecalis* e *C. albicans*. Tal investigação demonstrou a possibilidade dos peptídeos VSL2 e VS2, em estudo *ex vivo*, de atingir 400 µm de profundidade em túbulos dentinários, em 24h de tratamento (106). Outro estudo realizado por Wang *et al.* (107) demonstra a capacidade do peptídeo sintético DJK-5 agir em biofilmes de *E. faecalis*, em apenas 3 min.

Além de infecções endodônticas, percebe-se investigações utilizando PDHs na tentativa do controle da doença periodontal. Sabe-se que quando não tratadas, doenças periodontais podem se comunicar com lesões periapicais e formar lesões endodônticas-periodontais, ocasionando impacto direto sobre o prognóstico e tratamento (108). Como exemplo, Dantas *et al.* (109) demonstraram atividade do peptídeo Synoeca MP, em biofilmes envolvendo *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria detectada em biofilme subgingival de pacientes imunodeprimidos com doença periodontal (110). Neste estudo, foi possível observar *in vitro* a atividade antibacteriana da synoeca MP em ação sozinha, porém melhores resultados foram avaliados quando combinado synoeca-MP com clorexidina (CHX), os quais demonstraram eficácia antimicrobiana, além de atividade imunomoduladora, com regulação positiva de MPC-1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além de regulação negativa de NO e IL-10 (109).

Com a intenção de diminuir a progressão da invasão bacteriana e consequentemente patologia do tecido pulpar e tecidos periradiculares, investigações que visam a prevenção ou dissipação do biofilme de microrganismos cariogênicos estão sendo cada dia mais observados. Wang *et al.* (111) demonstraram, em microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura, que o peptídeo IDR1018 pode induzir a morte bacteriana presente em biofilmes orais pré formados e prevenir a formação do biofilme. Utilizando a concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi possível avaliar a prevenção da formação de biofilme após 3 dias. Além disso, em biofilme pré-formado, a mesma concentração ocasionou a morte de 60% das células bacterianas também após 3 dias. Ainda, o tratamento combinado utilizando o peptídeo IDR 1018 e a CHX aumentaram a atividade antibiofilme de cada composto em comparação com seu uso de forma isolada, resultando em morte  $> 50\%$  do biofilme em apenas 3 minutos (111). Outro estudo utilizando o peptídeo DJK-5 na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em biofilmes de *S. mutans*, demonstra a capacidade do peptídeo em eliminar 85% de células bacterianas em 3 dias, e quando utilizados em conjunto com a CHX 88% de células bacterianas foram eliminadas em 3 minutos (112). Tais estudos revelam a possibilidade dos peptídeos se tornarem agentes promissores em estratégias antibiofilmes, fator importante nas diversas áreas da odontologia. Deste modo, devido ao potencial imunomodulador, antibiofilme e indutor de reparo, nos próximos tópicos serão descritos os PDHs de interesse para desenvolvimento do estudo apresentado.

#### 2.4.1.1 IDR1018

O peptídeo IDR1018 deriva-se da classe de reguladores da defesa inata (IDRs). Essa classe é caracterizada por possuir compostos sintéticos, baseados nas sequências de PDHs naturais, ofertando propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas (113). O peptídeo IDR1018 é um derivado sintético de 12 resíduos, apresentando sua sequência de aminoácidos (VRLIVAVRIWRRNH<sub>2</sub>), que se baseia no derivado bovino Bac2a (RLARIVVIRVAR-NH<sub>2</sub>). Usando a sequência de Bac2a como modelo, a sequência de 12 aminoácidos foi gerada através de substituições pontuais, embaralhamento e exclusões (21). Assim, originou-se um peptídeo com ampla gama de atividades biológicas, incluindo funções pró e anti-inflamatórias (21),

atividades citotóxicas e atividade hemolítica mínimas, além de uma potente atividade antibiofilme (22, 23).

Possivelmente, o mecanismo de ação do peptídeo IDR 1018 está na propriedade de desencadear a degradação dos nucleotídeos mensageiros secundários relacionados ao estresse da guanosina tetra e penta fosfato [(p) ppGpp] (114). Esses nucleotídeos possuem papéis importantes na formação e manutenção de biofilmes (21). Assim, justifica-se o fato de muitas vezes encontrar excelentes ações antibiofilme, mas praticamente nenhuma atividade contra bactérias planctônicas ou vice-versa (114). Diante disso, pesquisa demonstra a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) desse peptídeo contra bactérias *S. mutans* e *E. faecalis*, utilizando concentrações de 0 a 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR1018. Foi observado que mesmo na maior concentração testada, o peptídeo não inibiu substancialmente o crescimento planctônico das bactérias testadas. Diferentemente, foi avaliado quando observado a ação desse peptídeo em biofilme dos mesmos organismos em hidroxiapatita, o qual 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi capaz de reduzir 60% da população total de biofilme após 72h (111).

Além de ações antibiofilme, o IDR1018 pode modular o sistema imune e promover depuração de agentes patogênicos (115). Ainda, podem promover a transição da imunidade inata para resposta imune adaptativa e também promover uma cicatrização de feridas (21, 115). Pena *et al.* (115), demonstram a capacidade do IDR1018 de modular sutilmente a diferenciação de macrófagos, promovendo atividade anti-inflamatória, mediados principalmente pela indução local de quimiocinas. Demonstrando a capacidade do peptídeo em promover o amortecimento de respostas pró-inflamatórias, porém mantendo respostas protetoras. Também é possível avaliar em estudo, a capacidade do IDR1018, atenuar a produção de TNF- $\alpha$  em 89%, quando as células foram estimuladas com LPS (116). Outro estudo demonstrou a capacidade do peptídeo em regular a expressão de marcadores de adesão e ativação de neutrófilos a partir da liberação de quimiocinas (117). Em relação a capacidade de reparo, investigação realizada por Steinstraesser *et al.* (118) demonstrou em ensaio *in vivo* que o IDR1018 provoca cicatrização de feridas em período menor de tempo, em murinos não diabéticos com a ferida infectada ou não por *S. aureus*. Estudo prévio também demonstrou a capacidade do peptídeo IDR1018 em induzir proliferação, migração, e expressão de genes reparativos *in vitro* (119). Pesquisas atuais investigam os principais compostos do peptídeo IDR1018 responsáveis em ocasionar

as propriedades antibacteriana e imunomoduladora. Estudo prévio demonstrou a partir dos derivados cíclicos do IDR1018, com base em três diferentes estratégias sintéticas, incluindo ciclização cabeça-cauda (C1), ciclização de cadeia lateral para cauda (C2), e uma ligação cruzada de ligação dissulfeto (C3). Os gerados miméticos mostraram estabilidade proteolítica aprimorada e agregação reduzida *in vitro* e *in vivo*. Ainda, o derivado C2 teve excelentes capacidade para suprimir inflamação e reduzir significativamente as cargas bacterianas em um modelo de infecção cutânea de *Staphylococcus aureus* de alta densidade em murinos (120).

O peptídeo IDR1018 também demonstrou adotar propriedades imunomoduladoras, antibiofilme e possuir um poder de cicatrização de feridas. Desta forma, apresentando propriedades importantes para um material destinado para uso em situações de capeamento pulpar. Assim, levando em consideração a necessidade de indução de reparo para a ocorrência de sucesso na terapia de capeamento pulpar direto, o IDR1018 pode ser um candidato promissor para o estudo.

#### 2.4.1.2 DJK-6

Outro peptídeo relatado também em 2015 pela equipe de pesquisa do professor Hancock, corresponde ao DJK-6 (24). Trata-se de um peptídeo que corresponde a uma versão sintética D-enantiômera derivada do peptídeo IDR1018 e de peptídeos antibiofilmes mais ativos descritos por de la Fuente-Núñez *et al.* (24). O DJK-6 possui sequência de 12 resíduos de aminoácidos (VQWRRIRVWVIR), apresentando peso molecular de 1667,62 Da. Foi criado com objetivo de superar limitações dos peptídeos L-enantiômeros, que envolve a degradação enzimática por proteases do hospedeiro. Assim, devido a versão D-aminoácido do DJK-6, esse peptídeo tende a ser mais ativo e ser resistente a proteases (24), diminuindo a possibilidade de degradação enzimática, pelo próprio hospedeiro durante possíveis terapias (23).

O mecanismo de ação para a sua função antibiofilme pode estar relacionado a degradação de nucleotídeos mensageiros secundários relacionados ao estresse da guanosina tetra e penta fosfato [(p) ppGpp], similar ao peptídeo IDR1018 (24). Como exemplo, estudo demonstra que o peptídeo DJK-6 apresentou capacidade antibiofilme de *Klebsiella pneumoniae* (KpC). E quando avaliado combinações com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, observou prevenção da formação de biofilme superior em relação a

atividade de células planctônicas de KpC (121). DJK-6, também se mostrou ativo na inibição do desenvolvimento e erradicação de biofilmes de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella entérica*. Além disso, esse peptídeo demonstrou forte sinergia com antibióticos convencionais (ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem e tobramicina) reduzindo as concentrações de antibióticos necessários para a inibição completa do biofilme em até 64 vezes (24).

Ainda não se observa na literatura a utilização desse peptídeo para microrganismos envolvidos na doença cárie ou patologia endodôntica. Desse modo, percebe-se a necessidade de estudos investigando a ação antibiofilme e imunomodulatória do peptídeo DJK-6 em microrganismos envolvidos na patologia cárie e sua evolução endodôntica. Assim, o peptídeo DJK-6 correspondeu a um dos peptídeos selecionados para o estudo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos PDHs IDR1018, DJK-6 e a ação conjunta dos peptídeos com extrato de MTA, no processo reparativo do complexo dentino-pulpar.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a melhor concentração dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 (2, 4, 8, 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), além do MTA, através de ensaios antibacterianos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM); ensaio de viabilidade de biofilme jovens; ensaio de viabilidade de células pulpare e o ensaio de migração celular.
- Avaliar o efeito dos peptídeos, MTA e combinação peptídeos com MTA na atividade antibiofilme de biofilmes jovens e maduros de *S. mutans*.
- Definir um sistema inflamatório *in vitro*, através de ensaios de viabilidade celular – MTT, dosagem de óxido nítrico e expressão gênica do marcador inflamatório – TNFRSF-1 por qPCR, após exposição da cultura celular aos estímulos rIFN- $\gamma$ , LPS, a união de ambos e as concentrações de antígeno em conjunto com rIFN- $\gamma$ .
- Após o estabelecimento do sistema inflamatório *in vitro*, avaliar expressão genica por qPCR de IL-6, TNFRSF-1 e GAPDH, após exposição dos peptídeos, MTA e combinação de ambos em cultura pulpar.
- Avaliar a atividade metabólica celular através do ensaio MTT, na concentração definida do peptídeo e do MTA associado ou não ao peptídeo.
- Avaliar a morfologia celular após tratamento com peptídeos (concentração definida), do MTA e da ação conjunta peptídeo e MTA, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar o efeito dos peptídeos, MTA e combinação de ambos na proliferação e migração de células pulpare.

- Analisar a expressão dos genes envolvidos na diferenciação odonto/osteogênica e biomineralização utilizando a técnica de PCR em tempo real, após tratamento com peptídeos, MTA e associação de ambos.
- Avaliar o potencial dos peptídeos, MTA e combinação de ambos em promover a diferenciação celular e estimular a biomineralização por meio da análise da atividade da fosfatase alcalina e quantificação de fosfato.
- Avaliar a formação de nódulos de mineralização pelo teste *Alizarin-red*, após tratamento com peptídeos, MTA e associação de ambos.

## 4. METÓDOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo baseia-se na avaliação do potencial antimicrobiano, imunomodulador e reparativo, dos PDHs DJK-6 e IDR1018 e sua associação com MTA em cultura pulpar primária. Para esse fim, o trabalho foi dividido em 6 fases: Fase I: definição da concentração dos peptídeos e do MTA. Fase II: Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme. Fase III: Definição de sistema inflamatório *in vitro* e atividade imunomodulatória. Fase IV: Efeitos da combinação dos PDHs com MTA e fase VI: Diferenciação celular e biomineralização (Figura 2).

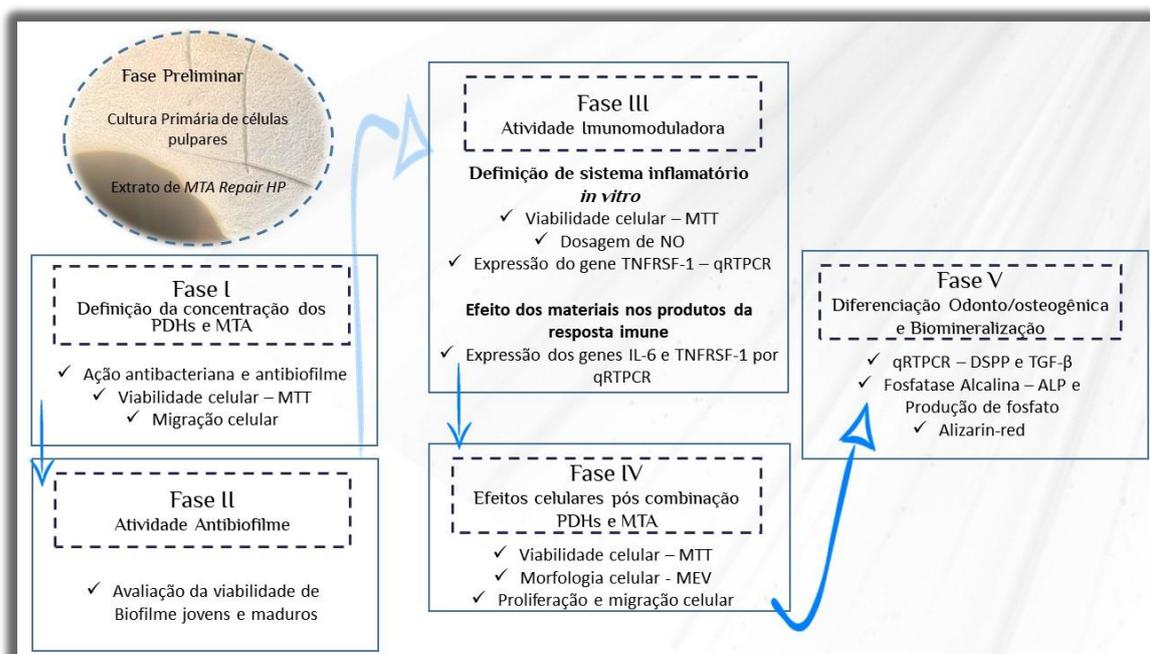


Figura 2 – Esquema representativo do desenvolvimento da pesquisa.

## 4.2 Amostras populacionais

Pacientes encaminhados à cirurgia na clínica odontológica integrada, da Universidade Católica de Brasília (UCB) foram convidados a participar da pesquisa. Primeiramente, os pacientes passaram por uma triagem onde foi realizada anamnese. Em seguida, foi realizado exame clínico intrabucal e extrabucal para avaliação e confirmação da necessidade da realização de exodontia. Este projeto foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa em humanos da UCB, sob número CEP-UCB CAAE: 728741700000029 (Anexo 4). Todos pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do elemento dentário extraído para pesquisa científica.

### 4.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes de ambos sexos foram incluídos e encaminhados para exodontia de terceiros molares hígidos, com indicação de exodontia por razões ortodônticas, traumatismos de tecido mole, ausência de antagonista ou posição inadequada para erupção. Estes indivíduos participaram da pesquisa em casos de ápice aberto, inclusos ou semi-inclusos, doados de pacientes com idade superior a 18 anos.

### 4.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes com idade inferior a 18 anos, com terceiros molares afetados com lesões cariosas ou doença periodontal.

## 4.3 OBTENÇÃO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA DOS DENTES EXTRAÍDOS

Após a realização da extração dentária, foi realizado um sulco na junção amelo-dentinária, utilizando broca cirúrgica *ZeKrya* (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) em alta rotação e sob refrigeração, com cautela para não ocasionar a exposição do tecido pulpar ou manipulação radicular. Após, os dentes foram alocados em um tubo tipo *falcon* contendo 10 mL de *Meio Eagle Modificado por Dulbecco - DMEM (Gibco®*,

Grand Island, NY, *EUA*), com 200  $\mu\text{L}$  de fungizone anfotericina B (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, *EUA*) e 10  $\mu\text{L}$  de gentamicina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) (122). O conjunto foi transportado ao laboratório da unidade de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas (CAPB), da Universidade Católica de Brasília (UCB).

#### **4.3.1 Cultura primária de célula pulpar – técnica *explant/outgrowth***

A remoção dos tecidos moles residuais e cimento utilizando curetas periodontais foi realizada em câmara de fluxo laminar (Neumar, São Paulo, SP, Brasil). Após, os dentes foram fraturados utilizando um esculpador *Hollenback* nº 03 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil). Consequentemente, as polpas dentárias foram removidas com auxílio de pinça (Golgran) e limas endodônticas tipo K 15 ou 10 (*Dentsply Maillefer*, Ballaigues, Suíça). O conteúdo pulpar foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após, a polpa foi seccionada com auxílio de lamina de bisturi e transferido para placa de 6 poços, cultivadas em meio DMEM, contendo alto teor de glicose (25 Mm), 50 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e 20% de SFB. Posteriormente, a placa foi transferida para uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 37 °C. Após a confluência, a monocamada de células foi removida das placas por meio da incubação com 300  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina a 0,5% (p/v) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, *EUA*) e 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (*Sigma Aldrich*) durante 2 min a 37 °C. Em seguida, as células foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL (*Corning*), centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e transferidas para garrafas pequenas, contendo meio DMEM, suplementado com 2 nM de glutamina, 50 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e 10% de SFB. Essas células foram subcultivadas até a obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (123). Cada subcultivo foi considerado uma passagem celular. Em virtude da senescência celular, foram utilizadas células entre a segunda e sexta passagens (124).

#### 4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS E MTA

Os peptídeos utilizados foram sintetizados pela *Peptide 2.0* (Chantilly, Virginia, EUA), com grau de pureza >95 %. A confirmação da massa molecular e pureza foi analisada por espectrometria de massas MALDI-TOF (Anexo 1A e 1B). Para os experimentos, os peptídeos foram pesados e diluídos em água ultrapura milli-q. Como biomaterial comparativo, o MTA *REPAIR HP* (Angelus, Paraná, Brasil) (125) foi manipulado de acordo com as normas do fabricante.

#### 4.5 PREPARO DO EXTRATO DE MTA

O MTA *Repair HP* (Angelus, Brasil) pesando 0,085g foi dividido em quatro partes iguais. Cada porção, contendo 0,02125g, foi pesada em balança de precisão. A seguir, cada porção foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Cada porção de MTA misturado foi inserida em um poço de uma placa de 24 poços (16,2 mm de diâmetro e 2 mm de altura) e incubada a 37 ° C, por 30 min (126). Após o tempo de presa, 2,5 mL de meio foram adicionados [meio DMEM suplementado (Sigma), Meio de infusão de cérebro e coração (BHI) (Sigma) ou meio de caldo limitado em nutrientes Todd Hewitt (BM2) (fosfato de potássio 62 mM (VETEC, Brasil), 7 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VETEC), 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma), 10 µM FeSO<sub>4</sub> (VETEC) e 0,5% de glicose (Sigma)]. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24h, de acordo com a Organização Internacional de Padronização (ISO) 10993-5. Após 24h de contato do MTA com o meio, o sobrenadante de cada poço foi unido, totalizando 10mL. Então, filtrado com filtros estéreis de 0,22 µm. Após essa filtração, o novo meio foi denominado MTA 1:1 ou MTA não diluído. A partir do meio MTA 1:1, maiores diluições de 1:2 e 1:4 foram criadas (17, 126). Os extratos de MTA foram analisados por *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) (Anexo 2). O início do preparo do extrato foi confeccionado no dia anterior de cada experimento e filtrado no dia da realização do ensaio. Além disso, foi realizada a checagem de pH de 30 min até 72h, a qual variou de 9.22 até 6.99.

#### 4.5.1 Manipulação do peptídeo adicionado ao MTA

Após obtenção do extrato de MTA cada poço referente a cada ensaio, recebeu a concentração de MTA estabelecida. Ensaios utilizando a conjugação de MTA e peptídeos, foram realizados após experimentos de definição de concentração. Então a concentração de peptídeo estabelecida foi adicionada em cada poço (18).

#### 4.6 FASE I - DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ESCOLHIDOS

Para definição da concentração dos peptídeos a serem testadas para realização dos experimentos que combinam PDHs e MTA, foram utilizados os ensaios antibacterianos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM); ensaio de viabilidade de biofilme jovens; ensaio de viabilidade de células pulpare e o ensaio de migração celular. Para todos os ensaios para seleção de concentração foram avaliados os peptídeos DJK-6, IDR1018 avaliando as concentrações 2 até 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o biomaterial MTA (1:1, 1:2 e 1:4). Após a realização dos experimentos citados, foram selecionadas as concentrações com melhores resultados utilizando as menores concentrações que produziram ação antibacteriana e antibiofilme, não foram citotóxicas para culturas pulpare e ocasionaram melhor migração.

##### 4.6.1 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos e do MTA

A avaliação antimicrobiana foi avaliada seguindo protocolo de ensaio de inibição de crescimento por micro diluição em caldo, segundo *national committee for clinical laboratory standards* (NCCLS), utilizando bactéria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), mas anteriormente foi necessário estabelecer a curva de crescimento da bactéria testada.

#### 4.6.2 Avaliação da curva de crescimento e determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria *S. mutans*

A curva de crescimento da bactéria *S. mutans*, foi realizada a partir de uma colônia pré-inoculada e incubada em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi, Paraná, Brasil) a 37 °C, 220 rpm, por uma noite. Posteriormente, 15 µL do pré-inóculo foi adicionado para cada 5 mL de meio BHI e incubado a 37 °C, em 220 rpm. Foi realizada leitura por densidade óptica (D. O.) desse inóculo a cada hora, cujo 100 µL da suspensão foi inserido em cada poço (triplicatas) e realizado leitura em leitor de microplacas (*BioTeckPowerWave* HT, EUA), em 595 nm. O crescimento da bactéria *S. mutans* foi avaliado até a D. O. ser estabilizada. A cada hora, o inóculo em meio sólido também foi realizado. Para isso, 100 µL da suspensão foram submetidas a 10 microdiluições seriadas (1:10) em solução salina (0,85% NaCl) e *Tween 20* (0,2%) estéril. A técnica de microgota foi realizada, a partir das microdiluições, 3 microgotas (2 µL cada) de cada diluição foi inoculada em placas contendo meio BHI ágar (Kasvi, Brasil). As placas foram inoculadas por 24h, em 37 °C. Prosseguindo para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Assim, foram correlacionados os valores da D. O. com as UFC (127) (Anexo 3).

#### 4.6.3 Concentração inibitória mínima dos peptídeos e do MTA

Pré-inóculo de três colônias de *S. mutans* foi realizado em 5 mL de caldo BHI (Kasvi, Brasil) a 37 °C, 220 rpm, *overnight*. Posteriormente 100 µL do pré-inóculo foi adicionado em 4.900 mL de meio BHI e incubado a 37 °C em 220 rpm, incubada até atingir a absorbância de 0,25 – 0,30 nm em uma leitura de comprimento de onda de 595 nm. Nessa absorbância foi considerado uma concentração de  $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Assim, com o pré-inóculo em fase logarítmica, o ensaio foi reproduzido em meio BHI, na concentração de  $2 \times 10^5$  UFC por poço para concentrações testadas dos peptídeos e do MTA. As concentrações analisadas para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 corresponderam ao intervalo de 2 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>. Para o grupo do MTA, foram avaliadas proporções do extrato, correspondendo o valor de 1:1, 1:2 e 1:4. Os seguintes controles foram utilizados para esse experimento: a) bactéria *S. mutans* em meio BHI; b) bactéria *S. mutans* em meio

BHI adicionados a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina (128); c) meio BHI sem o acréscimo de nenhum outro fator, correspondendo ao branco. Os grupos foram preparados em triplicatas biológicas e triplicata técnica em placas de cultura de 96 poços (TPP, EUA) incubada por 18 h, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação média em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), com leituras a cada 30 min a 595 nm. A CIM ou CBM foram determinadas a partir do crescimento microbiano nos pontos da metade da fase logarítmica curvas de crescimento realizadas previamente (abs 0,25 – 0,30), comparados aos controles positivo e negativo (129).

#### **4.6.4 Avaliação da viabilidade do biofilme jovem dos PDHs DJK-6, IDR1018, MTA e ação conjunta dos peptídeos com MTA**

##### 4.6.4.1 Atividade em biofilme jovem

Ensaio antibiofilme foram realizados com um pré-inóculo de *S. mutans* em meio BHI (Sigma)  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 220 rpm, durante a noite. A suspensão bacteriana foi diluída em meio mínimo BM2 a 1/100 v / v por poço e cultivada em placa de 96 poços com fundo em U a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 24h. Biofilme pré-formado foi exposto as concentrações de 2 a  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos PDHs DJK-6 e IDR1018, extratos de MTA nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4 (Angelus, Brasil) e uma combinação de ambos materiais. Posteriormente, para avaliar a viabilidade do biofilme, 100  $\mu\text{L}$  de meio BM2 e 10  $\mu\text{L}$  de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma) foram adicionados a cada poço, e as microplacas incubadas por 4 h, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  na ausência de luz. Após a solubilização completa do produto celular, a absorbância foi lida a 570 nm. O controle positivo foi representado por cloranfenicol ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e bactérias *S. mutans*, como controle negativo (96).

