

CAROLINE LOURENÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ROSIGLITAZONA, AGONISTA DO RECEPTOR GAMA ATIVADO
POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS, SOBRE A PROLIFERAÇÃO E
EXPRESSÃO DO TGF β 1 EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA POLPA
DENTÁRIA HUMANA**

BRASÍLIA, 2012

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

CAROLINE LOURENÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ROSIGLITAZONA, AGONISTA DO RECEPTOR GAMA ATIVADO
POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS, SOBRE A PROLIFERAÇÃO E
EXPRESSÃO DO TGF β 1 EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA POLPA
DENTÁRIA HUMANA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Acevedo Poppe

BRASÍLIA

2012

CAROLINE LOURENÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ROSIGLITAZONA, AGONISTA DO RECEPTOR GAMA ATIVADO
POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS, SOBRE A PROLIFERAÇÃO E
EXPRESSÃO DO TGF β 1 EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA POLPA
DENTÁRIA HUMANA**

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

Aprovado em 05 de outubro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Ana Carolina Acevedo Poppe – (presidente)

Universidade de Brasília - UnB

Francisco de Assis Rocha Neves – (examinador interno)

Universidade de Brasília - UnB

Taia Maria Berto Rezende - (examinador externo)

Universidade Católica de Brasília - UCB

Eliete Neves da Silva Guerra – (suplente)

Universidade de Brasília – UnB

Dedico este trabalho, com todo carinho que possa existir...

Aos meus pais, portas da minha existência...

Por me ensinarem o mais importante da vida...o amor!

Pilares da minha caminhada! Tudo que sou devo a vocês...meus pais!

Meus guerreiros! Minha vida!

Ao Rodrigo, meu Xuxu...

Por me ensinar o real significado de companheirismo e cumplicidade!

Quantas vezes quis cair e você me levantou! Quantas vezes chorei e você me confortou!

Obrigada pelo doce encanto do seu amor!

Ao seu lado, construo meu mundo de forma mais graciosa!

Às minhas irmãs...

Pedrinhas preciosas lapidadas por Deus...

Nailê, sua meiguice me encanta! Eu não seria a Cacá sem você!

Gabriela, sua determinação me inspira desde pequenina!

Muito obrigada por serem sempre tão cuidadosas comigo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os dias me permitir aprender com a vida!

À professora Ana Carolina, minha querida orientadora, pela feliz oportunidade que me proporcionou ao me introduzir na área de pesquisa! Muito obrigada por sempre acreditar em mim e em meu potencial! Obrigada por todos esses anos de convivência e aprendizado!

Ao professor Francisco, meu orientador de coração, minha imensa gratidão! Sinto-me honrada por ser sua aluna! Encanta-me sua paixão pela docência e pela pesquisa! Obrigada por ter me recebido de portas abertas no Farmol! E por ter confiado em mim! Obrigada pelo grande dom de acalmar minhas incansáveis angústias, durante o mestrado!

À querida Angélica! Faltam palavras para dizer o quanto te admiro! Sua dedicação, seu carinho! Consigo ver amor em tudo o que faz! Muito obrigada por acreditar em mim! Muito obrigada pelos conselhos e pelas palavras meigas! Muito obrigada pela dedicação! Não me canso de dizer que você me inspira a ser uma pessoa melhor! Foi um privilégio ter te conhecido! Muito obrigada por tudo!

Aos professores Marie, Luiz, Guilherme, Fátima, Adriana e Andrea! De coração, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e por me receberem de forma tão graciosa!

À professora Taia! Muito obrigada por tão gentilmente ter aceitado participar da minha banca!

À minha amiga Flora! Admiro sua garra e determinação! Muito obrigada por ter sido minha tutora ao me introduzir nas atividades laboratoriais do Farmol! De coração, sou muito grata!

À minha amiga Carine! Doce Carine! Alegre Carine! Obrigada pela amizade construída!! Obrigada por tantas vezes me consolar e me incentivar a sempre seguir em frente, não importando as dificuldades! Obrigada pelas incansáveis ajudas! Sem você, os ensaios de proliferação não teriam dado certo!

À minha amiga Michella! Minha querida Michella! Tão meiga! Tão organizada! E tão dedicada! Este trabalho é um pouco seu também! Sem a sua preciosa ajuda, eu não teria conseguido! Muito obrigada pela paciência, pela dedicação e pela amizade!!

Ao meu grande companheiro de bancada e amigo Alexandre! Pessoa simplesmente sensacional! Coração enorme! E uma determinação de gigante! Por piores que fossem os problemas, você sempre conseguia pensar positivo para achar soluções! Tenho imensa admiração!

Ao Maurício! Meu mestre! Muito obrigada! É incrível sua capacidade de simplificar as coisas, tornando-as tão fáceis! Seu otimismo, sua descontração são ensinamentos que levarei para vida!

Ao meu amigo Martin! Meu irmão! É tão bom ser recebida no Farmol com um sorriso e abraço seu! Obrigada por ser tão atencioso comigo e querer sempre meu bem!

À minha amiga Cris! Sua amizade tornou as idas ao Farmol muito mais prazerosas! Obrigada por ser tão atenciosa e dedicada!

À minha amiga Mariella! Eu simplesmente amo o seu jeitinho mineiro de ser! O laboratório não seria o mesmo sem você!

À querida Rilva! Sua força, organização, inteligência e solicitude me encantam! De coração, eu te agradeço por tudo que me ensinou! E por todas as vezes que me ajudou!

À Glorinha, por ter me introduzido no laboratório ainda na graduação! Obrigada pelos seus agradáveis ensinamentos!

À bela Isa...Isabella! Eu simplesmente adoro sua companhia! Sua alegria me contagia! Obrigada por tantos conselhos e incentivos!

À minha amiga Ana! Companheirinha de longa data! Obrigada por sua amizade, cumplicidade e incentivo!!

À minha amiga Pri! Pela cumplicidade de todos esses anos!

À minha querida amiga Paula! Por acreditar em mim e por compreender minha ausência durante esses anos!

Aos meus queridos amigos Cinthia, Tiago, Aline, Fernando, Andressa, Dora, lá e Dani que sempre torceram muito por mim!

Aos amigos do laboratório, Manu, Isabel, Pedro, Dileesh, Jana, Maíra, Carol, Dora, Ádria, Bia, Cintia, Natália, Lia, Olívia e Ivone por tornarem os momentos de bancada tão mais alegres!

Hoje sou um pouquinho de cada um de vocês!

"Cem vezes todos os dias lembro a mim mesmo que minha vida interior e exterior depende dos trabalhos de outros homens, vivos ou mortos, e que devo esforçar-me a fim de devolver na mesma medida que recebi."

Albert Einstein

RESUMO

Estudos recentes sugerem que o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) e seu agonista, a rosiglitazona, podem modular a expressão de moléculas relacionadas com eventos imuno-inflamatórios em células da polpa dentária humana, indicando, assim, a possibilidade de se utilizar agonistas deste receptor nuclear (RN) no controle da inflamação pulpar. Entretanto, eventos igualmente importantes no processo de reparo do complexo dentino-pulpar, tais como proliferação e expressão de genes envolvidos com a formação de dentina terciária, não foram abordados nesses estudos. Diante disso, a proposta do presente trabalho foi investigar o efeito da rosiglitazona sobre a proliferação celular e sobre a expressão do TGF β 1, em modelo experimental de cultura primária de células da polpa dentária humana. Para cumprir com os objetivos propostos, foram estabelecidas culturas primárias de polpas obtidas de terceiros molares inclusos e hígidos, com a raiz ainda em formação, extraídos por indicações clínicas. Os efeitos da rosiglitazona sobre a proliferação celular foram avaliados por meio de ensaio de incorporação de timidina marcada radioativamente com trítio ($[^3\text{H}]$ -timidina) e os efeitos sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1 foram avaliados por meio da técnica de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-PCRq). Os resultados dos ensaios de proliferação demonstraram que o tratamento com rosiglitazona durante 24 horas diminuiu a proliferação das células em cultura, enquanto que o tratamento durante 72 horas não alterou a proliferação celular. Os resultados dos ensaios de expressão gênica sugeriram que o tratamento com rosiglitazona durante 7 dias não alterou a expressão do gene que codifica o TGF β 1, no entanto, após 14 dias de tratamento com o ligante, sua expressão aumentou. Em conjunto os resultados dos ensaios de proliferação e de expressão gênica sugerem que a rosiglitazona possa estar envolvida com a ativação de vias de diferenciação ou de vias apoptóticas. No entanto, investigações adicionais são necessárias para melhor esclarecer o papel do PPAR γ na fisiopatologia pulpar.

Palavras-chave: complexo dentino-pulpar; cultura primária de células pulpares; receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais; rosiglitazona; fator transformador do crescimento β 1.

ABSTRACT

Several studies have suggested that peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and his agonist, rosiglitazone, can regulate the expression of immune-inflammatory related molecules in human dental pulp cells. The authors have raised the possibility of using PPAR γ agonists as an option in pulpal inflammation treatment. However, others events involved in the dental-pulp complex repair process, such as cell proliferation and gene expression of molecules related with the tertiary dentin formation, were not assessed in these studies. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of rosiglitazone on cell proliferation and on the TGF β 1 gene expression in primary human dental pulp cells culture. In order to perform the purposes of the present study, primary cultures were established from pulp tissue obtained from non-erupted, caries-free third molars, which were extracted due to therapeutic reasons. Effects of rosiglitazone on cell proliferation were evaluated by tritium labeled thymidine incorporation assay ($[^3\text{H}]$ -thymidine) and effects on TGF β 1 gene expression were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (RT-PCRq). The proliferation assays showed that treatment with rosiglitazone for 24 hours decreased cell proliferation, while after 72 hours treatment no changes in cell proliferation where observed when compared with controls. Gene expression results suggested that treatment with rosiglitazone for 7 days did not modify TGF β 1 gene expression, however, after 14 days ligand treatment, an increase in the expression was observed. Proliferation and TGF β 1 gene expression results suggest that rosiglitazone might be involved in differentiation or apoptotic pathways activation in the primary pulp cell cultures studied. However, further investigations are required to better understand the role of PPAR γ in dental pulp pathophysiology.

Key words: dental-pulp complex; human primary dental pulp cells culture; peroxisome proliferator-activated receptor gamma; rosiglitazone; transforming growth factor β 1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do complexo dentino-pulpar.....	22
Figura 2: Representação esquemática das zonas ou camadas morfológicas da polpa dentária madura.	24
Figura 3: Representação esquemática dos odontoblastos morfológicamente maduros	25
Figura 4: Estrutura geral dos PPARs, com a representação dos domínios funcionais.. ..	33
Figura 5: Regulação positiva da transcrição gênica ou transativação dependente de ligante.....	34
Figura 6: Repressão basal da transcrição gênica na ausência do ligante.....	35
Figura 7: Transrepressão dependente ligante.....	36
Figura 8: Obtenção de tecido pulpar a partir de 3° molares inclusos.....	44
Figura 9: Etapas para cultivo do tecido pulpar pela técnica de <i>explant</i>	46
Figura 10: Etapas para extração do RNA total.....	50
Figura 11: Aspecto morfológico de células da polpa dentária humana.....	57
Figura 12: O tratamento com rosiglitazona durante 24h diminui a proliferação de células derivadas de cultura primária da polpa dentária humana de forma concentração-dependente.....	58
Figura 13: O tratamento com rosiglitazona durante 72h não tem efeito sobre a proliferação de células derivadas de cultura primária da polpa dentária humana.....	59
Figura 14: Análise da integridade das subunidades 28S e 18S das amostras de RNA total.....	61

Figura 15: Genes alvo (TGF β 1) e controle (β -actina) apresentam eficiência de amplificação equivalente.....	62
Figura 16: As sequências de <i>primers</i> escolhidos apresentam especificidade de amplificação.....	63
Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do TGF β 1 após 7 e 14 dias de tratamento com veículo (DMSO) ou com rosiglitazona.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos pares de <i>primers</i> dos genes alvo e referência.....	52
Tabela 2: Grau de pureza do RNA total.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB - β -actina

AF-1 - função de ativação independente de ligante

AF-2 - função de ativação 2

AP-1 - proteína ativadora 1

BMP - proteínas morfogenéticas ósseas

Bp - pares de bases

cDNA - DNA complementar

cpm - contagem por minuto

Ct - *cycle threshold* / ciclo limiar

DBD - domínio de ligação ao DNA

DEPC - dietilpirocarbonato

DM2 - *diabetes mellitus* tipo 2

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

DR-1 - repetições diretas da sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo

ECM - matriz extracelular

EDTA - etilenodiamino tetra-acético

EPM - erro padrão da média

FGFs - fatores de crescimento para fibroblasto

hMSC - células-tronco mesenquimais humanas derivadas da medula óssea

HRE - elementos responsivos ao hormônio

HUB - Hospital Universitário de Brasília

ICAM-1 - molécula de adesão intracelular 1

IGFs - fatores de crescimento semelhante a insulina

IL-1 β - interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
LBD - domínio de ligação ao ligante
LDL - lipoproteínas de densidade baixa
LPS - lipopolissacarídeo
milli-Q - água deionizada pelo sistema Milli-Q fornecido pela *Millipore Corporation*
MMP-2 - metaloproteinase de matriz 2
MMP-9 - metaloproteinase de matriz 9
MMPs - metaloproteinases de matriz
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NF-kB - fator nuclear kB
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PDGF - fator de crescimento derivado de plaqueta
PPAR - receptores ativados por proliferadores peroxissomais
PPAR α – receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR β – receptor beta ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR γ - o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PPREs - elementos responsivos dos proliferadores peroxissomais
RN - receptores nucleares
RT - transcrição reversa
RT-PCRq - transcrição reversa e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa
RXR - receptor retinóide X
SFB - soro fetal bovino
TBE - tampão Tris-borato-EDTA
TCA - ácido tricloroacético
TGF β 1 – fator transformador do crescimento β 1
TLR - receptores *Toll-like*
Tm - temperatura de dissociação/ *melting temperature*
TNF α - fator de necrose tumoral- α

TZDs – tiazolidinedionas

UnB - Universidade de Brasília

UV - luz ultravioleta

VCAM-1 - molécula de adesão celular-1

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Complexo dentino-pulpar.....	22
2.1.1. Polpa dentária	23
2.1.2. Odontoblastos	24
2.1.3. Dentina.....	26
2.1.4. Potencial de reparo do complexo dentino-pulpar.....	27
2.2. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais.....	31
2.2.1. Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais	37
2.2.1.1. Agonistas sintéticos do PPAR γ : glitazonas.....	39
2.2.1.2. PPAR γ e o tecido pulpar.....	40
3. OBJETIVO GERAL	42
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Aspectos éticos.....	43
4.2. Cultura primária de células da polpa de dentes humanos.....	43
4.2.1. Obtenção de polpa dentária humana.....	43
4.2.2. Cultivo primário de células da polpa do dente.....	45
4.3. Obtenção e preparo da rosiglitazona	47
4.4. Ensaio de proliferação celular por incorporação de metil- ³ H-timidina.....	47
4.5. Detecção da expressão gênica relativa do TGF β 1.....	48
4.5.1. Extração de ácido ribonucleico (RNA) total	48
4.5.2. Quantificação, pureza e integridade do RNA total	50
4.5.4. Desenho dos <i>primers</i>	51
4.5.5. Transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo (RT-PCRq)	52
4.5.6. Validação dos <i>primers</i>	53
4.5.6.1. Curva de eficiência relativa dos <i>primers</i>	53
4.5.6.2. Curvas de dissociação dos <i>primers</i>	54
4.5.7. Quantificação relativa do gene que codifica o TGF β 1	54
4.6. Análise estatística.....	55

5. RESULTADOS	56
5.1. Estabelecimento de cultura primária de células da polpa de dentes humanos.....	56
5.2. Efeito da rosiglitazona sobre a proliferação de células da polpa dentária	58
5.3. Efeito da rosiglitazona sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1, em cultura primária de células da polpa dentária humana.....	60
5.3.1. Análise da qualidade do RNA total	60
5.3.2. Análise da eficiência relativa dos <i>primers</i>	61
5.3.3. Análise da especificidade dos <i>primers</i>	63
5.3.4. Análise do efeito da rosiglitazona na expressão do TGF β 1	64
6. DISCUSSÃO	65
6.1. Ensaio de proliferação celular	69
6.2. Efeito da rosiglitazona sobre a expressão do gene que codifica TGF β 1	72
7. CONCLUSÃO	77
8. REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	100
APÊNDICES	101

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo não mineralizado presente na cavidade interna do dente e delimitada pela dentina, tecido conjuntivo mineralizado avascular e maior constituinte do arcabouço mineral do órgão dentário (1). A dentina é formada pelos odontoblastos, que são as células especializadas da polpa (2). Juntas, dentina e polpa formam o complexo dentino-pulpar, responsável pela manutenção da vitalidade do dente (3).

Como outros tecidos do organismo, o complexo dentino-pulpar apresenta potencial de reparo, sendo capaz de responder a injúrias externas que afetam o dente (4). Esta resposta é observada por meio da deposição de dentina terciária, um tipo específico de dentina secretada apenas nas regiões que sofreram injúria e cuja principal função é de atuar como barreira física que afasta os irritantes da polpa e compensa, pelo menos parcialmente, as perdas de estrutura dentária, causadas por doença ou trauma (5). O processo de reparo é um evento complexo que pode envolver tanto a participação dos odontoblastos primários (6) como também células-tronco/progenitoras presentes no tecido pulpar (7, 8). Estas, quando requisitadas, são estimuladas a proliferar, migrar e a se diferenciar em células capazes de produzir tecido mineralizado, como tentativa de manter a polpa vital (9).

Muitos são os mecanismos moleculares que regulam as diversas etapas necessárias ao reparo e acredita-se que fatores de crescimento desempenhem papel chave nestes processos (10). Entre esses mediadores, o fator transformador do crescimento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) parece ser uma molécula crucial, regulando os eventos celulares de migração, proliferação e diferenciação, além da síntese e secreção de constituintes da matriz extracelular (11), essenciais para a formação da barreira mineralizada de dentina, que confere proteção à polpa.

A qualidade bem como o grau de sucesso de formação desta nova camada de dentina são modulados por diversos fatores, dependentes tanto da intensidade e extensão da injúria como também da reação imuno-inflamatória resultante (12). Esta é necessária para eliminar o agente agressor e promover reparo dos danos

causados aos tecidos (13). No entanto, quando exacerbada e descontrolada, pode causar destruição tecidual, frustrando qualquer tentativa de reparo e levando, por fim, à necrose (12). Assim, acredita-se que o controle da inflamação, antes que danos irreversíveis sejam impostos, seja necessário para favorecer os eventos relacionados com o reparo dentinário. Estratégias terapêuticas neste sentido foram sugeridas recentemente tendo como alvo o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) (14, 15).

O PPAR γ é um fator de transcrição regulado por ligante pertencente à superfamília dos receptores nucleares (RN), da qual fazem parte também os outros dois isotipos de PPAR, o PPAR α e o PPAR β/δ (16). O PPAR γ apresenta como ligantes endógenos ácidos graxos dietéticos e produtos derivados de seu metabolismo (17, 18) e, como ligantes sintéticos, as tiazolidinedionas (TZDs), classe de sensibilizadores insulínicos utilizada no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (19).

O PPAR γ é uma proteína de expressão tecidual ampla e funções variadas, participando da regulação da homeostasia energética, do controle do ciclo celular, da diferenciação e apoptose, sendo essencial para o processo de adipogênese (20, 21). Além disso, o PPAR γ e seus agonistas apresentam efeitos anti-inflamatórios, que já foram demonstrados em diferentes tecidos e linhagens celulares, incluindo células da polpa dentária (14, 15), o que despertou o interesse em se utilizar agonistas deste RN para controle da inflamação pulpar. Entretanto, os estudos que avaliaram os efeitos anti-inflamatórios do PPAR γ sobre células da polpa dentária não verificaram seus efeitos sobre a formação de dentina terciária e não há, na literatura, estudos que investiguem o papel do PPAR γ e de seus agonistas no processo de reparo dentinário e eventos celulares envolvidos. Assim, elucidar esses efeitos representa uma importante estratégia para a ampliação dos conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares que regulam a resposta de reparo do tecido pulpar, além de melhor esclarecer se agonistas do PPAR γ são potenciais agentes terapêuticos no controle da resposta imuno-inflamatória da polpa.

