Augusto Pereira Resende

Efeito de agonistas dos receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais sobre a migração de células da polpa dentária humana

Brasília
2016

Augusto Pereira Resende

Efeito de agonistas dos receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais sobre a migração de células da polpa dentária humana

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe

Coorientadora: Me. Caroline Lourenço de Lima

Brasília
2016

Dedico este trabalho à minha mãe, Jussara Pereira Resende, e ao meu pai, Edmilson Resende. À minha irmã Clarice e aos meus amigos Beatriz, Leonardo, Lilian, Mateus, Paulo, Pedro Henrique e Taiana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me guiar e dar forças.

Ao meu pai, Edmilson Resende, e a minha mãe, Jussara Pereira Resende, que sempre me apoiaram e me ajudaram seja qual tenha sido a situação ou dificuldade. Agradeço pela educação que me proporcionaram e, principalmente, pelo exemplo de pessoas que são. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim, espero que consiga retribuí-los da melhor forma possível.

À minha irmã, Clarice Pereira Resende, pelo exemplo de superação e perseverança.

Aos meus amigos: Beatriz, Leonardo, Mateus, Paulo, Pedro Henrique e Taiana, pela amizade que prezo tanto e por todo apoio proporcionado.

À Lilian Affonso, pela amizade, empenho e dedicação acadêmica, que me serviram de inspiração.

À Professora Doutora Ana Carolina Acevedo Poppe, por todo apoio e confiança em relação ao Trabalho de Conclusão de Curso, Programa de Extensão e Programa de Iniciação Científica. Agradeço por todas as oportunidades proporcionadas e pela possibilidade de crescimento, tanto na parte acadêmica quanto profissional. Saiba que a considero muito!

À Mestra Caroline Lourenço de Lima, pelo exemplo de grande profissional e pesquisadora. Agradeço por todo o conhecimento transmitido, sendo que sem a sua ajuda e ensinamentos, esse trabalho seria impossível de ser realizado. Obrigado por toda a dedicação e paciência. Saiba que você é um dos maiores exemplos para mim, espero algum dia poder ser pelo menos um pouco do profissional/pesquisador que você é hoje. Muito obrigado!

Ao Doutor Paulo Yamaguti, pelo conhecimento

transmitido e por despertar em mim o interesse pela área científica.

À Doutora Bruna Amorim, por toda a ajuda e ensinamentos.

Ao Gabriel Alvares Borges pelos ensinamentos e ajuda no estabelecimento do protocolo do ensaio de cicatrização de ferida – *Scratch.*

A todas as outras pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigado por toda a ajuda.

EPÍGRAFE

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

John F. Kennedy

RESUMO

RESENDE, Augusto Pereira. Efeito de agonistas dos receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais sobre a migração de células da polpa dentária humana. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A migração celular representa um dos eventos essenciais para o processo de reparo do complexo dentina-polpa e, portanto, deve ser finamente modulada para que seja bem-sucedido. Os receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais (PPARγ e PPARβ/δ) atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes e, entre as variadas funções, parecem participar da modulação da migração de diversas células. Porém, seu papel na migração de células da polpa dentária ainda não foi demonstrado. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da rosiglitazona (agonista do PPARγ) e do GW0742 (agonista do PPARβ/δ) sobre a migração de células pulpares humanas. Para isso, foram utilizadas culturas primárias de células de polpas dentárias humanas estabelecidas por meio da técnica de *explant*. Os efeitos dos agonistas sobre a migração celular foram avaliados por meio do ensaio de cicatrização de ferida ou *scratch*, que se baseia na criação de uma solução de continuidade em uma monocamada celular. As concentrações testadas foram 10μM para rosiglitazona e 0,1μM e 1μM para GW0742. Células cultivadas na presença de dimetilsulfóxido (veículo) serviram como grupo controle. O fechamento das feridas foi registrado por meio de imagens fotográficas nos tempos de 0, 12, 18, 24 e 36 horas após o tratamento e os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Os resultados sugeriram que o tratamento com rosiglitazona ou GW0742 não interferiu na migração celular quando comparado

com o grupo controle. Investigações adicionais são necessárias para melhor compreender o papel do PPARγ e do PPARβ/δ no processo de reparo do complexo dentina-polpa.