#### **4.6.5 Ensaio da viabilidade por MTT de células pulpares após exposição dos PDHs e MTA**

O ensaio de viabilidade celular, foi realizado em cultura pulpar após o período de 24 e 72h. Foram avaliados a viabilidade de células pulpares, após a exposição dos

PDHs DJK-6 e IDR1018 em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O biomaterial MTA nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4, também foram avaliados. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de MTT. Para tanto, foi removido o meio de cultura, de células cultivadas 24h h antes em placas de 96 poços (TPP, EUA), e em seguida adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMEM e 10  $\mu\text{L}$  de solução MTT (Sigma), em uma concentração de 5  $\text{mg.mL}^{-1}$ . As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37 °C, pelo tempo de 4h. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido – DMSO 100% foi adicionado e a placa lida em leitor de ELISA, em absorvância de 570 nm (130).

#### **4.6.6 Ensaio de migração celular – método *scratch***

Neste ensaio, as células pulpares ( $2,5 \times 10^5$  células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (Prolab) em meio DMEM (GIBCO), suplementado com 100  $\text{U.mL}^{-1}$  de penicilina (Invitrogen) e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  estreptomicina (Invitrogen) e 10% de SFB, mantidas até formação de uma monocamada confluenta. Após, algumas das células confluentes foram removidas da cultura de tecidos, com uma ponta de micropipeta de plástico com um orifício grande, reproduzindo uma ferida. As células restantes foram lavadas três vezes com meio citado anteriormente. Então, meio contendo concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dos PDHs DJK-6 e IDR1018, além do extrato de MTA (1:1, 1:2, 1:4) foram adicionados. Neste momento, o meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com 50  $\text{U.mL}^{-1}$  de penicilina e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina isento de SFB. As culturas foram incubadas e monitoradas por até 48h. Fotografias com auxílio de microscopia foram realizadas nos tempos de 0, 24 e 48h, para posteriormente serem analisadas, tratadas e contabilizadas com auxílio do *software Image J* (NIH, Bethesda, MD) (123).

## 4.7 FASE II - EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO PEPTÍDEOS E MTA NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA APÓS CONCENTRAÇÃO DEFINIDA

A atividade antibiofilme foi realizada em duas situações: biofilmes pré-formados jovens em placas de fundo em U e biofilmes maduros em disco de dentina. Os controles foram representados por cloranfenicol ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e bactérias *S. mutans*.

### 4.7.1 Atividade em biofilme jovem

Após definição das concentrações dos PDHs e diluição do MTA, novos ensaios antibiofilme foram realizados. Inicialmente foi realizada avaliação antibiofilme dos PDHs, MTA e combinação de ambos em biofilmes pré-formados por 24h em placa de 96 poços com fundo em U. O mesmo protocolo descrito anteriormente, para avaliação da viabilidade de biofilme jovem foi realizado (96).

### 4.7.2 Atividade em biofilme maduro

Quatorze terceiros molares, com coroas livres de cárie foram usados no estudo para preparação dos discos de dentina para realização de cultura de biofilme formado em 7 dias, nomeado como biofilme maduro. As coroas dos dentes foram cortadas transversalmente com uma máquina de corte de disco diamantado no limite do corno pulpar. Foram utilizados discos de 1 mm de espessura e 4 mm de diâmetro. Um disco de cada dente foi obtido, e todo o esmalte adjacente foi removido. Os discos foram tratados com EDTA 0,5 M por 60 s para ambos os lados e, a seguir, lavados com água destilada em abundância. Posteriormente, os discos foram embalados individualmente e esterilizados em autoclave (vapor saturado sob pressão). Após autoclavagem, os discos de dentina foram inseridos no fundo de uma placa de 24 poços. Sequencialmente, a suspensão bacteriana de *S. mutans* (ATCC 25175) foi diluída em meio BHI a 10/990 v / v por poço e cultivada em disco a 37 °C, por 7 dias. Após o tempo decorrido, o disco de dentina e o biofilme foram removidos do poço e lavados suavemente com PBS e, em seguida, inseridos em uma nova placa de 24 poços. O biofilme foi exposto aos PDHs, extratos de MTA (Angelus, Brasil) e

combinação de ambos por 24h. A bactéria *S. mutans* em meio BHI foi o controle positivo. Após 24h, o disco foi lavado em PBS duas vezes para remover o meio de cultura e as células não aderentes. Em seguida, a superfície do disco foi corada com 50 µL de kit de viabilidade bacteriana *live/dead baclight* composto de SYTO 9 e iodeto de propídio (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA). Em seguida, foram incubados em temperatura ambiente por 10 min; eles foram lavados com PBS e observados usando um microscópio de varredura a laser confocal invertido (Leica TCS-SPE; Leica Biosystems CMS, Mannheim, Alemanha). Cinco capturas de imagens foram feitas de cada amostra com uma lente de óleo 40x. Cada imagem era representativa de um campo de 275 x 275 µm<sup>2</sup>. As imagens foram então transferidas para o *software Imaris 7.2* (*Bitplane Inc*, St Paul, MN). A ferramenta de análise de biofilme foi utilizada para avaliar os 5 campos de cada amostra. O teste foi realizado em duas repetições de indivíduos, conduzidas em dias diferentes. Os resultados para cada grupo geraram uma média única, representativa de 10 campos de duas amostras biológicas (96).

#### 4.8 FASE III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS E DO MTA

##### 4.8.1 Preparo dos antígenos microbianos mortos pelo calor

O microrganismo *S. mutans* (ATCC 25175) foi selecionado para este estudo e utilizado na forma de antígeno morto pelo calor, como relatado em estudos prévios (131, 132). Desta forma, o preparo do antígeno envolveu a coleta de colônias recém repicadas que foram ressuspensas em tampão PBS (separadamente) e quantificadas por D.O. Posteriormente, estes foram aquecidos a 121 °C, durante 50 min e posteriormente armazenados a -20 °C. A morte destes microrganismos foi confirmada a partir de inoculação de uma alíquota de cada antígeno em meio líquido e nova incubação por 24h (133).

#### **4.8.2 Definição dos estímulos utilizados para reprodução de sistema inflamatório**

Anteriormente a realização dos ensaios definitivos, foram realizados experimentos para determinar a concentração e os estímulos necessários para realização de um sistema *in vitro* que se assemelhe ao processo inflamatório pulpar.

##### 4.8.2.1 Viabilidade celular – MTT

Para avaliação da concentração de antígeno a ser utilizada em células pulpares, foram avaliadas as concentrações de  $1 \times 10^6$  até  $1 \times 10^8$  (UFC por poço). Foram utilizadas como controle negativo, células pulpares expostas ao meio de cultura. Como controle positivo, as células pulpares foram expostas ao meio de cultura e solução de lise (10 Mm Tris, pH 7,4, 1 Mm EDTA e 0,1% triton X-100). Também foram testados os estímulos rIFN- $\gamma$ , LPS, a união de ambos e as concentrações de antígeno em conjunto com rIFN- $\gamma$ . Após foi realizado o ensaio de viabilidade celular durante 24 e 72h, utilizando o método de MTT, como mencionado anteriormente.

##### 4.8.2.2 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de nitrito nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pelo método de *Green* (134), com adaptações. Foram transferidos 100  $\mu$ L dos sobrenadantes de cultura para placas de 96 poços (TPP, EUA), acrescidos de 100  $\mu$ L de DMEM (Gibco, EUA) suplementado nos poços da curva padrão de nitrito de sódio. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico 2,5% e naftiletilenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada leitura em leitor de microplacas (*Bio-Tek PowerWave HT*, EUA), a 490 nm. A quantidade de nitrito foi calculada a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio (1,5625  $\mu$ M a 200  $\mu$ M) (134).

#### 4.8.2.3 Análise da expressão gênica do marcador inflamatório – TNFRSF-1 por qPCR

Os níveis de RNA mensageiro do Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1 – TNFRSF-1 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH foram avaliados por qPCR após 24h da cultura celular exposta ao LPS, IFN- $\gamma$ , LPS + IFN- $\gamma$ , concentrações de antígeno morto pelo calor de *S. mutans* em concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  (UFC por poço), além das mesmas concentrações adicionadas a IFN- $\gamma$ . O método utilizado correspondeu a PCR em tempo real com *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) nas condições recomendadas pelo fabricante. Cada reação teve um volume final de 10  $\mu$ L, consistindo em: 0,5  $\mu$ L de *TaqMan® Small RNA Assay* (20X); 0,66  $\mu$ L de cDNA; 5  $\mu$ L de *TaqMan® Universal PCR Master Mix II* (2x) e 3,83  $\mu$ L de água sem nuclease com a sonda *TaqMan®* (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific - KIT q-PCR Assay). Ao final desses ciclos, os resultados foram analisados para determinar a diferença na expressão de miRNA nas amostras testadas. Os níveis relativos de expressão no grupo experimental foram calculados por  $\Delta$  ( $\Delta$ CT) ( $\Delta$ CTControle -  $\Delta$ CTExperimento) (135).

#### **4.8.3 Efeito dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos com MTA nos produtos da resposta imune**

Após o estabelecido do sistema *in vitro* envolvendo a utilização do interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e lipopolissacarídeos (LPS), os efeitos dos peptídeos, MTA e combinação de peptídeos e MTA foram observados em todas essas condições simuladas. Assim, as células pulpareas foram semeadas em triplicatas biológicas em placas de 6 poços com meio DMEM suplementado, a uma densidade de  $2,5 \times 10^5$  células / poço e estimuladas com IFN- $\gamma$  e LPS por 24h. Após esse período, peptídeos, MTA e uma combinação de ambos peptídeos e MTA foram expostos às células pulpar por 24h. Posteriormente, os níveis de RNA mensageiro de Interleucina IL-6, TNFRSF-1 e GAPDH foram avaliados com o sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA), nas condições recomendadas pelo fabricante.

## 4.9 FASE IV – EFEITOS DA RESPOSTA CELULAR APÓS COMBINAÇÃO DO MTA E PEPTÍDEOS

### 4.9.1 Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos, MTA e do peptídeo em conjunto com extratos do MTA em células pulpareas - MTT

Após a definição das concentrações dos PDHs e do MTA, novos ensaios para avaliar a viabilidade celular após exposição dos materiais em 24, 48 e 72h foram realizados, utilizando o método de MTT. Porém nesse momento foram adicionados novos grupos, correspondendo aos grupos dos PDHs em conjunto com extrato de MTA. Para este experimento, os grupos controles foram representados por: a) Célula pulpar primária e meio de cultura suplementado com SFB 10%; b) Célula pulpar primária, meio de cultura suplementado com SFB 10% e solução de lise (10 Mm Tris, ph 7,4, 1 Mm EDTA e 0,1% triton X-100) (136).

### 4.9.2 Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação da morfologia celular após tratamento com os peptídeos DJK-6, IDR1018, MTA e peptídeo adicionado ao MTA foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7000F *Scanning Microscope*, JEOL, EUA). Para isso, lamínulas de vidro quadradas com 18 mm x 18 mm (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) foram posicionadas na base da placa de 6 poços (Prolab, São Paulo, SP, Brasil), antes do cultivo das células. Em seguida, 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB foi inserido, seguindo pelas células ( $2 \times 10^5$ ). Após 24h, foi realizada a inserção dos peptídeos e do material MTA que permaneceram por mais 24h. Após esse período, a lamínula foi fixada em glutaraldeído 2,5% por 24h, seguindo por duas lavagens com cacodilato de sódio. Posteriormente, as células foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 30 min em capela e realizado desidratação em solução de acetona 30, 50, 70, 95 e 100%. Após secagem da lamínula, esta foi metalizada e analisada em microscópio eletrônico de varredura (JMST33A *Scanning Microscope*,

JEOL, EUA) (57). As imagens foram captadas em aumentos de 300x, 1500x e 3000x para avaliação da morfologia celular da cultura pulpar primária.

### **4.9.3 Efeito dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA na proliferação e migração de células pulpares**

#### 4.9.3.1 Proliferação de células pulpares

Células pulpares ( $1 \times 10^4$  células / poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, por 24h. Em seguida, a cultura foi exposta aos PDHs, extrato de MTA *Repair HP* e combinação de ambos. As culturas celulares foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 e 48h. A proliferação celular foi avaliada usando a coloração *Trypan Blue* (Sigma) 0,4%, então as células foram contadas imediatamente, utilizando câmara de Neubauer (Brand GmbH, Wertheim, Alemanha) sob um microscópio com ampliação de 40X, após as células serem recuperadas por tripsina (0,025%) e EDTA (0,01%) (137). Todas as contagens foram realizadas, utilizando a média de três réplicas técnicas e biológicas de cada amostra em cada tempo experimental e comparadas com o número celular inicial do experimento (137).

#### 4.9.3.2 Ensaio de migração celular – método *scratch*

Após definição das concentrações dos PDHs utilizadas, novo ensaio de migração celular foi realizado. Neste momento, as células pulpares foram expostas aos PDHs, MTA e combinação de ambos, por 24h e 48h. O método foi conduzido conforme relatado anteriormente (123).

#### 4.10 FASE V - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS, MTA E PEPTÍDEOS EM CONJUNTO COM MTA NA DIFERENCIAÇÃO ODONTO/OSTEOGÊNICA E BIOMINERALIZAÇÃO

As células pulpares foram cultivadas em placas de 6 poços em densidade de  $5 \times 10^4$  (célula/poço) por 14 dias em meio de cultura odonto/osteogênico, PDHs, MTA e união de ambos. Meio de cultura contendo alto teor de glicose (25 mM) e suplementado com  $50 \text{ U.mL}^{-1}$  de penicilina,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e 10% de SFB (meio de cultura padrão), foi utilizado como meio de controle negativo. Células cultivadas com meio de diferenciação odonto/osteogênica contendo meio DMEM suplementado com  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  de dexametasona (Sigma Aldrich®),  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®) e  $2,16 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol 2-fosfato dissódico (Sigma Aldrich®) (138), foram utilizadas como controle positivo. Posteriormente procedimentos para realização de qPCR foram conduzidos.

##### 4.10.1 Análise da expressão gênica de marcadores de biomineralização

A expressão gênica de DSPP e TGF- $\beta$  foram avaliados por PCR em tempo real com *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific)*.

###### 4.10.1.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

Após estimulação com DJK-6, IDR1018, extrato de MTA e extrato de MTA com os peptídeos, as células foram coletadas para a extração de RNA total pelo método de trizol (*ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA*). Para isso, após 14 dias foi utilizado 1000 $\mu\text{L}$  de Trizol em contato direto com a cultura celular. As amostras foram homogenizadas, mantidas a temperatura ambiente por 5 min e centrifugadas a 2.100 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (*ThermoFisher Scientific*). As amostras foram homogenizadas e mantidas a temperatura ambiente, por 10 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 4 °C, a 8.000 rpm, por 20 min. Após a centrifugação, a fase

aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (*ThermoFisher Scientific*). A mistura foi homogeneizada com auxílio de aparelho vortex e incubada no gelo, por 10 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Então, 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado ao *pellet*, e o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado; o *pellet* de RNA mantido a temperatura ambiente até secagem final e por fim, o *pellet* foi ressuspensão em 30  $\mu\text{L}$  de água *RNase free* (*ThermoFisher Scientific*) (139).

#### 4.10.1.2 Quantificação e pureza do RNA total

O RNA total foi quantificado utilizando o método de Qubit (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*, Califórnia, EUA). Para isso 1  $\mu\text{L}$  do fluoróforo foi adicionado a 199  $\mu\text{L}$  do tampão. Após homogeneização foi removido 1  $\mu\text{L}$  da reação e adicionado 1  $\mu\text{L}$  da amostra testada. Então a mistura ficou acondicionada em ambiente com ausência de luz, em temperatura ambiente por 2 min. Após foi realizada leitura no equipamento Qubit, resultando na concentração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a partir do volume inicial de amostra (1  $\mu\text{L}$ ). Em conjunto com a quantificação por Qubit também foi utilizado espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE), para avaliar a qualidade das amostras utilizadas e possíveis contaminantes. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Razões entre 1,7 e 2,2 foram consideradas adequadas (37, 135).

#### 4.10.1.3 Síntese de cDNA

Em seguida, DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 450 ng de RNA. Em conjunto com RNA, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  do mix preparado com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (*Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific*). Utilizando o Kit, foi adicionado 3,2  $\mu\text{L}$  de água *RNase free* (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*); 2  $\mu\text{L}$  do *Buffer RT 10X* (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*); 0,8  $\mu\text{L}$  do mix de dNTP 25X (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*); 2  $\mu\text{L}$  de *Random Primers RT 10X* (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*); 1  $\mu\text{L}$  do Inibidor de

RNAse 20U/ $\mu$ L (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*); e 1  $\mu$ L de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen™ *ThermoFisher Scientific*). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao ciclo de temperatura em um termociclador: 10 min a 25 °C; 120 min a 37 °C; 5 min a 85 °C e 4 °C até que as amostras fossem retiradas do termociclador e armazenadas em freezer a -20 °C (135).

#### 4.10.1.4 PCR em tempo real

A análise de expressão gênica foi realizada por qPCR com *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific*). A fim de verificar a expressão de genes indicativos de diferenciação odontogênica e mineralização dentinária foram avaliados a expressão dos genes DSPP, TGF- $\beta$  e GAPDH, como gene constitutivo. A reação de quantificação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação apresentou um volume final de 10  $\mu$ L, sendo composto por: 0,5  $\mu$ L de *TaqMan® Small RNA Assay (20X)*; 0,66  $\mu$ L de cDNA; 5  $\mu$ L de *TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2x)* e 3,83  $\mu$ L de Água Nuclease free com a sonda *TaqMan® (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific - KIT q-PCR Assay)*. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da enzima *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*), a 95 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C, durante 1 s para desnaturação do DNA e 60 °C, durante 20 s para emparelhamento e polimerização do iniciador. Os resultados foram analisados com base nos valores de CT, tal valor refere-se ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente chegue o limiar de detecção escolhido. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram transferidos para planilhas para realização da análise por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (135). Foi utilizada água desionizada destilada como controle negativo de cada par de sonda de iniciadores (135).

#### **4.10.2 Produção de fosfatase alcalina**

A atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) foi medida pelo método colorimétrico de p-nitrofenil fosfato (pNPP), usando o kit de atividade de dietanolamina de fosfatase alcalina (Sigma). Após 14 dias de contato celular com o meio

osteogênico, HDPs e MTA, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em 0,05% Triton X-100 por 20 min em temperatura ambiente, sob agitação. As células foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, agitadas por 20 s, centrifugadas por 15 min a 4 ° C e 2500 rpm, e mantidos em gelo por 20 min. Alíquotas de lisado celular foram incubadas com p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato a 37 ° C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de NaOH 1N, e a absorbância foi medida em 405 nm usando o espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA). Normalização de alcalino a atividade da fosfatase foi mantida pela proteína total avaliada pelo método Qubit (140).

#### **4.10.3 Quantificação de fosfato**

A determinação da concentração de fosfato foi verificada a partir do sobrenadante das culturas de células pulpares após 14 dias experimentais em condições osteogênicas. O teste foi realizado com o *kit Phosphate Colorimetric Assay* (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de fosfato foram expressos em nanomolar (nM), após comparação com a curva padrão proposta pelo kit (0 – 5 nMol) (141).

#### **4.10.4 Avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo método de Alizarin-red**

Após 14 dias de exposição das células pulpares ao meio odonto/osteogênico e aos PDHs, MTA e união de ambos, a formação de nódulos de mineralização foi avaliada pela coloração *Alizarin Red* (Sigma). Para isso, após 14 dias o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e posteriormente as células foram fixadas em formaldeído a 4% por 15 min. Logo após, foram enxaguadas com PBS e coradas com 40 mM de reagente de coloração com vermelho de alizarina por 30 min sob agitação. As células foram lavadas quatro vezes com água destilada. As amostras resultantes foram analisadas qualitativamente e fotografadas em microscópio invertido (140). Para uma análise quantitativa, uma proporção de 4:1 de ácido acético a 10% (Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) e metanol (Dinâmica) foi adicionada

a cada poço para dissolução dos nódulos calcificados. Em seguida, o sobrenadante foi avaliado por espectrofotômetro em absorbância de 405 nm (142).

#### 4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. Somente o ensaio para avaliação da viabilidade de biofilmes maduros, foram realizados em duplicata. Os resultados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão para cada experimento. Em seguida foi realizada a verificação de normalidade (teste de *Kolmogorov Smirnov*) e posterior estatística paramétrica, mediante a análise de variância de um fator (*one way ANOVA*) e quando necessário *two way ANOVA*. As análises foram consideradas a um nível de significância de 95%. A análise estatística foi realizada no *software Graph Pad Prism 5* (Califórnia, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA ESCOLHA DOS PEPTÍDEOS E DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS CELULARES

#### 5.1.2 Avaliação da CIM e CBM dos peptídeos DJK-6, IDR1018 e do biomaterial MTA

Os peptídeos DJK-6 e IDR1018, além do MTA foram analisados quanto a sua atividade de inibição da bactéria *S. mutans* (ATCC 25175). Observou-se que nenhum peptídeo testado demonstrou atividade antibacteriana contra bactéria *S. mutans* em estado planctônico, até a concentração máxima testada de 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, o biomaterial MTA *Repair HP* não demonstrou eficácia antibacteriana contra *S. mutans*, em nenhuma diluição testada (Tabela 1).

<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)		
Material testado	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$ )	CBM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$ )
IDR1018	>256/167	>256/167
DJK-6	>256/ 153	>256/153
MTA (1:1)	ND	ND
MTA (1:2)	ND	ND
MTA (1:4)	ND	ND

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos IDR1018, DJK-6 e do biomaterial MTA contra o microrganismo *S. mutans in vitro*. Os controles positivos foram cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) estão representadas em  $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$ . ND – não detectado.

### 5.1.3 Avaliação da viabilidade do biofilme em diversas concentrações dos PDHs DJK-6, IDR1018, do biomaterial MTA e ação conjunta dos PDHs com MTA

Quando o biofilme jovem pré-formado foi exposto a 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, uma redução de 76,8% e 89,8%, respectivamente do biofilme foi observado. Notou-se diferença estatística entre as concentrações de 4 a 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 com as concentrações de 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  deste mesmo peptídeo (Figura 3A). Além disso, percebemos uma redução da viabilidade bacteriana em todas as concentrações testadas (4 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), quando comparado ao controle negativo, cultura de *S. mutans* em biofilme, na ausência de tratamento.

Em relação ao peptídeo IDR1018, observou-se que as concentrações de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  deste peptídeo reduziram 85% e 87% do biofilme, respectivamente. No entanto, concentrações, menores deste peptídeo (8 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), reduziram apenas 27% e 29%, respectivamente do biofilme (Figura 3B), avaliando diferenças estatísticas entre as menores concentrações testadas com as maiores, 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além do mais, tais concentrações (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não apresentaram diferença estatística em relação ao controle positivo (Figura 3B).

Quando avaliado o extrato do biomaterial MTA foi possível observar uma redução de 92% do biofilme, quando este foi utilizado na proporção de 1:1. Porém, quando analisado proporções menores do mesmo extrato (1:2 e 1:4), percebeu-se redução de 62% e 60% do biofilme, respectivamente. Notou-se que não há diferença estatística do extrato de MTA na concentração de 1:1 com o controle positivo, diferente do que se observou nas menores concentrações testadas (Figura 3C).