Diante disso, a proposta deste trabalho foi verificar o efeito de um agonista sintético do PPAR γ , a rosiglitazona, sobre dois eventos relacionados com o processo

de reparo, proliferação celular e expressão gênica do TGF β 1, em cultura primária de células da polpa dentária humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Complexo dentino-pulpar

O complexo dentino-pulpar é constituído pela polpa dentária e pela dentina, tecidos morfológicamente distintos, mas referidos como uma única entidade integrada por compartilharem da mesma origem embriológica e por apresentarem uma íntima relação topográfica e funcional (3) (**Figura 1**).

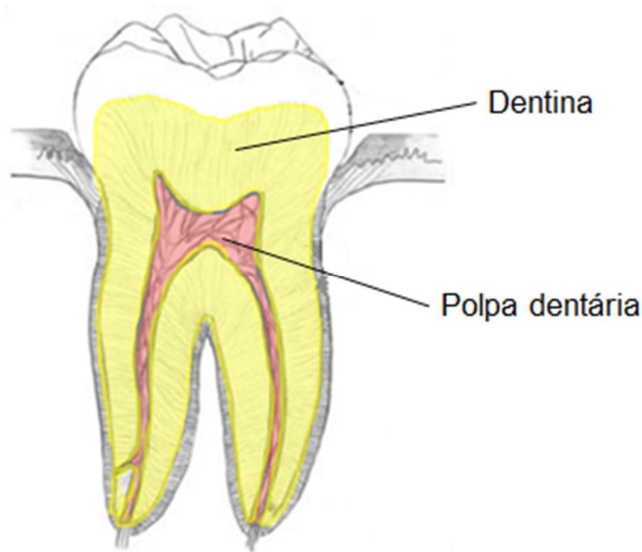


Figura 1: Representação esquemática do complexo dentino-pulpar. Em vermelho, polpa dentária, tecido conjuntivo frouxo, delimitado pela dentina (amarelo), tecido conjuntivo mineralizado e avascular. Adaptado de (22).

Dentina e polpa são tecidos de origem ectomesenchimal e se desenvolvem a partir de interações com o epitélio dental adjacente (23). Uma vez formado, o complexo dentino-pulpar é responsável pela vitalidade do dente e pela manutenção das funções básicas de propriocepção e percepção sensorial bem como é capaz de reagir a agressões que recaem sobre o órgão dentário, por meio de mecanismos de defesa e reparo (24)

2.1.1. Polpa dentária

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo não mineralizado presente na cavidade interna do dente, sendo responsável pela sua manutenção e vitalidade. Ela é constituída por uma população de células envolvidas por uma matriz extracelular amorfa e fibrosa, permeada por plexos nervoso, sanguíneo e linfático que se conectam aos tecidos circundantes ao dente via forame apical e foraminas apicais acessórias (1).

A população de células do tecido pulpar é heterogênea, sendo composta por fibroblastos, que são as células mais abundantes, por células de defesa, por células-tronco/progenitoras mesenquimais e pelos odontoblastos, que são as células funcionais e especializadas do complexo dentino-pulpar. Quanto à matriz extracelular (ECM), esta é constituída principalmente por fibras colágenas, em sua maioria do tipo I e tipo III, proteoglicanos e glicoproteínas, à semelhança dos outros tecidos conjuntivos do organismo (25).

O padrão de organização e distribuição das células e dos demais constituintes do tecido pulpar determina a formação de zonas ou camadas, mais evidentes na polpa coronária, e que são denominadas de zona central, zona rica em células ou camada de *Höhl*, camada pobre em células ou de *Weil* e camada odontoblástica (3) (**Figura 2**).

A zona central, ou estroma da polpa, é composta por vênulas, arteríolas e nervos mais calibrosos, sendo os fibroblastos as células mais abundantes. Células de defesa, incluindo macrófagos, células dendríticas e alguns linfócitos T, também estão presentes, associados principalmente aos vasos sanguíneos do estroma pulpar e constituindo a próxima camada, denominada de zona rica em células ou camada de *Höhl*, assim chamada por ser densamente povoada por fibroblastos e por células-tronco/progenitoras mesenquimais. Os fibroblastos emitem seus prolongamentos para a próxima camada, denominada de camada de *Weil*, uma região pobre em células, porém rica em capilares sanguíneos e fibras nervosas não mielinizadas. Por fim, ao longo da periferia da polpa, constituindo uma única camada de células em paliçadas estão os odontoblastos, cujas principais funções são formação e manutenção da dentina (3)

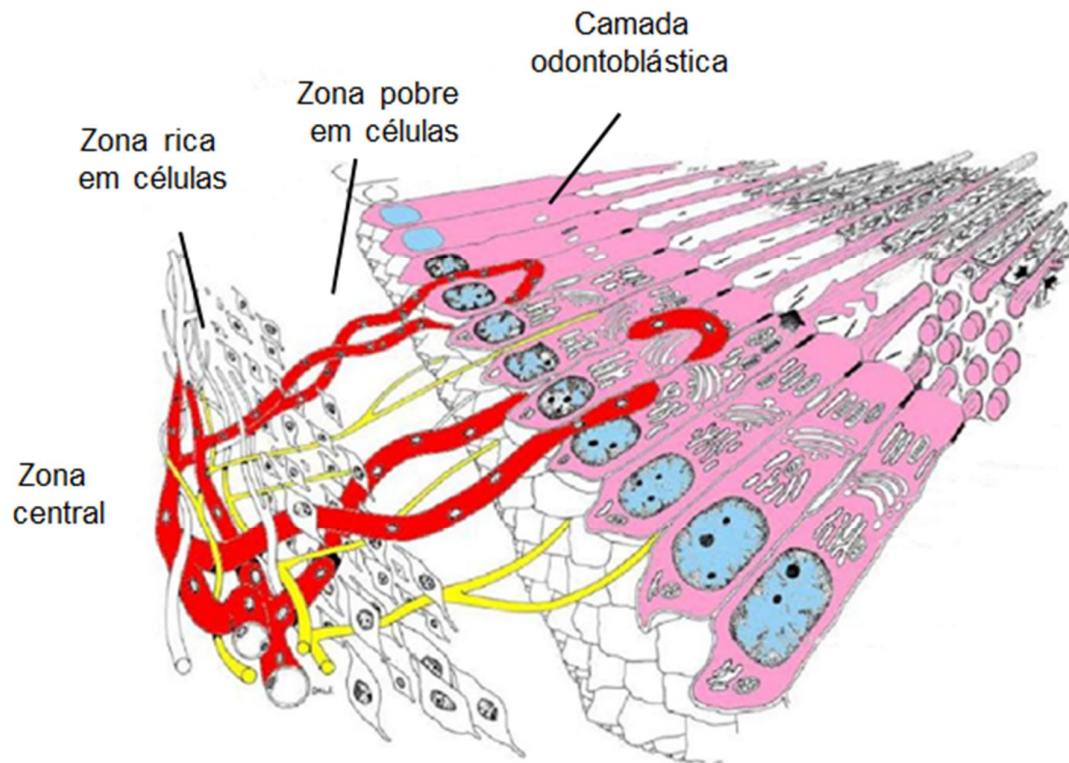


Figura 2: Representação esquemática das zonas ou camadas morfológicas da polpa dentária madura. Adaptado de (26)

2.1.2. Odontoblastos

Os odontoblastos são células ectomesenquimais pós-mitóticas e, portanto, sem capacidade proliferativa (2). Eles se originam a partir de células provenientes da crista neural craniana que, nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, migram para o mesênquima do primeiro arco branquial e processo nasofrontal, constituindo, assim, o ectomesênquima subjacente ao epitélio da cavidade oral primitiva (27, 28).

Morfologicamente, os odontoblastos completamente maduros são células colunares polarizadas com núcleo excêntrico, localizado no polo proximal e com um único prolongamento citoplasmático, denominado de processo odontoblástico. Este se origina no polo distal do corpo celular e se estende para o interior da dentina, determinando a formação dos túbulos dentinários, principal característica deste tecido. O processo odontoblástico é desprovido de organelas, mas apresenta um

citoesqueleto bastante desenvolvido com numerosos microfilamentos e microtúbulos. Pequenos ramos laterais são emitidos a partir do processo odontoblástico e se interligam, favorecendo a comunicação intercelular e a circulação de fluidos e metabólitos através da matriz calcificada (**Figura 3**). Enquanto o corpo celular é responsável pela síntese e controle dos constituintes da matriz dentinária, o prolongamento dos odontoblastos é responsável pela secreção destes componentes e, até certo ponto, pela endocitose (29, 30).

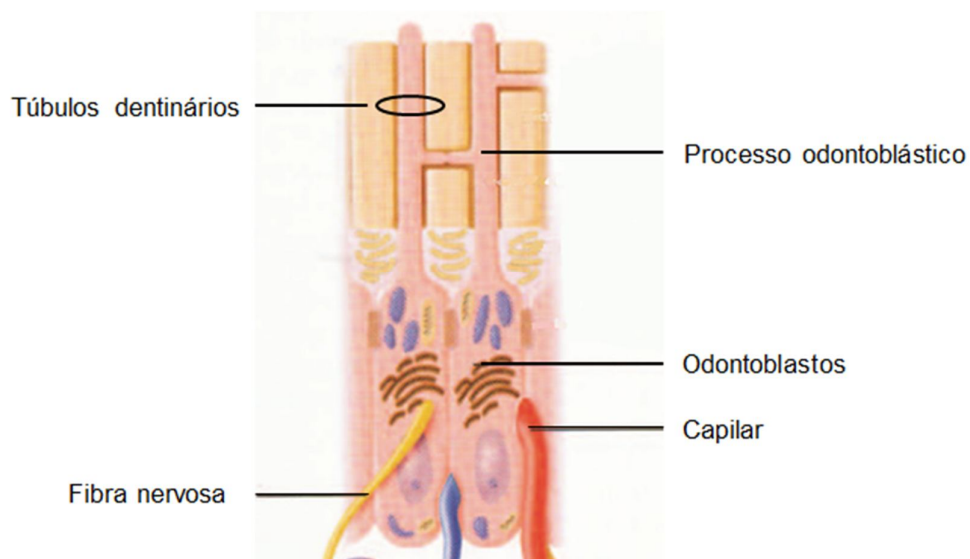


Figura 3: Representação esquemática dos odontoblastos morfologicamente maduros. Células colunares e polarizadas com o núcleo localizado no polo proximal e com único prolongamento citoplasmático, denominado de processo odontoblástico, que se origina no polo distal do corpo celular e se estende para o interior da dentina, determinando a formação dos túbulos dentinários. Adaptado de (3).

Os odontoblastos começam a formar dentina após a sua diferenciação, que se inicia durante o desenvolvimento do germe dentário, nas regiões correspondentes às futuras cúspides e pontas incisais, e progride sequencialmente em direção apical (31). Completada a formação do dente, os odontoblastos tornam-se progressivamente menores e com um número decrescente de organelas (32). Eles diminuem o ritmo de secreção, mas continuam a produzir dentina, de forma bem lenta, durante toda a existência do dente, enquanto este permanecer vital. Sua

atividade metabólica pode, contudo, aumentar em resposta a estímulos externos, participando dos mecanismos de reparo do complexo dentino-pulpar (6).

2.1.3. Dentina

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado avascular e de natureza tubular, composta por cerca de 70 % de material inorgânico (hidroxiapatita), 20 % de matriz orgânica e 10% de água (5). A parte orgânica da matriz dentinária é predominantemente (cerca de 90 %) formada por colágeno, em sua grande maioria do tipo I. Os componentes orgânicos não colagênicos incluem fosfoproteínas, proteoglicanos, glicoproteínas ácidas, lipídeos e fatores de crescimento. Muitas dessas proteínas não colagênicas desempenham papéis chaves na regulação da mineralização e no controle do crescimento dos cristais de hidroxiapatita, durante a formação da dentina (33, 34).

À semelhança da matriz de osteóide no osso, a dentina encontra-se separada do corpo dos odontoblastos por uma matriz dentinária não mineralizada, denominada de pré-dentina. Essas duas matrizes refletem a existência de dois padrões de secreção pelo processo odontoblástico, um mais proximal relacionado com a secreção dos constituintes da matriz de pré-dentina e um mais distal, relacionado com a secreção dos componentes da frente de mineralização (35).

A dentina pode ser classificada como primária, secundária ou terciária, dependendo de quando ela foi formada (36). A dentina formada durante o desenvolvimento da coroa e da raiz recebe o nome de dentina primária e resulta da atividade metabólica máxima dos odontoblastos, enquanto que a dentina secretada fisiologicamente após o desenvolvimento total da raiz e com o dente em posição funcional recebe o nome de dentina secundária. Esta é produzida de forma lenta e contínua e não apresenta diferenças estruturais em relação à dentina primária. Diante de estímulos externos, um novo tipo de dentina, denominada de terciária, pode se formar, como parte do processo de reparo do complexo dentino-pulpar (5).

2.1.4. Potencial de reparo do complexo dentino-pulpar

O complexo dentino-pulpar apresenta potencial de reparo e regeneração que é observado por meio da deposição de dentina terciária. Diferente das dentinas primária e secundária que são depositadas de maneira homogênea ao longo de toda a periferia da polpa, a dentina terciária é secretada localmente, apenas nas regiões que sofreram injúria e sua função primordial é servir como uma barreira física que afasta da polpa dentária os estímulos que significam agressão. Dependendo da natureza, intensidade e duração do estímulo, a dentina terciária poderá ser produzida pelos odontoblastos primários ou por células-tronco/progenitoras presentes na polpa dentária (37).

Em geral, injúrias leves, tais como lesões de cárie iniciais ou de lenta progressão, irritação química provocada por materiais restauradores ou abrasão/atricção leve, induzem a produção de dentina terciária pelos odontoblastos da própria camada odontoblástica, que aumentam sua atividade metabólica em resposta aos insultos. Neste caso, a dentina terciária recebe o nome de reacional e é bastante semelhante às dentinas primária e secundária (6).

Injúrias mais graves, como por exemplo lesões de cárie na dentina, processos cariosos de rápida progressão e exposições pulpares por cárie ou trauma, podem levar a morte dos odontoblastos subjacentes à área afetada. Neste caso, se as condições do tecido forem favoráveis, os odontoblastos destruídos serão substituídos por uma nova geração de células similares a odontoblastos, que será estimulada a se diferenciar e a secretar dentina terciária, como tentativa de manter a vitalidade do dente. A dentina formada nestas condições recebe o nome de reparadora e apresenta estrutura diversa, podendo tanto ter características tubulares semelhantes às dentinas primária e secundária quanto uma aparência mais desorganizada e atubular, com inclusões celulares, lembrando matriz óssea (osteodentina) (38).

As células responsáveis pela formação de dentina reparadora derivam de células-tronco/progenitoras presentes no interior do tecido pulpar (39, 40). A origem precisa dessas células permanece indefinida, mas os potenciais nichos sugeridos incluem a camada rica em células de Höhl, regiões perivasculares (e.g. pericitos) e região central da polpa (41). Quando devidamente induzidas, essas células são

recrutadas de seus nichos para os sítios danificados e estimuladas a se diferenciar. Por fim, adquirem competência para produzir e secretar matriz mineralizada (7).

Já é bem estabelecido que o recrutamento celular envolve proliferação e migração. Clássicos estudos autorradiográficos de incorporação de timidina marcada com material radioativo (trítio, H^3) por células da polpa, após capeamento (proteção da polpa exposta com material capaz de induzir reparo dentinário e manter a vitalidade do dente (42)), demonstraram que as células envolvidas no processo de reparo apresentavam aumento da sua taxa de proliferação, seguido de migração para os sítios danificados (43-45). Portanto, a atividade mitótica é, provavelmente, o primeiro passo na formação de uma nova camada de dentina e, juntamente com a migração e a diferenciação, constitui requisito essencial para o processo de reparo. Esses eventos celulares devem ser finamente regulados para que o reparo seja bem sucedido. Falhas nos mecanismos reguladores podem conduzir a formação de tecido anormal ou a completa ausência dele, comprometendo, assim, a proteção do complexo dentino-pulpar e, conseqüentemente, a vitalidade do dente.

2.1.5. Mecanismos que modulam o processo de reparo do complexo dentino-pulpar

Além de depender da intensidade e extensão da injúria, a qualidade da dentina terciária bem como o êxito na sua formação serão influenciados por outros fatores, tais como pela reação imuno-inflamatória que se instala também em resposta ao estímulo agressor e por fatores dependentes do hospedeiro, os quais incluem o envelhecimento, que modifica tanto a população de células presente no tecido como as respostas imunes inata e sistêmica (46). É importante reconhecer que estes processos, isto é, injúria, defesa e reparo, e os aspectos moleculares e celulares resultantes estão inter-relacionados e que a interação e o equilíbrio relativo entre eles serão determinantes na manutenção da vitalidade pulpar (10).

Os mecanismos moleculares que regulam a formação de dentina reacional e reparadora são complexos e ainda não estão completamente elucidados. É possível que fatores de crescimento e outras moléculas presentes na matriz de dentina e no estroma da polpa, assim como citocinas envolvidas no processo inflamatório que

acompanha a injúria estejam envolvidos na modulação da resposta do complexo dentino-pulpar. Além disso, acredita-se que a natureza, a quantidade e o tempo de ação desses mediadores possam influenciar as respostas de reparo e seus desfechos (10, 12).

Nas últimas décadas, diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o potencial de vários fatores de crescimento em estimular a formação de dentina terciária. Membros da superfamília dos TGF β s, tais como TGF β 1, -2 e -3 (11, 47, 48) e as proteínas morfogenéticas ósseas 2, 4 e 7 (BMP-2, -4 e -7) (49-53), além de membros da família dos fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) (54) e da família dos fatores de crescimento para fibroblasto (FGFs) (55) foram capazes de estimular, em maior ou menor grau, dentinogênese reacional e/ou reparadora.

Enquanto as células da polpa dentária representam uma potencial fonte de fatores de crescimento, a dentina parece ser a outra (56). Diversos fatores de crescimento, incluindo membros da superfamília dos TGF β s (57), IGF-1 e -2 (58), FGF-2, além de fatores angiogênicos, tais como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (59) já foram identificados na matriz dentinária. É possível que essas moléculas sejam produzidas pelos odontoblastos durante a formação das dentinas primária e secundária e, posteriormente, tornam-se aprisionadas na matriz, permanecendo em sua forma ativa ou latente associadas a outros componentes dentinários. Injúrias que induzam a desmineralização da dentina liberam estes fatores de crescimento para o tecido pulpar, onde eles são capazes de orquestrar os eventos relacionados com o reparo (56).

Entre os inúmeros fatores de crescimento, o TGF β 1 merece especial atenção. Já foi demonstrado que TGF β 1 é expresso durante o desenvolvimento dentário (60) e na polpa madura, tanto nos odontoblastos quanto na matriz dentinária (57), sendo sua expressão relacionada com a diferenciação dos odontoblastos (61). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que essa molécula é capaz de regular os principais eventos celulares envolvidos no processo de reparo, ou seja, proliferação, migração e diferenciação (11, 62). Assim, é possível que TGF β 1 desempenhe um papel chave na sinalização dos eventos envolvidos tanto com as dentinogêneses primária e secundária, quanto com a terciária. Por fim, sua habilidade em estimular a

produção de componentes da matriz extracelular e, ao mesmo tempo, de funcionar como um potente imunossupressor faz do TGF β 1 um forte candidato para manutenção da homeostasia do tecido pulpar e como regulador do processo de reparo (63, 64).

Além de fatores de crescimento, outras citocinas inflamatórias também modulam os eventos envolvidos com o reparo dentinário (65). Direta ou indiretamente, injúrias que recaem sobre o complexo dentino-pulpar estimulam a produção e liberação desses mediadores inflamatórios por diversas células presentes na polpa dentária, incluindo odontoblastos, células do sistema imune e fibroblastos (66, 67).