ABSTRACT

RESENDE, Augusto Pereira. Effect of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and beta/delta on dental pulp cells migration process. 2016. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Cell migration represents one of the essential events related to dental pulp repair; therefore, it must be precisely modulated to be well-succeeded. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARγ and PPARβ/δ) are ligand-activated transcription factors that regulate the transcription of a large variety of genes implicated in several process, including cell migration of different cell types. However, their role in dental pulp cell migration is not known. Thus, the purpose of the present study was to evaluate the effect of rosiglitazone (PPARγ agonist) and GW0742 (PPARYβ/δ agonist) on human dental pulp cell migration. For that, human dental pulp primary cell cultures were established by using the explant technique. Cell migration was evaluated by scratch assay, that consists on creating a gap on a confluent cell monolayer. The concentrations tested were 10μM of rosiglitazone and 0.1μM and 1μM of GW0742. Cells cultivated with dimetilsufoxide (vehicle) were used as control group. The closure of the gap was captured by photographic images at 0, 12, 18, 24 and 36 hours after the treatment. The measurements obtained were statistically analyzed. The results suggested that the treatment with rosiglitazone or GW0742 did not interfere on cell migration in comparison with the control group. Further investigations are required to better understand the role of PPARγ and PPARβ/δ on dental pulp repair.

SUMÁRIO

Artigo Científico 17

Folha de Título 19

Resumo 20

Abstract.....22

Introdução 24

Materiais e Métodos.....27

Resultados.....32

Discussão 36

Referências 41

Anexos 45

Anexo I 45

Anexo II 57

Anexo III 58

Anexo IV.....59

Anexo V.....60

ARTIGO CIENTÍFICO

Parte dos resultados apresentados no presente trabalho de conclusão de curso foram publicados no artigo:
De Lima, CL; Coelho, MS; Royer, C; Resende, AP; Borges, GA; Da Silva, JR; Amato, AA; Guerra, E; Neves, FAR; Acevedo, AC. *Rosiglitazone Inhibits Proliferation and Induces Osteopontin Gene Expression in Human Dental Pulp Cells*. J Endod, v. 41, n. 9, p. 1486-91, Sep 2015. (Revista internacional Qualis A1 Odontologia)
A apresentação do presente trabalho se baseou nas normas de publicação da revista *Journal of Endodontics*.

FOLHA DE TÍTULO

Efeito de agonistas dos receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais sobre a migração de células da polpa dentária humana

Effect of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and beta/delta on dental pulp cells migration

Augusto Pereira Resende[1]
Caroline Lourenço de Lima[2]
Ana Carolina Acevedo Poppe[3]

[1] Aluno de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.
[2] Cirurgiã dentista, mestre em Ciências da Saúde, Laboratório de Histopatologia Bucal e Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.
[3] Professora Associada, Laboratório de Histopatologia Bucal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Correspondência: Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: acevpoppel@gmail.com / Telefone: (61) 3107-1977

RESUMO

Efeito de Agonistas dos Receptores Gama e Beta/Delta Ativados por Proliferadores Peroxissomais Sobre a Migração de Células da Polpa Dentária Humana