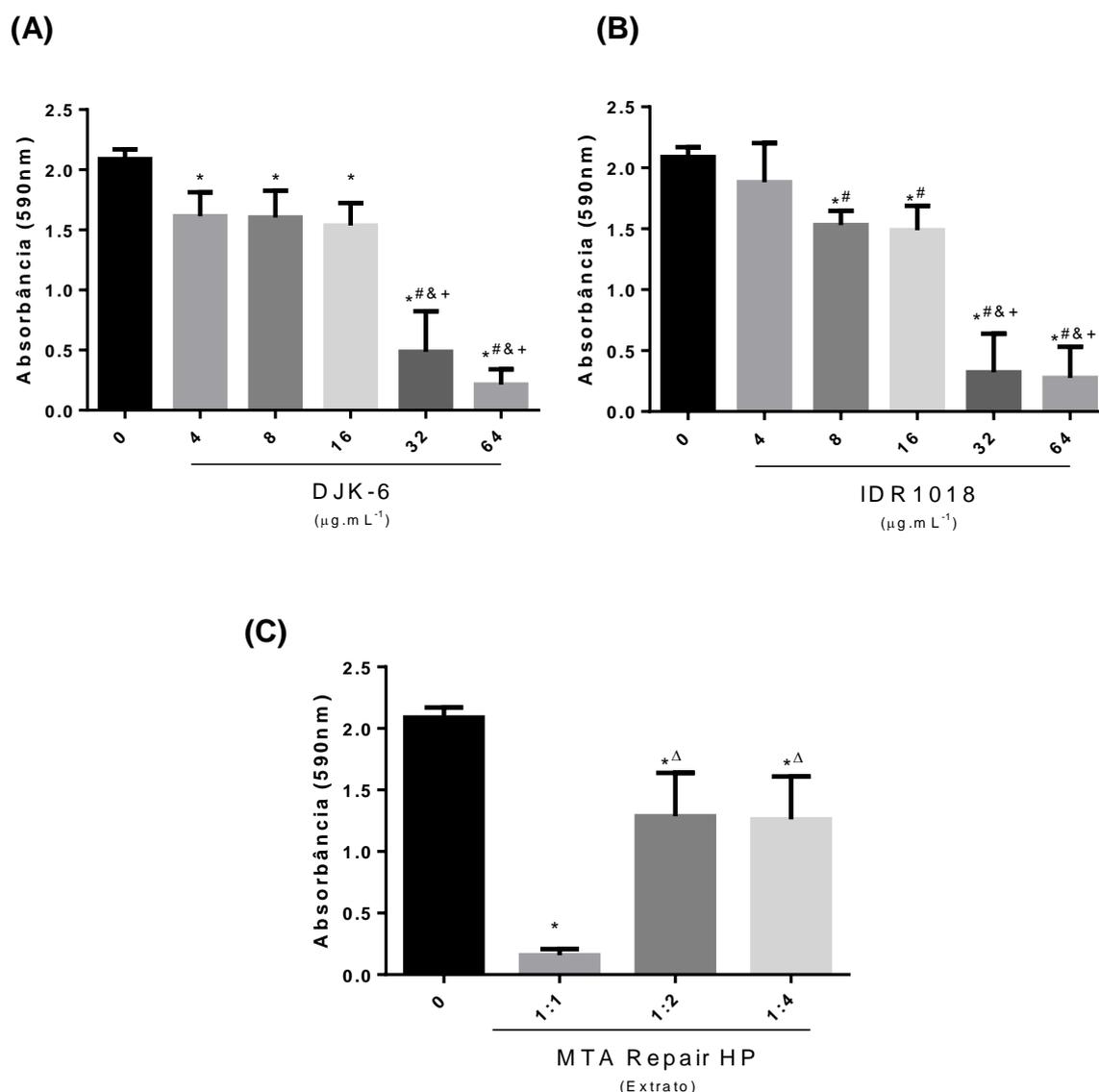


Figura 3 – Viabilidade do biofilme jovem de *S. mutans* após exposição dos peptídeos DJK-6 (A), IDR1018 (B) e do biomaterial MTA (C). O controle positivo foi representado pela cultura bacteriana na presença do cloranfenicol  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\delta$ ) em relação a concentração de  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\gamma$ ) em relação a concentração de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\Delta$ ) em relação ao MTA (1:1). Diferenças estatísticas verificadas pelo teste one-way ANOVA e pós teste Tukey's.

Após avaliar a atuação efetiva dos peptídeos DJK-6, IDR1018 e do biomaterial MTA contra biofilme de *S. mutans*, foi proposto a análise dos peptídeos em conjunto com o extrato do MTA, a fim de verificar se ocorreria maior ação antibiofilme.

Analisando os dados obtidos após esta junção, percebeu-se que ocorreu redução de 92% do biofilme na presença de extratos do MTA com o peptídeo DJK-6

na concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Também foi observado que quanto maior a concentração do peptídeo nesta associação, maior a redução do biofilme. De modo que não foram observadas diferenças estatísticas comparando-se o controle positivo com os grupos contendo extratos do MTA com DJK-6 nas concentrações de 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estas concentrações de peptídeo nesta associação, levaram a reduções de 95%, 96% e 97% do biofilme (Figura 4A).

Ao avaliar a adição do peptídeo IDR1018 ao extrato do MTA, percebemos maior redução do biofilme à medida que a concentração do peptídeo foi aumentada. Assim, notou-se que a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  promoveu uma redução de 99,4% do biofilme, após 24h de exposição. Também não foram observadas diferenças estatísticas dos grupos contendo extrato de MTA com o peptídeo IDR1018 nas concentrações de 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com o grupo controle positivo. Notaram-se diferenças estatísticas entre os grupos contendo extratos de MTA e o peptídeo IDR1018, nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com os grupos que continham 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo (Figura 4B).

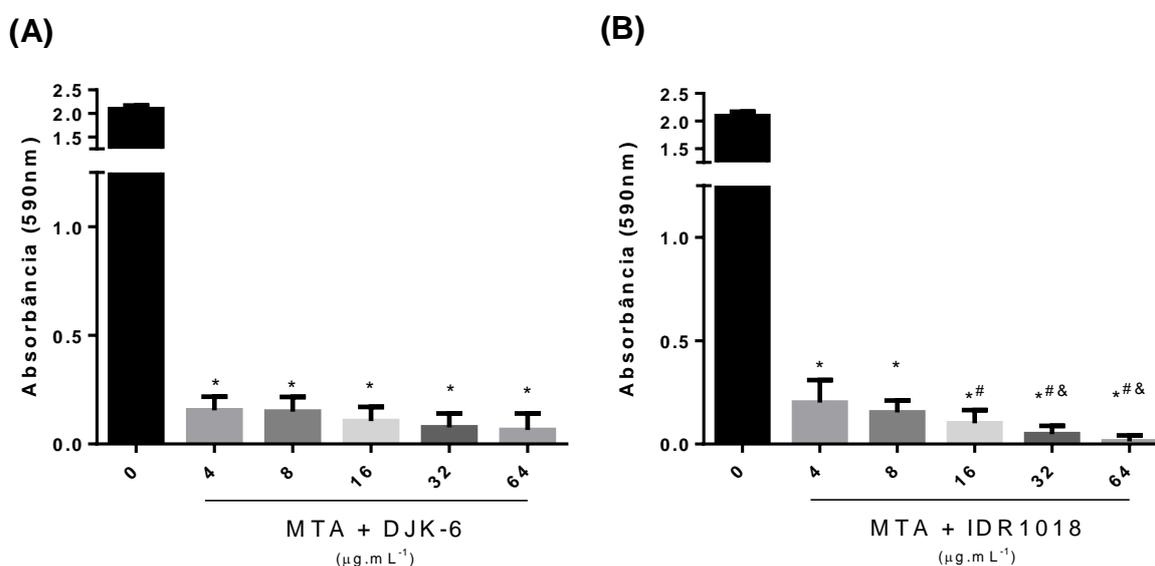


Figura 4 – Viabilidade do biofilme jovem de *S. mutans* após exposição dos peptídeos DJK-6 (A), IDR1018 (B), em conjunto com MTA. O controle positivo foi representado pela cultura bacteriana na presença do cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\delta$ ) em relação a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\gamma$ ) em relação a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ( $\Delta$ ) em relação ao MTA (1:1). Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

Percebendo a capacidade antibiofilme da conjugação do biomaterial MTA com os peptídeos, notou-se a necessidade de comparar se tal redução do biofilme seria diferente da atuação apenas do extrato do MTA (proporção 1:1). Deste modo, observou-se que a presença de 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de DJK-6 no extrato do MTA, levou a 61% e 69% de reduções do biofilme, respectivamente, em comparação com extratos do MTA (proporção 1:1) (Figura 5A). Em adição, quando 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR1018 foram adicionados ao extrato do MTA, percebeu-se reduções do biofilme em 76% e 98%, em relação ao extrato de MTA (Figura 5B).

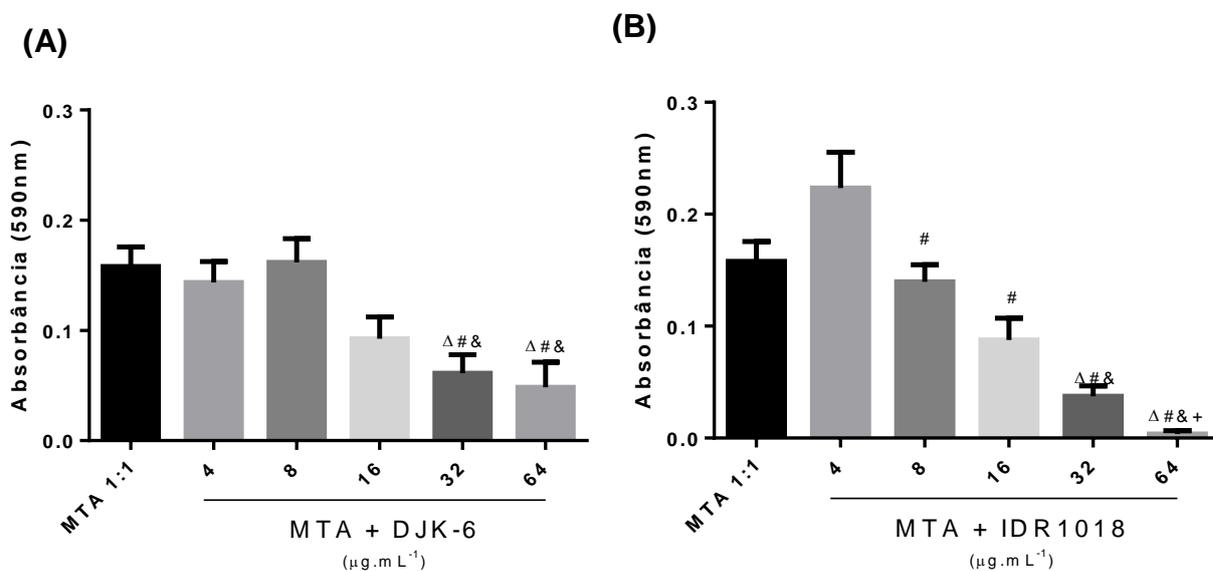


Figura 5 - Média de absorbância do biomaterial MTA avaliado em conjunto com peptídeos DJK-6 e IDR1018 contra o microrganismo *S. mutans in vitro*. Análise comparativa com o biomaterial MTA na concentração de 1:1. O controle positivo foi representado por cloranfenicol 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle negativo, apenas pela bactéria *S. mutans*, em meio BM2.  $p < 0,05$  foi representado por (\*) quando a diferença estatística foi em relação ao controle negativo; (#) em relação a concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (&) em relação a concentração de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (+) em relação a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (δ) em relação a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (γ) em relação a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (Δ) em relação ao MTA (1:1). Todos os gráficos representam médias e erro-padrão da absorbância de três réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

#### **5.1.4 Viabilidade celular após exposição de diferentes concentrações dos PDHs e do MTA**

Afim de avaliar a viabilidade celular após inserção de cada peptídeo em diferentes concentrações (2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foi realizado o ensaio de MTT. Observou-se que na presença do peptídeo DJK-6, a viabilidade celular foi mantida, em ambos os tempos avaliados (Figura 6A e 6B). Entretanto, pode-se destacar que na presença do peptídeo IDR1018, a viabilidade celular foi diminuída na medida que a concentração do peptídeo foi aumentada. Assim, observou-se redução significativa da viabilidade celular em 16% na concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 25% na concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 23% na concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Contudo, notou-se indícios de recuperação celular após 72h de incubação, retornando à viabilidade celular a valor similar ao controle (Figura 6C e 6D).

Além da análise da viabilidade celular na presença dos peptídeos de modo independente, também foi avaliada a viabilidade celular na presença de extratos do MTA nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4, separadamente. Observou-se manutenção da viabilidade celular independente da concentração e período de exposição testados (Figura 6E e 6F).

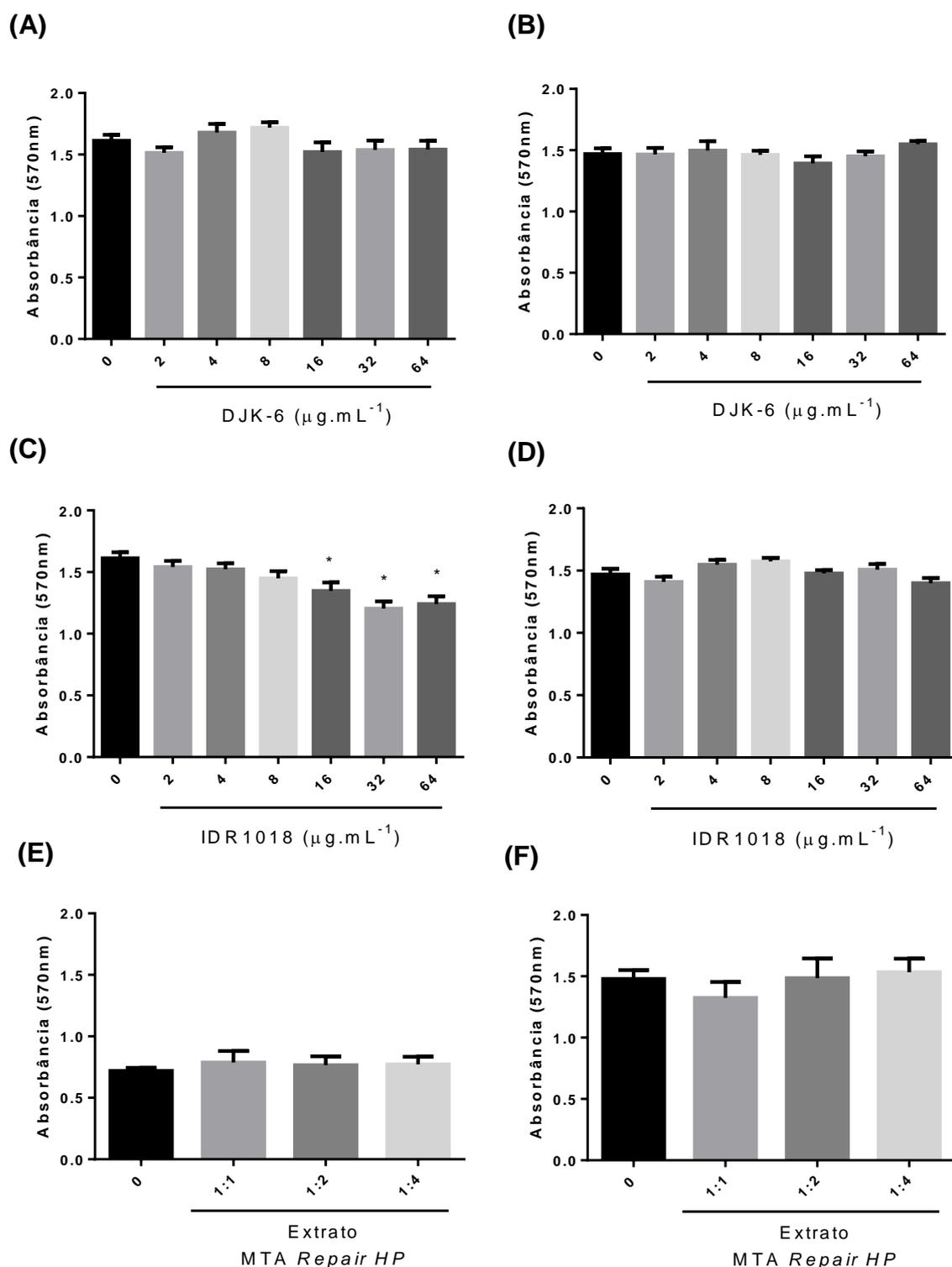


Figura 6 - (A) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo DJK-6, por 24h. (B) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo DJK-6, por 72h. (C) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo IDR1018, por 24h. (D) Viabilidade celular após exposição celular ao peptídeo IDR1018, por 72h. (E) Viabilidade celular após exposição celular ao extrato de MTA, por 24h. (F) Viabilidade celular após exposição celular ao extrato de MTA, por 72h. Todos os gráficos representam médias e erro-padrão da absorbância de três réplicas biológicas em triplicatas. (\*) representam diferenças estatísticas entre os grupos em comparação com o grupo de célula pulpar, quando  $p < 0.05$ . Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

### **5.1.5 Ensaio de migração na presença do peptídeo DJK-6, IDR1018 e do extrato do biomaterial MTA analisados de forma independente**

Cada peptídeo e o extrato do MTA foram avaliados separadamente, em tempos de 24 e 48h. O valor absoluto de células migradas para o interior da ferida foi contabilizado e correlacionando a sua concentração. Tal análise pode ser analisada por gráficos, conforme demonstrado em cada tópico e nas figuras dispostas após cada tópico.

### **5.1.6 Ensaio de migração na presença do peptídeo DJK-6**

O ensaio para análise de migração de células pulpares *in vitro* para determinação da concentração de peptídeo a ser utilizado demonstrou que em comparação com o controle, observou-se aumento de 53%, 89% e 82% na taxa migratória, quando o peptídeo DJK-6 foi utilizado nas concentrações de 8, 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em 24h (Figura 7A e 8). Porém, esse aumento apresentou declínio, na medida que ocorreu aumento da concentração do peptídeo testada para 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentando aumento de 43% na taxa de migração celular, em relação ao controle. Em 48h, observou-se o mesmo padrão de migração, notando aumento de 59% e 49%, na taxa de migração, na presença das concentrações de 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, quando comparado ao controle. Também foi observado um declínio na taxa de migração na presença de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, observando aumento de apenas 16%, quando comparado ao controle (Figura 7B e 8).

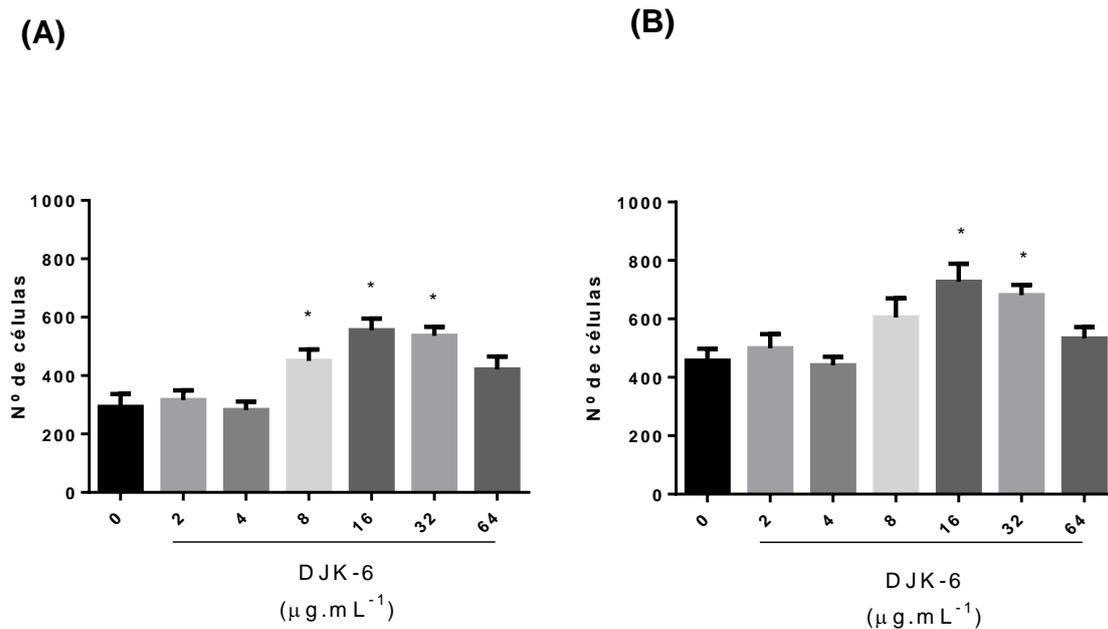


Figura 7. Avaliação do comportamento migratório de cultura de células pulpares primárias exposta ao peptídeo DJK-6. (A) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida utilizando o peptídeo DJK-6, nas concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , no tempo de 24h. (B) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida após 48h.  $p < 0,05$  foi representado por (\*), comparado com o grupo de célula pulpar sem estímulo. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

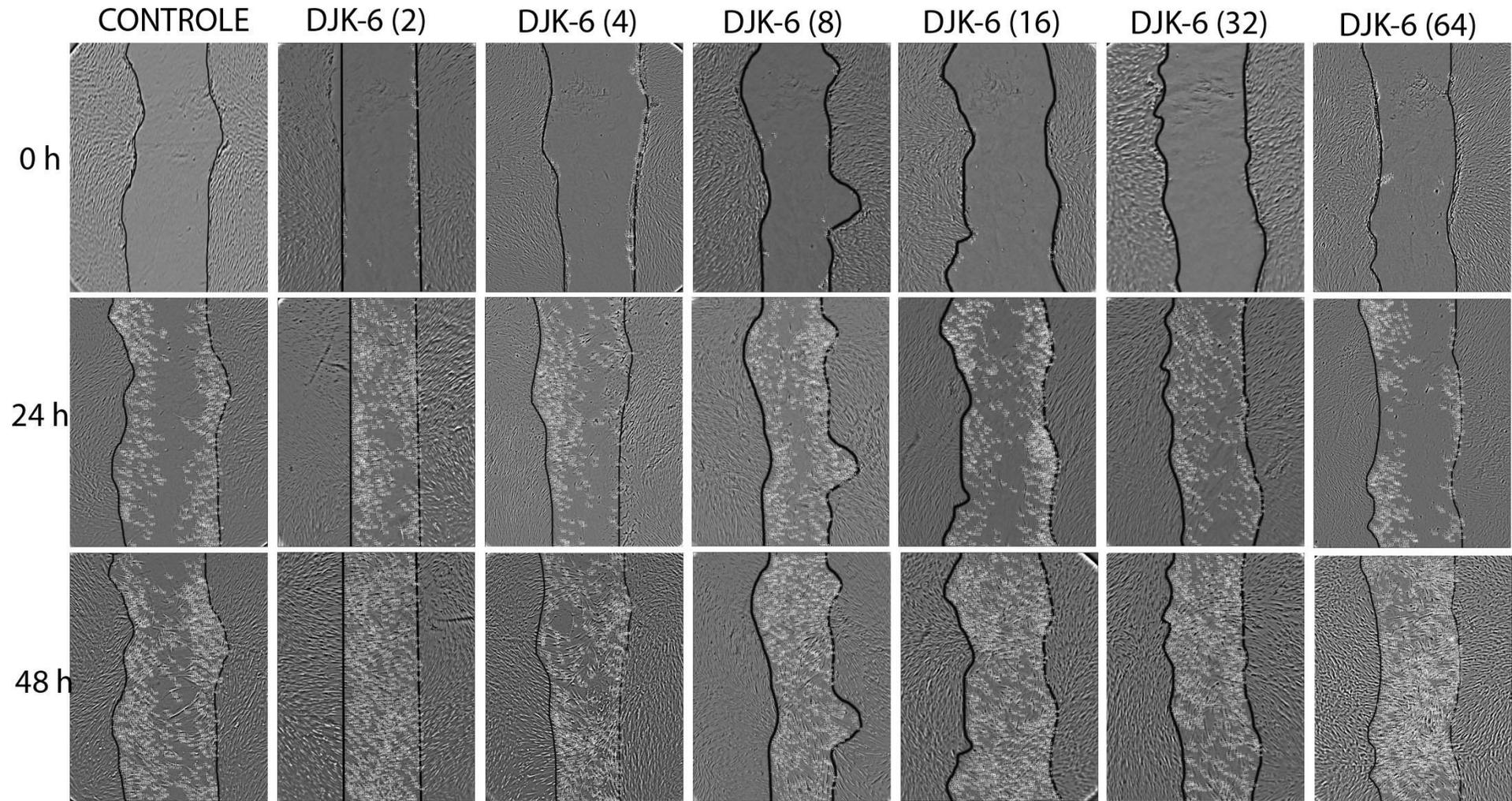


Figura 8 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com peptídeo DJK-6, em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.

### 5.1.7 Ensaio de migração na presença do peptídeo IDR1018

Os ensaios para análise de atividade migratória de células pulpares, quando em contato com o peptídeo IDR1018 demonstraram que quanto maior a concentração desse peptídeo na cultura de células pulpares primárias, menor foi a capacidade de migração dessas células *in vitro*, quando comparado com controle. Observou-se maior migração celular quando as culturas foram incubadas com  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  deste peptídeo, após 24h, correspondendo a um aumento de 50%, quando comparado ao controle (Figura 9A e 10). Quando avaliada a migração após 48h, observou-se diminuição de 92% na taxa de migração celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR1018 (Figura 9B e 10).