O processo imuno-inflamatório resultante da liberação dessas moléculas é necessário para proteger a polpa das agressões e acompanha ou precede os eventos de reparo (68). No entanto, sua presença pode dificultar ou até mesmo evitar que tais eventos ocorram (12). De fato, é classicamente demonstrado que a presença de inflamação impede a formação de dentina terciária (69, 70). As razões para falhas na formação de tecido dentinário não são completamente compreendidas. Além dos danos diretos causados ao tecido devido a liberação de enzimas proteolíticas, tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular e os contatos celulares, e de mediadores inflamatórios que apresentam efeitos deletérios sobre DNA, proteínas e lipídeos, resultando em morte celular, outros mecanismos são propostos para explicar o efeito negativo da inflamação no processo de reparo (12).

Já foi demonstrado que tanto células-tronco mesenquimais quanto odontoblastos expressam, em sua superfície, receptores de reconhecimento padrão denominados receptores *Toll-like* (TLR), que estão relacionados com a ativação da imunidade inata, sugerindo, assim, um possível papel dessas células na resposta imuno-inflamatória. Esses mesmos estudos indicam que a ativação dos TLR induz a expressão de mediadores inflamatórios, relacionados com o fator nuclear kB (NF-kB) ao mesmo tempo em que inibe a diferenciação de células-tronco e a síntese de constituintes da matriz extracelular pelos odontoblastos (71, 72). Dessa forma, é possível que a formação de dentina terciária seja modulada por mecanismos que

envolvem uma alteração no padrão de expressão gênica de células primariamente relacionadas com o reparo, reorientando-as para desempenhar funções de defesa.

É possível ainda que a natureza, a quantidade e o tempo de ação de citocinas liberadas em resposta a injúrias possam influenciar a formação da dentina terciária. Em concentrações relativamente pequenas, citocinas pró-inflamatórias parecem ser necessárias para promoção dos processos regenerativos, incluindo recrutamento celular, diferenciação e secreção de matriz dentinária. Em contraste, concentrações relativamente altas e por períodos mais prolongados dessas moléculas, em consequência, por exemplo, de infecções graves ou persistentes, podem desencadear uma resposta inflamatória intensa que, se não resolvida, impede direta (via inibição da ativação de células tronco/progenitoras) ou indiretamente (via destruição tecidual) o reparo dentinário (12).

Essas evidências fortemente sugerem que o controle da resposta inflamatória e imunológica constitui em um pré-requisito fundamental para o processo de reparo do complexo dentino-pulpar, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de prevenir danos inflamatórios irreversíveis na polpa, mantendo sua vitalidade e, ao mesmo tempo, proporcionando condições de reparo. Neste sentido, estratégias para o controle da resposta imuno-inflamatória na polpa foram recentemente sugeridas tendo como alvo o receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) (15).

2.2. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

Os PPARs são proteínas pertencentes à superfamília dos RN, cujos membros atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes (73). À superfamília pertencem, atualmente, 48 genes do genoma humano (74) que codificam proteínas relacionadas com praticamente todos os processos fisiológicos, tais como desenvolvimento, reprodução, processos imuno-inflamatórios, função vascular, homeostasia energética e depuração de toxinas (75).

Os PPARs incluem três isotipos, codificados por genes distintos, o PPAR α , o PPAR β/δ e o PPAR γ , que diferem na afinidade pelo ligante, na distribuição tecidual e nos níveis de expressão tecidual (76). Sua nomenclatura é resultado da

identificação do primeiro isotipo clonado, o PPAR α , na década de 90, como alvo de compostos xenobióticos que induzem a proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores (77).

Os PPARs apresentam uma organização estrutural comum a todos os RN, caracterizada pela presença de domínios funcionais. São eles o domínio A/B, ou região amino-terminal, o domínio C ou domínio de ligação ao DNA (DBD), o domínio D (região de dobradiça) e o domínio E ou domínio de ligação ao ligante (LBD), na região carboxi-terminal (78) (**Figura 4**).

A porção amino-terminal é o domínio menos conservado e contém uma função de ativação independente de ligante (AF-1). O domínio C ou DBD é a região mais conservada e consiste de dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco” (*zinc fingers*) (75). O DBD é responsável pela ligação dos PPARs a regiões específicas do DNA, constituídas pela sequência hexanucleotídica AGGTCA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE) (73). O domínio D é menos conservado e representa uma região de dobradiça que confere flexibilidade ao RN, permitindo, assim, sua dimerização com outro RN e, ao mesmo tempo, sua ligação com o DNA. O domínio E ou LBD reconhece ligantes específicos, determinando, dessa forma, a especificidade da resposta relacionada ao ligante. O LBD está envolvido com diversas funções reguladas, em sua maioria, pela ligação do ligante, como translocação para o núcleo, dimerização, interação com cofatores da transcrição e a função de ativação 2 (AF-2), responsável pela ativação da transcrição dependente de ligante (78).

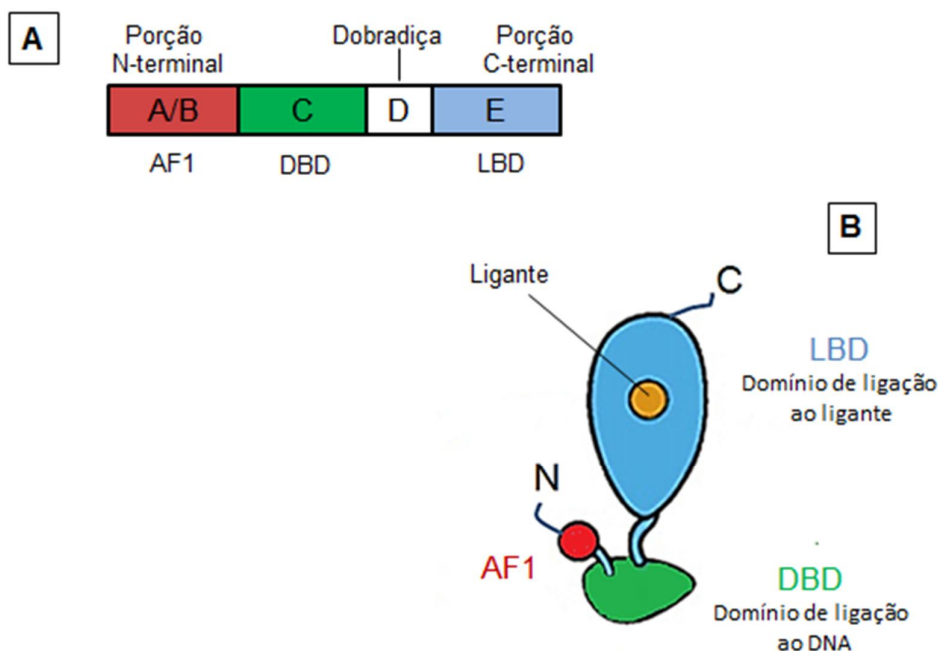


Figura 4: Estrutura geral dos PPARs, com a representação dos domínios funcionais. A– Estrutura primária, com a representação da região amino-terminal (domínio A/B, em que se encontra o domínio função de ativação 1 ou AF-1, implicado na transativação independente do ligante), domínio C ou domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio D (região de dobradiça), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E). B – Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD. Adaptado de (79).

Os PPARs ligam-se aos elementos responsivos, por meio da dimerização com outro RN, o receptor retinóide X (RXR), nas porções 5' e 3', respectivamente, sendo incapazes de se ligar como monômeros (80, 81). As sequências específicas nas quais o heterodímero PPAR/RXR se liga estão presentes nas regiões promotoras dos genes-alvos e são denominadas de elementos responsivos dos proliferadores peroxissomais (PPREs). Os PPREs consistem de repetições diretas de duas sequências hexanucleotídicas, AGGTCA, separadas por um único nucleotídeo (DR-1) (82)

À semelhança dos demais RN, os PPARs regulam a expressão gênica por meio de três mecanismos básicos, que envolvem ou não a presença do ligante. São eles transativação, repressão basal e transrepressão (78).

A transativação consiste na ativação da transcrição gênica de maneira ligante dependente, por meio da ligação direta do heterodímero PPAR-RXR aos PPRES dos genes-alvo. Ao se ligar no PPAR, o ligante induz uma mudança conformacional do receptor que permite a dissociação coordenada dos correpressores e a associação dos complexos de coativadores. Estes modificam a estrutura da cromatina, facilitando o recrutamento da maquinaria transcrricional ao promotor do gene-alvo, resultando, assim, na ativação da transcrição (83, 84) (**Figura 5**).

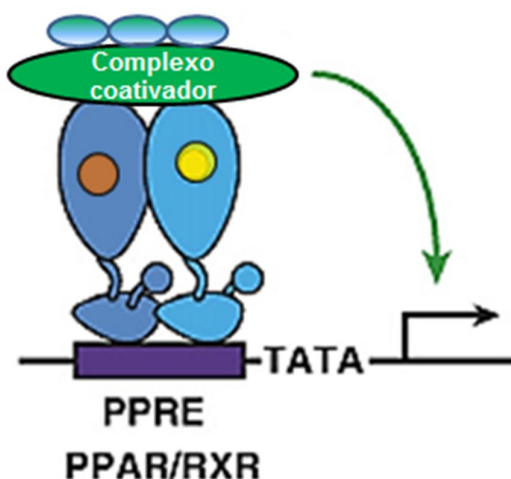


Figura 5: Regulação positiva da transcrição gênica ou transativação dependente de ligante. A alteração conformacional do receptor promovida pela ligação do ligante determina dissociação de proteínas correpressoras, recrutamento de coativadores, interação com a maquinaria de transcrição basal da célula e, assim, ativação da transcrição de genes regulados positivamente pelo PPAR ativado. Adaptado de (79).

A repressão basal ocorre quando o heterodímero PPAR-RXR encontra-se ligado ao PPRES na ausência de ligante. Nesta condição, a conformação estrutural resultante induz o recrutamento de proteínas correpressoras que mantêm a cromatina em sua forma enovelada, impedindo, assim, as atividades da maquinaria transcrricional e dos complexos coativadores, resultando em uma repressão ativa da expressão gênica (85) (**Figura 6**).

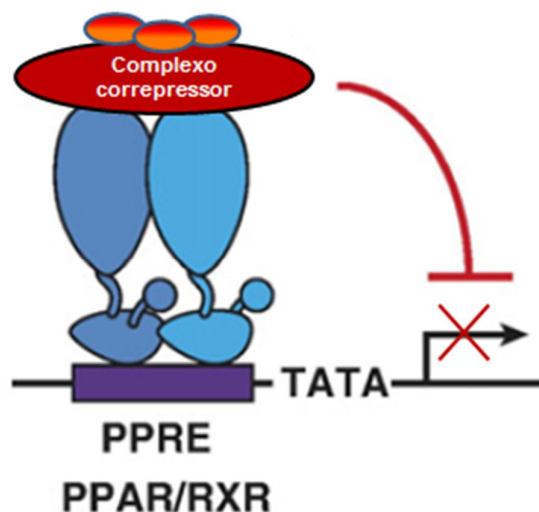


Figura 6: Repressão basal da transcrição gênica na ausência do ligante. Na ausência do ligante, o heterodímero PPAR-RXR é capaz de se ligar aos elementos responsivos no DNA (PPRE), recrutar proteínas do complexo corepressor e, assim, reprimir a transcrição de genes alvo. Adaptado de (79).

Os PPARs podem também regular negativamente a expressão gênica por meio de mecanismos dependentes de ligante, denominados de transrepressão. Diferente da repressão basal e da transativação, esse tipo de regulação negativa não envolve a ligação direta do receptor aos PPREs no DNA. Embora pouco compreendida, diversos mecanismos são propostos para explicar a transrepressão, tais como interação direta entre PPARs ativados e outros fatores de transcrição, o que impediria estes de se ligar aos elementos responsivos dos genes-alvo, competição por coativadores, disponibilização de proteínas que reprimem a atividade transcrricional e bloqueio da depuração de complexos de corepressores. A transrepressão é a forma como os PPARs reprimem a ação de fatores de crescimento relacionados com atividade pró-inflamatória, tais como NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1) (79) (**Figura 7**).

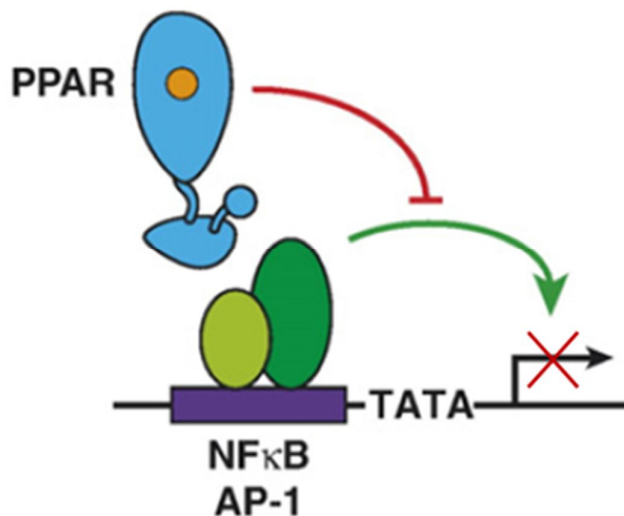


Figura 7: Transrepressão dependente ligante. Regulação negativa da transcrição gênica caracterizada pela atividade antagonista do PPAR γ ativado sobre a estimulação da expressão gênica por outros fatores de transcrição, como o fator nuclear Kapa B (NF-kB) e a proteína ativadora 1 (AP-1). Adaptado de (79).

Por meio desses três mecanismos básicos, os PPARs regulam a expressão de diversos genes do organismo relacionados com funções fisiológicas variadas, tais como homeostasia de lipídeos e glicose, resposta imuno-inflamatória, fertilidade e reparo tecidual, e também com condições patológicas, incluindo dislipidemia, DM2, câncer, inflamação crônica e aterosclerose (86).

A diversidade de funções relacionadas com os PPARs pode ser atribuída, em parte, à variedade de ligantes endógenos lipofílicos capazes de ativar esses receptores. Inúmeros compostos lipídicos derivados da dieta e/ou resultantes do metabolismo, como ácidos graxos insaturados, espécimes lipídicos oxidados, eicosanóides e prostaglandinas ativam os PPARs, sendo estes, portanto, considerados sensores lipídicos (87). Além disso, em concordância com sua variedade de funções, os PPARs apresentam distribuição tecidual ampla, embora os níveis de expressão de cada isotipo sejam tecido-específicos (88).

2.2.1. Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais

O gene que codifica o PPAR γ em humanos foi mapeado no cromossomo 3 (89) e origina três RNA mensageiros, o PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3, que diferem na extremidade 5' pela utilização de promotores distintos e pelo processamento alternativo do RNA mensageiro (90, 91).

O PPAR γ 1 e o PPAR γ 3 codificam a mesma proteína, isto é, PPAR γ 1, que é expressa em baixos níveis por uma ampla variedade de células, tais como adipócitos, pneumócitos, células epiteliais do cólon, bexiga, mama e próstata, células musculares cardíacas e esqueléticas, células vasculares e macrófagos (92). O PPAR γ 2 origina a isoforma PPAR γ 2, que se distingue pela presença de 28 aminoácidos adicionais na extremidade amino-terminal, sendo seletivamente expressa por adipócitos (93).

O PPAR γ foi originalmente reconhecido pelo seu importante papel na adipogênese e na manutenção das funções do tecido adiposo, especialmente a isoforma 2, sendo a expressão ectópica desta suficiente para que fibroblastos em cultura se diferenciasssem em adipócitos (94). Suas potentes ações na promoção da adipogênese e na homeostasia lipídica podem ser atribuídas à sua capacidade de regular genes específicos do tecido adiposo, como os envolvidos com o metabolismo, captação, transporte e armazenamento de lipídeos (95, 96). Por conta dessas propriedades, o PPAR γ desempenha também papel chave na homeostasia da glicose e no controle da sensibilidade a insulina (20). Sua ativação está relacionada com a melhora da ação insulínica nos tecidos-alvo e com a diminuição da concentração sérica de glicose, sendo alvo farmacológico para o tratamento do DM2 (97).

Em concordância com sua ampla expressão, o PPAR γ está envolvido com outras ações além do controle da adipogênese e do metabolismo energético, participando, assim, na modulação do ciclo celular, da diferenciação e da apoptose de diversas células nas quais é expresso (21, 98). Muitos estudos *in vitro* indicam que a ativação do PPAR γ por diferentes ligantes está relacionada com efeitos antiproliferativos. Linhagens de variados tipos de câncer, tais como de pulmão (99, 100), mama (101), próstata (102) e pâncreas (103), tiveram o ciclo celular

interrompido após tratamento com ligantes de PPAR γ , e mesmo a diferenciação de adipócitos parece envolver a inibição da progressão do ciclo celular por este RN ativado (104).

Em função dos efeitos na modulação da proliferação celular, muitos estudos sugerem um potencial papel anticarcinogênico do PPAR γ e de seus agonistas. Entretanto, sua participação na tumorigênese é bastante controversa (105). Alguns estudos em roedores sugerem que ligantes de PPAR γ podem potencializar o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como carcinomas de células de transição do urotélio, hemangiossarcomas, lipossarcomas e tumores sarcomatosos, enquanto que outros estudos em animais indicaram um efeito protetor. Estas diferenças têm sido atribuídas a diversos fatores, tais como especificidade do ligante, modelo animal utilizado e tipo de câncer. Além disso, ainda é questionado se os efeitos de agonistas do PPAR γ sobre a formação do tumor são dependentes ou independentes da ativação deste RN (106).

A versatilidade de funções desempenhadas pelo PPAR γ inclui também importante papel no controle da resposta imuno-inflamatória (107, 108), mediada principalmente por mecanismos de transrepressão dependente de ligante (79). PPAR γ é expresso em várias células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e quando ativado por ligantes pode desempenhar ações anti-inflamatórias que incluem inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e quimiocinas, as duas últimas necessárias para o recrutamento celular, modulação das funções de células dendríticas e controle da maturação de monócitos em macrófagos (109, 110).

Suas ações anti-inflamatórias foram inicialmente demonstradas em cultura de monócitos e macrófagos, nas quais observou-se o potencial de agonistas do PPAR γ em inibir a expressão de mediadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) e óxido nítrico (111, 112), exercendo seus efeitos, pelo menos em parte, por meio do bloqueio da atividade de certos fatores transcricionais relacionados à inflamação, como o NF-kB e AP-1 (111).

O papel pleiotrópico do PPAR γ faz deste RN um alvo farmacológico extremamente atraente para o tratamento de diversas doenças metabólicas e imuno-inflamatórias, incluindo DM2, obesidade, aterosclerose, artrite reumatoide, asma, doenças autoimunes e doenças degenerativas.

2.2.1.1. Agonistas sintéticos do PPAR γ : glitazonas

Os primeiros compostos sintéticos identificados como agonistas de alta afinidade do PPAR γ fazem parte de uma classe de agentes antidiabéticos utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2 e são conhecidos como tiazolidinedionas (TZDs) ou glitazonas (19). Entre as TZDs estão a troglitazona, a pioglitazona e a rosiglitazona, que diferem quanto à estrutura química e afinidade pelo PPAR γ (16).

As TZDs são eficazes no tratamento do DM2 (113) e, em conformidade com a ampla expressão e variedade de funções do PPAR γ , apresentam efeitos que vão além do controle glicêmico e aumento da sensibilidade insulínica. Assim, já foi demonstrado que as TZDs induzem adipogênese (114), podem influenciar o ciclo celular, a diferenciação e apoptose (115). Além disso, as elas são capazes de modular a resposta imuno-inflamatória de diversos tecidos, incluindo pulmão (116), rim (117), intestino (118) e articulações (119), apresentando potencial antiaterogênico, sugerido tanto em modelo animal (120) quanto em humanos (121). Estes estudos indicam uma potencial aplicação destes agonistas no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes.

A utilização das TZDs, contudo, tem sido contestada na prática clínica devido aos variados efeitos adversos associados, os quais incluem retenção hídrica e edema periférico (122), ganho ponderal, por retenção hídrica (123), aumento da adipogênese (124) e, conforme sugerido recentemente, por indução de hiperfagia (125), eventos cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, associada também à retenção hídrica (126), e fratura óssea (127). Em função desses efeitos adversos, atualmente, apenas a pioglitazona encontra-se disponível para o tratamento do DM2. A troglitazona e a rosiglitazona tiveram sua comercialização suspensa por estarem associadas, respectivamente, com

hepatotoxicidade idiossincrática e por suspeita de aumentar o risco de doenças cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio (128-130). E mesmo a pioglitazona teve sua relação risco-benefício recentemente reavaliada, após publicação de estudos clínicos observacionais, associando-a ao risco de câncer de bexiga (131, 132).

É importante considerar que várias evidências sugerem que alguns dos efeitos benéficos e também adversos das TZDs sejam mediados por mecanismos independentes da ativação do PPAR γ (133-136) e que, embora classicamente consideradas agonistas seletivos deste RN (19), já foi demonstrado que as TZDs apresentam efeitos também sobre a atividade dos outros dois isotipos, o PPAR α e o PPAR β/δ (137, 138).

2.2.1.2. PPAR γ e o tecido pulpar

O papel do PPAR γ no tecido pulpar sempre esteve relacionado com sua ação adipogênica, sendo utilizado como marcador específico da diferenciação em adipócitos de células da polpa, quando cultivadas em condições apropriadas (139-142).

No entanto, a diversidade de efeitos benéficos do PPAR γ sobre a resposta inflamatória em diferentes tecidos despertou o interesse de se investigar o seu papel também na inflamação pulpar. Deste modo, recentemente, demonstrou-se o potencial deste RN e de seu agonista, a rosiglitazona, em diminuir a expressão de mediadores da inflamação, tais como MMP-9, MMP-2, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular-1 (VCAM-1), em cultura primária de células da polpa estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (14, 15). Tais achados expandiram ainda mais as potencialidades terapêuticas de agonistas do PPAR γ levantando, assim, a possibilidade de utilizá-los no controle da inflamação pulpar, condição essa necessária para favorecer o reparo.

Não há, na literatura, estudos que investigam os efeitos de agonistas do PPAR γ sobre o processo de reparo e eventos celulares envolvidos. Porém, seus efeitos sobre o tecido ósseo são bem conhecidos. Estudos *in vitro* sugerem que

agonistas de PPAR γ são capazes de reprimir a osteogênese e induzir a adipogênese em células progenitoras mesenquimais (114, 143), por meio de mecanismos variados que incluem a ativação de vias de sinalização adipogênica concomitantemente à supressão de vias osteogênicas (144) e indução de apoptose de osteoblastos (145). Além disso, em modelos animais, o tratamento com TZDs induz a perda óssea associada à supressão da osteoblastogênese, aumento de tecido adiposo na medula óssea e indução da osteoclastogênese (146, 147). Os efeitos antiosteogênicos de agonistas do PPAR γ foram observados também em modelos animais de regeneração óssea. Neles, o tratamento com rosiglitazona inibiu a regeneração e aumentou o acúmulo de tecido adiposo nas regiões de reparo, sugerindo, que a regeneração óssea possa ser significativamente comprometida com o uso de TZDs (148).

Com base nessas evidências, se faz necessário investigar se agonistas de PPAR γ terão efeitos similares no tecido pulpar, prejudicando, assim, o processo de reparo. Abordagens farmacológicas, no contexto do complexo dentino-pulpar, tendo como alvo o PPAR γ seriam aquelas capazes de manter os efeitos favoráveis do controle da inflamação, sem apresentar efeitos adversos sobre o processo de reparo.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da rosiglitazona sobre eventos relacionados com o processo de reparo dentinário em cultura primária de células derivadas da polpa dentária humana.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer culturas primárias de células derivadas de tecido pulpar de dentes permanentes humanos.
- Verificar o efeito da rosiglitazona sobre a proliferação de células da polpa dentária humana em cultura, durante 24 e 72 horas.
- Verificar o efeito da rosiglitazona sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1 por células da polpa dentária humana em cultura, durante 7 e 14 dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (**ANEXO A - Processo nº 044/10**).

4.2. Cultura primária de células da polpa de dentes humanos

4.2.1. Obtenção de polpa dentária humana

As polpas dentárias foram obtidas a partir de terceiros molares inclusos, extraídos por razões clínicas e cedidos por 11 pacientes com idade entre 15 e 23 anos, atendidos no Setor de Cirurgia Oral e Buco Maxilo Facial, da Divisão de Odontologia, do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Brasil. A doação dos dentes foi autorizada pelo paciente ou responsável, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**). Apenas dentes hígidos de pacientes saudáveis e que não faziam uso de medicação sistêmica foram usados nesta pesquisa.

Imediatamente após a extração e ao lado de uma chama de lamparina, os dentes tiveram as superfícies desinfetadas com álcool a 70% (v/v) ou com digluconato de clorexidina a 0,12%. Os tecidos moles residuais foram removidos com auxílio de curetas periodontais (Neumar, São Paulo, SP, BR) e um sulco transversal abaixo da junção cimento esmalte foi realizado com broca cirúrgica *carbide* (SSWhite, Lakewood, NJ, EUA) em alta rotação e sob refrigeração. Em seguida, os dentes foram fraturados com fórceps 16 (Quinelato, Rio Claro, SP, BR) e a polpa dentária foi removida com auxílio de pinça e curetas periodontais e transferidas para meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) gelado, contendo 10% de soro fetal bovino

(SFB) (v/v) (*Invitrogen*), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de anfotericina B (*Gibco®*) (**figura 8**).

Os tecidos foram, então, transportados até o Laboratório de Farmacologia Molecular, localizado na Faculdade de Ciências da Saúde e Medicina, da Universidade de Brasília (UnB) e mantidos a 4°C até o momento do cultivo celular.

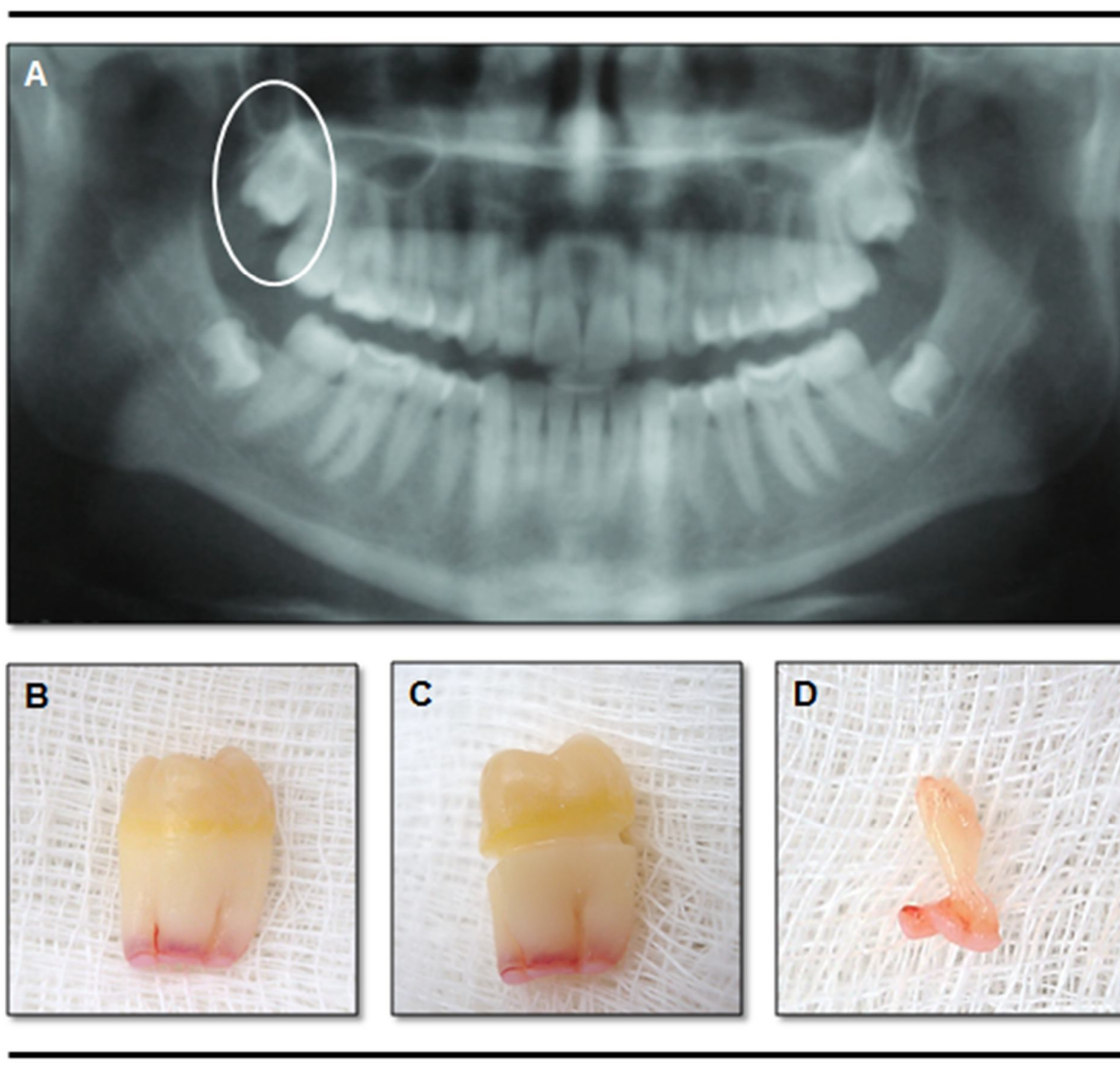


Figura 8: Obtenção de tecido pulpar a partir de 3° molares inclusos. A – Radiografia panorâmica com destaque para o dente 18 incluído, com indicação de extração. B – Dente 18 após limpeza de sua superfície. C – Sulco transversal abaixo da junção cimento esmalte. D – Obtenção da polpa dentária.

4.2.2. Cultivo primário de células da polpa do dente

As linhagens primárias foram obtidas pela técnica de *explant*, ou seja, a partir da cultura de pequenos fragmentos da polpa, denominados explantes.

Em capela de fluxo laminar, as polpas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (**figura 9, A**) e, em seguida, com meio DMEM (**figura 9, B**), ambos contendo 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 1% de anfotericina B. O tecido pulpar foi então seccionado em pequenos fragmentos com lâminas de bisturi nº 15 (Solidor, Suzhou, CH) (**figura 9, C**) e estes foram transferidos para placas de cultura de 6 poços ou de 35 mm (*Corning Incorporation*, Lowell, MA, EUA), fixados com a ajuda de lamínulas de vidro estéreis (**figura 9, D**) e cultivados em 1,5 mL de meio DMEM, contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 20% de SFB (**figura 9, E e F**).

As culturas foram mantidas em incubadoras a 37°C e com 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias a partir do quarto dia de cultivo. Após a confluência, a monocamada de células foi removida das placas por meio da incubação com 300 µL 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 minutos a 37 °C. Em seguida, as células foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL (*Corning*), centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e transferidas para placas de 100 mm (*Corning*), contendo meio DMEM, suplementado com 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de SFB. Para perpetuação da linhagem, as células foram subcultivadas em placas de 150 mm (*Corning*) com o mesmo meio de cultura, sempre que a monocamada atingisse subconfluência de aproximadamente 80 % da placa. Cada ciclo de tripsinização e subcultura foi considerado como uma passagem celular. A fim de se estabelecer um estoque, as linhagens foram congeladas na segunda passagem em solução de congelamento constituída por SFB e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v) (*Sigma Aldrich*). Os criotubos (*Corning*) foram mantidos em freezer a 85°C negativos até que a utilização das células fosse necessária. Para esta pesquisa, apenas células entre a terceira e quinta passagens foram utilizadas, em função da senescência celular e do selecionamento do fenótipo para uma linhagem mais fibroblástica, com o avanço da expansão da cultura (149, 150).

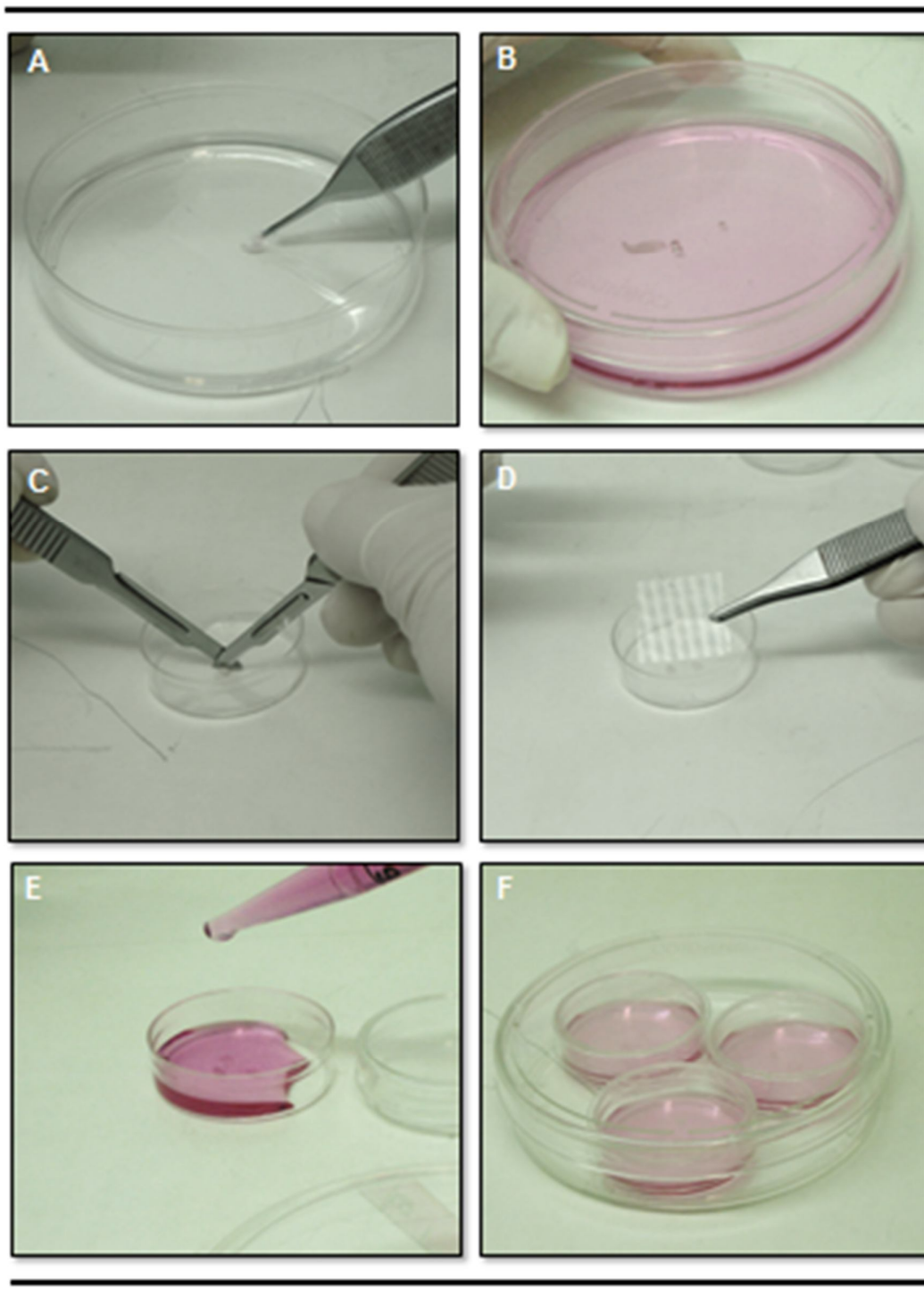


Figura 9: Etapas para cultivo do tecido pulpar pela técnica de *explant*. A – Lavagem da polpa dentária com PBS. B – Lavagem da polpa dentária com meio de cultura. C – Obtenção dos fragmentos pulpar por meio de secção da polpa dentária com lâminas de bisturi. D – Fragmentos fixados com lamínulas de vidro estéreis. E – Adição de 1,5 mL de meio de cultura. F – Fragmentos distribuídos em 3 placas de 35 mm.

4.3. Obtenção e preparo da rosiglitazona

A rosiglitazona, apresentada na forma de pó cristalizado, foi obtida a partir da *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, MI, EUA) e dissolvida em DMSO para realização dos ensaios celulares. Nos ensaios de proliferação, foram testadas as concentrações de 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-8} M, considerando-se que em ensaios de transativação observa-se ativação significativa do receptor a partir da concentração de 10^{-7} M. Para os ensaios de expressão gênica, foi avaliada a concentração de 10^{-5} M que, como mencionado anteriormente, ativa de forma significativa o receptor. Além disso, esta representa uma concentração saturante do PPAR γ , sendo considerada adequada para se investigar inicialmente o efeito da ativação do receptor sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1(19).

4.4. Ensaio de proliferação celular por incorporação de metil- 3 H-timidina

O efeito da rosiglitazona sobre a proliferação de células da polpa em cultura foi avaliado por meio de ensaio de incorporação de [3 H]-timidina (*PerkinElmer*, Boston, MA, EUA), que consiste de um nucleotídeo marcado com isótopo radioativo em seu grupamento metila. Esse ensaio garante a marcação específica apenas das células que estão na fase S do ciclo celular. Ele baseia-se no princípio de que quanto maior for a taxa de síntese de DNA, maior será a taxa de incorporação do nucleotídeo marcado. Dessa forma, assume-se que grupo que apresentou maior taxa de síntese de DNA apresentou também maior taxa de proliferação celular.

Neste ensaio, aproximadamente 2.000 células/cm 2 foram plaqueadas em placas de 12 poços (*Corning*) e mantidas por 48 horas em meio DMEM contendo 10% de SFB e antibióticos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas por mais 24 horas em meio DMEM contendo 0,5% de SFB e antibióticos, a fim de induzir quiescência celular. Após esse período, as células foram tratadas com rosiglitazona nas concentrações de 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. O grupo controle foi tratado com o veículo (DMSO). Os tempos de tratamento foram de 24 e 72 horas. Nas 4 horas finais de tratamento, 0,5 μ Ci/ml de [3 H]-timidina (atividade específica, 40-60 Ci/mmol) foi adicionado em cada poço das placas.

A quantidade de [³H]-timidina incorporada ao DNA foi determinada pelo método de precipitação por ácido tricloroacético (TCA) (*Sigma Aldrich*). As células foram lavadas gentilmente 2 vezes com PBS e mais 2 vezes com TCA a 10% em água destilada (v/v), ambos gelados. Em seguida, para promover a lise das células, 150 µL de hidróxido de sódio a 0,5 M (*Sigma Aldrich*) foram adicionados em cada poço das placas e estas foram mantidas em banho-maria a 36°C por 30 minutos, sob leve agitação. Os lisados celulares resultantes foram transferidos para tubos específicos contendo 3 mL de líquido de cintilação (*PerkinElmer*) e levados a um contador de emissão de partículas β. A leitura foi dada em cpm (contagem por minuto). A taxa de proliferação foi calculada por meio da divisão do valor da leitura obtido nos lisados celulares tratados com as diferentes concentrações de rosiglitazona pelo valor obtido no lisado tratado com veículo, e expressa em valores percentuais.

4.5. Detecção da expressão gênica relativa do TGFβ1

Para verificar se o tratamento com rosiglitazona interfere na expressão do gene que codifica o TGFβ1, aproximadamente 18.000 células/cm² foram plaqueadas em placas de 100 mm contendo meio DMEM com 10% de SFB e antibióticos e assim mantidas até sua confluência. Após 24 horas de confluência, as células foram tratadas com rosiglitazona na concentração de 10⁻⁵M ou com veículo (DMSO). Os tempos de tratamento foram de 7 e 14 dias. A expressão do gene que codifica o TGFβ1 foi avaliada por meio da extração do RNA total seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-PCRq).

4.5.1. Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

A extração do RNA total das células foi realizada com o reagente TRIzol® (*Invitrogen*) e seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, o meio de cultura foi descartado (**figura 10, A**) e as células foram lavadas 2 vezes com PBS (**figura 10, B**). Com as placas sobre gelo, 2 mL de TRIzol foram adicionados a cada uma delas (**figura 10, C**) e, em seguida, as células foram removidas com ajuda de rodos (*cell scraper, Costa/Corning*) (**figura 10, D**), transferidas para tubos de 1,5 mL

(*Axygen Incorporation*, Union City, CA, EUA) e mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas para remoção de *debris* celulares (14000 rpm, 10 minutos, 4°C) (**figura 10, E**) e o sobrenadante foi coletado em outros tubos de 1,5 mL. Em seguida, 200 µL de clorofórmio (*Sigma Aldrich*) foram adicionados para cada 1 mL de suspensão (sobrenadante da etapa anterior) (**figura 10, F**) e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos, incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugada para separação das fases (14000 rpm, 15 minutos, 4°C) (**figura 10, G**). A fase aquosa (superior) contendo RNA total foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e 500 µL de isopropanol (*J.T.Baker®*, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) foi adicionado para precipitação do RNA (**figura 10, H**), seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação (14000 rpm, 10 minutos, 4°C). O *pellet* formado (**figura 10, I**) foi lavado com etanol (*J.T.Baker®*) a 75% (v/v), novamente centrifugado (9000 rpm, 5 minutos, 4°C), seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de água deionizada (milli-Q) estéril tratada com 0,1% (p/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) (*Sigma Aldrich*). As amostras foram armazenadas em freezer a 80°C negativos até o momento do uso.