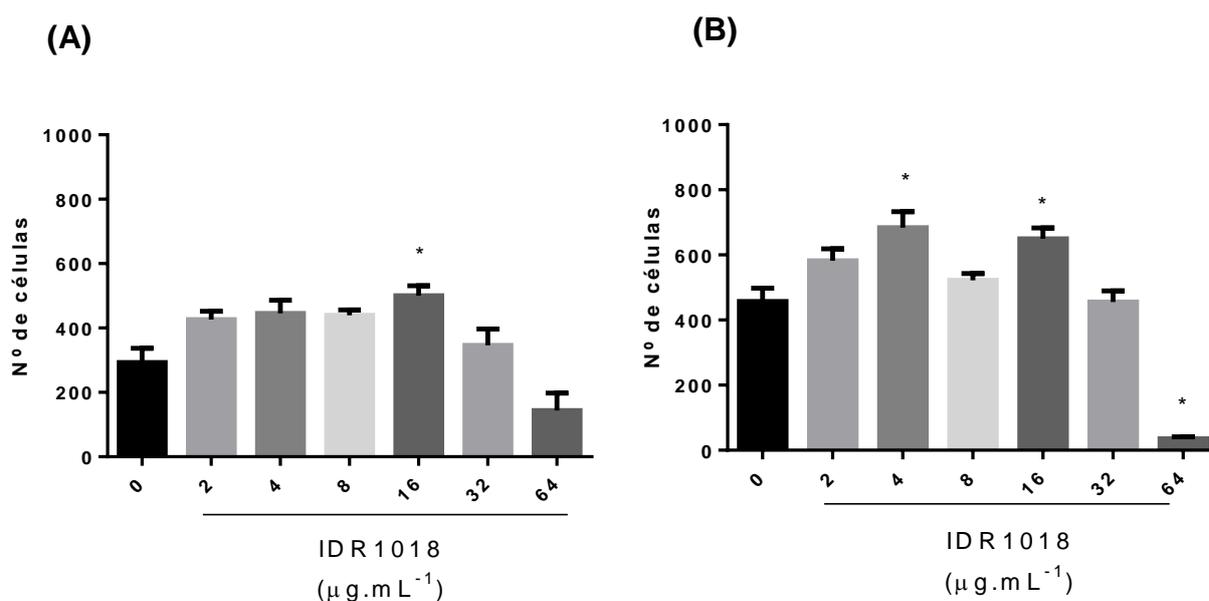


Figura 9. Avaliação do comportamento migratório de célula pulpar primária quando exposto ao peptídeo IDR1018.  $p < 0,05$  foi representado por (\*), comparado com o grupo de célula pulpar sem estímulo. (A) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida utilizando o peptídeo IDR1018 nas concentrações de 2 a  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 24h. (B) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida no tempo de 48h. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way ANOVA* e pós teste Tukey's .

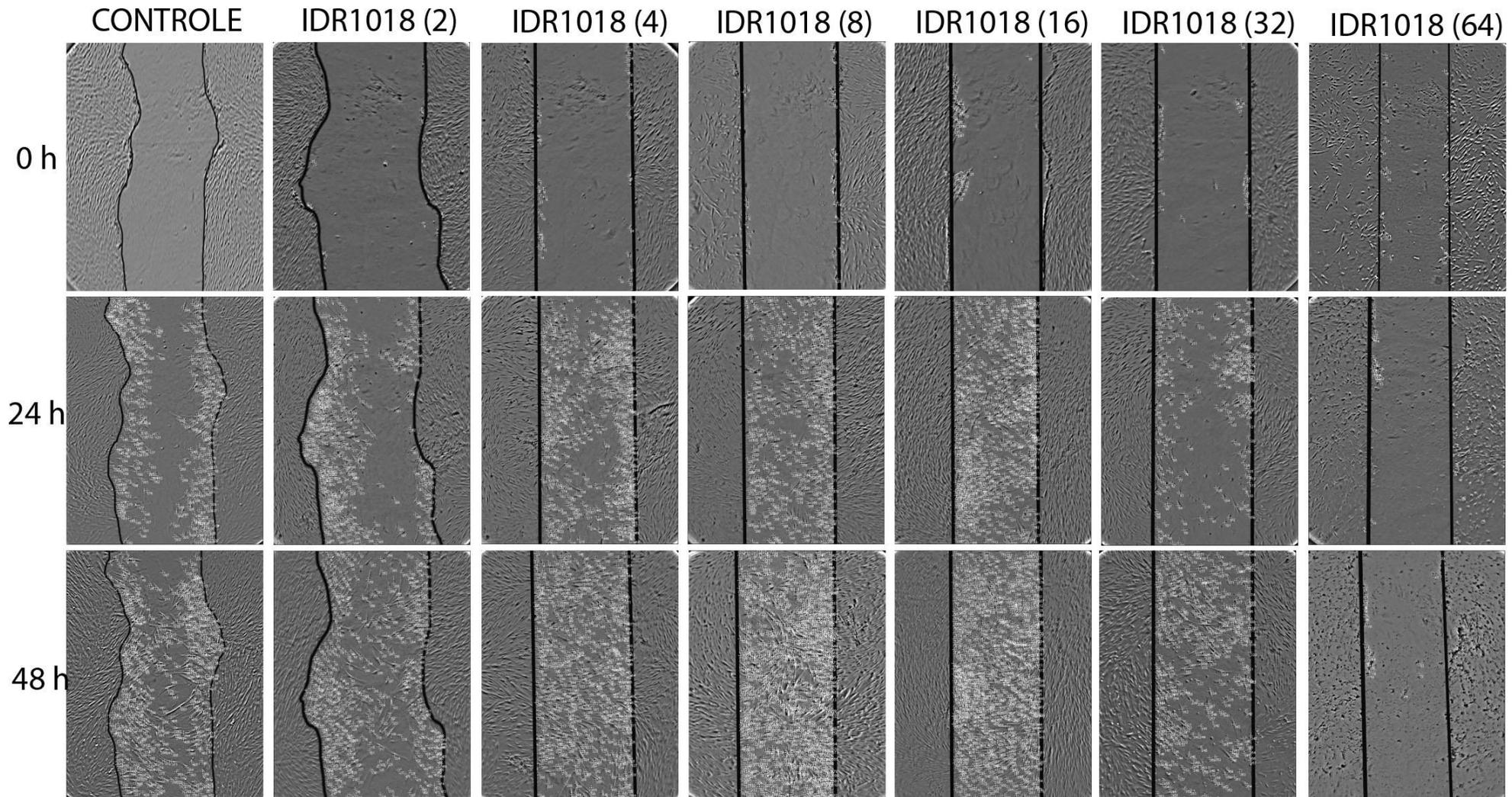


Figura 10 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com peptídeo IDR1018, em concentrações de 2 a 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.

### 5.1.8 Ensaio de migração na presença de extratos do MTA

Notou-se que quanto mais concentrado o biomaterial, menor foi a característica migratória celular em relação ao controle. Observando que a concentração de 1:1 do biomaterial migrou de forma semelhante ao controle. Porém, quando o extrato do biomaterial foi diluído 1:2 e 1:4, observou-se um aumento na taxa de migração celular, totalizando taxas de 51% e 42%, respectivamente em relação ao controle, após 24h (Figura 11A e 12). Padrão semelhante ocorreu após 48h de incubação, o qual observou-se aumento nas taxas de migração de 34% e 51%, nas proporções de 1:2 e 1:4 do extrato do MTA, respectivamente (Figura 11B e 12).

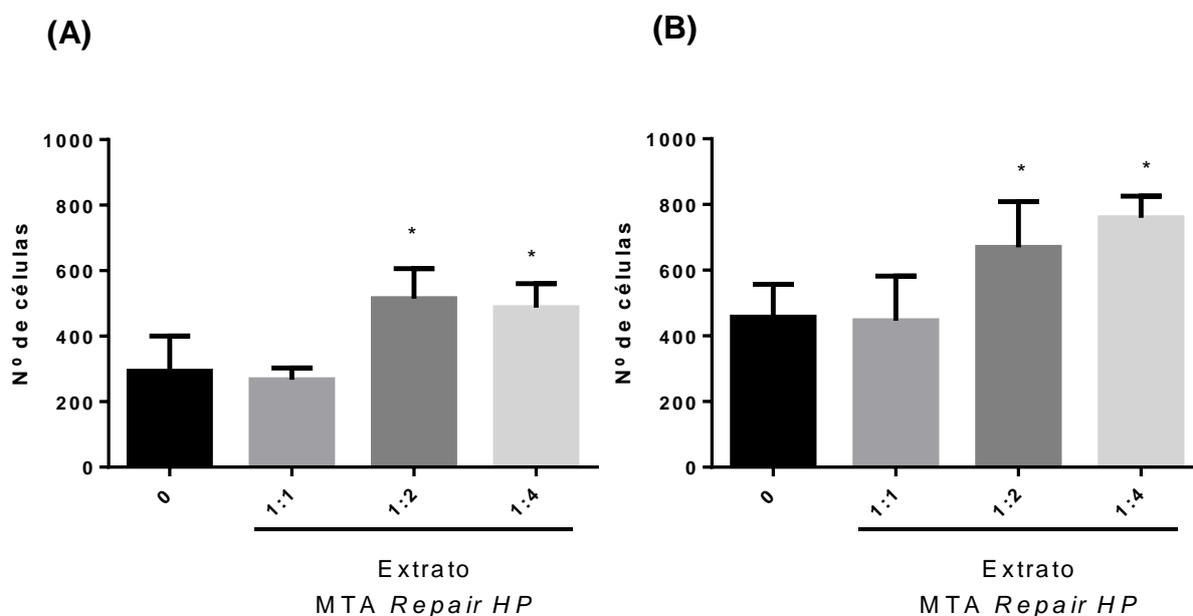


Figura 11. Avaliação do comportamento migratório de célula pulpar primária quando exposto a extratos do biomaterial MTA. (A) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida utilizando extratos do biomaterial nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4, no tempo de 24h. (B) Avaliação do número de células migradas para o interior da ferida no tempo de 48h.  $p < 0,05$  foi representado por barras, comparado com o grupo de célula pulpar sem estímulo. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way ANOVA* e pós teste Tukey's.

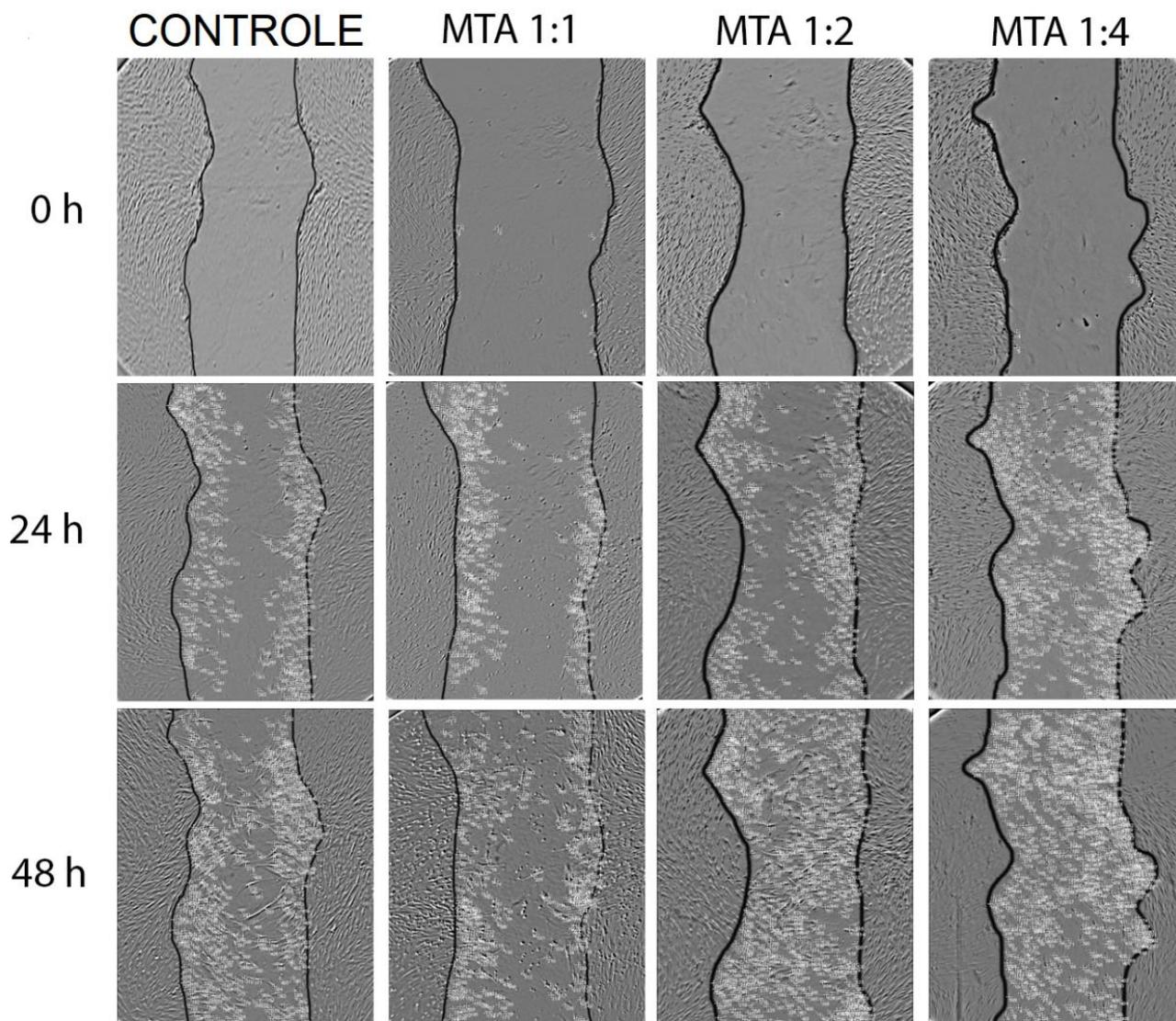


Figura 12 - Ensaio de migração celular em cultura pulpar primária. Através do método de *scratch*, foi avaliado o comportamento migratório celular em contato com extrato de MTA, em diluições 1:1, 1:2 e 1:4, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de célula.

### 5.1.9 Definição da concentração dos PDHs e do MTA

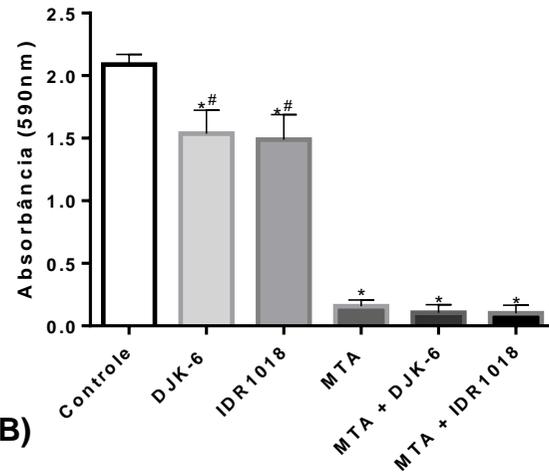
Após observar os ensaios de ação antibacteriana, atividade antibiofilme, viabilidade e migração celular, definiu-se a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Esta concentração foi definida em função da menor concentração dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 que foi capaz de ocasionar maiores aumentos na taxa de migração celular. Por outro lado, extratos do biomaterial MTA na proporção de 1:1 também foi selecionado, por permitir viabilidade celular semelhante ao controle, além desta proporção ser a utilizada no contexto clínico de capeamento pulpar direto. Percebeu-se que concentrações maiores dos PDHs produziam maior efeito antibacteriano, mas causavam maior citotoxicidade e menor migração. Desta forma, para abranger requisitos necessários para o processo de reparo, a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi selecionada.

### 5.2 EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO PEPTÍDEOS E MTA NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

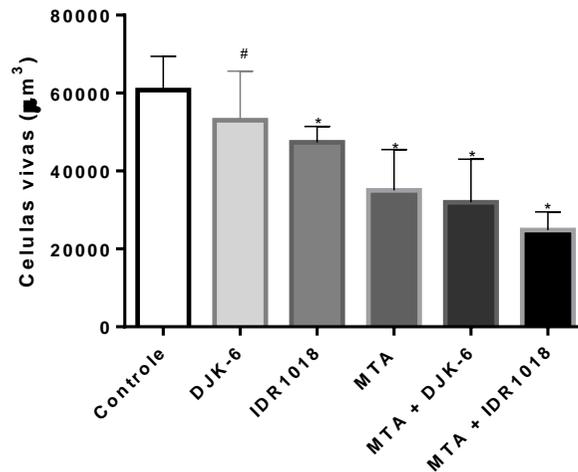
Extrato de MTA *Repair HP*, peptídeos ou a combinação de peptídeos e MTA não foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans* (ATCC25175) em condições planctônicas em ensaio de microdiluição. Entretanto, observou redução da viabilidade de *S. mutans* em biofilme jovem pré-formado em placas de 96 poços *U Bottom* por 24h, quando foram expostas aos peptídeos, MTA e combinação de peptídeos com MTA. Percebe-se reduções mais significativas de biofilme jovem, quando o biofilme foi exposto ao MTA (92%) e as combinações MTA com DJK-6 (95%) e MTA com IDR1018 (95%), comparando com controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 13A).

A capacidade antibiofilme dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos com MTA também foi avaliada em biofilme maduro, cultivado em discos de dentina por 7 dias. Assim como avaliado em biofilmes jovens, nota-se que a viabilidade de biofilme de *S. mutans* foi menor quando as células foram expostas ao MTA e a combinação peptídeos e MTA ( $p < 0,05$ ). Percebe-se redução de biofilme em 42% quando o biofilme foi exposto ao MTA, 47% com a combinação MTA e DJK-6 e 59% com a combinação MTA e IDR1018, comparado ao controle (Figura 13B e C).

(A)



(B)



(C)

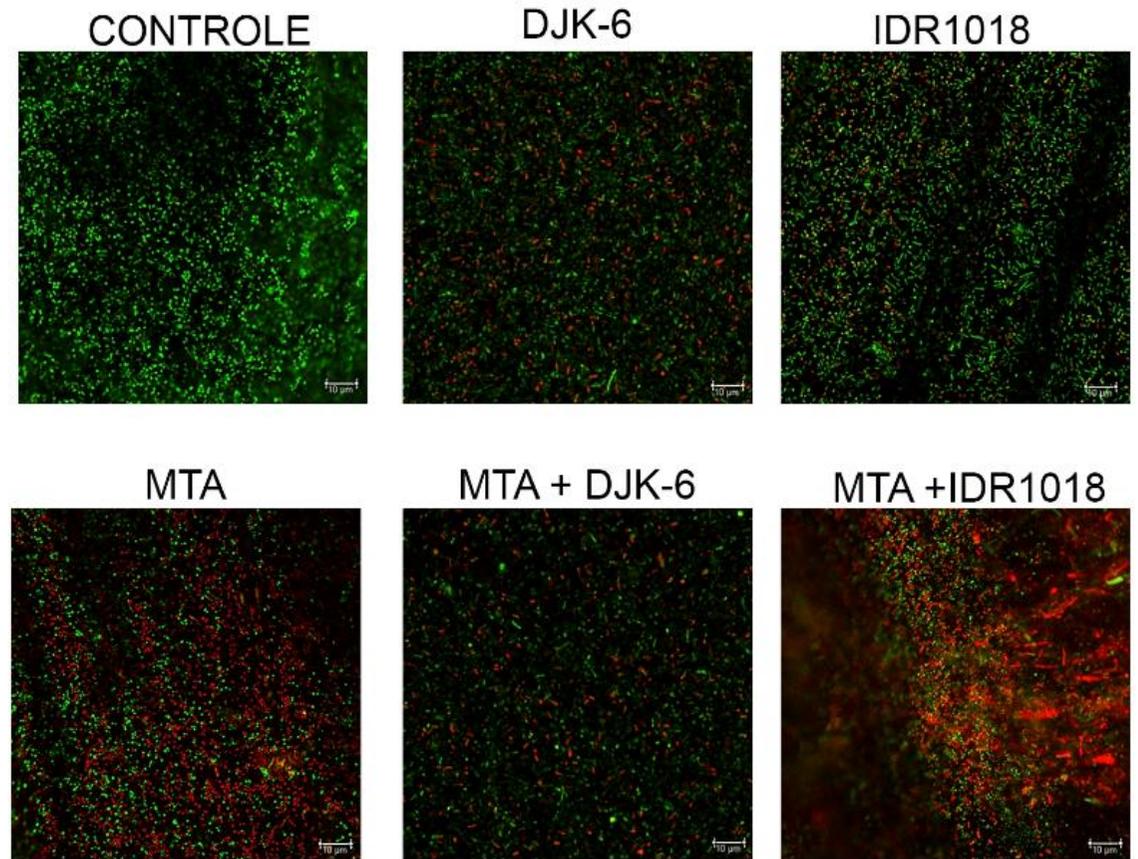


Figura 13 - (A) Viabilidade celular de *S. mutans* após 24h de exposição aos peptídeos, MTA e combinação de ambos em biofilme jovem pré-formado em placas de 96 poços de fundo de U. (B) Biovolume total ( $\mu\text{m}^3$ ) de células vivas do biofilme maduro de *S. mutans* em discos de dentina após 7 dias, seguido por peptídeos, MTA e combinação de ambas as exposições por 24h, avaliadas por microscopia confocal. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,001$  em relação ao controle e #  $p < 0,001$  em relação ao MTA, por ANOVA *one-way* e pós-Tukey. O controle positivo para (A) e (B) foi representado pela bactéria *S. mutans* em meio BHI. (C) Imagens de microscopia confocal do biofilme de *S. mutans*. Imagens verdes representam células vivas e imagens vermelhas representam células mortas. Barra de escala - 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS E DO MTA

Para avaliação da atividade imunomodulatória na presença dos peptídeos e do MTA, inicialmente um sistema *in vitro* de resposta imune foi estabelecido conforme os resultados abaixo descritos.

#### 5.3.1 Definição da concentração de antígenos

A fim de definir os estímulos necessários para o sistema de resposta imune *in vitro* e a concentração do antígeno de *S. mutans* capaz de promover um sistema *in vitro* imuno inflamatório, foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT, dosagem de NO e expressão do gene TNFRSF-1.

##### 5.3.1.1 Viabilidade celular

Ao avaliar a viabilidade celular, após exposição aos estímulos inflamatórios por 24h, notou-se que a concentração de HK-*S. mutans*, na concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> ocasionou uma redução de 35% da viabilidade celular. Em adição, percebeu-se uma redução ainda maior, totalizando 98% de redução celular, na presença de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de HK-*S. mutans*, quando comparado ao controle. Também foi possível observar uma redução de 99% na viabilidade celular quando as culturas foram expostas a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de HK-*S. mutans*, juntamente com o IFN- $\gamma$  (Figura 14A).

Após 72h de incubação, foi possível observar uma recuperação na viabilidade celular na presença de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> de HK-*S. mutans*, estando a valores semelhantes a cultura de células pulpareas na ausência de estímulo. Porém, notou-se que a concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de HK-*S. mutans* levou a uma redução de 97% da viabilidade celular, assim como quando avaliado a mesma concentração deste antígeno na presença do IFN- $\gamma$ , levando a uma redução da viabilidade em 95% (Figura 14B).

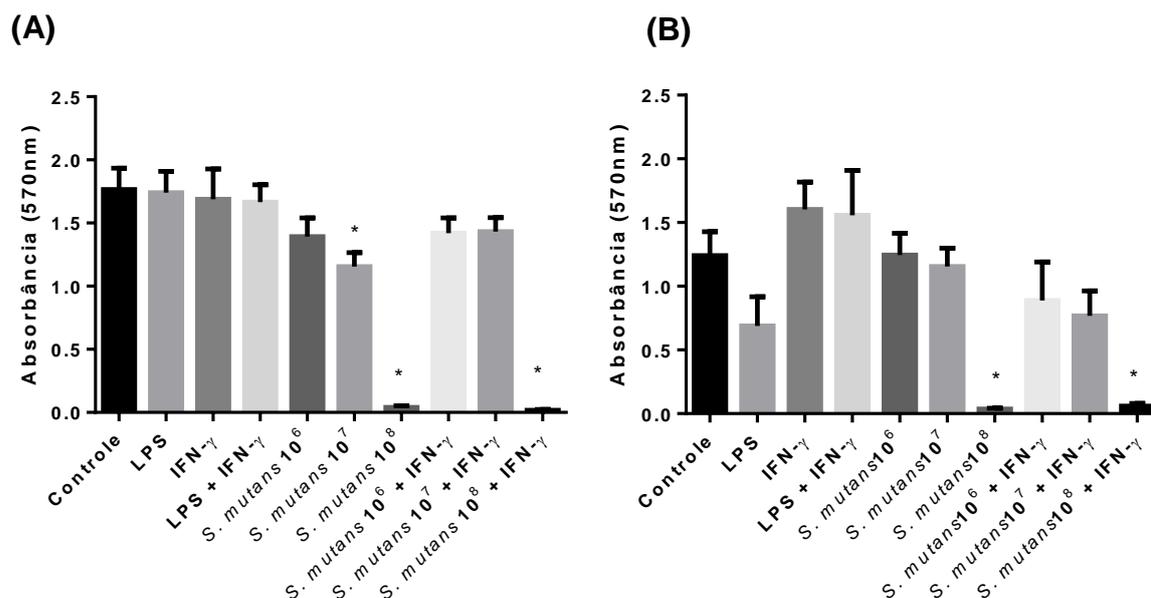


Figura 14 – (A) Avaliação da viabilidade celular após exposição por 24h dos estímulos LPS, IFN- $\gamma$  e antígenos de *S. mutans* nas concentrações de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup>. (B) Avaliação da viabilidade celular após exposição por 72h dos estímulos LPS, IFN- $\gamma$  e antígenos de *S. mutans* nas concentrações de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup>. \*p<0,05, indica diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Tukey, com o grupo controle.

### 5.3.1.2 Dosagem de óxido nítrico – NO

Não foi detectada a produção de NO após exposição celular aos estímulos de LPS e IFN, além das concentrações variadas de antígenos de *S. mutans* (10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), após 24h e 72h de incubação.