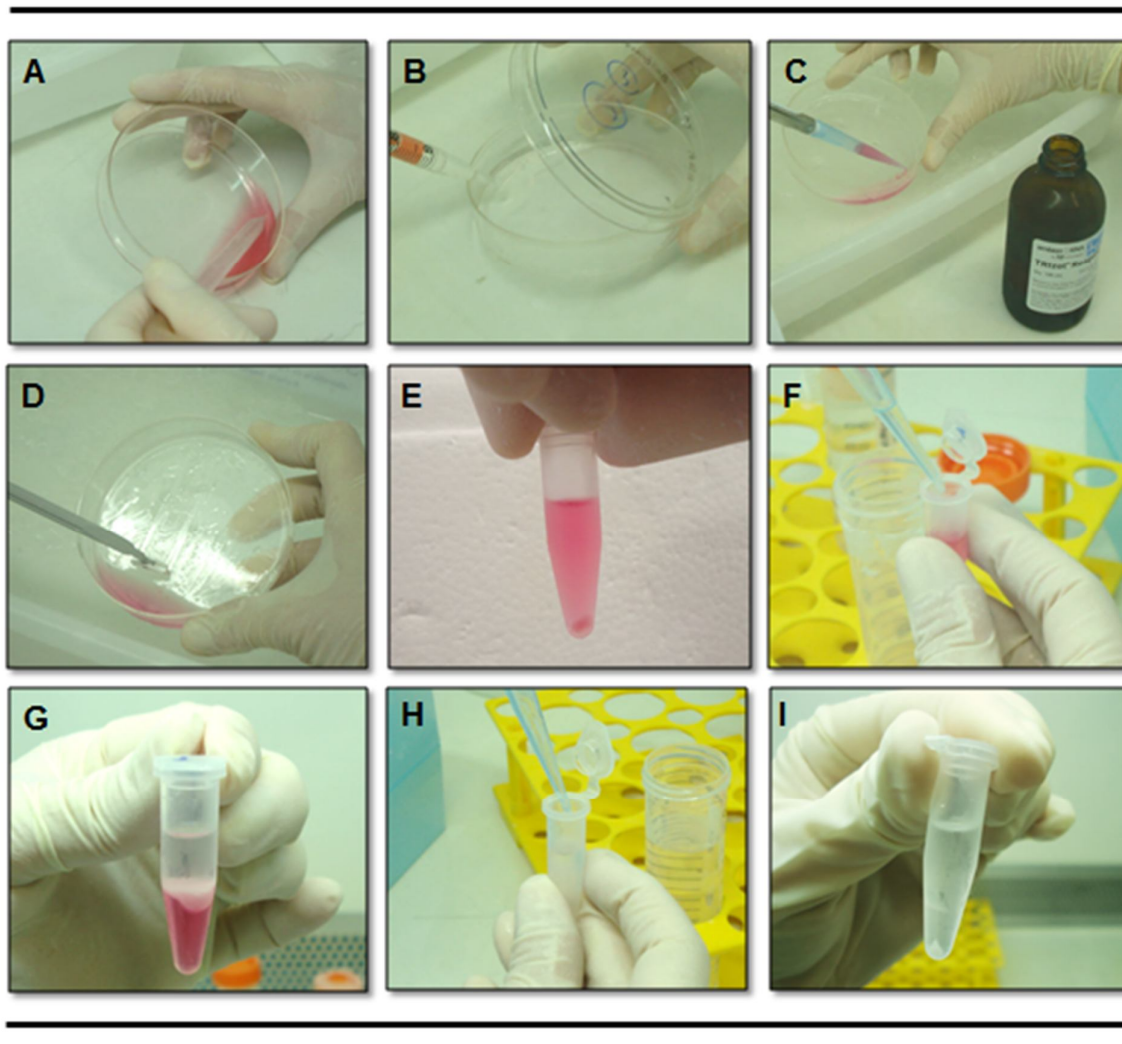


Figura 10: Etapas para extração do RNA total. A – Aspiração do meio de cultura. B – Lavagem com PBS. C – Adição do reagente TRizol[®]. D – Remoção das células da placa de cultura. E – Aspecto da amostra, após centrifugação para remoção dos *debris*. F – Adição de clorofórmio. G – Aspecto das três fases obtidas após centrifugação. H – Precipitação do RNA total com isopropanol. Aspecto do *pellet* de RNA total, formado após centrifugação.

4.5.2. Quantificação, pureza e integridade do RNA total

A quantificação e o grau de pureza das amostras de RNA total foram determinados por espectrometria, utilizando-se o aparelho *NanoVue Plus* (GE Healthcare Life Sciences, UK, EU). As amostras foram desnaturadas a 60°C durante 10 minutos e, em seguida, 1 μ L de RNA total foi transferido para o espectrofotômetro. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260 nm

e expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 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.

A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1x (Tris-borato-EDTA) por 40 minutos a 80V. O gel foi corado com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ em água destilada) e examinado sob luz ultravioleta (UV) a fim de se avaliar a qualidade das subunidades 28s e 18s do RNA ribossomal (RNAr). A fotodocumentação foi realizada com *software* para análise de imagens da *Alphamager* versão 5.5.

4.5.3. Tratamento do RNA total com DNase I

A fim de se eliminar possíveis contaminações por DNA genômico, alíquotas das amostras contendo até $2 \mu\text{g}$ de RNA total foram tratadas com 1 unidade/ μL de DNase I (*Sigma Aldrich*), por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se inativação da enzima por meio da adição de um tampão de inativação contendo EDTA (50mM) e aquecimento a 70°C , por 10 minutos. Esse procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante da enzima.

4.5.4. Desenho dos *primers*

As sequências dos iniciadores (*primers*) diretos e reversos utilizadas para amplificação dos genes que codificam TGF β 1 e β -actina foram obtidas a partir da literatura e fornecidas pelo IDT[®] (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA, EUA). O gene que codifica a β -actina, expresso constitutivamente, foi utilizado como controle endógeno e normalizador da reação (gene referência). Os critérios de escolha dos *primers* incluíram tamanho em torno de 20 nucleotídeos, conteúdo de guanina e citosina (GC) entre 50 e 60%, temperatura de anelamento dos pares próximas e em torno de 60°C e tamanho do produto de amplificação menor que 300 pares de base (bp). Além disso, para confirmar a especificidade dos *primers*, foi feita comparação com as sequências disponíveis no banco de dados não redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) pelo programa

BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências dos *primers* bem como o tamanho do fragmento esperado após amplificação encontram-se na **tabela 1**.

Tabela 1- Identificação dos pares de *primers* dos genes alvo e referência.

Gene	NCBI (Gene ID)	Sequência (5'- 3')	Tamanho (bp)
TGFβ1*	7040	D- CCCAGCATCTGCAAAGCTC R- GTCAATGTACAGCGTCCGCA	101
ACTB *	60	D- TCACCCACACTGTGCCCATCTACG R- CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG	295

* TGFβ1: fator transformador do crescimento β1; ACTB: β-actina; bp: pares de base.

4.5.5. Transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo (RT-PCRq)

A transcrição reversa (RT) e a amplificação por PCR quantitativa (PCRq) foram realizadas em um único passo utilizando-se o kit *Power SYBR[®] Green RNA-to-C_T 1-Step* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. O produto de amplificação de cada amostra foi determinado pelo sistema *SYBR[®] Green*. Este método utiliza fluoróforos que se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, sendo a intensidade desta proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência é então detectada e representada por meio do Ct (*cycle threshold / ciclo limiar*), o qual corresponde ao número de ciclos de reação necessários para a amplificação tornar-se exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*) para um volume final de 10 μL e continham 0,08 μl de *Mix* da enzima RT (125x), 5 μL de *Mix Power SYBR[®] Green RT-PCR* (2x), 0,2 μl (100nM) de cada *primer* (concentração inicial de 5μM) e 1 a 5ng de RNA. O volume foi

completado com água livre de RNase e DNase. Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi realizada para cada par de *primer*, a fim de se verificarem possíveis contaminações.

As condições da reação foram as mesmas para todos os experimentos de RT-PCRq: 30 minutos, a 48°C, para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos, a 95°C, para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, para desnaturação e 60°C, por 1 minuto, para anelamento e extensão.

Todos os experimentos de RT-PCRq foram realizados no equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* e os dados obtidos foram analisados com o programa *Software StepOne v2.1*.

A fim de se determinar o melhor método de quantificação relativa da expressão do gene que codifica o TGFβ1, a análise de sua expressão foi precedida por um experimento de validação, necessário para demonstrar equivalência entre as eficiências de amplificação dos *primers* do gene alvo e do gene referência e para verificar a especificidade da reação de amplificação (151).

4.5.6. Validação dos *primers*

4.5.6.1. Curva de eficiência relativa dos *primers*

Para determinar se as reações de amplificação do gene alvo e do gene referência apresentavam a mesma eficiência, inicialmente foi feita uma curva de diluição seriada, denominada de curva padrão, para cada par de *primers*, partindo-se de uma amostra de 5 ng de RNA, diluída sequencialmente para 1 ng, 0,2 ng e 0,04 ng (fator de diluição 5). As reações para cada concentração de RNA foram realizadas em triplicata. Em seguida, as médias dos valores dos Ct obtidos na reação de amplificação do gene alvo, gerados para cada diluição, foram subtraídas pelas médias dos valores dos Ct obtidos na reação de amplificação do gene referência e estas variações ($\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}$) foram representadas graficamente em relação ao log da diluição correspondente para criar uma regressão linear semi-log. Para ser equivalente, a inclinação da reta, correspondente ao valor

“a” da equação da reta ($y = ax + b$) deve ser $< 0,1$ e $> -0,1$. A curva de eficiência relativa foi realizada com o programa *Microsoft Excel*, versão 2010 para *Windows*.

4.5.6.2. Curvas de dissociação dos *primers*

Curvas de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*) foram realizadas para cada par de *primers*, a fim de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e/ou de produtos inespecíficos de amplificação, o que poderia interferir na quantificação real do transcrito alvo. As curvas foram feitas após a reação de PCRq, aumentando-se gradativamente a temperatura (acréscimos de 0,3 °C) de 60 °C para 95 °C. Neste procedimento, à medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação T_m (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada. Assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da razão entre a derivada da fluorescência e a derivada da temperatura (dF / dT) em relação a temperatura.

4.5.7. Quantificação relativa do gene que codifica o TGF β 1

Após validação, as reações de RT-PCRq foram realizadas para o gene TGF β 1 nas amostras tratadas ou não tratadas (calibrador) com rosiglitazona (10^{-5} M), utilizando-se 1 ng de RNA de cada uma. Os valores dos Ct obtidos para todas as amostras foram normalizados em função do controle endógeno (β -actina) por meio da subtração do Ct do gene alvo pelo Ct do gene referência (ΔCt). A quantificação relativa da expressão do gene que codifica o TGF β 1 foi feita utilizando-se o método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Por este método, a expressão relativa do gene corresponderá ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostras} - \Delta Ct_{calibrador}$.

4.6. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos 3 vezes de forma independente, utilizando-se, para cada um, polpas de doadores diferentes.

Os resultados do ensaio de proliferação celular foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da taxa de proliferação dos grupos tratados com rosiglitazona, em relação ao grupo tratado com veículo (controle). Os dados foram representados em porcentagem. O teste estatístico empregado foi análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla de *Newman-Keuls*.

Os resultados da expressão relativa do gene que codifica o TGF β 1 também foram apresentados como média \pm EPM da expressão nos grupos tratados com ligante, em relação ao grupo tratado com veículo (controle). A análise dos dados foi realizada através o teste *t* de *Student* entre cada grupo tratado e o grupo controle.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad 5.0* para *Windows*. O critério de significância foi o valor $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Estabelecimento de cultura primária de células da polpa de dentes humanos

Foram estabelecidas 9 culturas primárias. Em geral, o tempo necessário para se começar a observar crescimento a partir dos fragmentos da polpa foi de 6 a 12 dias depois do início do cultivo. Em algumas polpas, contudo, foi possível visualizar migração celular já no quarto dia. As células que migravam a partir dos fragmentos eram aderentes à placa e apresentavam morfologia heterogênea, em sua maioria com aspecto alongado e fusiforme, semelhante a fibroblastos, e algumas com morfologia esférica (**Figura 11, A**). Com o avanço da proliferação e confluência, as células foram adquirindo aparência predominantemente alongada (**Figura 11, B**).

A primeira subcultura (primeira passagem) foi realizada, aproximadamente, entre 10 a 30 dias após o início do crescimento. Da mesma forma, as células da primeira e das demais subculturas (até a sexta) também apresentavam morfologia predominantemente bipolar ou multipolar, com poucas células esféricas e birrefringentes. Na cultura não confluenta, as células encontravam-se distribuídas por toda a superfície da placa e orientadas aleatoriamente. À medida que a confluência era alcançada, as células tornavam-se mais alongadas e fusiformes, com arranjo paralelo e em espirais claramente observados (**Figura 11, C - F**).

O tempo necessário para o estabelecimento do estoque celular foi de aproximadamente 2 meses para cada linhagem primária.

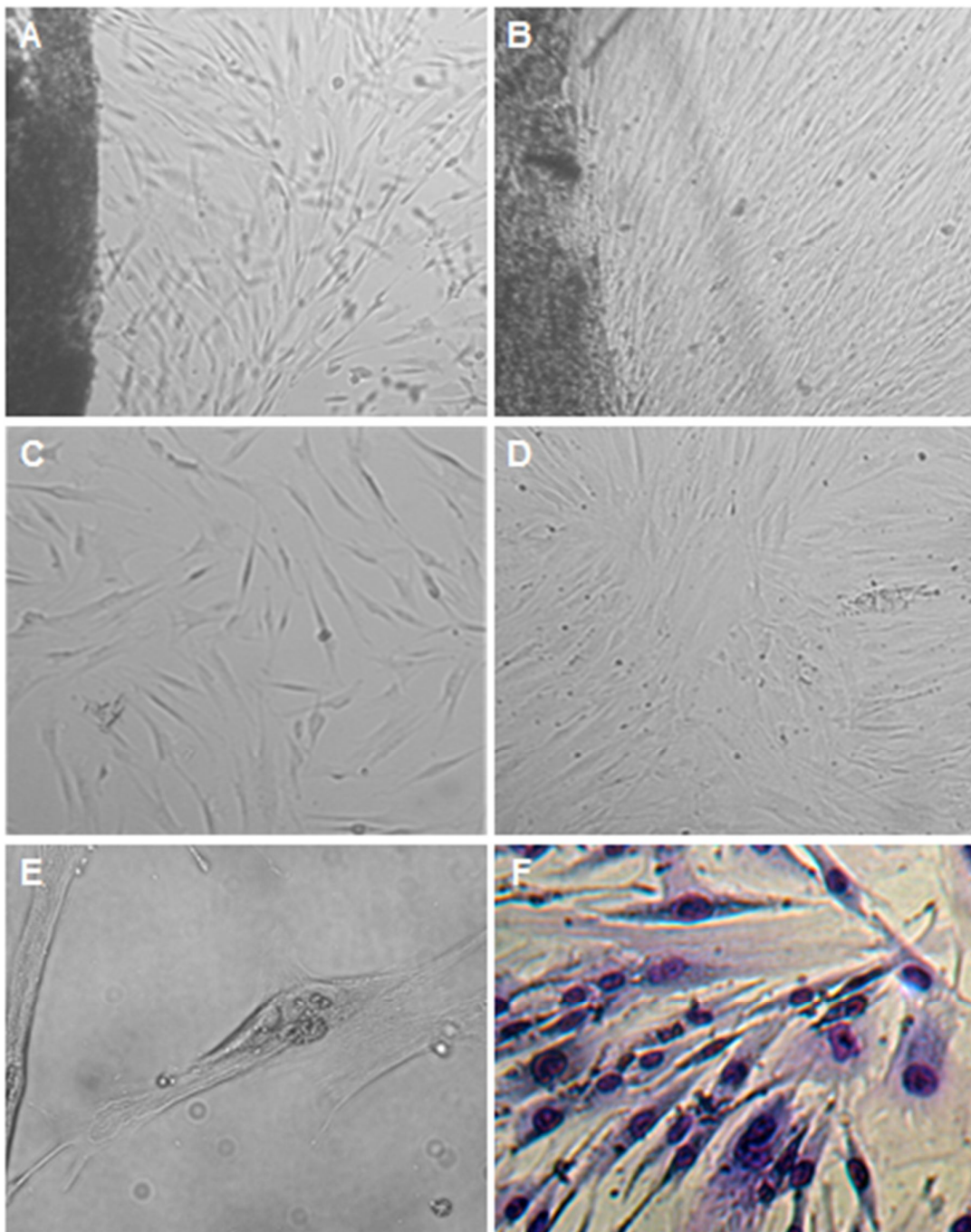


Figura 11: Aspecto morfológico de células da polpa dentária humana. A - Células alongadas e algumas esféricas migrando a partir do fragmento, 8 dias após início do crescimento celular. B – Células confluentes com morfologia predominantemente alongada, 14 dias após início de crescimento celular. C – Células com morfologia predominantemente fusiforme, distribuídas aleatoriamente na placa de cultura, após 4 subcultivos D – Células subconfluentes, adquirindo arranjo paralelo (4 subcultivos). E – Detalhe da morfologia fusiforme das células. F – Cultura com alta densidade celular corada em Giemsa. Microscopia invertida com contraste de fase; A, B C e D, objetiva de 4x; E , objetiva de 20x; F, objetiva de 10x.

5.2. Efeito da rosiglitazona sobre a proliferação de células da polpa dentária

O efeito da rosiglitazona sobre a proliferação de células em cultura derivadas da polpa dentária humana foi verificado por meio de ensaio de incorporação de [³H]-timidina.

O tratamento, por 24 horas, com doses crescentes de rosiglitazona (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) provocou redução da proliferação de forma concentração-dependente, mas apenas a maior concentração (10^{-5} M) foi capaz de reduzir a proliferação de forma significativa ($p=0,0173$), cerca de 38 % ($\pm 12,81$ %) em relação ao controle (Figura 12).

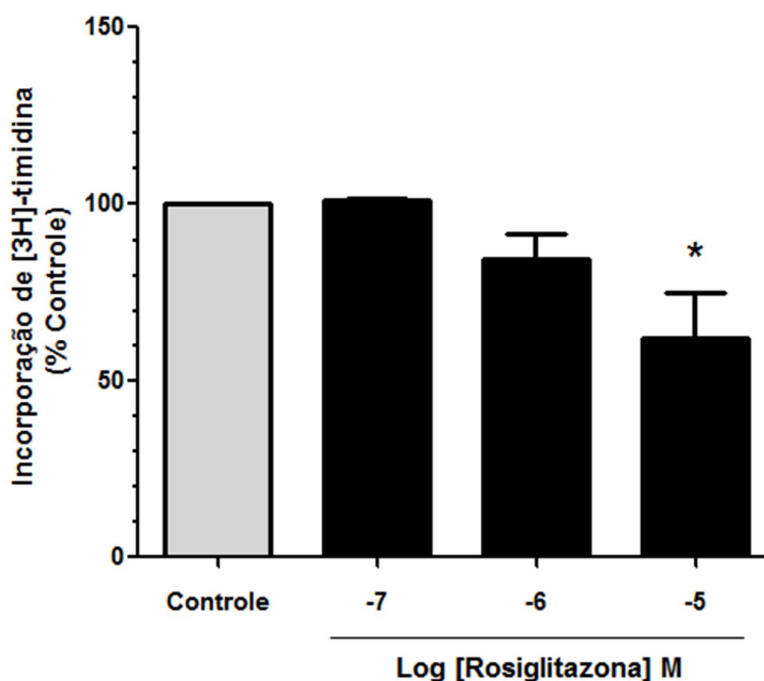


Figura 12: O tratamento com rosiglitazona durante 24h diminui a proliferação de células derivadas de cultura primária da polpa dentária humana de forma concentração-dependente. 2.000 células/cm² foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas, por 24h, com concentrações crescentes de rosiglitazona (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) ou veículo (DMSO). Nas 4 horas finais de tratamento, 0,5 μ Ci/ml de [³H]-timidina foi adicionado em cada poço. Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do percentual de incorporação de [³H]-timidina em relação ao controle, de 4 experimentos independentes realizados em triplicata. * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (DMSO), por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de *Newman-Keuls*.

Quando as células foram incubadas por 72 horas com as mesmas doses de rosiglitazona utilizadas no ensaio anterior (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M), não foi observado nenhum efeito sobre a proliferação celular (**Figura 13**).

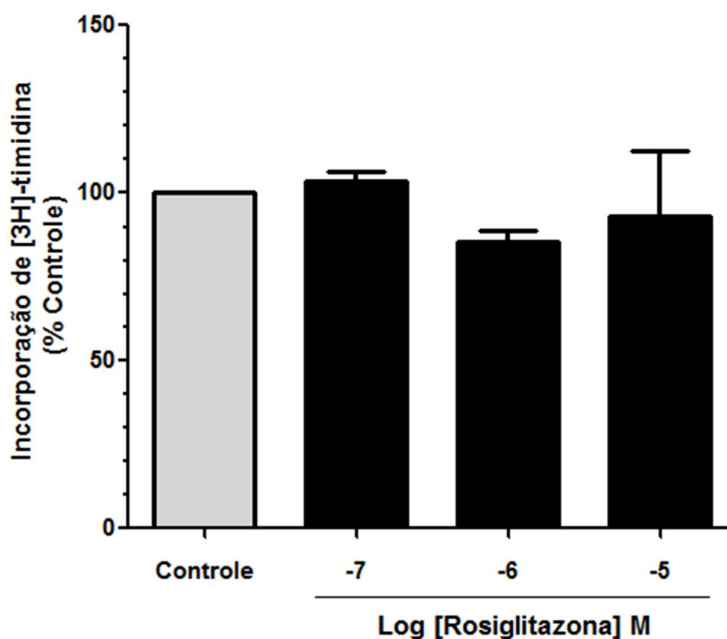


Figura 13: O tratamento com rosiglitazona durante 72h não tem efeito sobre a proliferação de células derivadas de cultura primária da polpa dentária humana. 2.000 células/cm² foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas, por 72h, com concentrações crescentes de rosiglitazona (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) ou veículo (DMSO). Nas 4 horas finais de tratamento, 0,5 μ Ci/ml de [³H]-timidina foi adicionado em cada poço. Dados expressos como média \pm EPM do percentual de incorporação de [³H]-timidina em relação ao controle, de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de *Newman-Keuls*.

5.3. Efeito da rosiglitazona sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1, em cultura primária de células da polpa dentária humana

A avaliação da expressão do gene que codifica do TGF β 1 em cultura primária de células da polpa dentária humana em resposta ao tratamento com rosiglitazona foi precedida de extração do RNA total celular, análise de sua qualidade e integridade, e validação da PCR (análise da eficiência e especificidade dos *primers*).

5.3.1. Análise da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total pode interferir na análise da expressão gênica por PCRq, comprometendo os resultados. Assim, as amostras de RNA total obtidas dos grupos celulares tratados com rosiglitazona (10^{-5} M) ou com veículo (DMSO) por 7 e 14 dias foram avaliadas quanto ao grau de pureza e quanto a sua integridade.

Cada uma das 4 amostras das 3 culturas celulares (n=3) apresentou grau de pureza, determinado em espectrofotômetro pela razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, dentro do intervalo aceitável, entre 1,7 e 2,2 (**tabela 2**).

Tabela 2 - Grau de pureza do RNA total.

n	Amostra - RNA total	Razão 260 nm / 280 nm
1	Controle - 7dias	1.8
	Rosiglitazona - 7 dias	1.9
	Controle - 14 dias	1.9
	Rosiglitazona - 14 dias	1.9
2	Controle - 7dias	1.9
	Rosiglitazona - 7 dias	1.9
	Controle - 14 dias	1.9
	Rosiglitazona - 14 dias	1.9
3	Controle - 7dias	1.8
	Rosiglitazona - 7 dias	1.9
	Controle - 14 dias	1.9
	Rosiglitazona - 14 dias	1.9

n: número do experimento.

A integridade do RNA total foi determinada pela análise qualitativa das subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, após eletroforese das amostras em gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídeo. Quando as amostras foram observadas sobre luz U.V., foi possível visualizar, de forma nítida, as duas subunidades de todas as amostras de RNA total, das 3 culturas diferentes. Além disso, não foram observados rastros de degradação abaixo das subunidades, confirmando, assim, integridade de cada uma delas (**figura 14**).

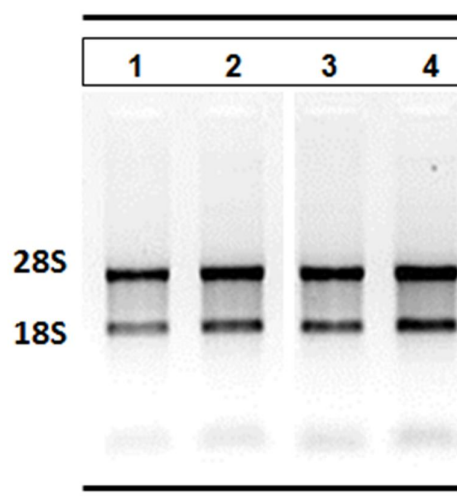


Figura 14: Análise da integridade das subunidades 28S e 18S das amostras de RNA total. As amostras de RNA total foram obtidas de linhagens primárias de células da polpa dentária humana de 3 doadores diferentes, após serem cultivadas por 7 e 14 dias com rosiglitazona ($10^{-5}M$) ou veículo (DMSO) em placas de cultura com diâmetro de 100 mm. A integridade das amostras foi verificada sobre luz U.V. após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. Imagem representativa dos grupos experimentais de uma cultura. Grupos experimentais: **1** - controle (DMSO), 7 dias. **2** - rosiglitazona ($10^{-5}M$), 7 dias. **3** - controle (DMSO), 14 dias. **4** – rosiglitazona ($10^{-5}M$), 14 dias.

5.3.2. Análise da eficiência relativa dos *primers*

A análise da expressão gênica relativa pela técnica de PCRq, utilizando-se o método de comparação $\Delta\Delta Ct$, requer que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência sejam equivalentes. Dessa forma, inicialmente, uma curva de diluição seriada foi realizada para cada par de *primers* (**Figura 15, A e B**). Em

seguida, os valores dos Ct obtidos para cada diluição foram utilizados para determinar a equivalência da eficiência de amplificação, por meio de sua representação gráfica (log da diluição x ΔCt). A equivalência foi determinada pela inclinação da reta gerada ao se comparar a eficiência do gene alvo (TGF β 1) com a do gene controle (β -actina). Pela equação obtida, pode ser observado que o valor correspondente a inclinação da reta está entre o intervalo $-0,1$ e $0,1$ ($0,0671$), possibilitando, portanto, a utilização do método de comparação aritmético (**Figura 15, C**).

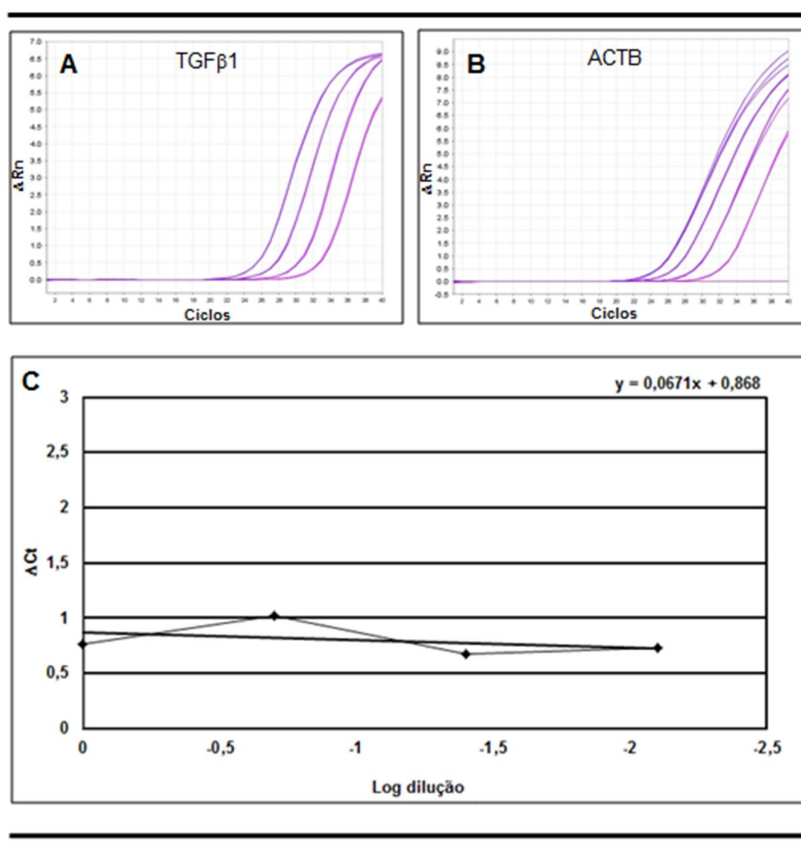


Figura 15: Genes alvo (TGF β 1) e controle (β -actina) apresentam eficiência de amplificação equivalente. Curvas de diluição seriada foram feitas para cada par de *primers*, partindo-se de uma amostra de RNA de 5 ng e diluindo-se sequencialmente para 1ng, 0,2 ng e 0,04 ng (A e B). As diluições foram feitas em triplicata e as médias dos valores dos Ct do gene alvo, obtidas para cada diluição, foram subtraídas pelas médias dos valores dos Ct do controle. Estas variações (ΔCt) foram representadas graficamente em função do log da diluição correspondente (C). A inclinação ($0,067$) da reta obtida por regressão linear demonstra que as eficiências de amplificação dos dois pares de *primers* são equivalentes ($< 0,1$ e $> -0,1$).

5.3.3. Análise da especificidade dos *primers*

O fluoróforo presente no sistema SYBR® Green de detecção da amplificação liga-se a qualquer DNA fita-dupla. Assim, a presença de produtos inespecíficos de amplificação ou a formação de dímeros de *primers* podem comprometer os resultados da quantificação relativa do gene de interesse. Considerando-se esses aspectos, os *primers* foram avaliados quanto a sua especificidade por meio da curva de dissociação do produto de amplificação (curva de *melting*). A presença de apenas um pico na curva indica uma amplificação específica de um único fragmento de DNA e ausência de dímeros de *primer* (Figura 16).

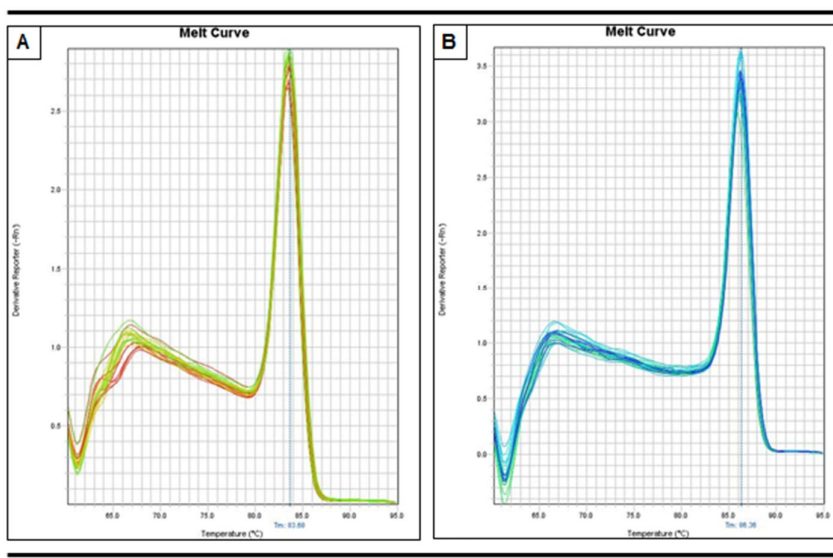


Figura 16: As seqüências de *primers* escolhidos apresentam especificidade de amplificação.

Os *primers* dos genes alvo (TGF β 1) e de referência (β -actina) foram avaliados quanto à sua especificidade de amplificação por meio de curvas de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*), realizadas após reação de PCRq, aumentando-se gradativamente a temperatura (acréscimos de 0,3 °C) de 60 °C para 95 °C. A presença de apenas um pico nas curvas demonstra a ausência de formação de dímeros e/ou de produtos inespecíficos de amplificação. A, TGF β 1; B, β -actina.

5.3.4. Análise do efeito da rosiglitazona na expressão do TGFβ1

A expressão do TGFβ1 em células da polpa dentária humana, cultivadas por 7 e 14 dias com rosiglitazona (10^{-5} M) ou com veículo (DMSO) foi analisada por RT-PCRq.

Quando as células foram incubadas apenas com o veículo (DMSO), não foi observada variação da expressão basal do TGFβ1, entre os 2 tempos de cultivo. (**figura 17, A**). Da mesma forma, quando as células foram incubadas, por 7 dias, com rosiglitazona (10^{-5} M) ou veículo (DMSO), também não foi observada variação da expressão do TGFβ1 em relação ao controle (**Figura 17, B**). No entanto, quando as células foram incubadas com a mesma concentração de rosiglitazona, por 14 dias, houve um aumento significativo na expressão do TGFβ1, de 1.375 (\pm 0.11) em relação ao controle (**figura 17, C**).

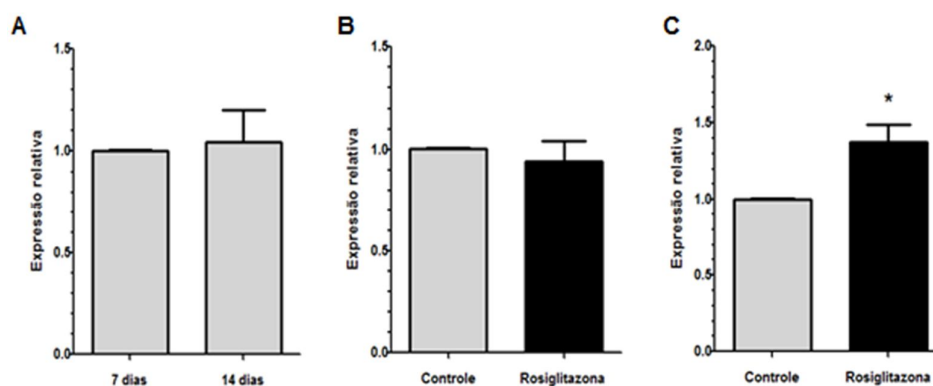


Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do TGFβ1 após 7 e 14 dias de tratamento com veículo (DMSO) ou com rosiglitazona. Células derivadas de cultura primária de polpa dentária humana foram cultivadas em placas de 100 mm e, após confluência, incubadas com veículo (DMSO) ou com rosiglitazona (10^{-5} M) por 7 e 14 dias. O RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão do gene que codifica o TGFβ1 foi analisada por meio de RT-PCRq. A – Não foi observada variação do nível de expressão basal do TGFβ1 em relação aos dois tempos de tratamento. B – Após 7 dias de tratamento, não foi observada variação do nível de expressão gênica do TGFβ1 em relação ao controle. C – Após 14 dias de tratamento, foi observado aumento significativo (1.375, \pm 0.11) do nível de expressão gênica TGFβ1 em relação ao controle. Dados expressos como média \pm EPM do nível de expressão do TGFβ1 em relação ao tempo de tratamento (A) ou em relação ao controle (B e C), de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (DMSO), por teste *t* de Student.

6. DISCUSSÃO

Evidências recentes sugerem que o PPAR γ pode modular a expressão de moléculas relacionadas com eventos imuno-inflamatórios pulpares (14, 15). Estes estudos, além de ampliarem os conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares que regulam a resposta de defesa do tecido pulpar, indicaram a possibilidade de se utilizar agonistas sintéticos deste RN, da classe das TZDs, no controle da inflamação da polpa. Entretanto, eventos igualmente importantes no processo de reparo do complexo dentino-pulpar, tais como proliferação e expressão de genes envolvidos com a formação de dentina terciária, não foram abordados nesses estudos. Considerando que estratégias terapêuticas que buscam o controle da resposta imuno-inflamatória pulpar devem ser ponderadas quanto aos possíveis efeitos sobre outros aspectos relacionados com reparo dentinário, o presente estudo propôs investigar o efeito de um agonista total do PPAR γ , a rosiglitazona, sobre a proliferação celular e sobre a expressão de TGF β 1, em modelo experimental de cultura primária de células da polpa dentária humana.

Para cumprir com os objetivos propostos no projeto, foram estabelecidas culturas primárias de células da polpa dentária humana. Além disso, foi necessário testar e padronizar diversos protocolos que não eram rotina no Laboratório de Farmacologia Molecular e no Laboratório de Histopatologia Bucal, o que demandou tempo para superar as dificuldades metodológicas.

A rosiglitazona foi utilizada por ser um representante das TZDs já classicamente descrito como agonista de alta afinidade do PPAR γ (19) e por apresentar menor custo relativo e maior facilidade de obtenção em relação às demais TZDs, como por exemplo, a pioglitazona.

A escolha do modelo experimental foi fundamentada na ampla utilização da cultura primária no estudo de diversos aspectos fisiopatológicos do complexo dentino-pulpar, incluindo comportamento celular, potencial odontogênico e mecanismos de reparo (150), além de ser uma ferramenta essencial para obtenção

e caracterização de células-tronco/progenitoras mesenquimais, presentes no tecido pulpar (39, 141). Embora apresente algumas limitações, como senescência celular, a qual limita o tempo de trabalho com essas células, e menor taxa de proliferação em comparação com linhagens imortalizadas, culturas primárias da polpa de dentes humanos são considerados modelos de estudo válidos (152). De fato, culturas primárias são constituídas por uma população celular heterogênea, que retém muitas das características de diferenciação observáveis em células *in vivo* (152).

A obtenção relativamente simples e acessível do tecido pulpar, a partir de dentes extraídos, que seriam descartados, também favorece a frequente utilização destas culturas como modelo de estudo. Assim, a decisão de se utilizar, neste trabalho, culturas primárias de células pulpares humanas foi fundamentada pela semelhança de características que essas células preservam em relação ao tecido original e, também, pela relativa facilidade de aquisição das polpas dentárias.

Alguns autores, contudo, sugerem a utilização de linhagens celulares imortalizadas (153-155). Para eles, a cultura primária consome tempo e os resultados podem ser variáveis. Linhagens imortalizadas, embora retenham poucas características das células originais *in vivo*, possuem, como vantagens, a disponibilidade quase ilimitada, maior taxa de crescimento e, muitas vezes, maior facilidade para se trabalhar. Além disso, por serem mais homogêneas, os resultados com elas obtidos são mais reproduzíveis (152).

Muitas evidências indicam que a reprodutibilidade dos resultados de estudos que utilizam cultura primária de células pulpares é influenciada pelas condições dos dentes doados, em relação ao estado funcional (incluso ou erupcionado) (156) e estágio de desenvolvimento (157). É possível que tais características possam refletir na população celular obtida e, conseqüentemente, no comportamento das células durante os ensaios. Um estudo que comparou dentes inclusos e erupcionados sugere que as características dos dentes doados podem influenciar o padrão de expressão de genes que codificam moléculas relacionadas com a matriz extracelular (156). Outro estudo envolvendo dentes inclusos em diferentes estágios de desenvolvimento demonstrou que células obtidas de terceiros molares, apenas com a coroa formada, apresentavam taxa de proliferação maior em relação às taxas de células isoladas de dentes com a raiz já em formação (157).