### 5.3.1.3 Expressão do gene TNFRSF-1

A fim de selecionar um estímulo que provocasse a produção de mediador inflamatório em cultura de células pulpares humanas *in vitro*, simulando um ambiente inflamatório, foi avaliado a expressão do gene TNFRSF-1. Após exposição das células pulpares humanas com LPS, IFN- $\gamma$ , LPS e IFN- $\gamma$ , antígeno *HK-S. mutans* (10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) e a combinação dos antígenos com IFN- $\gamma$ , foi avaliado a expressão do gene TNF- $\alpha$  por qPCR (Figura 15). Observou-se aumento significativo dos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao LPS e IFN- $\gamma$  (p<0,05), em relação ao controle, representado por células pulpares cultivadas em meio DMEM

(Figura 13). Assim, como estímulos inflamatórios foram selecionados o LPS e o IFN- $\gamma$ .

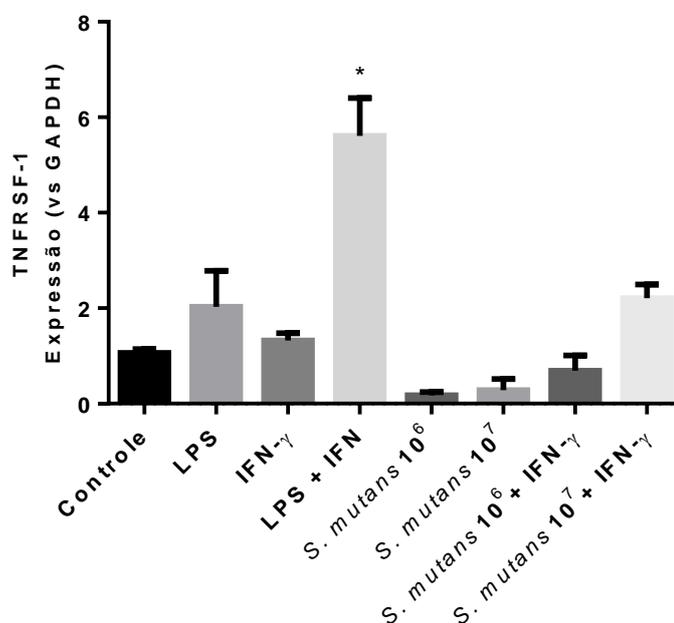


Figura 15 – Definição do estímulo necessário para reprodução do sistema inflamatório *in vitro*. Expressão do gene TNF- $\alpha$  nas amostras de culturas de células pulpare primárias, expostas à LPS, IFN- $\gamma$ , LPS + IFN- $\gamma$ , antígeno *HK-S. mutans* ( $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e a combinação dos antígenos com IFN- $\gamma$  após 24h de incubação. \* $p < 0,05$ , indica diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's, com o grupo controle.

### 5.3.2 Efeito dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos com MTA nos produtos da resposta imune

O controle do processo inflamatório, corresponde a um fator importante durante o processo de reparo. Deste modo, foi avaliado a capacidade dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA em modular a expressão dos genes IL-6 e TNFRSF-1, relacionados ao processo inflamatório.

Após 24h de exposição dos PDHs, MTA e combinação dos peptídeos com MTA em células pulpare estimuladas ao IFN- $\gamma$  e LPS, observou-se que a exposição do peptídeo IDR1018, MTA, e a combinação MTA com DJK-6 e IDR1018 em células pulpare estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ocasionaram redução da expressão de IL-6, quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 16A). Foi possível observar redução da expressão de IL-6 de forma mais expressiva quando as células foram expostas ao

peptídeo IDR1018 e a combinação MTA com DJK-6 e MTA com IDR1018, quando comparadas ao extrato de MTA individual ( $p < 0,05$ ) (Figura 16A). Também foi avaliada a expressão do gene TNFRSF-1 após exposição dos peptídeos, do MTA e da combinação de ambos. Foi possível observar que o peptídeo IDR1018, MTA e MTA em conjunto com DJK-6 ocasionaram aumento de TNFRSF-1 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Avaliou-se que o peptídeo IDR1018 e a combinação MTA e DJK-6 ocasionaram menor expressão de TNFRSF-1, quando comparado ao MTA ( $p < 0,05$ ) (Figura 16B).

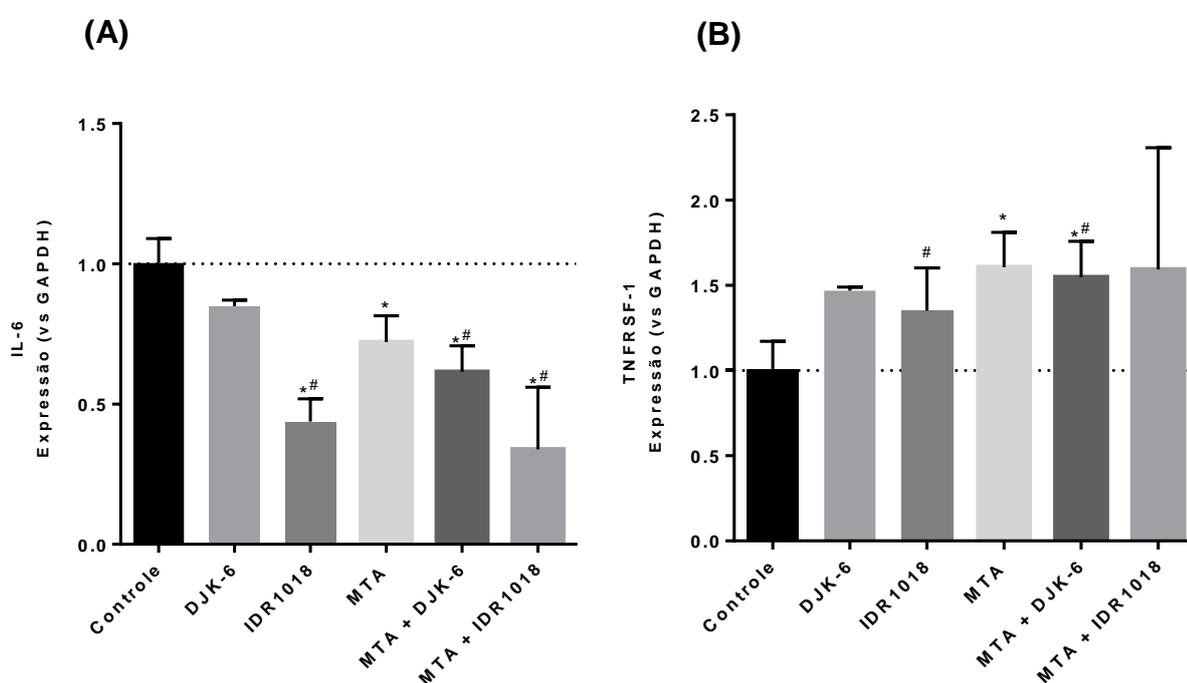


Figura 16 – (A) Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 24h de incubação (B). Expressão de TNFRSF-1. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística entre o controle e os grupos, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's. #  $p < 0,05$  representa diferença estatística entre MTA e os demais grupos, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS PEPTÍDEOS, MTA E DO PEPTÍDEO EM CONJUNTO COM EXTRATOS DO MTA CAUSAR CITOTOXIDADE EM CÉLULAS PULPARES

Após determinação da concentração de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para os peptídeos DJK-6 e IDR1018, foram realizadas análises a partir da união do peptídeo com extrato do MTA. Inicialmente foi observado o grau de toxicidade da união dos peptídeos com MTA. Deste modo, foi realizado ensaio de viabilidade celular e análise da morfologia celular por MEV.

##### 5.4.1 Ensaio de viabilidade celular

Percebeu-se manutenção da viabilidade celular quando os peptídeos foram utilizados de forma independente, após 24h. Ao adicionarmos o peptídeo DJK-6 ao extrato do MTA, notou-se taxa de viabilidade celular similar a célula pulpar na ausência de estímulo (controle). Entretanto, a presença de extratos do MTA contendo o peptídeo IDR1018 ocasionou diminuição de 17% da viabilidade celular, quando comparado o grupo controle, após 24h (Figura 17).

Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada após 48h de contato com os peptídeos, MTA e o conjunto de ambos. O peptídeo DJK-6 avaliado de forma independente, ocasionou uma redução significativa de 18,5% da viabilidade celular. No entanto, o peptídeo IDR1018 avaliado de forma independente, assim como a união dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 com extratos de MTA, foram capazes de manter a viabilidade celular semelhante a observada nas culturas contendo apenas a célula pulpar. Ademais, pode-se observar recuperação celular do grupo representado por IDR1018 em conjunto com extratos do MTA, não observando diferença significativa com o controle (Figura 17).

Em seguida, foi analisada viabilidade celular após 72h. Percebeu-se uma redução de 14% na viabilidade celular na presença do peptídeo DJK-6, após 72h, em comparação com o controle. Em contrapartida, na presença de extratos do MTA, do peptídeo DJK-6 com extratos do MTA e do peptídeo IDR1018 com extratos do MTA observou-se aumento de 50%, 32% e 27% nas taxas de viabilidade celular, respectivamente (Figura 17).

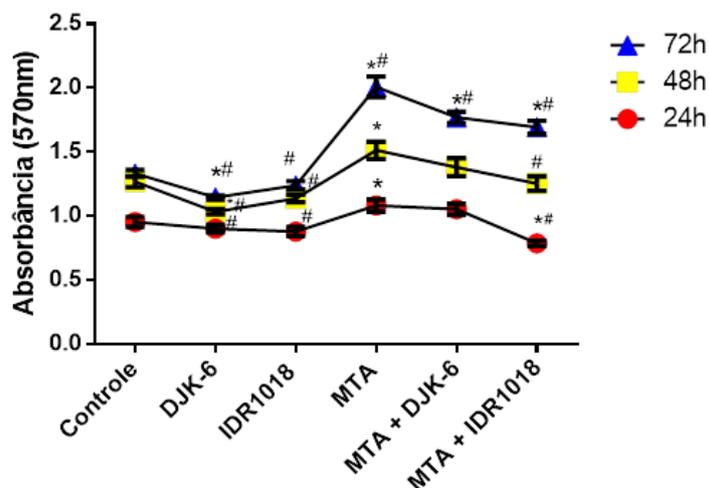


Figura 17 - Viabilidade celular pulpar por MTT, após exposição de HDPs (DJK-6 e IDR1018), MTA e combinação de ambos após 24h, 48h e 72h em cultura de celulose pulpar. \* $p < 0,05$  em relação ao controle, pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's. # $p < 0,05$  em relação ao MTA Reparo HP, pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's.

#### 5.4.2 Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura em amostras encubadas com os peptídeos DJK-6 e IDR1018, MTA e da combinação destes peptídeos com extrato do MTA

Inicialmente, foi observado um grande número de células pulpares aderidas às lamínulas. Na análise das imagens utilizando uma ampliação de 300x, notou-se que as células pulpares se apresentaram alongadas tanto na amostra controle negativo quanto nas amostras testes, na presença dos peptídeos DJK-6, IDR1018 e da união dos peptídeos com extrato do MTA. Entretanto, observou-se que nas células expostas apenas ao extrato de MTA, ocorreu redução no número de extensões citoplasmáticas nas regiões dos pontos de adesão focal, envolvidos com a aderência das células à lamínula. Nas amostras avaliadas em ampliação de imagem de 1500x, foi possível observar maior presença de filamentos citoplasmáticos delgados aderidos a lamínula no controle negativo e nas culturas expostas aos peptídeos DJK-6 e IDR1018. Entretanto, observou-se uma redução desses filamentos à medida que os extratos de MTA eram adicionados a estes grupos, ou seja, nas culturas estimuladas com extratos de MTA isolado e nas culturas estimuladas com os peptídeos DJK-6 e IDR1018 em conjunto com extrato de MTA. Já na avaliação em ampliação de imagem de 3000x, percebeu-se a presença de agregação dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 na superfície celular, quando avaliados de forma independente. Da mesma forma, o biomaterial MTA também foi observado de forma abundante distribuído na superfície celular,

quando analisado de forma isolada. Além do mais, notou-se que ao adicionar os peptídeos DJK-6 e IDR1018 ao extrato de MTA, produziu uma agregação ainda mais abundante destes componentes na superfície celular, principalmente no grupo contendo o peptídeo IDR1018 e extrato de MTA (Figura 18).

Controle

DJK-6

IDR1018

MTA

MTA + DJK-6

MTA + IDR1018

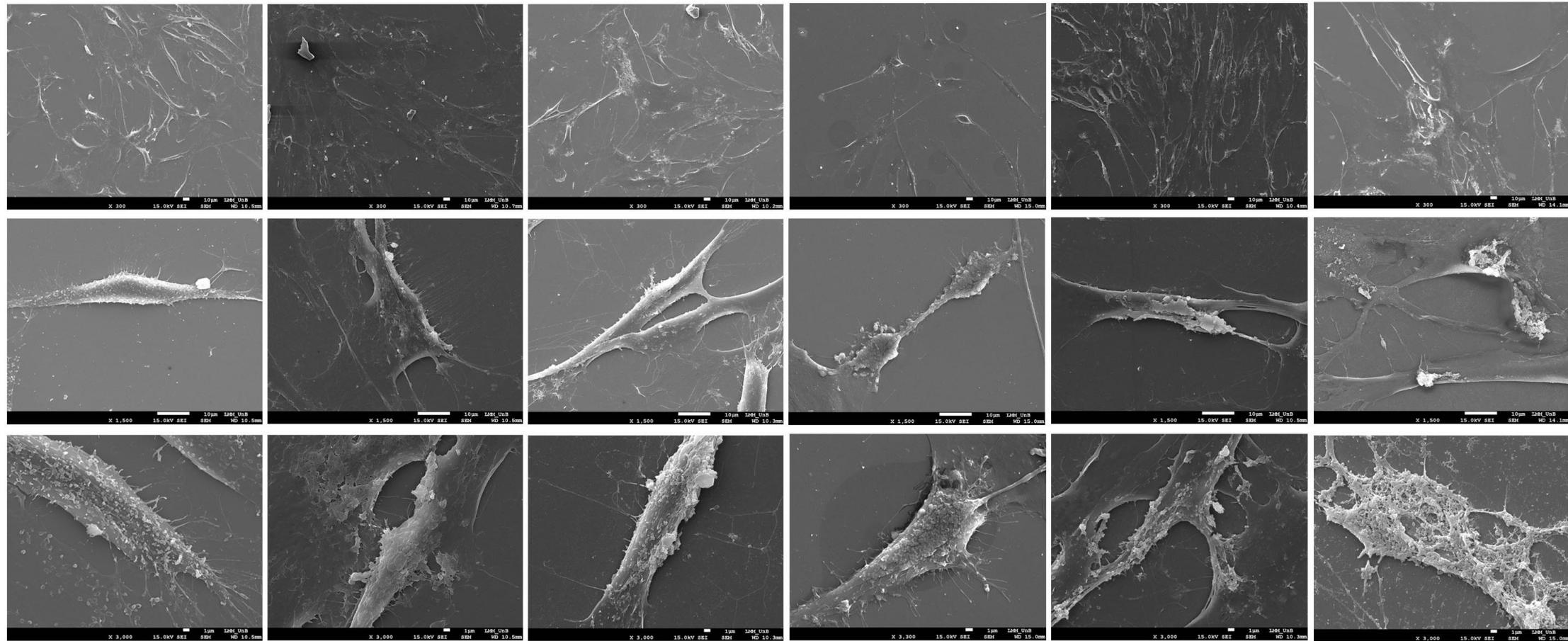


Figura 18 –Microscopia eletrônica de varredura representativa das células de cultura pulpar, após exposição ao meio DMEM, avaliado como controle negativo. Peptídeos DJK-6, IDR1018 e biomaterial MTA, avaliados de forma isolada. Avaliação da combinação dos peptídeos DJK-6 e IDR1018 com MTA. Cada linha representa o aumento utilizado para análise das amostras. A primeira linha representa ampliação de 300x; a segunda linha, ampliação de 1.500x; e a terceira linha, ampliação de 3000x. O material empregado para análise está representado nas colunas.

## 5.5 EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E MTA NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PULPARES

Um dos processos relacionados ao reparo refere-se à proliferação e migração celular. Após contato dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA em células pulpares *in vitro* em 24h, foi possível avaliar maior proliferação celular quando as células foram expostas ao peptídeo IDR1018, causando 45% de proliferação quando comparado ao controle e 39% maior quando comparado ao extrato de MTA (Figura 19A).

A fim de avaliar a migração celular após a inserção de HDPs, MTA e combinação de HDPs e MTA, um ensaio de migração foi realizado. Após o contato dos materiais na célula pulpar por um período de 24h, foi observado um aumento de 55% na migração celular quando exposto ao peptídeo DJK-6 e à combinação DJK-6 e MTA, quando comparado ao controle. Além disso, também foi avaliado um aumento de 51% na migração de células expostas à combinação DJK-6 e MTA, quando comparado ao grupo contendo apenas MTA. Após contato de HDPs, MTA e combinação de HDPs e MTA por 48h em cultura de células pulpares, observou-se aumento de 44% na migração celular em contato com o peptídeo DJK-6, quando comparado ao controle. Aumentos nas taxas de migração de 62% também foram observados quando as culturas foram expostas ao peptídeo DJK-6 combinado com MTA e 39% em culturas expostas ao peptídeo IDR1018 combinado com MTA. Por fim, um aumento de 38% na taxa de migração celular também foi observado nas culturas estimuladas com o peptídeo DJK-6 combinado com MTA, quando comparadas às culturas estimuladas apenas com extratos de MTA (Figura 19B e C).

Após comparação dos dois ensaios, pode-se observar que possivelmente o peptídeo IDR1018 ocasionou proliferação de células pulpares. Enquanto o peptídeo DJK-6 e a combinação de DJK-6 e MTA ocasionaram migração celular.

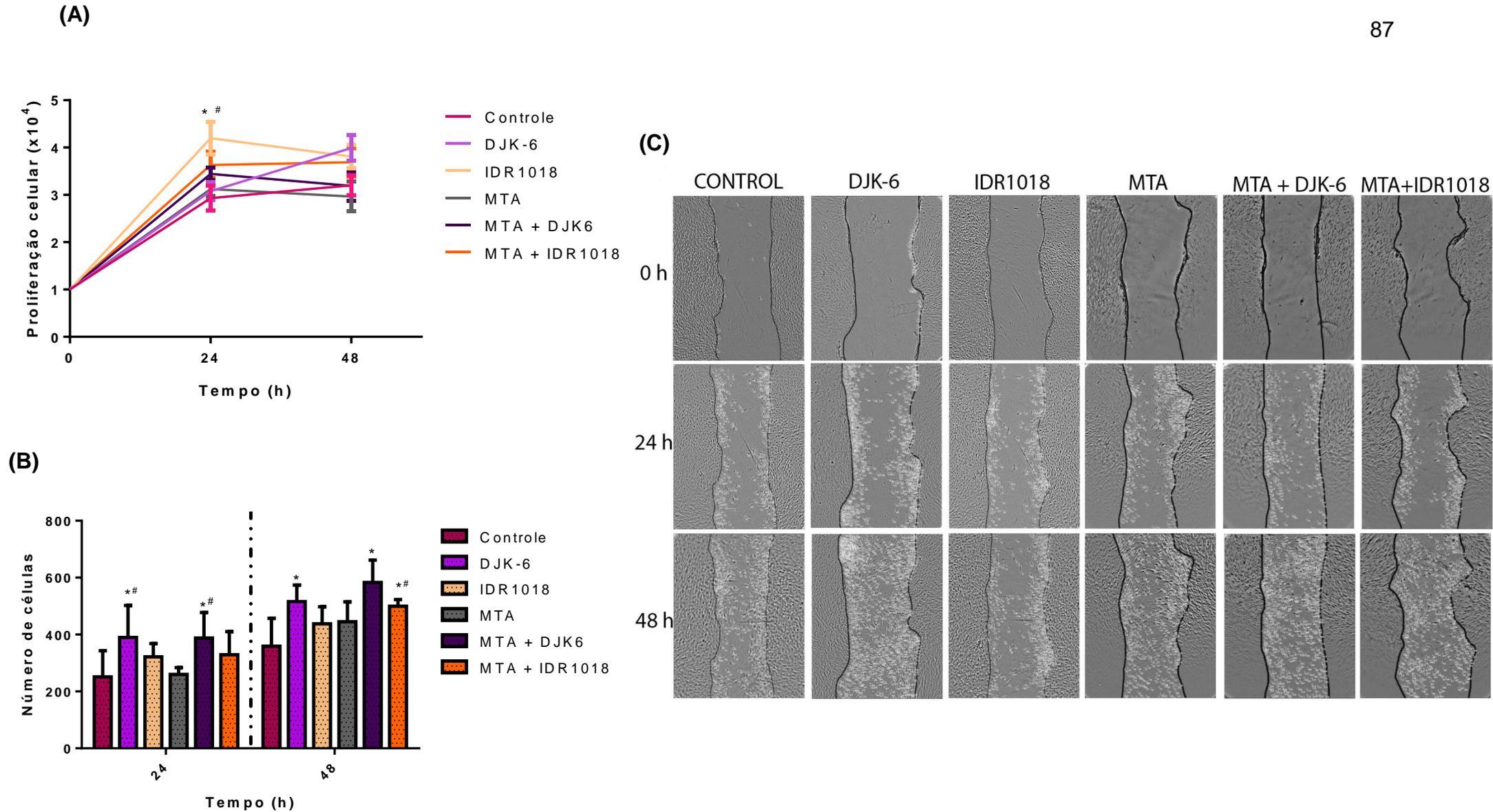


Figura 19 - (A) Proliferação de células pulpares pelo método *trypan blue*, após 24h e 48h de HDPs, MTA e combinação de ambas as exposições. As barras representam a diferença estatística entre o controle e os grupos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao MTA Reparo HP, verificadas pelo teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey's. (B) Comportamento migratório das células pulpares quando expostas a HDPs, MTA e combinação de ambos. O gráfico representativo indica a porcentagem de células migradas para a ferida em 24h e 48h. (C) Imagem representativa do teste de migração celular, usando o método *scratch*. Os pontos denotam a presença de células dentro da ferida. As linhas verticais correspondem ao local inicial onde a ferida foi realizada no ponto inicial. O teste foi realizado por 24h e 48h. As colunas representaram cada material testado.

## 5.6 EFEITO DOS PEPTÍDEOS, MTA E COMBINAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E MTA NA DIFERENCIAÇÃO ODONTOGÊNICA E BIOMINERALIZAÇÃO

### 5.6.1 Expressão dos genes DSPP e TGF- $\beta$

Após 14 dias de estimulação das células pulpareas com peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos com MTA em meio osteogênico, foi observado maior expressão do gene DSPP, quando as células pulpareas foram expostas ao extrato de MTA, comparando ao controle ( $p < 0,05$ ). Entretanto, maior expressão do gene DSPP foi avaliada, quando as células foram expostas com a combinação MTA e IDR1018, comparando ao controle e ao extrato de MTA ( $p < 0,05$ ). Enquanto a expressão de DSPP foi significativamente menor quando as células foram expostas ao DJK-6 e a combinação MTA e DJK-6, comparado com extrato de MTA (Figura 20A). Também foi avaliada a expressão do gene TGF- $\beta$  após 14 dias de incubação dos materiais testados em cultura de células pulpareas em meio osteogênico. Observou-se redução dos níveis de expressão do gene TGF- $\beta$  nas células pulpareas expostas a combinação MTA e DJK-6 ( $p < 0,05$ ) (Figura 20B).

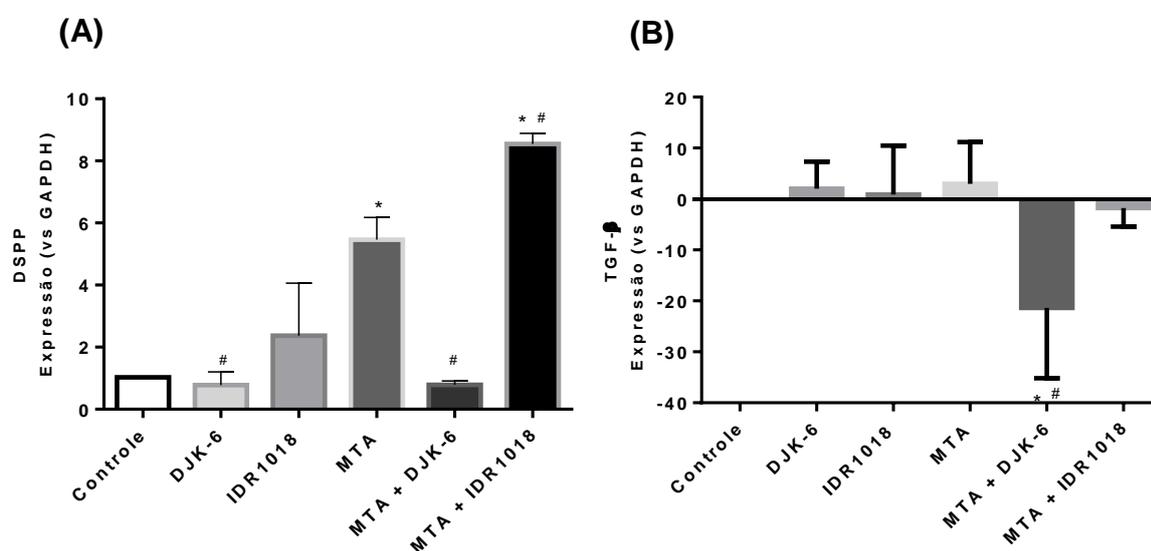


Figura 20 - (A) Expressão do gene DSPP nas amostras de culturas de células pulpareas primárias cultivadas em meio osteogênico, expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 14 dias de incubação (B). Expressão de TGF- $\beta$  nas amostras de culturas de células pulpareas cultivadas em meio osteogênico, expostas à DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 após 14 dias de incubação. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. \* $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle e #  $p < 0,05$ , quando comparado com o MTA, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

### 5.6.2 Produção de fosfatase alcalina – ALP e concentração de fosfato

Em geral observou que MTA teve atividade de ALP significativamente mais baixa do que o grupo controle, assim como a combinação MTA e DJK-6 ( $p < 0,05$ ). O peptídeo IDR1018 e a combinação MTA e IDR1018 tiveram atividade ALP significativamente maior em relação ao controle e ao extrato de MTA ( $p < 0,05$ ) (Figura 21A). Em relação a produção de fosfato não foi observado diferenças significativas dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos com MTA em relação ao controle (Figura 21B).

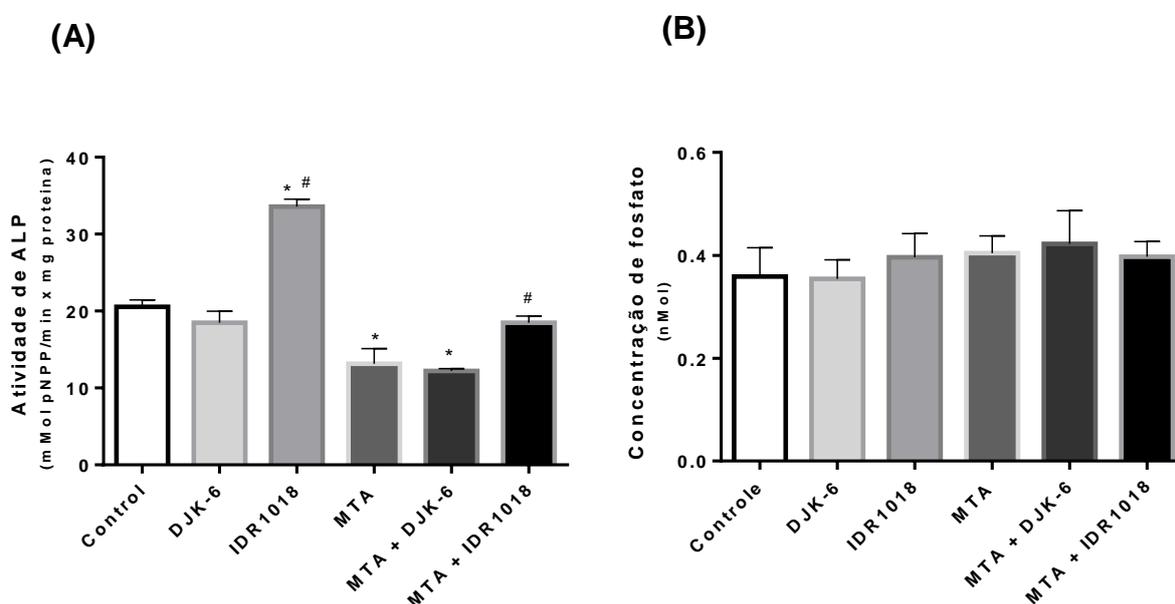


Figura 21 - (A) Atividade da fosfatase alcalina celular (ALP) em cultura de células pulpares em condições osteogênicas, expostas aos peptídeos DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018, por 14 dias. A atividade de ALP (mMol p-nitrofenol/por minuto) foi normalizada pela quantidade total de proteína por proteína. Representação gráfica de duas réplicas biológicas independentes. (B) Avaliação da concentração de fosfato do sobrenadante celular, após exposição dos peptídeos DJK-6, IDR1018, MTA, MTA + DJK-6, MTA + IDR1018 por 14 dias. Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de duas réplicas biológicas em triplicata técnicas. \* $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle e #  $p < 0,05$ , quando comparado com o MTA, pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Tukey's.

### 5.6.3 Avaliação da formação de nódulos de mineralização pelo método de Alizarin-red

Conforme demonstrado nas figuras 22A, B e C, após 14 dias de exposição celular, o peptídeo IDR1018 e a combinação MTA e IDR1018, promoveram maior produção de nódulos mineralizados quando comparados com controle e com MTA ( $p < 0,05$ ). Também observou que o peptídeo DJK-6 e a combinação MTA e DJK-6 ocasionaram menor produção de nódulos mineralizados, quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Ainda, não foi avaliada diferença significativa da produção de nódulos de mineralização do MTA com controle.

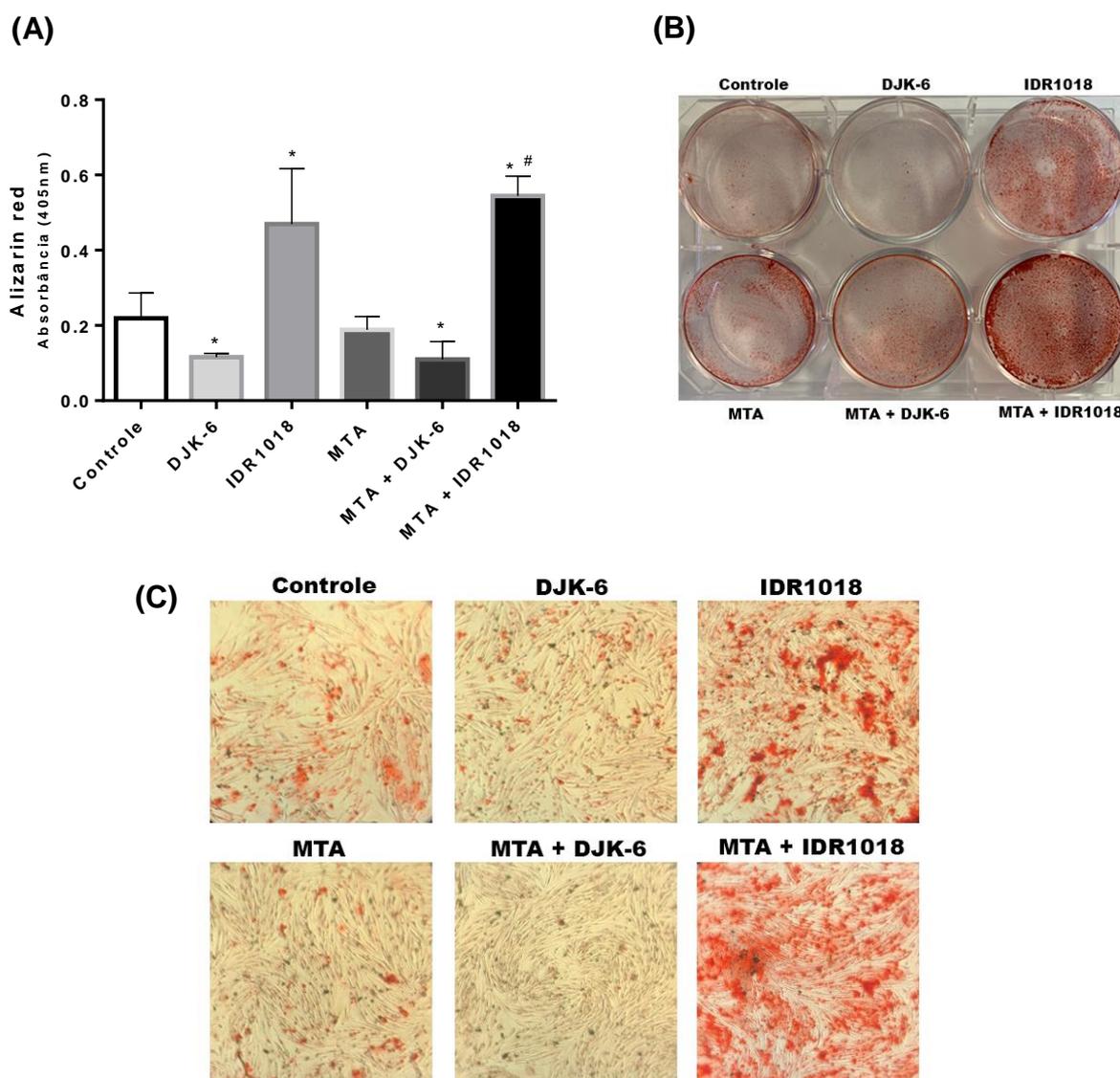


Figura 22 - (A) Avaliação quantitativa de três réplicas biológicas independentes de deposição da matriz mineral após exposição dos peptídeos, MTA e combinação dos peptídeos e MTA em cultura de células pulpares, coradas com Vermelho de Alizarina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da absorbância em comparação com o controle. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao MTA Repair HP, por *one -way ANOVA* e pós-teste de Tukey. (B) Imagem representativa da matriz mineralizada em placa de 6 poços após 14 dias de peptídeos, MTA e combinação de ambas as exposições. (C) Imagem representativa da deposição de matriz mineralizada por coloração com vermelho de alizarina em condições de diferenciação odontogênica e exposição de peptídeos, MTA e combinação de ambos. O controle representou a cultura de células pulpares em meio odontogênico por 14 dias.

## 6 DISCUSSÃO

Lesões de cárie profundas ou fraturas coronárias podem ocasionar exposições pulpares. A preservação do tecido pulpar é de extrema importância para manutenção das funções que esse tecido possui, como capacidade formadora, nutritiva, defensiva e sensorial (25, 143-145). Entre as alternativas para restabelecimento da função dentária após exposição do tecido está a possibilidade de realizar métodos de preservação pulpar, como o capeamento pulpar direto (8). Esta técnica visa a utilização de biomateriais, que atuam como barreira de exposição ao meio, que irá estimular a cura e reparo do tecido perdido, através da produção de dentina reparadora (9). Atualmente, materiais relacionados a formulações do hidróxido de cálcio e MTA, são os materiais mais utilizados como materiais para proteção pulpar (6). Entretanto, o sucesso da terapia utilizando os biomateriais existentes ainda depende da duração da exposição pulpar ao meio externo, tamanho da exposição ocorrida e idade do paciente. Em geral, o capeamento pulpar direto tem sido indicado quando o tamanho da polpa dentária exposta tem menos de 1 mm de diâmetro e o controle da hemorragia é conquistado (15). Devido limitações da terapia com materiais utilizados atualmente, esse estudo propôs a utilização de peptídeos em conjunto ao MTA, para auxiliar no processo de reparo do complexo dentino-pulpar. Os peptídeos selecionados possuem histórico de desempenho antibiofilme, imunomodulador e de participação em eventos cicatriciais (115, 121, 146, 147), características importantes a serem agregadas aos materiais para capeamento pulpar existentes no mercado.

Os eventos que norteiam os eventos de regeneração e reparo do complexo dentina-polpa envolvem equilíbrio entre patógenos e resposta inflamatória, migração celular, proliferação, diferenciação de células especializadas, produção e deposição de matriz dentinária e biomineralização (1). Compreendendo a importância do conjunto de eventos para que o reparo seja realizado, este estudo utilizou os ensaios de atividade antibacteriana, antibiofilme, viabilidade e migração celular para definir a melhor concentração dos peptídeos a serem utilizados para combinação com MTA.

Inicialmente, sabe-se que o controle de microrganismos pode ser decisivo no sucesso da terapia conservadora pulpar. Desta forma, é desejável que o material utilizado tenha capacidade antibacteriana, além da capacidade de induzir formação de tecido mineralizado (8, 13, 14). Primeiramente, foi avaliado se alguma concentração dos PDHs e do MTA apresentava capacidade de ocasionar inibição

bacteriana em estado planctônico. Porém, foi avaliado que não houve inibição do crescimento da bactéria *S. mutans* em condições planctônicas com nenhuma concentração dos peptídeos e do MTA. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo prévio (111), que também não observaram inibição do crescimento de bactérias planctônicas, após adição do peptídeo IDR1018. Outras investigações não observaram qualquer ação antibacteriana do MTA em *S. mutans* em condições planctônicas (148, 149).

Entretanto, sabe-se que a maioria dos microrganismos na natureza vivem agregadas em biofilme (150). Inicialmente, observamos a capacidade do MTA ocasionar redução de biofilme de *S. mutans*. O potencial antibacteriano do MTA pode estar relacionado com a superfície de contato, pH alcalino e liberação de hidroxila (151, 152). Esses fatores estão diretamente ligados a danos em proteínas, lipídios e DNA de microrganismos (152). Nosso estudo também avaliou que os PDHs e estes em conjunto com MTA apresentam capacidade de reduzir biofilmes de *S. mutans* jovens. Estudos prévios demonstraram a habilidade antibiofilme que o peptídeo IDR1018 possui, constatando aumento de atividade à medida que a concentração era aumentada, assim como avaliado em nosso estudo (150, 153). Sabendo da capacidade de reduzir biofilme dos peptídeos, do MTA e da união de ambos, também era necessário compreender se as concentrações seriam tóxicas as células pulpares. Deste modo, foi realizado ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular após exposição dos peptídeos e do MTA.

Notamos que o peptídeo DJK-6 e o biomaterial MTA apresentaram valores de viabilidade celular semelhante ao controle, tanto após 24h, quanto 72h. Resultados semelhantes de viabilidade em células pulpares já foram observados após exposição a extratos do MTA *Repair HP* (diluições 1:1, 1:2 e 1:4) (17, 154). Entretanto, o peptídeo IDR1018, apresentou redução da viabilidade a partir de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas primeiras 24h, retornando a padrões similares ao controle, após 72h. Resultados semelhantes foram encontrados por Haney *et al.* (155), os quais demonstram a capacidade de redução na viabilidade após as primeiras 24h, quando exposto a células mononucleares do sangue periférico (PBMC), em concentrações superiores a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR1018. Porém, resultados contrários foram avaliados por estudo prévio, que demonstrou redução de 22% da viabilidade somente após  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  deste peptídeo, em cultura de queratinócitos humanos (HaCat) e não observou redução da viabilidade em concentrações até  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR1018, em fibroblastos

humanos (118). Porém, ainda não existem estudos de viabilidade de células pulpares humanas na presença do peptídeo IDR1018.

A partir dos resultados de viabilidade celular, o passo seguinte foi a avaliação em modelo *in vitro* da capacidade destes materiais em promover migração celular. Nesse ensaio utilizou-se como controle, cultura de células pulpares em meio DMEM, na ausência de SFB, afim de remover possíveis interferências no processo de migração celular (154). Foi observado que o peptídeo IDR1018 ocasionou melhor migração em menores concentrações (até  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), assim como também foi observado nos resultados de viabilidade celular. Resultados contraditórios mostraram um efeito dose-dependente do peptídeo na cicatrização de feridas em modelos de rato (26). Esse estudo demonstrou que a concentração de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi mais eficiente. Entretanto animais tratados com doses mais baixas como  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentaram cicatrização da ferida entre 8-10 dias, ocasionando resultados superiores ao controle.

Em relação ao biomaterial MTA, percebeu-se que a concentração de 1:1 do extrato de MTA *Repair HP* promoveu migração similar ao controle e ao realizar diluições desse material, a capacidade migratória foi maior que a observada no grupo controle. Resultado semelhante foi avaliado por Tomás-Catalá *et al.* (17), que observaram na presença de diluições de 1:2 e 1:4 deste material, uma maior migração nas primeiras 24h. Entretanto, após 48h, relatam migração semelhante a cultura de células pulpares (17). Através de estudos prévios, nota-se características de migração diferentes, quando as empresas de fabricação do MTA foram diferentes ao trabalhado no estudo. Como exemplo, uma pesquisa com MTA *Pro Root* (Dentsply), demonstrou que quanto menor a diluição do extrato do MTA, melhor sua capacidade migratória (156). Outra dificuldade observada nos estudos que utilizam extratos do MTA está na padronização vigente deste extrato, a qual impõe apenas temperatura e tempo de contato do material com o meio condicionado. Assim, o tamanho do material que entrará em contato com o material e o volume final é variável em vários estudos avaliados, dificultando o padrão de comparação com esse material (18, 58, 72, 126, 157).

Assim, foi observado que a concentração de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi a menor concentração dos PDHs DJK-6 e IDR1018 que proporcionou maior migração celular em 24h e 48h. Além disso, não apresentou toxicidade em cultura de células pulpares. Entretanto, assim como os estudos prévios relatados, também observamos que concentrações maiores dos PDHs DJK-6 e IDR1018 proporcionavam maior ação

antibiofilme (150, 153). Porém, sabendo que o processo de reparo corresponde a um conjunto de eventos e não somente a ação antibacteriana, a concentração de 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos PDHs foi selecionada para os ensaios posteriores.

Em seguida, a junção destes peptídeos ao MTA foi realizada e esta associação foi testada contra biofilmes jovens e maduros de *S. mutans*. Notamos que a união dos peptídeos ao MTA foi capaz de ocasionar redução do biofilme de *S. mutans*. Semelhante ao que percebemos em nosso estudo, no qual a atividade antibiofilme foi maior ao unir os PDHs ao MTA, estudo prévio também observou maior redução de biofilme de *S. mutans* quando da união do peptídeo IDR1018 a outro peptídeo denominado ZXR-2.3 (153). Não existem resultados prévios de atividade antibacteriana de associações do MTA com peptídeos. Porém, pode-se observar relatos prévios da associação do PDH IDR1018 com outros materiais, como CHX e EDTA. Nesses casos, a adição do peptídeo aumentou a atividade antibiofilme destes materiais, como demonstrado em estudo prévio (111). A capacidade dos peptídeos atuarem efetivamente em biofilmes e com pouca efetividade ou nenhuma em bactérias planctônicas, pode ser justificada pelo mecanismo de ação dos peptídeos IDR1018 e DJK-6, responsáveis por atingir [(p) ppGpp], representado por nucleotídeos importantes na formação e manutenção de biofilmes (21, 114).

A presença de agressões ao complexo dentino pulpar ativa uma rede de sinalizações inflamatórias (1, 158). O estímulo de microrganismos ou trauma induz a liberação de TNF- $\alpha$ , documentado como marcador de inflamação precoce (159). A presença de TNF, promoverá o recrutamento de leucócitos, induzindo vasodilatação e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (160). Afim de compreender se os PDHs e o MTA eram capazes de reduzir o processo inflamatório, simulamos um quadro de inflamação pulpar, na qual as culturas de células pulpares foram expostas ao LPS em conjunto com IFN- $\gamma$ . Observamos a capacidade de redução da expressão do gene IL-6 após exposição celular ao PDH IDR1018, MTA e conjunto PDHs e MTA. A IL-6 corresponde a um dos principais mediadores de resposta do hospedeiro após agressões. Estudos demonstraram maior presença de IL-6 em dentes com cárie em comparação a polpas normais (158) e redução da expressão deste gene após tratamento (161). Assim como nosso estudo demonstrou a possibilidade do peptídeo IDR1018 ocasionar redução de IL-6 em ambiente inflamado, outros estudos também observaram redução de IL-6 após exposição de cultura de macrófagos ao peptídeo IDR1018 (162, 163). Outro estudo demonstrou a

capacidade do MTA e o conjunto MTA e N-acetilcisteína ocasionar redução de IL-6 e TNF $\alpha$  em cultura de células pulpare inflamadas com LPS (164), corroborando com nosso achado. Entretanto, nosso estudo não observou diferença significativa da expressão do gene TNFRSF-1 após exposição das células aos peptídeos. Enquanto que ao expor MTA e MTA com DJK-6 na cultura celular notou-se maior expressão genica de TNFRSF-1. O gene TNFRSF-1 pode ser responsável por ativar os receptores das proteínas sinalizadoras do fator de necrose tumoral (165) e por esse motivo tem sido considerado um importante gene avaliado. Encontramos maior produção desse gene ao expor as células com MTA e do MTA em conjunto com DJK-6. Estudo prévio também avaliou maior produção de TNF- $\alpha$  ao expor macrófagos ao MTA em ambiente inflamado pela presença de LPS (166). Além disso, a capacidade do MTA em ocasionar aumento de TNF- $\alpha$  foi demonstrado em culturas pulpare isentas de estímulos inflamatórios, demonstrando a capacidade do próprio material ocasionar produção deste mediador (167). Um baixo nível de inflamação estimula os eventos de reparo dentinário, assim a ocorrência da expressão de TNF também pode estar relacionada ao processo de reparo (1). Estudo prévio demonstrou que o TNF- $\alpha$  foi mediador envolvido na diferenciação de células da polpa dentária em direção a um fenótipo odontoblástico, ocasionando maior mineralização e expressão precoce e aumentada de fosfoproteína dentinária (DPP), sialoproteína dentinária (DSPP) e matriz dentinária proteína 1 (DMP1) (168).

Observando a capacidade do MTA e dos PDHs em conjunto com MTA reduzir biofilme e ocasionar possível imunomodulação era preciso avaliar a capacidade citotóxica desses materiais em cultura de células pulpare. Notou-se que somente o conjunto MTA e IDR1018 ocasionou redução da viabilidade celular, após 24h de contato. No entanto, esta redução da viabilidade foi revertida, após 48h de incubação. Também foi avaliado redução da viabilidade celular após 48h e 72h de contato com o PDH DJK-6. Segundo a ISO 10993-5-2009, o material testado pode ser considerado citotóxico após redução da viabilidade celular em mais de 30%, deste modo a redução da viabilidade apresentada pelos materiais testados podem ser considerados aceitáveis, pelas normas estabelecidas. Materiais como Dycal (Dentsply, EUA) são muito utilizados para capeamento pulpar indireto, apesar da literatura demonstrar redução da viabilidade celular *in vitro* de 65% após 8 dias de exposição (169). Ao passo seguinte, foi avaliado a morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura. Nesse ensaio não foi observado alteração de morfologia celular, mas

percebe-se presença de precipitados na superfície celular, após inserção dos peptídeos e do próprio biomaterial MTA. Estudo prévio demonstrou a capacidade do peptídeo IDR1018 em formar agregados em cultura celular, de modo que tal característica está intimamente ligada com a composição da solução que o peptídeo foi dissolvido (155). Nosso estudo realizou dissolução do peptídeo em água mili-Q autoclavada, o que de acordo com estudo (155), é uma solução que gera menor possibilidade de formação de agregados. Além do peptídeo IDR1018, também se avaliou a presença de agregação do peptídeo DJK-6 e do biomaterial MTA. É importante ressaltar que o peptídeo DJK-6 é derivado do peptídeo IDR1018 (24), o que pode ter acompanhado tal característica do peptídeo de origem. Nota-se avaliações de tais precipitados na superfície celular em vários estudos que utilizam MTA, porém não há relatos da diminuição de efetividade ou prejuízo em dependência de tal característica (170-172). Em nosso estudo foi possível avaliar que após união dos peptídeos com MTA, a avaliação de agregados foi mais abundante, possivelmente causado por atuação somática da característica de cada material.

Percebe-se que mesmo com a formação de debris/precipitado na superfície celular, não houveram reduções significativas da viabilidade celular e ainda observamos capacidade de proliferação superior ao controle quando as células foram expostas ao conjunto MTA e IDR1018. Mesmo com a pequena redução na viabilidade celular proporcionada na presença do peptídeo DJK-6, percebeu-se que o mesmo peptídeo permitiu a maior migração celular, em 24h e 48h. Além disso, ao adicionar o peptídeo DJK-6 ao extrato do MTA ocorreu um aumento significativo na migração celular, em relação ao MTA. Além disso, a união do peptídeo IDR1018 com MTA também permitiu um acréscimo na migração celular promovida apenas na presença do MTA. Assim, avalia-se que a união dos peptídeos com o MTA favoreceu o processo migratório em cultura de células pulpares. Estudo anterior demonstrou proliferação e migração em culturas 2D e 3D de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos na presença do peptídeo IDR1018 (119). Ainda, outro estudo demonstrou a capacidade de baixas concentrações do peptídeo ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), ocasionar fechamento de feridas em camundongos (118). Até o momento não foi avaliado na literatura a utilização dos PDHs IDR1018 e DJK-6 em cultura de células pulpares. Em relação ao MTA, estudo prévio demonstrou a capacidade de migração do MTA, observando migração similar ao controle de células pulpares sem estímulo nas primeiras 24h, aumentando o fechamento da ferida em 48h, corroborando com nosso resultado (17). Nosso estudo

também demonstrou a capacidade dos PDHs em aumentar a migração celular observada na presença do MTA.