Sugere-se também que a idade do doador possa influenciar as características funcionais das células obtidas pela cultura primária (158). Dessa forma, a fim de se garantirem resultados mais homogêneos e reproduzíveis, apenas dentes hígidos e inclusos com a raiz já em formação e de pacientes jovens e com idades aproximadas foram selecionados para esta pesquisa. Além disso, considerando que existem evidências, na literatura, de que condições patológicas sistêmicas possam influenciar a homeostasia do tecido pulpar (159-161), somente polpas dentárias de doadores sem doenças sistêmicas e que não faziam uso regular de medicações foram utilizadas para o estabelecimento das culturas. Tais requisitos, embora necessários, atrasaram a coleta do material, já que dificultaram a escolha dos sujeitos.

As culturas primárias foram obtidas a partir do cultivo de pequenos fragmentos da polpa dentária, denominados explantes. Este método de isolamento, conhecido como *outgrowth*, é utilizado por diversos pesquisadores para estudar aspectos variados da fisiologia celular, sendo eficiente para obtenção de subpopulações com potencial odontogênico e/ou capazes de formar nódulos de mineralização (162, 163). A escolha por esta técnica de isolamento deveu-se à maior conveniência oferecida por ela em relação à simplicidade de execução e ao baixo custo, quando comparada ao outro método de isolamento, por digestão enzimática. No entanto, embora seja mais simples, o isolamento por *outgrowth* necessita de um tempo maior para que um número suficiente de células migre do fragmento para a placa de cultura e, conseqüentemente, um maior tempo para o estabelecimento de um estoque celular adequado. Além disso, linhagens celulares obtidas a partir do subcultivo de culturas primárias isoladas por *outgrowth* apresentaram taxa de proliferação menor em relação àquelas isoladas por digestão enzimática (150).

O isolamento por digestão enzimática permite que diferentes tipos de células sejam liberados durante a dissociação do tecido (141), ao passo que, no *outgrowth*, a cultura será constituída somente por células capazes de migrar do fragmento para a placa de cultura o que, possivelmente, resulta em menor heterogeneidade (152). De fato, enquanto diferentes padrões de colônia celulares são estabelecidos pelo método de digestão enzimática (141), as células de culturas por *outgrowth* tendem a ter morfologia mais homogênea, a maioria fusiformes, semelhantes a fibroblastos

(163, 164). Assim, conforme Huang e colaboradores sugeriram, diferentes métodos de isolamento podem originar diferentes populações ou linhagens de células pulpares, o que explica as diferenças na taxa de proliferação. No entanto, em relação à diferenciação odontoblástica, os dois métodos parecem gerar células pulpares contendo progenitores de odontoblastos (150).

No presente estudo, o tempo necessário para se observar migração celular a partir dos fragmentos pulpares foi semelhante ao observado na literatura (150, 164) e as células que migraram a partir dos fragmentos, assim como as células derivadas das primeiras subculturas, apresentaram morfologia predominantemente alongada, a semelhança de estudos morfológicos descritos por Stanislawski e colaboradores (164). Poucas células esféricas também foram observadas. Conforme abordado anteriormente, é possível que o padrão morfológico obtido e, portanto, o tipo de população celular, tenha sido determinado pelo método de isolamento utilizado. O método de *outgrowth* seleciona células que são capazes de migrar para fora do fragmento. Além disso, apenas aquelas capazes de se dividir perpetuam-se na cultura. Uma vez que fibroblastos pulpares, células mesenquimais indiferenciadas, células endoteliais e pericitos apresentam esta capacidade proliferativa e de aderência, sugere-se que as culturas estabelecidas, no presente estudo, sejam constituídas por estes diferentes tipos celulares, sendo fibroblastos pulpares o tipo predominante (150). Ademais, é possível que células progenitoras comprometidas com a diferenciação odontoblástica estejam presentes. Avaliação do perfil gênico e/ou imunofenotípico dessas culturas se faz necessário, em um segundo momento, para melhor caracterizá-las.

Estudos indicam que a expansão da cultura seleciona a população celular para uma linhagem fibroblástica e mais diferenciada, reduzindo drasticamente a população de células progenitoras (149, 150). Dessa forma, com base nestas evidências, apenas linhagens entre a terceira e quinta passagens foram utilizadas para realização dos experimentos de proliferação e expressão gênica.

6.1. Ensaio de proliferação celular

O PPAR γ , embora classicamente reconhecido pelo seu importante papel na adipogênese e no controle do metabolismo energético, está envolvido com outros processos fisiopatológicos celulares e teciduais, como o controle do ciclo celular e dos processos de diferenciação e apoptose de diversas células nas quais é expresso (20). Considerando que a modulação do ciclo celular de células-tronco/progenitoras presentes na polpa dentária representa um dos requisitos fundamentais para o processo de reparo dentinário (7, 165), os efeitos da rosiglitazona, agonista do PPAR γ , sobre a proliferação de células pulpares foram avaliados por meio de incorporação de [3 H]-timidina. Para isso, inicialmente foram testados e estabelecidos alguns parâmetros a serem utilizados no ensaio, incluindo densidade celular, tamanho da placa de cultura e presença ou não de SFB.

Os resultados do presente trabalho indicaram que o tratamento com rosiglitazona durante 24 horas diminui a proliferação de células pulpares de forma concentração-dependente, sendo significativo na maior concentração (10^{-5} M). Não há, na literatura, evidências a respeito do efeito de agonistas sintéticos do PPAR γ sobre a proliferação de células da polpa dentária. Contudo, seus efeitos sobre ciclo celular de outras linhagens celulares são bem conhecidos, estando este RN associado, principalmente, a um papel antiproliferativo (20).

A capacidade do PPAR γ ativado em inibir a proliferação celular foi inicialmente demonstrada em estudo utilizando linhagem de fibroblastos embrionários de ratos (NIH-3T3), transfectada, de forma estável, com as isoformas PPAR γ 1 ou PPAR γ 2, e linhagem transformada de adipócito marrom de roedores (HIB1B), ambas cultivadas na presença ou ausência da pioglitazona. Neste estudo, a ativação do PPAR γ foi suficiente para interromper o ciclo celular e, de forma subsequente, induzir a adipogênese (104). Posteriormente, os efeitos antiproliferativos do PPAR γ e de seus agonistas foram evidenciados em vários modelos de câncer, como lipossarcoma (166), glioblastoma (167), de pulmão (168) e de mama (169), e em outras linhagens celulares, incluindo culturas primárias de músculo liso humano e de ratos (170) e fibroblastos da derme de modelos diabéticos

de roedores (171). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com outros apresentados na literatura.

Os mecanismos moleculares por meio dos quais o PPAR γ modula a proliferação celular não são completamente compreendidos, mas sugere-se envolver transativação e transrepressão de moléculas que participam da sinalização de diferentes vias da regulação do ciclo celular, induzindo o acúmulo de células nas fases G0/G1 ou G2, podendo implicar a diferenciação ou apoptose (105). De fato, células primárias de lipossarcoma humano tratadas com agonistas do PPAR γ apresentaram inibição do crescimento celular, acúmulo de lipídeos e expressão de marcadores específicos da diferenciação adipogênica (166). A indução da diferenciação foi evidenciada em outros modelos de câncer, tais como em células de leucemia mielóide (172). Em alguns tipos de câncer, como por exemplo, de pulmão, dependendo das condições experimentais (e.g. presença ou ausência de SFB), agonistas do PPAR γ foram capazes de induzir diferenciação ou apoptose celular (168). A apoptose, como causa da diminuição da proliferação celular, foi sugerida também em outros modelos de câncer, incluindo de mama (169), fígado (173) e cérebro (167).

Alguns mecanismos sugeridos para explicar a indução de apoptose e/ou diferenciação por agonistas do PPAR γ incluem redução da atividade de ligação ao DNA do complexo E2F/DP (fatores de transcrição que regulam genes relacionados com a progressão do ciclo celular, em especial a síntese de DNA), via modulação de sua fosforilação (104), aumento da expressão de moléculas pró-apoptóticas e inibição de moléculas anti-apoptóticas (174, 175), inibição de ciclinas D1 (proteínas envolvidas com a progressão do ciclo celular) e aumento da expressão de moléculas relacionadas com o processo de diferenciação (168). A diversidade de mecanismos existentes pode ser atribuída às condições experimentais, bem como pode refletir aspectos específicos relacionados à célula, espécie ou o ligante estudado (105).

Embora seja sugerido, no presente estudo, que o tratamento com rosiglitazona por 24 horas diminui a proliferação celular, não é possível inferir se os efeitos são por meio de indução da apoptose ou via diferenciação celular. Sabe-se que a diferenciação de células-tronco/ progenitoras presentes na polpa dentária é precedida da saída da célula do ciclo celular (176). No entanto, para verificar se o

efeito antiproliferativo da rosiglitazona está associado ao direcionamento da cultura primária para diferenciação celular, são necessários estudos da expressão de marcadores fenotípicos, em especial odontogênicos, tais como sialofosfoproteína dentinária (DSPP).

Estudo em modelo animal de regeneração de ossos longos sugeriu que o tratamento com rosiglitazona diminuiu a proliferação de células progenitoras mesenquimais, relacionadas com o reparo ósseo e, ao mesmo tempo, inibiu a diferenciação osteoblástica e induziu a diferenciação adipocitária (148). Outro estudo, utilizando modelo experimental *in vivo* e *in vitro*, indicou que o tratamento com rosiglitazona induziu a apoptose de osteoblastos e osteócitos (145). A indução de apoptose celular foi observada também em estudo utilizando células-tronco mesenquimais humanas derivadas da medula óssea (hMSC) tratadas com rosiglitazona (177). Devido às semelhanças existentes entre o tecido ósseo e o complexo dentino-pulpar, bem como entre culturas de hMSC e células-tronco/progenitoras derivadas da polpa, poderia ser inferido que, no presente modelo, estaria ocorrendo inibição da diferenciação odontogênica, favorecendo a diferenciação adipocitária e/ou indução de apoptose. Porém, os resultados em modelos ósseos devem ser interpretados de maneira cautelosa, já que diferenças existem entre osso e dentina, no que diz respeito, por exemplo, à remodelação tecidual e às potencialidades dos nichos de células-tronco/progenitoras (Huang et Gronthos, 2009). Assim, estudos que avaliem a diferenciação e apoptose de células da polpa dentária são necessários. É importante verificar também se os efeitos observados neste estudo são mediados pela ativação do PPAR γ , uma vez que existem dados sugestivos de que a modulação do ciclo celular pela rosiglitazona possa ocorrer por mecanismos independentes deste RN (178).

Em geral, os estudos que verificaram o papel de agonistas do PPAR γ sobre a proliferação celular sugerem que seus efeitos são intensificados ao longo do tempo (167, 169). Diferente do esperado, não foram observados efeitos sobre a proliferação celular após 72 horas de tratamento com rosiglitazona. Essa diferença nos resultados poderia ser atribuída às condições experimentais, entre elas a retirada de SFB do meio de cultura. É bem estabelecido que o SFB contém diversos fatores de crescimento, hormônios e vitaminas necessários para a proliferação celular (152). Assim, é possível que a privação desses fatores, durante todo o

período do experimento, induziria a saída do ciclo celular para fase G₀, tornando as células não responsivas ao tratamento com a rosiglitazona.

Outra explicação para o resultado contraditório poderia ser a heterogeneidade celular da cultura primária. Por mais que critérios relacionados à escolha dos dentes e ao número de passagens da cultura tenham sido estabelecidos a fim de garantir maior homogeneidade, polpas dentárias obtidas de diferentes doadores, potencialmente, originam culturas primárias com populações celulares diferentes (152). Considerando que o resultado apresentado neste trabalho representa a média de três experimentos independentes, utilizando células de três doadores distintos e em diferentes passagens, é possível que um número amostral maior seja necessário para melhor esclarecer os efeitos do tratamento com rosiglitazona durante 72 horas.

Por fim, seria possível que o tratamento relativamente prolongado com rosiglitazona tenha inibido a expressão do PPAR γ . Este mecanismo de regulação negativa mediada por ligante foi sugerido por Hauser e colaboradores, como forma de garantir a homeostasia fisiológica deste RN (179). Porém, para verificar se, de fato, os resultados encontrados neste trabalho poderiam ser atribuídos a esse mecanismo, estudos avaliando a expressão do PPAR γ ao longo do tempo de tratamento com o ligante são necessários.

6.2. Efeito da rosiglitazona sobre a expressão do gene que codifica TGF β 1

Outro aspecto da ativação do PPAR γ em células da polpa dentária é o seu efeito sobre a expressão do gene que codifica o TGF β 1, fator de crescimento envolvido com a diferenciação odontoblástica e com o processo de reparo do complexo dentino-pulpar (37, 61). O TGF β 1 apresenta efeitos pleiotrópicos, estando envolvido com vários processos biológicos essenciais, incluindo desenvolvimento, cicatrização de feridas, processo de reparo tecidual e resposta imune (180). Sua participação como molécula sinalizadora dos eventos celulares relacionados com o reparo dentinário tem sido amplamente investigada ao longo das duas últimas décadas, estando este fator de crescimento envolvido com a deposição de matriz

extracelular e com a formação de dentina terciária tanto em modelos de cultura celular (181) quanto em modelos animais (62). Assim, a decisão de se avaliar o efeito de um agonista do PPAR γ sobre a expressão gênica do TGF β 1 foi justificada pelo importante papel desempenhado por esta molécula no complexo dentino-pulpar.

Os resultados deste trabalho indicaram que a expressão basal do TGF β 1 nas culturas primárias de células da polpa dentária humana permaneceu constante entre os dois tempos avaliados, 7 e 14 dias. Por outro lado, Nakashima e colaboradores, estudando o padrão de expressão do TGF β 1, ao longo de 28 dias, em culturas primárias de células da polpa de dentes bovinos, sugeriu que a expressão gênica deste fator de crescimento diminui em função do tempo (51). Porém, ao contrário das condições estabelecidas no presente trabalho, o padrão de expressão deste fator de crescimento foi avaliado em células cultivadas em meio de cultura com adição de ácido ascórbico, utilizado para induzir o fenótipo de osteo/odontoblasto. Assim, é possível que as diferenças encontradas entre os resultados possam ser atribuídas ao tipo de células e também às condições empregadas para o cultivo celular.

Quando as células foram cultivadas na presença da rosiglitazona (10^{-5} M) por 7 dias, não foi observado nenhum efeito sobre a expressão gênica do TGF β 1. No entanto, após 14 dias de tratamento com o ligante, sua expressão aumentou. Estudos anteriores, em sua maioria, sugerem que agonistas do PPAR γ , em determinadas condições, reduzem a expressão gênica e proteica deste fator de crescimento, em diferentes modelos celulares. Estudo utilizando células mesangiais de ratos, transfectadas de forma transiente com o promotor do gene que codifica o TGF β 1, e cultivadas na presença de alta concentração de glicose, como modelo celular de nefropatia diabética, demonstrou que tanto rosiglitazona quanto troglitazona reprimem a transcrição deste promotor, ativado pela alta concentração de glicose (182). Outro estudo demonstrou, em cultura primária de células mesoteliais humanas do peritônio, que troglitazona diminui os níveis aumentados do TGF β 1 em consequência também da presença de alta concentração de glicose. Esse efeito foi observado tanto para o transcrito quanto para a proteína (183). A expressão proteica do TGF β 1, aumentada em resposta a lipoproteínas de densidade

baixa (LDL) adicionadas ao meio de cultura, também foi reduzida pelo tratamento com pioglitazona por 24 horas, em cultura primária de células do túbulo proximal de rins de gambá (184).

Efeitos semelhantes de agonistas do PPAR γ sobre a expressão do TGF β 1 foram observados em diferentes modelos animais, tais como de DM2 (185), de fibrose (186) e de resposta inflamatória (187). Em todos esses estudos, com modelos celular e animal, os efeitos inibitórios de agonistas do PPAR γ sobre a expressão do TGF β 1 foram verificados em condições nas quais os níveis de expressão deste fator de crescimento já encontravam-se aumentados. Estes mesmos estudos e outros sugerem que agonistas do PPAR γ não apresentam efeitos sobre a expressão basal do TGF β 1 (183, 184, 188), o que está em concordância com os resultados do presente trabalho, em relação ao tratamento por 7 dias. Não foram encontrados na literatura, até o momento da redação desse texto, estudos que avaliaram, em modelos de cultura de células, o efeito de agonistas do PPAR γ sobre a expressão do TGF β 1, por um período prolongado de tempo. Assim, é possível que o tratamento com rosiglitazona por 14 dias induza o aumento da expressão do TGF β 1, ao menos em cultura de células da polpa dentária humana,

O aumento da expressão do TGF β 1 observado pode estar relacionado com a ativação de diferentes vias celulares. Um estudo com culturas primárias de explantes da polpa de dentes humanos indicou que células induzidas a se diferenciar em osteo/odontoblastos, por 28 dias, apresentavam expressão gênica do TGF β 1 maior do que células não induzidas (189). Outro estudo, com mesmo modelo celular, demonstrou que materiais utilizados para capeamento pulpar aumentam a expressão deste fator de crescimento. Os autores sugeriram que os mecanismos moleculares envolvidos com a capacidade destes materiais em induzir reparo dentinário poderia ser explicada, pelo menos em parte, por este aumento na expressão do TGF β 1 (190). Em conjunto, estas evidências indicam que a diferenciação odontoblástica e o processo de reparo dentinário estejam relacionados com um nível aumentado deste fator de crescimento, o que sugere que o tratamento com rosiglitazona poderia estar ativando vias relacionadas com a diferenciação osteo/odontoblástica. Porém, os estudos que avaliam o efeito de agonistas do PPAR γ sobre a diferenciação osteoblástica indicam que estes ligantes estão

relacionados com a inibição desta via de diferenciação (144). Assim, outra possibilidade é a de que o aumento da expressão gênica do TGF β 1 estaria relacionado com a ativação de vias apoptóticas. De fato, tem sido demonstrado que níveis aumentados do TGF β 1 induzem apoptose celular em linhagens celulares odontoblástica (191) e em outras linhagens, como por exemplo em células do músculo liso vascular (192). Porém, para verificar se esta via está sendo ativada pela rosiglitazona, estudos que avaliem a expressão de marcadores apoptóticos são necessários.

Analisados em conjunto os resultados de proliferação e expressão gênica do TGF β 1, poderia-se inferir que, embora avaliados em tempos diferentes, a diminuição da proliferação celular em resposta ao tratamento com a rosiglitazona estaria sendo causada por um direcionamento da cultura para diferenciação ou para apoptose, o que refletiria em um aumento, mesmo que tardio, da expressão gênica do TGF β 1. Conforme descrito anteriormente, tanto a diferenciação odontoblástica quanto a apoptose celular relacionam-se com níveis aumentados deste fator de crescimento (191, 192). Entretanto, tendo como referência os estudos em modelos ósseos, seria mais coerente concluir que a diminuição da proliferação poderia estar sendo causada por um direcionamento da linhagem para um fenótipo adipocitário, e não odontogênico, ou para ativação de vias de apoptose. Em ambas as situações, os níveis do TGF β 1 encontram-se aumentados (193, 194). Assim, considerando que o TGF β 1 configura-se tanto como um marcador apoptóticos quanto de diferenciação celular, investigações adicionais são necessárias para melhor compreender o papel do PPAR γ na fisiopatologia pulpar. Além disso, é importante ressaltar, ainda, que os resultados deste trabalho são muito preliminares, sendo necessários mais estudos, a fim de se verificar se o PPAR γ representa um alvo farmacológico vantajoso no controle da resposta imuno-inflamatória pulpar e no favorecimento do processo de reparo dentinário.

Por fim, cabe salientar que estes resultados foram obtidos a partir de modelo de cultura de células mantidas em meio regular de crescimento e sem a adição de agentes que mimetizem a inflamação pulpar e/ou que induzam mineralização. É possível que, diante desses estímulos, outros efeitos possam ser encontrados. Além disso, deve-se ter cautela na extrapolação dos resultados obtidos a partir de

modelos em cultura celular, uma vez que, embora válidos, estes modelos não simulam as condições fisiológicas reais.

7. CONCLUSÃO

- Foram estabelecidas culturas primárias de células pulpares humanas obtidas a partir de terceiros molares inclusos de indivíduos jovens.
- O tratamento com rosiglitazona, durante 24 horas, diminuiu a proliferação de células da polpa dentária humana em cultura.
- O tratamento com rosiglitazona, durante 72 horas, não alterou a proliferação de células da polpa dentária humana em cultura.
- O tratamento de células da polpa dentária humana em cultura com rosiglitazona, durante 7 dias, não alterou a expressão do gene que codifica o TGF β 1.
- O tratamento de células da polpa dentária humana em cultura com rosiglitazona, durante 14 dias, aumentou a expressão do gene que codifica o TGF β 1.