Percorrendo os eventos que norteiam o processo de reparo, após controle do processo inflamatório, migração e proliferação celular, inicia-se o processo de produção, deposição e biomineralização da matriz dentinária (1). Dentre várias proteínas da matriz extracelular (ECM), uma proteína de notável importância corresponde a sialofosfoproteína dentinária (DSPP). DSPP tem sido usada como um marcador para a diferenciação *in vitro* de células-tronco derivadas da polpa dentária em odontoblastos (173, 174). Além disso, DSPP está associada com a mineralização da dentina (175), é expressa por células semelhantes a odontoblastos subjacentes à dentina reparadora recém-formada (176). O presente estudo observou que o MTA e a união do MTA com IDR1018, levou a um aumento significativo da produção de DSPP, demonstrando a capacidade do IDR1018 em melhorar o processo de diferenciação odontoblástica e mineralização dentinária. Estudo prévio relatou que a união do MTA a proteína osteostatina também promoveu maior expressão do gene DSPP em cultura de células pulpares, quando comparado ao uso do MTA sozinho (18). Ressalta-se ausência de informação prévia acerca da expressão dos genes DSPP e TGF- $\beta$  em células pulpares, na presença dos PDHs IDR1018 e DJK-6. Nosso estudo também observou a baixa expressão do gene DSPP quando o PDH DJK-6 foi exposto na cultura de células pulpares. Coincidentemente, observamos inibição de TGF- $\beta$  quando DJK-6 foi exposto na cultura celular. TGF- $\beta$  tem a função de regular o processo de crescimento, diferenciação celular e deposição de matriz extracelular (1, 176, 177). Estudos prévios relatam que o TGF- $\beta$  tem um papel crucial na regulação da transcrição de DSPP (176, 177), podendo explicar a baixa expressão de DSPP quando as células pulpares foram expostas ao PDH DJK-6. Entretanto, nosso estudo observou baixa expressão de TGF- $\beta$  nos demais grupos e alta expressão do gene DSPP. Desta forma, outros estudos prévios *in vitro* demonstram que altas concentrações de TGF- $\beta$  diminuíram a expressão de DSPP (178, 179). Além disso, outro estudo demonstrou que a superexpressão de TGF- $\beta$  promoveu uma baixa expressão de DSPP, comprometendo a mineralização dentinária de camundongos (180). Assim, acredita-se que TGF- $\beta$  pode ser um fator crítico na transição da matriz pré-dentina não mineralizada em matriz mineralizada (178), na qual a sua expressão pode ser alta durante as primeiras fases do reparo e após a deposição de matriz mineral ocasionar uma redução de sua expressão. Ainda são necessários mais

estudos que relacionem a presença do fator TGF- $\beta$  e DSPP, para conclusões mais assertivas.

Outro fator importante durante o processo de diferenciação odontoblástica e deposição mineral, corresponde a atividade da fosfatase alcalina – ALP. A enzima ALP representa um marcador inicial de calcificação, que notavelmente elevam-se na fase inicial da mineralização (181). O presente estudo demonstrou a capacidade do peptídeo IDR1018 e o conjunto MTA e IDR1018 ocasionar maior atividade de ALP, demonstrando visualmente a capacidade de ambos grupos promoverem maior formação de nódulos de mineralização. Somando a presença de fosfato no meio extracelular. O fosfato corresponde um componente estrutural importante na formação da hidroxiapatita. O conjunto de fatores, demonstram a capacidade que o peptídeo IDR1018 e a união desse peptídeo com MTA ocasionar maior capacidade de reparo, quando comparado ao MTA sozinho. Até o presente momento, esse é o primeiro estudo que demonstra as propriedades de biomineralização do PDH IDR1018.

Assim, este trabalho demonstrou que formulações com PDH IDR1018 podem auxiliar no processo de reparo do complexo dentino-pulpar. Entretanto limitações podem ser avaliadas, entre elas destaca-se que este trabalho adicionou os peptídeos ao MTA na forma de extratos e corresponde um trabalho *in vitro*. Desta forma, uma vez que existe um potencial para esta associação, novos estudos são necessários. Assim, dentre as perspectivas estão a avaliação da melhor forma de se adicionar o peptídeo ao MTA, permitindo sua liberação e mantendo as propriedades observadas, quando produzido em maiores escalas. Avaliação de modos de acondicionamento do material também devem ser avaliadas. Em adição, também é necessário a avaliação desta associação em estudos *in vivo*.

## 7 CONCLUSÕES

Conclui-se que a união dos PDHs ao MTA auxiliou na redução de biofilmes jovens e maduros de *S. mutans*, além de participar do processo de imunomodulação, com redução da IL-6, sem apresentar toxicidade em células pulpares. Além disso, o PDH IDR1018 e a sua união com MTA foram capazes de auxiliar no processo de reparo promovendo proliferação e migração celular. O PDH IDR1018 em conjunto com MTA também foi capaz de participar do processo de biomineralização, induzindo a expressão do gene DSPP, aumentando a atividade de ALP e ainda promovendo grandes quantidades de nódulos de mineralização *in vitro*. Desta forma, formulações com PDH IDR1018 podem auxiliar no processo de reparo do complexo dentino-pulpar.

## 8 REFERÊNCIAS

1. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018;51(8):829-846.
2. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S4-16.
3. Rechenberg DK, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167289.
4. Brasil S. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Ministério da Saúde. 2012.
5. Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, Karbasi S, Khademi AA. Tissue engineering: Dentin - pulp complex regeneration approaches (A review). *Tissue Cell.* 2017;49(5):552-564.
6. Yang Y, Huang L, Dong Y, Zhang H, Zhou W, Ban J, et al. In vitro antibacterial activity of a novel resin-based pulp capping material containing the quaternary ammonium salt MAE-DB and Portland cement. *PLoS One.* 2014;9(11):e112549.
7. European Society of Endodontology developed b, Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J.* 2019;52(7):923-934.
8. Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod.* 2014;40(11):1746-1751.
9. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nor JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013;39(1):76-82.
10. Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res.* 2008;87(3):256-261.
11. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-651.
12. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S46-51.
13. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(3):305-315; quiz 305-315.
14. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-413.
15. Komabayashi T, Zhu Q, Eberhart R, Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J.* 2016;35(1):1-12.
16. Yu F, Dong Y, Yang YW, Lin PT, Yu HH, Sun X, et al. Effect of an Experimental Direct Pulp-capping Material on the Properties and Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Sci Rep.* 2016;6:34713.
17. Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2018;44(1):126-132.
18. Han JW, Lee BN, Kim SM, Koh JT, Min KS, Hwang YC. Odontogenic Potential of Parathyroid Hormone-related Protein (107-111) Alone or in Combination with Mineral Trioxide Aggregate in Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2017;43(12):2054-2060.
19. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D933-937.
20. Afacan NJ, Yeung AT, Pena OM, Hancock RE. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des.* 2012;18(6):807-819.
21. Mansour SC, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *J Pept Sci.* 2015;21(5):323-329.

22. Haney EF, Brito-Sanchez Y, Trimble MJ, Mansour SC, Cherkasov A, Hancock REW. Computer-aided Discovery of Peptides that Specifically Attack Bacterial Biofilms. *Sci Rep*. 2018;8(1):1871.
23. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;11(1):37-51.
24. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernandez D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem Biol*. 2015;22(2):196-205.
25. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27.
26. About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers and dental repair. *J Dent*. 2001;29(2):109-117.
27. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.
28. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016;56(4):144-153.
29. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):369-376.
30. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):425-437.
31. Beres F, Isaac J, Mouton L, Rouziere S, Berdal A, Simon S, et al. Comparative Physicochemical Analysis of Pulp Stone and Dentin. *J Endod*. 2016;42(3):432-438.
32. Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller KA, Schweikl H, Buchalla W, et al. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *Int Endod J*. 2017.
33. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*. 2012;57(2):109-121.
34. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002;81(10):695-700.
35. Kundzina R, Stangvaltaite L, Eriksen HM, Kerosuo E. Capping carious exposures in adults: a randomized controlled trial investigating mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2016.
36. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006;27(14):2865-2873.
37. Daltoe MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernandez PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2016;42(4):596-603.
38. Brizuela C, Ormeno A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramirez V, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017;43(11):1776-1780.
39. Clarke DE. Vital pulp therapy for complicated crown fracture of permanent canine teeth in dogs: a three-year retrospective study. *J Vet Dent*. 2001;18(3):117-121.
40. Momoi Y, Hayashi M, Fujitani M, Fukushima M, Imazato S, Kubo S, et al. Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy--evidence and consensus based report. *J Dent*. 2012;40(2):95-105.
41. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(1):58-75.
42. Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*. 1996;21(1):4-11.
43. Lee SY, Min KS, Choi GW, Park JH, Park SH, Lee SI, et al. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide-induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod*. 2012;38(3):405-410.

44. Yun HM, Chang SW, Park KR, Herr L, Kim EC. Combined Effects of Growth Hormone and Mineral Trioxide Aggregate on Growth, Differentiation, and Angiogenesis in Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2016;42(2):269-275.
45. Nyborg H. Healing processes in the pulp on capping; a morphologic study; experiments on surgical lesions of the pulp in dog and man. *Acta Odontol Scand.* 1955;13(suppl. 16):1-130.
46. Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *J Endod.* 2008;34(7 Suppl):S25-28.
47. Chen L, Zheng L, Jiang J, Gui J, Zhang L, Huang Y, et al. Calcium Hydroxide-induced Proliferation, Migration, Osteogenic Differentiation, and Mineralization via the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2016;42(9):1355-1361.
48. Kitasako Y, Ikeda M, Tagami J. Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. *Dent Traumatol.* 2008;24(2):201-206.
49. Huang XQ, Camba J, Gu LS, Bergeron BE, Ricucci D, Pashley DH, et al. Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement. *Dent Mater.* 2018;34(2):317-330.
50. Caliskan MK, Guneri P. Prognostic factors in direct pulp capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide: 2- to 6-year follow-up. *Clin Oral Investig.* 2017;21(1):357-367.
51. Beetke E, Wenzel B, Lau B, Bienengraber V. [Direct capping of the artificial exposed pulp in teeth with deep caries]. *Stomatol DDR.* 1990;40(6):246-249.
52. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod.* 2000;26(9):525-528.
53. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018;51(2):177-205.
54. Schwendicke F, Brouwer F, Schwendicke A, Paris S. Different materials for direct pulp capping: systematic review and meta-analysis and trial sequential analysis. *Clin Oral Investig.* 2016;20(6):1121-1132.
55. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006;39(5):415-422.
56. Rodrigues EM, Cornelio AL, Mestieri LB, Fuentes AS, Salles LP, Rossa-Junior C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J.* 2016.
57. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Ghodousi J, Eskandarizadeh A. SEM evaluation of neodentinal bridging after direct pulp protection with mineral trioxide aggregate. *Aust Endod J.* 2006;32(1):26-30.
58. Woo SM, Kim WJ, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim SM, et al. Combination of Mineral Trioxide Aggregate and Platelet-rich Fibrin Promotes the Odontoblastic Differentiation and Mineralization of Human Dental Pulp Cells via BMP/Smad Signaling Pathway. *J Endod.* 2016;42(1):82-88.
59. Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent.* 2014;42(5):517-533.
60. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2010;43(10):917-929.
61. Camilleri J, Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *Int Endod J.* 2011;44(1):9-20.
62. Percinoto C, de Castro AM, Pinto LM. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies employing calcium hydroxide and trioxide mineral aggregate. *Gen Dent.* 2006;54(4):258-261.
63. Park SJ, Heo SM, Hong SO, Hwang YC, Lee KW, Min KS. Odontogenic effect of a fast-setting pozzolan-based pulp capping material. *J Endod.* 2014;40(8):1124-1131.

64. Duarte MA, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(5):648-650.
65. De-Deus G, de Souza MC, Sergio Fidel RA, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009;35(6):887-890.
66. Maroto M, Barberia E, Planells P, Garcia Godoy F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. *Am J Dent.* 2005;18(3):151-154.
67. Watts JD, Holt DM, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2007;33(8):970-973.
68. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig.* 2015;19(9):2201-2209.
69. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod.* 2015;41(9):1412-1417.
70. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimaraes BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod.* 2014;40(8):1235-1240.
71. Benetti F, Queiroz IOA, Cosme-Silva L, Conti LC, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. *Braz Dent J.* 2019;30(4):325-332.
72. Chang SW, Kim JY, Kim MJ, Kim GH, Yi JK, Lee DW, et al. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(4):298-306.
73. Hsu TT, Yeh CH, Kao CT, Chen YW, Huang TH, Yang JJ, et al. Antibacterial and Odontogenesis Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate Combined with CO<sub>2</sub> Laser Treatment. *J Endod.* 2015;41(7):1073-1080.
74. Bidar M, Moushekhian S, Gharechahi M, Talati A, Ahrari F, Bojarpour M. The Effect of Low Level Laser Therapy on Direct Pulp Capping in Dogs. *J Lasers Med Sci.* 2016;7(3):177-183.
75. Cuthbertson RM, Kemp BE, Barden JA. Structure study of osteostatin PTHrP[Thr107](107-139). *Biochim Biophys Acta.* 1999;1432(1):64-72.
76. Lima SM, de Padua GM, Sousa MG, Freire Mde S, Franco OL, Rezende TM. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv.* 2015;33(1):203-213.
77. Hancock RE, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(5):321-334.
78. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1087-1093.
79. Wang G, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(9):2160-2172.
80. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):800-808.
81. Diehnelt CW. Peptide array based discovery of synthetic antimicrobial peptides. *Front Microbiol.* 2013;4:402.
82. Marin-Luevano P, Trujillo V, Rodriguez-Carlos A, Gonzalez-Curiel I, Enciso-Moreno JA, Hancock REW, et al. Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment. *Peptides.* 2018;101:135-144.
83. Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys Lipids.* 2011;164(8):766-781.

84. Wang ZH, Wang YL, Zeng XY. Construction and expression of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* by using the nisin-controlled gene expression system: the case of the PRRSV ORF6 gene. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):1088-1096.
85. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):503-516.
86. Grant M, Kilsgard O, Akerman S, Klinge B, Demmer RT, Malmstrom J, et al. The Human Salivary Antimicrobial Peptide Profile according to the Oral Microbiota in Health, Periodontitis and Smoking. *J Innate Immun.* 2018:1-12.
87. Mishra B, Reiling S, Zarena D, Wang G. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;38:87-96.
88. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol.* 2010;5(10):905-917.
89. Anunthawan T, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE, Klaynongsruang S. Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848(6):1352-1358.
90. Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, Benincasa M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016;16(1):76-88.
91. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
92. Yasir M, Willcox MDP, Dutta D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel).* 2018;11(12).
93. Choi KY, Chow LN, Mookherjee N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun.* 2012;4(4):361-370.
94. Wang X, Wang K, He Y, Lu X, Wen D, Wu C, et al. The functions of serpin-3, a negative-regulator involved in prophenoloxidase activation and antimicrobial peptides expression of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Dev Comp Immunol.* 2017;69:1-11.
95. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-1301 e1293.
96. Wang Y, Fan Y, Zhou Z, Tu H, Ren Q, Wang X, et al. De novo synthetic short antimicrobial peptides against cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2017;80:41-50.
97. da Silva BR, de Freitas VA, Nascimento-Neto LG, Carneiro VA, Arruda FV, de Aguiar AS, et al. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature. *Peptides.* 2012;36(2):315-321.
98. Tao R, Tong Z, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides.* 2011;32(8):1748-1754.
99. Tong Z, Ni L, Ling J. Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides.* 2014;60:32-40.
100. Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and Repair in Endodontics-A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics. *Dent J (Basel).* 2016;4(1).
101. He Y, Gan Y, Lu J, Feng Q, Wang H, Guan H, et al. Pulpal Tissue Inflammatory Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Mice. *J Endod.* 2016.
102. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-280.
103. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.
104. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(3):139-150.
105. Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, Cantuaria APC, Dutra FRP, Magalhaes BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, in vitro: An endodontic perspective. *Peptides.* 2017;95:16-24.
106. Winfred SB, Meiyazagan G, Panda JJ, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan VS, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent.* 2014;8(2):254-260.

107. Wang D, Shen Y, Ma J, Hancock REW, Haapasalo M. Antibiofilm Effect of D-enantiomeric Peptide Alone and Combined with EDTA In Vitro. *J Endod.* 2017;43(11):1862-1867.
108. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S173-S182.
109. Dantas E, Lima SMF, Cantuaria APC, Amorim IA, Almeida JA, Cunha TF, et al. Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Cell Physiol.* 2019.
110. Vieira Colombo AP, Magalhaes CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog.* 2016;94:27-34.
111. Wang Z, de la Fuente-Nunez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132512.
112. Zhang T, Wang Z, Hancock RE, de la Fuente-Nunez C, Haapasalo M. Treatment of Oral Biofilms by a D-Enantiomeric Peptide. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166997.
113. Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(4):243-254.
114. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004152.
115. Pena OM, Afacan N, Pistolic J, Chen C, Madera L, Falsafi R, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PLoS One.* 2013;8(1):e52449.
116. Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, et al. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnol.* 2007;25(4):465-472.
117. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock RE. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J Leukoc Biol.* 2013;94(1):159-170.
118. Steintraesser L, Hirsch T, Schulte M, Kueckelhaus M, Jacobsen F, Mersch EA, et al. Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PLoS One.* 2012;7(8):e39373.
119. Alencar-Silva T, Zonari A, Foyt D, Gang M, Pogue R, Saldanha-Araujo F, et al. IDR-1018 induces cell proliferation, migration, and reparative gene expression in 2D culture and 3D human skin equivalents. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(11):2018-2030.
120. Etayash H, Pletzer D, Kumar P, Straus SK, Hancock REW. Cyclic Derivative of Host-Defense Peptide IDR-1018 Improves Proteolytic Stability, Suppresses Inflammation, and Enhances In Vivo Activity. *J Med Chem.* 2020;63(17):9228-9236.
121. Ribeiro SM, de la Fuente-Nunez C, Baquir B, Faria-Junior C, Franco OL, Hancock RE. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):3906-3912.
122. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 2006;324(2):225-236.
123. Kajiya M, Shiba H, Komatsuzawa H, Ouhara K, Fujita T, Takeda K, et al. The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics. *J Endod.* 2010;36(6):1009-1013.
124. de Lima CL, Coelho MS, Royer C, Resende AP, Borges GA, Rodrigues da Silva J, et al. Rosiglitazone Inhibits Proliferation and Induces Osteopontin Gene Expression in Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2015;41(9):1486-1491.

125. Dotto SR, Travassos RM, de Oliveira EP, Machado ME, Martins JL. Evaluation of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and gel for smear layer removal. *Aust Endod J.* 2007;33(2):62-65.
126. Braga JM, Oliveira RR, Martins RC, Ribeiro Sobrinho AP. The effects of a mineral trioxide aggregate-based sealer on the production of reactive oxygen species, nitrogen species and cytokines by two macrophage subtypes. *Int Endod J.* 2014;47(10):909-919.
127. Lopez-Lopez A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simon-Soro A, Mira A. Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*. *Front Microbiol.* 2017;8:379.
128. Kim RJ, Kim MO, Lee KS, Lee DY, Shin JH. An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2015;60(10):1497-1502.
129. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163-175.
130. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014;30(7):769-784.
131. Ciandrini E, Campana R, Baffone W. Live and heat-killed *Lactobacillus* spp. interfere with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* during biofilm development on titanium surface. *Arch Oral Biol.* 2017;78:48-57.
132. Saeki A, Segawa T, Abe T, Sugiyama M, Arimoto T, Hara H, et al. Toll-like receptor 2-mediated modulation of growth and functions of regulatory T cells by oral streptococci. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(4):267-280.
133. Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuaria AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod.* 2015;41(7):1061-1065.
134. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-138.
135. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-1582.
136. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
137. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(7).
138. Tabatabaei FS, Torshabi M. In vitro proliferation and osteogenic differentiation of endometrial stem cells and dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(2):239-247.
139. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622.
140. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):97.
141. Chande S, Bergwitz C. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(11):637-655.
142. Macri-Pellizzeri L, De Melo N, Ahmed I, Grant D, Scammell B, Sottile V. Live Quantitative Monitoring of Mineral Deposition in Stem Cells Using Tetracycline Hydrochloride. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24(3):171-178.
143. Fristad I. Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. *Acta Odontol Scand.* 1997;55(4):236-254.
144. Fristad I, Bletsas A, Byers M. Inflammatory nerve responses in the dental pulp. *Endodontic Topics.* 2010;17:12-41.

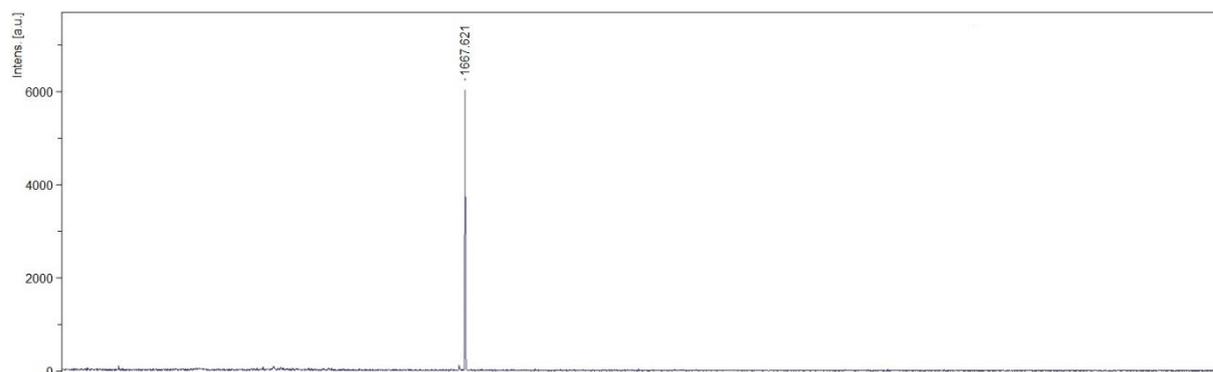
145. Farges JC, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*. 2011;216(4):513-517.
146. Silva ON, de la Fuente-Nunez C, Haney EF, Fensterseifer IC, Ribeiro SM, Porto WF, et al. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. *Sci Rep*. 2016;6:35465.
147. Wang D, Shen Y, Hancock REW, Ma J, Haapasalo M. Antimicrobial Effect of Peptide DJK-5 Used Alone or Mixed with EDTA on Mono- and Multispecies Biofilms in Dentin Canals. *J Endod*. 2018;44(11):1709-1713.
148. Shin M, Chen JW, Tsai CY, Aprecio R, Zhang W, Yochim JM, et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of a New Fast-Set MTA. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2071247.
149. Pimenta HC, Borges AH, Bandeca MC, Neves AT, Fontes RG, da Silva PV, et al. Antimicrobial activity of filling materials used in primary teeth pulpotomy. *J Int Oral Health*. 2015;7(4):54-57.
150. Wang D, Haapasalo M, Gao Y, Ma J, Shen Y. Antibiofilm peptides against biofilms on titanium and hydroxyapatite surfaces. *Bioact Mater*. 2018;3(4):418-425.
151. Silva PAO, Lima SMF, Martins DCM, Amorim IA, Lacorte C, de Almeida JA, et al. Concentrated MTA Repair HP reduced biofilm and can cause reparative action at a distance. *Int Endod J*. 2021.
152. Janini ACP, Bombarda GF, Pelepenko LE, Marciano MA. Antimicrobial Activity of Calcium Silicate-Based Dental Materials: A Literature Review. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(7).
153. Cao Y, Yin H, Wang W, Pei P, Wang Y, Wang X, et al. Killing *Streptococcus mutans* in mature biofilm with a combination of antimicrobial and antibiofilm peptides. *Amino Acids*. 2020;52(1):1-14.
154. Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2017;50 Suppl 2:e63-e72.
155. Haney EF, Wu BC, Lee K, Hilchie AL, Hancock REW. Aggregation and Its Influence on the Immunomodulatory Activity of Synthetic Innate Defense Regulator Peptides. *Cell Chem Biol*. 2017;24(8):969-980 e964.
156. Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *J Endod*. 2014;40(8):1118-1123.
157. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J*. 2017;50 Suppl 2:e31-e39.
158. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013;46(6):573-580.
159. Song F, Sun H, Huang L, Fu D, Huang C. The Role of Pannexin3-Modified Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Repairing Rat Cranial Critical-Sized Bone Defects. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(6):2174-2188.
160. Hall BE, Zhang L, Sun ZJ, Utreras E, Prochazkova M, Cho A, et al. Conditional TNF-alpha Overexpression in the Tooth and Alveolar Bone Results in Painful Pulpitis and Osteitis. *J Dent Res*. 2016;95(2):188-195.
161. Schmidt J, Hubler C, Krohn S, Schmalz G, Schneider H, Berg T, et al. Detection of Inflammatory and Homeostasis Biomarkers after Selective Removal of Carious Dentin-An In Vivo Feasibility Study. *J Clin Med*. 2021;10(5).
162. Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, Cantuaria APC, Junior NGO, Santos TS, et al. An Immunomodulatory Peptide Confers Protection in an Experimental Candidemia Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8).
163. Choe H, Narayanan AS, Gandhi DA, Weinberg A, Marcus RE, Lee Z, et al. Immunomodulatory Peptide IDR-1018 Decreases Implant Infection and Preserves Osseointegration. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(9):2898-2907.

164. Weekate K, Chuenjitkuntaworn B, Chuveera P, Vaseenon S, Chompu-Inwai P, Ittichaicharoen J, et al. Alterations of mitochondrial dynamics, inflammation and mineralization potential of lipopolysaccharide-induced human dental pulp cells after exposure to N-acetyl cysteine, Biodentine or ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2021;54(6):951-965.
165. Kimberley FC, Lobito AA, Siegel RM, Sreaton GR. Falling into TRAPS--receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):217.
166. Yuan Z, Zhu X, Li Y, Yan P, Jiang H. Influence of iRoot SP and mineral trioxide aggregate on the activation and polarization of macrophages induced by lipopolysaccharide. *BMC Oral Health.* 2018;18(1):56.
167. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014;40(1):113-118.
168. Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2009;88(4):339-344.
169. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385-388.
170. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod.* 2010;36(6):1042-1047.
171. Sequeira DB, Seabra CM, Palma PJ, Cardoso AL, Peca J, Santos JM. Effects of a New Bioceramic Material on Human Apical Papilla Cells. *J Funct Biomater.* 2018;9(4).
172. Huck C, Barud HD, Basso FG, Costa CA, Hebling J, Garcia LD. Cytotoxicity of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder) Containing Different Radiopacifiers. *Braz Dent J.* 2017;28(1):57-64.
173. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):709-721.
174. Yamamoto R, Yamakoshi Y. Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in porcine pulp and dentin - Gene expression and function. *J Oral Biosci.* 2016;58(4):120-127.
175. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone.* 2002;30(2):377-385.
176. Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Histol.* 2008;39(2):153-160.
177. Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC, et al. The dynamics of TGF-beta in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci Rep.* 2018;8(1):4450.
178. Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M. TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):354-358.
179. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):911-918.
180. Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, Wright JT, Kulkarni AB. Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *J Biol Chem.* 2001;276(14):11016-11020.
181. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.

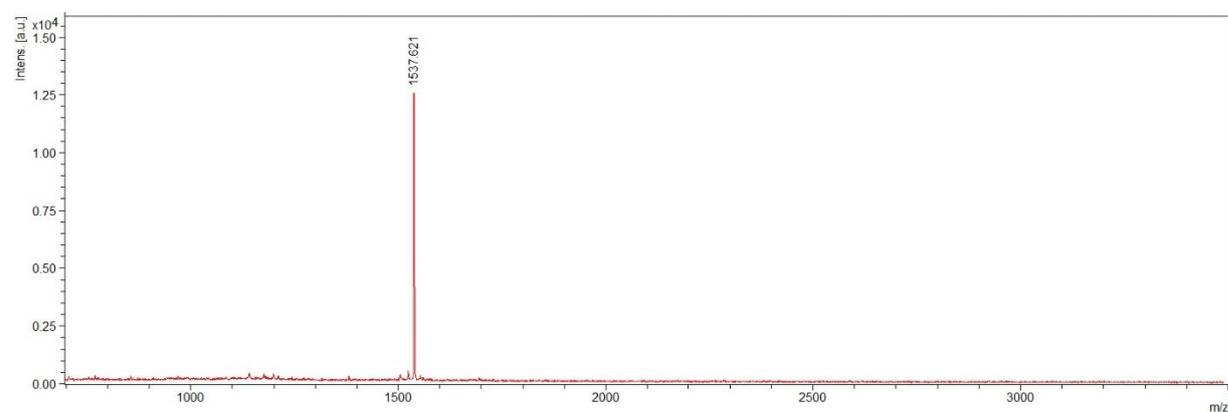
## 9 ANEXOS

Anexo 1 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo DJK-6 (1667.62 Da) (A) e IDR1018 (1537,62) (B), com pureza superior a 95%.

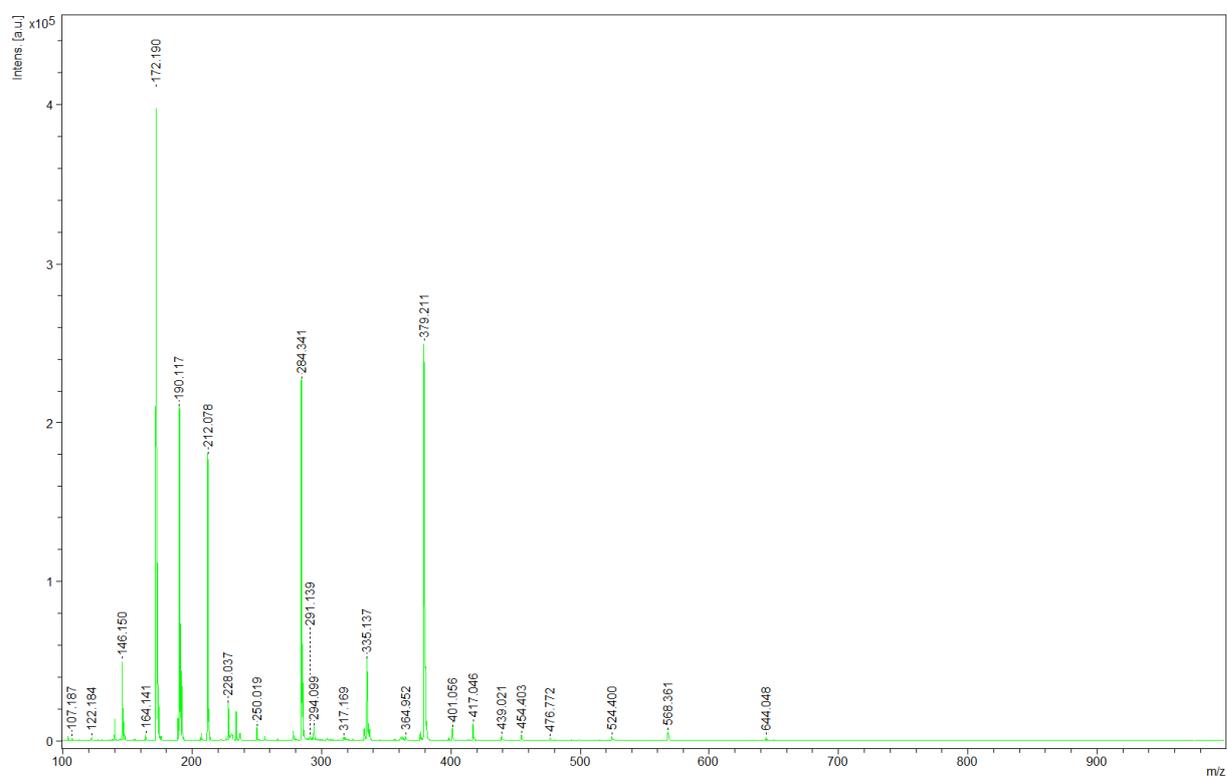
**(A)**



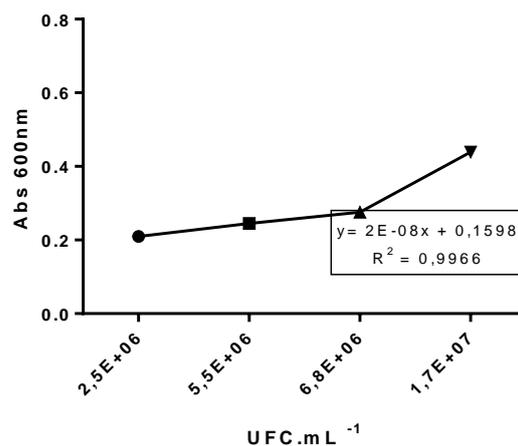
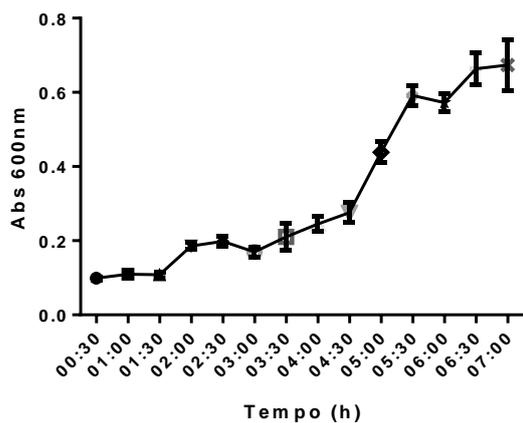
**(B)**



Anexo 2 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao extrato de MTA *Repair HP*.



Anexo 3 – Curvas representativa de crescimento da bactéria *S. mutans* de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação em horas. (B) representa a linha de tendência com equação e  $R^2$  e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL<sup>-1</sup>.



## Anexo 4 – Aprovação no comitê de ética em pesquisa



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Peptídeos de defesa do hospedeiro nos processos regenerativos do complexo dentino-pulpar

**Pesquisador:** Taia Maria Berto Rezende

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 72087417.0.0000.0029

**Instituição Proponente:** Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF  
Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.209.368

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de pesquisa que envolve a Escola de Odontologia e o Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (ex. Universidade Católica de Brasília), a ser desenvolvido pela estudante de doutorado Poliana Amanda Oliveira Silva (Ciências da Saúde, Universidade de Brasília) sob orientação da professora Dra. Taia Maria Berto Rezende.

**1. RESUMO**

Durante evolução do processo de cárie ou em decorrência a uma fratura dentária complexa, a exposição pulpar pode ocorrer. Um método para a preservação do tecido pulpar após sua exposição consiste na realização do capeamento pulpar direto, esta técnica visa a utilização de biomateriais que desempenham a função de estimular a cura e reparação do tecido perdido, através da produção de dentina reparadora. Os materiais mais empregados para terapia de capeamento consistem no hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e no agregado de trióxido mineral (MTA), que apresentam algumas desvantagens. Deste modo, pesquisas em busca de novos biomateriais com propriedades de indução de reparo tecidual, vêm sendo executadas. Neste sentido, a atuação antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomodulatória de peptídeos de defesa do hospedeiro

**Endereço:** QS 07 Lote 01 EPCT - Anexo Bloco Central - Bloco- L Sala - 02  
**Bairro:** Taguatinga **CEP:** 71.966-700  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3356-9784 **Fax:** (61)3356-3010 **E-mail:** cep@ucb.br



Continuação do Parecer: 2.209.368

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento.pdf	05/06/2017 18:21:45	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP.pdf	05/06/2017 18:15:20	Taia Maria Berto Rezende	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 09 de Agosto de 2017

---

**Assinado por:**

**Cintia do Couto Mascarenhas**  
(Coordenador)

Endereço: QS 07 Lote 01 EPCT - Anexo Bloco Central - Bloco- L Sala - 02  
 Bairro: Taguatinga CEP: 71.966-700  
 UF: DF Município: BRASILIA  
 Telefone: (61)3356-9784 Fax: (61)3356-3010 E-mail: cep@ucb.br

Anexo 5 - Produção científica relacionado a trabalhos como primeira autora durante o período de doutoramento.

Artigo 1 - Silva PAO, Lima SMF, Freire MS, Murad AM, Franco OL, Rezende TMB. Proteomic analysis of human dental pulp in different clinical diagnosis. Clin Oral Investig. 2021 May;25(5):3285-3295. doi: 10.1007/s00784-020-03660-3. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33159586.

Clinical Oral Investigations  
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03660-3>

ORIGINAL ARTICLE



## Proteomic analysis of human dental pulp in different clinical diagnosis

Poliana Amanda Oliveira Silva<sup>1</sup> · Stella Maris de Freitas Lima<sup>2,3</sup> · Mirna de Souza Freire<sup>2,4</sup> · André Melro Murad<sup>5</sup> · Octávio Luiz Franco<sup>2,6</sup> · Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3</sup>

Received: 4 May 2020 / Accepted: 27 October 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

**Objectives** The present study aimed to identify proteins obtained from pulp tissue and correlate with each clinical diagnosis (healthy pulp, inflamed pulp, and necrotic pulp).

**Materials and methods** A total of forty-five molars were used. Three biological replicas were evaluated. Lysis and sonication were used for protein extraction. Protein quantification was assessed by using the Bradford technique, and shotgun proteome analysis was performed by nanoUPLC-MS<sup>E</sup> using a Synapt G2 mass spectrometer. Mass spectra data were processed using the Waters PLGS software, and protein identification was done using the human Uniprot database appended to the PLGS search engine.

**Results** A total of 123 different proteins were identified in all evaluated pulp conditions. Among these, 66 proteins were observed for healthy pulp, 66 for inflamed pulp, and 91 for necrotic pulp. Most protein identification was related to immune response, multi-organism process, platelet activation, and stress in inflamed pulp samples compared to healthy pulp. Proteins related to cellular component organization or biogenesis, developmental process, growth, immune response, multi-organism process, response to stimulus, signaling, stress, and transport were identified in cases of apical periodontitis compared to inflamed pulp.

**Conclusions** The progression of the disease to inflamed pulp promoted a high abundance of proteins related to the immune system and stress. Comparing the necrotic pulp with inflamed pulp conditions, a high abundance of proteins was noticed related to metabolism, transport, and response between organisms.

**Clinical relevance** This finding may assist in future studies of new markers, understanding of tissue engineering, and development of future products.

**Keywords** Endodontics · Proteomics · Pulp · Pulpitis · Pulp necrosis

### Introduction

Dental pulp is a highly vascularized and innervated connective tissue closely surrounded by dentin [1, 2]. This tissue can

be exposed to inflammatory [3] and/or microbial aggressors [4]. The pulp inflammatory process triggered by these agents may vary according to the aggressors' type and intensity [5]. With the evolution of pulp disease, innate effector cells

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03660-3>.

✉ Taia Maria Berto Rezende  
 taiambr@gmail.com; taia@ucb.br

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Módulo C, room C-221, Brasília, Distrito Federal 70.790-160, Brazil

<sup>3</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>4</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, UNICEPLAC, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>6</sup> S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Published online: 07 November 2020

Springer

Artigo 2 - Silva PAO, Lima SMF, Martins DCM, Amorim IA, Lacorte C, de Almeida JA, Franco OL, Rezende TMB. Concentrated MTA Repair HP reduced biofilm and can cause reparative action at a distance. *Int Endod J.* 2021 Oct;54(10):1925-1936. doi: 10.1111/iej.13592. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34164821.

Received: 11 June 2020 | Accepted: 22 June 2021

DOI: 10.1111/iej.13592

ORIGINAL ARTICLE

INTERNATIONAL  
ENDODONTIC JOURNAL | WILEY

## Concentrated MTA Repair HP reduced biofilm and can cause reparative action at a distance

Poliana Amanda Oliveira Silva<sup>1</sup> | Stella Maris de Freitas Lima<sup>2,3</sup>  | Danilo César Mota Martins<sup>1,4</sup> | Ingrid Aquino Amorim<sup>2,5</sup> | Cristiano Lacorte<sup>6</sup> | Jeesser Alves de Almeida<sup>7</sup> | Octávio Luiz Franco<sup>2,8,9</sup>  | Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>4</sup>Curso de Odontologia, Centro Universitário ICESP, Brasília, Brazil

<sup>5</sup>Curso de Odontologia, Centro Universitário UNIEURO, Brasília, Brazil

<sup>6</sup>Laboratório de Biologia Sintética, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

<sup>7</sup>Curso de Educação Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brazil

<sup>8</sup>S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

<sup>9</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de

Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

### Correspondence

Taia Maria Berto Rezende, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil.  
Email: [tatambr@gmail.com](mailto:tatambr@gmail.com); [tata@p.uch.br](mailto:tata@p.uch.br)

### Funding information

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – grant 409196/2018-5); Fundação de Amparo do Distrito Federal (FAPDF – grant 0193.001702/2017) and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).

### Abstract

**Aim:** To evaluate *in vitro* whether MTA Repair HP can induce repair processes at a distance, including its effects on biofilm, cell viability, migration, production of TGF- $\beta$ , phosphate and ALP, evaluated through MTA diluted extracts.

**Methodology:** Initially, antibacterial tests were performed with the bacterium *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) in the presence of MTA extracts (dilutions of 1:1, 1:2 and 1:4). Growth inhibition assay by microdilution in broth, antibiofilm plate assay of young biofilm and antibiofilm assay in confocal microscopy of mature biofilm were carried out. Then, pulp cells were stimulated in the presence of several MTA dilutions, and cell viability (MTT assay), proliferation and migration capacity (scratch assay) were evaluated. To evaluate the capacity of 1:1, 1:2 and 1:4 dilutions of MTA Repair HP to promote the production of important agents of odontogenic differentiation and mineralization, ALP activity, TGF- $\beta$  secretion and phosphate quantification were measured. Statistical differences were verified using one-way and two-way ANOVA and Tukey's post-tests.

**Results:** The test dilutions of MTA Repair HP did not inhibit planktonic *S. mutans* growth but were able to reduce young and mature *S. mutans* biofilm ( $p < 0.001$ ). In addition, none of the MTA Repair HP dilutions was cytotoxic for pulp cells. The 1:2 and 1:4 dilutions of MTA Repair HP induced migration and proliferation of pulp cells ( $p < 0.05$ ). ALP activity and TGF- $\beta$  secretion were independent of the tested dilution

Artigo 3 - Silva PAO, LIMA SMF, Almeida JA, Grisi DC ; KOGAWA EM, FRANCO OL, REZENDE TMB. Systemic conditions of diabetic patients diagnosed with apical periodontitis. RGO. REVISTA GAÚCHA DE ODONTOLOGIA (ONLINE), 2020.

<http://dx.doi.org/10.1590/1981-86372020005020190110>

| ORIGINAL

## *Systemic conditions of diabetic patients diagnosed with apical periodontitis*

### *Condições sistêmicas de pacientes diabéticos diagnosticados com periodontite apical*

Pollana Amanda Oliveira SILVA<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0001-5570-2945>

Stella Maris de Freitas LIMA<sup>2,3</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-1259-8761>

Josser Alves de ALMEIDA<sup>4</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-3409-8005>

Daniela Corôa GRISI<sup>5</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-2468-8190>

Evelyn Mikaela KOGAWA<sup>6</sup>  <https://orcid.org/0000-0001-7573-1068>

Simone Cruz LONGATTI<sup>7</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-1021-0146>

Octávio Luiz FRANCO<sup>1,8</sup>  <https://orcid.org/0000-0001-9546-0525>

Tala Maria Berto REZENDE<sup>1,9,10</sup>  <https://orcid.org/0000-0000-4148-0059>

#### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to evaluate the association between glycemic control status in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients and apical periodontitis. **Methods:** For that, twenty-seven patients were involved in this study. The survey was based on anamnesis, intra and extra oral examination and radiographic evaluation. Diabetes mellitus information involved type of diabetes and blood glucose analysis. Patients were divided according to their metabolic control status (glycemic controlled and poorly controlled T2DM patients). **Results:** A higher fasting blood glucose level ( $p = 0.004$ ) and a higher percentage of HbA1c ( $p = 0.0001$ ) were demonstrated in poorly controlled T2DM patients when compared to glycemic controlled T2DM. However, the frequency of apical periodontitis and the elapsed time since diabetes mellitus diagnosis were higher in controlled T2DM patients, reaching 64%. Nevertheless, controlled T2DM patients presented a higher number of apical periodontitis cases ( $p < 0.05$ ). Thus, concluded that controlled patients T2DM presented higher presence of apical periodontitis than poorly controlled T2DM ones. In these patients, the time elapsed since the

\*\*\*\*\*

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasília, DF, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Católica de Brasília, Curso de Odontologia, Brasília, DF, Brasil.

<sup>3</sup> Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, DF, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade de Brasília, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Brasília, DF, Brasil.

<sup>6</sup> Universidade Católica de Brasília, Curso de Farmácia, Brasília, DF, Brasil.

<sup>7</sup> Universidade Católica Dom Bosco, S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>8</sup> Universidade Católica de Brasília, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia e Curso de Odontologia, SGAN 916 - Av. W5 - Campus II - Módulo C, Sala C-221, 70790-160, Brasília, DF, Brasil. Correspondence to: TMB REZENDE. E-mail: <talambtr@gmail.com>.

\*\*\*\*\*

How to cite this article

Silva PAO, Lima SMF, Almeida JA, Grisi DC, Kogawa EM, Longatti SC, Franco OL, Rezende TMB. Systemic conditions of diabetic patients diagnosed with apical periodontitis. RGO, Rev Gaúch Odontol. 2021;69(s202):10050. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-86372020005020190110>

## Anexo 6 - Produção científica em processo de submissão.

International Endodontic Journal



**Host Defense Peptides combined with MTA Repair HP  
increase the repair capacity of the pulp-dentine complex**

Journal:	<i>International Endodontic Journal</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript Type:	Original Scientific Article
Keywords:	Mineral trioxide aggregate, bioceramic materials, peptides, IDR1018, DJK-6, pulp capping

## Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

**Submitted to**

International Endodontic Journal

**Manuscript ID**

IEJ-21-00678

**Title**

Host Defense Peptides combined with MTA Repair HP increase the repair capacity of the pulp-dentine complex

**Authors**

Silva, Poliana Amanda  
Martins, Danilo  
Cantuária, Ana  
Andrade, Rosângela  
Lacorte, Cristiano  
de Almeida, Jesser  
Aguiar, Lana  
Corrêa, José Raimundo  
Franco, Octavio  
Rezende, Taia

**Date Submitted**

16-Oct-2021

Anexo 7 - Produção científica relacionado a trabalhos em colaboração durante o período de doutoramento.

Artigo 1 – 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. *Int Endod J.* 2019 Apr;52(4):424-438. doi: 10.1111/iej.13019. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30244498.

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

A. F. dos Santos<sup>1</sup>, J. M. Pacheco<sup>1</sup>, P. A. O. Silva<sup>2</sup>, A. K. Bedran-Russo<sup>3</sup>,  
T. M. B. Rezende<sup>2</sup> , P. N. R. Pereira<sup>4</sup> & A. P. D. Ribeiro<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; <sup>3</sup>Department of Restorative Dentistry, UIC College of Dentistry, Chicago, IL, USA; and <sup>4</sup>Department 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*, 52, 424–438, 2019.

**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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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).

Artigo 2 – LIMA SMF, SILVA PAO, REZENDE TMB. Improvement of Reparative Bioceramics in Endodontics - A Critical Review. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, v. 24, p. 18306-18310, 2020

Mini Review



ISSN: 2574 -1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2020.24.004059

## Improvement of Reparative Bioceramics in Endodontics - A Critical Review

Stella Maris de Freitas Lima<sup>1\*</sup>, Poliana Amanda Oliveira Silva<sup>2</sup> and Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dental Course, Universidade Católica de Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Post graduation in Health Sciences, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Post graduation in Genomic Sciences and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, Brazil

\*Corresponding author: Stella Maris de Freitas Lima, Professor of Endodontics, Universidade Católica de Brasília, Brazil



### ARTICLE INFO

Received: 📅 December 30, 2019

Published: 📅 January 10, 2020

**Citation:** Stella Maris de Freitas Lima, Poliana Amanda Oliveira Silva, Taia Maria Berto Rezende. Improvement of Reparative Bioceramics in Endodontics - A Critical Review. Biomed J Sci & Tech Res 24(3)-2020. BJSTR. MS.ID.004059.

**Keywords:** Bioceramics; Endodontics; MTA

### ABSTRACT

The advent of bioceramics materials increases the possibility of reparative and regenerative processes in dentistry, and more precisely, in endodontics. Bioceramics materials presents biocompatibility, bioactivity, resistance to leakage, sealing ability, and biomineralization activity. Mineral trioxide aggregate (MTA) is a gold standard bioceramic material indicated for reparative procedures presenting high clinical success. MTA is used for pulp capping, pulpotomy, apexification, perforation, root resorption repair, regenerative endodontics, and apical surgery. The emergence of MTA demonstrated great potential in endodontic therapies, and modifications and improvements of this bioceramic gave rise to many other materials. New bioceramic materials are now available in several countries with distinct compositions. Although there is a concern regarding the modification of compounds and formulation of bioceramic materials for reaching better properties, distinct products produce the same effects of reduced leakage, biological activity, sealing ability, marginal adaptation and bridge formation. The biological properties of bioceramic materials are well defined in literature, but new formulations must be evaluated in longitudinal clinical cases, and systematic reviews and meta-analysis are needed to compare these products better. The present review demonstrates a summary of bioceramics properties, applications, improvements, and future directions in endodontics to maintain tooth longevity.

### Introduction

The dental structure can be affected by physical, chemical, and biological events. Dental caries and trauma are the most frequent aggressions involving teeth [1]. Both circumstances can trigger pulpal responses and culminate in inflammation and/or tissue necrosis [2]. The necrotic pulp can be infected by many microorganisms that can mediate the inflammation and destruction of the tooth surrounding tissues [3]. Pulp and periradicular inflammation can also trigger root internal/external resorption and alveolar bone resorption [4,5]. Thus, several pathological conditions can affect dental structures and, the first intervention must be based on eliminating the aggression by treating trauma and/or infection (e.g., treating caries, restoring cavities, performing endodontic therapy). After tissue inflammation and repair should be stimulated, and a new tissue can be formed or replaced. For these reasons, medicine and dentistry are

in constant improvements involving machines, techniques, and materials for treating diseases and improving life quality. The advent of bioceramics materials increases the possibility of reparative and regenerative processes in dentistry, and more precisely, in endodontics. The present review demonstrates a summary of bioceramics properties, applications, improvements, and future directions in endodontics to maintain tooth longevity better.

### Bioceramics Applications for Reparative Endodontics

Ceramics are inorganic non-metallic materials produced by heated raw minerals [6]. Bioceramics are materials composed of nanosphere particles of tricalcium silicate, tantalum pentoxide, dicalcium silicate, monobasic, amorphous silicon dioxide, and calcium phosphate [7]. Bioceramic materials include alumina and zirconia, bioactive glass, glass ceramics, calcium silicates, hydroxyapatite, re-