8. REFERÊNCIAS

1. Baume LJ. The biology of pulp and dentine: a historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. Basel ; New York: S. Karger; 1980 moth. x, 246 p. p.
2. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. The international journal of biochemistry & cell biology. 2004;36(8):1367-73. Epub 2004/05/19.
3. Pashley DHaL, F. R. Dentin-pulp complex structure and function. Pathways of the pulp. 9^a ed. St. Louis: Cohen, S.and Hargreaves, K. M.; 2007. p. 438-91.
4. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatr Dent*. 2008;30(3):206-10.
5. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 1993;4(5):679-728. Epub 1993/01/01.
6. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):273-80.
7. Harichane Y, Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Granja I, Goldberg A, Kellermann O, et al. Pulpal progenitors and dentin repair. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):307-12.
8. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(15-16):1911-20.
9. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007;13(2):151-7.

10. Smith A. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003;67(6):678-89.
11. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of dental research.* 2000;79(9):1689-96. Epub 2000/10/07.
12. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of dentistry.* 2010;38(9):687-97. Epub 2010/06/29.
13. Bergenholtz G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod.* 1981;7(3):100-4.
14. Kim JC, Lee YH, Yu MK, Lee NH, Park JD, Bhattarai G, et al. Anti-inflammatory mechanism of PPARgamma on LPS-induced pulp cells: role of the ROS removal activity. *Arch Oral Biol.* 2012;57(4):392-400.
15. Yu MK, Lee JC, Kim JH, Lee YH, Jeon JG, Jhee EC, et al. Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma on human dental pulp cells. *J Endod.* 2009;35(4):524-8.
16. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of medicinal chemistry.* 2000;43(4):527-50. Epub 2000/02/26.
17. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83(5):803-12.
18. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4318-23.

19. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270(22):12953-6.
20. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289-312.
21. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem.* 2001;276(41):37731-4.
22. Pääkkönen V, Tjäderhane L. High-throughput Gene and Protein Expression Analysis in Pulp Biologic Research: Review. *Journal of Endodontics.* 2010;36(2):179-89.
23. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1647-8.
24. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian dental journal.* 2007;52(1 Suppl):S4-16. Epub 2007/06/06.
25. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 2004;15(1):13-27.
26. Cate ART. *Oral Histology: development, structure, and function* 5ed. St Louis, Missouri: John Schreffer; 1998.
27. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000;127(8):1671-9.
28. Sharpe PT. Neural crest and tooth morphogenesis. *Adv Dent Res.* 2001;15:4-7.

29. Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec.* 1996;245(2):235-49.
30. Holland GR. The odontoblast process: form and function. *Journal of dental research.* 1985:499-514.
31. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):51-68. Epub 1995/02/01.
32. Couve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 1986;31(10):643-51.
33. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connective tissue research.* 1995;33(1-3):59-65. Epub 1995/01/01.
34. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.* 2011;3:711-35.
35. Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):213-22.
36. Kuttler Y. Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1959;12(8):996-9.
37. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of dentistry.* 2000;28(2):77-92. Epub 2000/02/10.
38. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):281-90. Epub 1995/02/01.
39. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30. Epub 2000/11/23.

40. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(4):696-704. Epub 2003/04/04.
41. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(1):61-70.
42. Glossary of Endodontic Terms. Chicago, IL2003. American Association of Endodontists.
43. Feit J, Metelova M, Sindelka Z. Incorporation of 3H thymidine into damaged pulp of rat incisors. *Journal of dental research*. 1970;49(4):783-6. Epub 1970/07/01.
44. Fitzgerald M CDJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):707-15.
45. Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *Journal of dental research*. 1979;58(Spec Issue D):2198-206. Epub 1979/11/01.
46. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*. 2002;36(4):223-32.
47. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connective tissue research*. 2002;43(2-3):387-90.
48. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol*. 1999;44(2):149-56.
49. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol*. 1994;39(12):1085-9.

50. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *Journal of dental research*. 1994;73(9):1515-22.
51. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol*. 1994;162(1):18-28.
52. Rutherford B, Spangberg L, Tucker M, Charette M. Transdental stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys. *Arch Oral Biol*. 1995;40(7):681-3.
53. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol*. 1993;38(7):571-6.
54. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res*. 2001;15:108-12.
55. Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y, Tsuji T. FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(3):1052-9.
56. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*. 2012;57(2):109-21.
57. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*. 1997;42(3):219-23.
58. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1990;5(7):717-23.

59. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6.
60. D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor-beta 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol.* 1990;35(12):957-65.
61. Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol.* 1992;36(4):491-503.
62. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *European journal of oral sciences.* 1998;106 Suppl 1:192-6. Epub 1998/04/16.
63. Horst OV, Tompkins KA, Coats SR, Braham PH, Darveau RP, Dale BA. TGF-beta1 Inhibits TLR-mediated odontoblast responses to oral bacteria. *Journal of dental research.* 2009;88(4):333-8.
64. D'Souza RN, Cavender A, Dickinson D, Roberts A, Letterio J. TGF-beta1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex. *European journal of oral sciences.* 1998;1:185-91.
65. Kokkas A, Goulas A, Stavrianos C, Anogianakis G. The role of cytokines in pulp inflammation: *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011 Jul-Sep;25(3):303-11.; 2011.
66. Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, et al. Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology.* 2010;215(1):53-9.
67. Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *Journal of dental research.* 2008;87(3):256-61.

68. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2008;58(2):137-47. Epub 2008/07/08.
69. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *European journal of oral sciences*. 2000;108(3):202-6.
70. Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *European journal of oral sciences*. 2001;109(6):422-4.
71. Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol*. 2006;176(5):2880-7.
72. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 2007;109(4):1422-32.
73. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*. 2003;116(4):585-6.
74. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet*. 2001;17(10):554-6.
75. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters*. 2008;582(1):2-9. Epub 2007/11/21.
76. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):726-41.

77. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
78. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1269-304. Epub 2001/06/28.
79. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):926-35. Epub 2007/04/17.
80. Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*. 1997;272(32):20108-17.
81. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1440-4.
82. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
83. Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2007;8:936-51.
84. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta*. 2007;8:915-25.
85. Santos GM, Fairall L, Schwabe JW. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(3):87-93.
86. Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly*. 2010;15(140):13071.

87. Devchand PR, Ijpenberg A, Devesvergne B, Wahli W. PPARs: nuclear receptors for fatty acids, eicosanoids, and xenobiotics. *Adv Exp Med Biol.* 1999;469:231-6.
88. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7355-9.
89. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995;4(4-5):281-99.
90. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS letters.* 1998;438(1-2):55-60.
91. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18779-89.
92. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2007;8:999-1013.
93. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224-34.
94. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79(7):1147-56.
95. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 1999;99(3):239-42.

96. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS letters*. 2010;584(15):3242-9.
97. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(6):331-6.
98. Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer treatment reviews*. 2004;30(6):545-54. Epub 2004/08/25.
99. Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, Monden T, Yamada M, Shimizu H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene*. 2002;21(14):2171-80.
100. Li MY, Hsin MK, Yip J, Mok TS, Underwood MJ, Chen GG. PPARgamma activation extinguishes smoking carcinogen by inhibiting NNK-mediated proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(1):113-22.
101. Yin F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR, et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(5):916-22. Epub 2001/08/31.
102. Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):10990-5.
103. Kawa S, Nikaido T, Unno H, Usuda N, Nakayama K, Kiyosawa K. Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone. *Pancreas*. 2002;24(1):1-7.
104. Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*. 1997;11(15):1987-98.

105. Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol.* 2011;164(1):68-82.
106. Amato AA, de Assis Rocha Neves F. Idealized PPARgamma-Based Therapies: Lessons from Bench and Bedside. *PPAR Res.* 2012;978687:14.
107. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):748-59.
108. Nencioni A, Wesselborg S, Brossart P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol.* 2003;23(1-2):1-13.
109. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends in immunology.* 2007;28(12):551-8. Epub 2007/11/06.
110. Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6(2):137-43.
111. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998;391(6662):79-82. Epub 1998/01/09.
112. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391(6662):82-6. Epub 1998/01/09.
113. Kahn BB, McGraw TE. Rosiglitazone, PPARgamma, and type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2010;363(27):2667-9.
114. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol.* 1996;50(5):1087-94.

115. Chou FS, Wang PS, Kulp S, Pinzone JJ. Effects of thiazolidinediones on differentiation, proliferation, and apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2007;5(6):523-30.
116. Liu D, Zeng BX, Zhang SH, Yao SL. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. *Inflamm Res.* 2005;54(11):464-70.
117. Wang WM, Chen H, Zhong F, Lu Y, Han L, Chen N. Inhibitory effects of rosiglitazone on lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine model and HK-2 cells. *Am J Nephrol.* 2011;34(2):152-62.
118. Dworzanski T, Celinski K, Korolczuk A, Slomka M, Radej S, Czechowska G, et al. Influence of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) agonist, rosiglitazone and antagonist, biphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) on the course of inflammation in the experimental model of colitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(6):683-93.
119. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serraino I, Di Paola R, et al. Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3544-56.
120. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;106(4):523-31.
121. Pfutzner A, Marx N, Lubben G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, et al. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(12):1925-31.
122. Mudaliar S, Chang AR, Henry RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr Pract.* 2003;9(5):406-16.

123. Basu A, Jensen MD, McCann F, Mukhopadhyay D, Joyner MJ, Rizza RA. Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(3):510-4.
124. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2784-91.
125. Ryan KK, Li B, Grayson BE, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. A role for central nervous system PPAR-gamma in the regulation of energy balance. *Nat Med*. 2011;17(5):623-6.
126. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003. *Circulation*. 2003;108(23):2941-8.
127. Grey A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int*. 2008;19(2):129-37.
128. Malik AH, Prasad P, Saboorian MH, Thiele DL, Malet PF. Hepatic injury due to troglitazone. *Dig Dis Sci*. 2000;45(1):210-4.
129. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2457-71.
130. Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med*. 2010;170(14):1191-201.
131. Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, Jr., et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 2011;34(4):916-22.

132. Piccinni C, Motola D, Marchesini G, Poluzzi E. Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. *Diabetes Care*. 2011;34(6):1369-71.
133. Liu HB, Hu YS, Medcalf RL, Simpson RW, Dear AE. Thiazolidinediones inhibit TNF α induction of PAI-1 independent of PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(1):30-7.
134. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(9):4844-9.
135. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*. 2001;7(1):48-52.
136. Galli A, Ceni E, Mello T, Polvani S, Tarocchi M, Buccoliero F, et al. Thiazolidinediones inhibit hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus-transgenic mice by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent regulation of nucleophosmin. *Hepatology*. 2010;52(2):493-505.
137. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(3):704-11.
138. Hall JM, McDonnell DP. The molecular mechanisms underlying the proinflammatory actions of thiazolidinediones in human macrophages. *Mol Endocrinol*. 2007;21(8):1756-68.
139. Nozaki T, Ohura K. Gene expression profile of dental pulp cells during differentiation into an adipocyte lineage. *J Pharmacol Sci*. 2011;115(3):354-63.
140. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):501-6.

141. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*. 2002;81(8):531-5. Epub 2002/07/31.
142. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
143. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2002;143(6):2376-84.
144. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem*. 1999;74(3):357-71.
145. Soroceanu MA, Miao D, Bai XY, Su H, Goltzman D, Karaplis AC. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol*. 2004;183(1):203-16.
146. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007;13(12):1496-503.
147. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*. 2005;146(3):1226-35.
148. Liu L, Aronson J, Huang S, Lu Y, Czernik P, Rahman S, et al. Rosiglitazone inhibits bone regeneration and causes significant accumulation of fat at sites of new bone formation. *Calcif Tissue Int*. 2012;91(2):139-48.
149. Min JH, Ko SY, Cho YB, Ryu CJ, Jang YJ. Dentinogenic potential of human adult dental pulp cells during the extended primary culture. *Hum Cell*. 2011;24(1):43-50.

150. 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):225-36.
151. 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):611-22.
152. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique.* 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005. p. 642 p.
153. Panagakos FS. Transformation and preliminary characterization of primary human pulp cells. *J Endod.* 1998;24(3):171-5.
154. Hao J, Narayanan K, Ramachandran A, He G, Almushayt A, Evans C, et al. Odontoblast cells immortalized by telomerase produce mineralized dentin-like tissue both in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19976-81.
155. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connective tissue research.* 1995;33(1-3):97-103.
156. Harumi Miyagi SP, Kerkis I, da Costa Maranduba CM, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. *J Endod.* 2010;36(5):826-31.
157. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *Journal of dental research.* 2008;87(7):676-81.
158. Shiba H, Nakanishi K, Rashid F, Mizuno N, Hino T, Ogawa T, et al. Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with in vivo cellular aging in human pulp cells. *J Endod.* 2003;29(1):9-11.

159. Ilic J, Radovic K, Roganovic J, Brkovic B, Stojic D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *J Endod.* 2012;38(6):764-8.
160. Nayak M, Kumar J, Prasad LK. A radiographic correlation between systemic disorders and pulp stones. *Indian J Dent Res.* 2010;21(3):369-73.
161. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodriguez RR. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci.* 2006;48(4):195-9.
162. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res.* 2000;258(1):33-41.
163. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000;66(2):129-38.
164. Stanislawski L, Carreau JP, Pouchelet M, Chen ZH, Goldberg M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig.* 1997;1(3):131-40.
165. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):275-9.
166. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(1):237-41.
167. Grommes C, Landreth GE, Sastre M, Beck M, Feinstein DL, Jacobs AH, et al. Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1524-33.

168. Chang TH, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60(4):1129-38.
169. Bonofiglio D, Cione E, Qi H, Pingitore A, Perri M, Catalano S, et al. Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2009;175(3):1270-80.
170. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275(29):22435-41.
171. Liao H, Pastar I, Chen W. Rosiglitazone modulates the behaviors of diabetic host-derived fibroblasts in a carboxymethyllysine-modified collagen model. *Wound Repair Regen.* 2012;20(3):435-43.
172. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ.* 2006;48(3):177-88.
173. Cao LQ, Chen XL, Wang Q, Huang XH, Zhen MC, Zhang LJ, et al. Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(6):879-87.
174. Liu JJ, Liu PQ, Lin DJ, Xiao RZ, Huang M, Li XD, et al. Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Ann Hematol.* 2007;86(3):173-83.
175. Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Wu XY, Lin Q, et al. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol.* 2005;16(3):455-9.

176. Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol.* 2001;46(3):221-8.
177. Bruedigam C, Eijken M, Koedam M, van de Peppel J, Drabek K, Chiba H, et al. A new concept underlying stem cell lineage skewing that explains the detrimental effects of thiazolidinediones on bone. *Stem Cells.* 2010;28(5):916-27.
178. Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(2):430-7.
179. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18527-33.
180. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1350-8.
181. Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int.* 2006;30(4):295-300.
182. Weigert C, Brodbeck K, Bierhaus A, Haring HU, Schleicher ED. c-Fos-driven transcriptional activation of transforming growth factor beta-1: inhibition of high glucose-induced promoter activity by thiazolidinediones. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(2):301-7.
183. Peng Y, Liu H, Liu F, Liu Y, Li J, Chen X. Troglitazone inhibits synthesis of transforming growth factor-beta1 and reduces matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Nephrology.* 2006;11(6):516-23.
184. Zafiriou S, Stanners SR, Polhill TS, Poronnik P, Pollock CA. Pioglitazone increases renal tubular cell albumin uptake but limits proinflammatory and fibrotic responses. *Kidney Int.* 2004;65(5):1647-53.

185. Ohtomo S, Izuhara Y, Takizawa S, Yamada N, Kakuta T, van Ypersele de Strihou C, et al. Thiazolidinediones provide better renoprotection than insulin in an obese, hypertensive type II diabetic rat model. *Kidney Int.* 2007;72(12):1512-9.
186. Samah M, El-Aidy Ael R, Tawfik MK, Ewais MM. Evaluation of the antifibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2012;689(1-3):186-93.
187. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, et al. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest.* 2009;89(1):47-58.
188. Zafiriou S, Stanners SR, Saad S, Polhill TS, Poronnik P, Pollock CA. Pioglitazone inhibits cell growth and reduces matrix production in human kidney fibroblasts. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(3):638-45.
189. Durand SH, Romeas A, Couble ML, Langlois D, Li JY, Magloire H, et al. Expression of the TGF-beta/BMP inhibitor EVI1 in human dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):712-9.
190. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2011;45(5):439-48.
191. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Smith AJ. Smad protein mediated transforming growth factor beta1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line. *Arch Oral Biol.* 2005;50(11):929-36.
192. Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. *Diabetes.* 2005;54(3):811-7.
193. Shockley KR, Lazarenko OP, Czernik PJ, Rosen CJ, Churchill GA, Lecka-Czernik B. PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of

osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(2):232-46.

194. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell.* 2004;3(6):379-89.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA, PROCESSO N° 044/2010



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **0 44/10**

Título do Projeto: “Avaliação in vitro de rosiglitazona, agonista do PPARgamma, sobre células pulpares humanas”.


Pesquisadora Responsável: Caroline Loureço de Lima

Data de Entrada: 20/04/10

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **044/10** com o título: “Avaliação in vitro de rosiglitazona, agonista do PPARgamma, sobre células pulpares humanas”, analisado na 4ª Reunião Ordinária, realizada no dia 04 de maio de 2010.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 04 de maio de 2010.


Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “**Avaliação *in vitro* do efeito da rosiglitazona, agonista do PPARgama, sobre células pulpares humanas**”. O objetivo é avaliar os efeitos do medicamento rosiglitazona, com possível ação anti-inflamatória, sobre células da polpa dentária, obtidas a partir de dentes extraídos por razões clínicas. Estas células serão cultivadas e, posteriormente, submetidas a testes com este medicamento. Com esta pesquisa, espera-se verificar a possibilidade ou não de se utilizar esse medicamento no controle da inflamação da polpa (pulpite).

Ao assinar este termo, o senhor (a) estará autorizando doar o(s) dente(s) com indicação de extração para contribuir com esta pesquisa, consciente de que este(s) dente(s) foi/foram extraídos por indicação terapêutica, para melhoria da sua saúde, como documentado em seu prontuário.

Somente as células do(s) dente(s) serão utilizadas na presente pesquisa. Os Fragmentos remanescentes serão descartados. Após conclusão dos experimentos, as células serão armazenadas e, caso sejam utilizadas em uma pesquisa futura, o senhor(a) será contatado para nova autorização.

O senhor (a) não terá nenhum custo e não receberá nenhuma remuneração ao participar desta pesquisa. O (A) senhor (a) pode se recusar ou desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem qualquer forma de prejuízo. A sua identidade será preservada (seu nome não será revelado). Em qualquer momento, o senhor (a) poderá ter acesso aos resultados e eles poderão ser publicados em eventos e revistas científicas, sempre mantendo o sigilo da sua participação.

Esta pesquisa não oferece nenhum risco a(o) senhor(a). Espera-se, com esse estudo, obter uma melhor compreensão dos eventos que regulam a inflamação da polpa dos dentes.

O (A) senhor (a) tem total liberdade de pedir esclarecimentos em relação a qualquer dúvida que surja. Qualquer dúvida, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Caroline Lourenço de Lima no telefone (61) 8132-5450.

Eu,.....

autorizo doar meu(s) dente(s) para pesquisa “**Avaliação *in vitro* do efeito da rosiglitazona, agonista do PPARgama, sobre células pulpares humanas**”, ciente de que este(s) foi/foram extraídos por indicação terapêutica, como documentado em meu prontuário. Concordo com todos os itens abordados no termo de consentimento livre e esclarecido.

Assinatura do doador ou responsável

RG n: _____

Pesquisador responsável

RG n: _____

Assinatura

Brasília, ____ de _____ de

Observação: Este termo de consentimento Livre e Esclarecido está apresentado em duas cópias, das quais uma ficará com o voluntário da pesquisa.

Informações sobre a aprovação dessa pesquisa podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP-FS/UnB) pelo telefone 3307-3799.