A migração celular representa um dos eventos essenciais para o processo de reparo do complexo dentina-polpa e, portanto, deve ser finamente modulada para que seja bem-sucedido. Os receptores gama e beta/delta ativados por proliferadores peroxissomais (PPARγ e PPARβ/δ) atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes e, entre as variadas funções, parecem participar da modulação da migração de diversas células. Porém, seu papel na migração de células da polpa dentária ainda não foi demonstrado. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da rosiglitazona (agonista do PPARγ) e do GW0742 (agonista do PPARβ/δ) sobre a migração de células pulpares humanas. Para isso, foram utilizadas culturas primárias de células de polpas dentárias humanas estabelecidas por meio da técnica de *explant*. Os efeitos dos agonistas sobre a migração celular foram avaliados por meio do ensaio de cicatrização de ferida ou *scratch*, que se baseia na criação de uma solução de continuidade em uma monocamada celular. As concentrações testadas foram 10μM para rosiglitazona e 0,1μM e 1μM para GW0742. Células cultivadas na presença de dimetilsulfóxido (veículo) serviram como grupo controle. O fechamento das feridas foi registrado por meio de imagens fotográficas nos tempos de 0, 12, 18, 24 e 36 horas após o tratamento e os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Os resultados sugeriram que o tratamento com rosiglitazona ou GW0742 não interferiu na migração celular quando comparado com o grupo controle. Investigações adicionais são necessárias para melhor compreender o papel do PPARγ e do PPARβ/δ no processo de reparo do complexo dentina-polpa.

Palavras-chave:

Dentina; polpa dentária; cultura primária de células; PPAR gama; PPAR beta; migração celular.

ABSTRACT

Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma and Beta/Delta on Dental Pulp Cells Migration.

Cell migration represents one of the essential events related to dental pulp repair; therefore, it must be precisely modulated to be well-succeeded. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARγ and PPARβ/δ) are ligand-activated transcription factors that regulate the transcription of a large variety of genes implicated in several process, including cell migration of different cell types. However, their role in dental pulp cell migration is not known. Thus, the purpose of the present study was to evaluate the effect of rosiglitazone (PPARγ agonist) and GW0742 (PPARYβ/δ agonist) on human dental pulp cell migration. For that, human dental pulp primary cell cultures were established by using the explant technique. Cell migration was evaluated by scratch assay, that consists on creating a gap on a confluent cell monolayer. The concentrations tested were 10μM of rosiglitazone and 0.1μM and 1μM of GW0742. Cells cultivated with dimetilsufoxide (vehicle) were used as control group. The closure of the gap was captured by photographic images at 0, 12, 18, 24 and 36 hours after the treatment. The measurements obtained were statistically analyzed. The results suggested that the treatment with rosiglitazone or GW0742 did not interfere on cell migration in comparison with the control group. Further investigations are required to better understand the role of PPARγ and PPARβ/δ on dental pulp repair.

***Keywords*:**

Dentin; dental pulp; primary cell culture; PPAR gamma; PPAR-beta; cell migration.

INTRODUÇÃO

O complexo dentina-polpa é um tecido conjuntivo especializado, composto pela dentina e pela polpa dentária, ambas apresentando uma relação embriológica, histológica e funcional (1). Elas são originadas de uma única estrutura embriológica, denominada papila dentária. Esta é composta por células ectomesenquimais derivadas das cristas neurais cranianas (2). A dentina é formada por células especializadas da polpa dentária, os odontoblastos, responsáveis pela secreção do conteúdo orgânico e mineral. Essas células localizam-se na periferia do tecido pulpar, que também é composto por células características de tecido conjuntivo frouxo (1).

Como todo tecido conjuntivo, em resposta a estímulos nocivos de natureza biológica, física, química ou mecânica, o complexo dentina-polpa tem capacidade de reparo que pode ser observada por meio da deposição de dentina terciária. Essa é depositada somente nas regiões que sofreram agressão e tem a finalidade de diminuir a permeabilidade dentinária ou aumentar a distância da polpa em relação ao agente agressor, protegendo, assim, a vitalidade pulpar. A formação de dentina terciária pode ser estimulada por vários fatores, como a doença cárie, a atrição, a abrasão, a erosão, as restaurações e os materiais restauradores (3).

Dependendo da intensidade e duração do estímulo, a dentina terciária poderá ser do tipo reacional ou reparador, assim subdividida por apresentar origens celulares distintas. Além disso, os dois tipos de dentina terciária se diferem quanto à qualidade do tecido mineralizado e quanto à formação e disposição dos túbulos dentinários (4).

A dentina reacional é secretada pelos odontoblastos primários frente a uma irritação pulpar de baixa intensidade, sendo resultante do aumento da atividade metabólica destas células. Estruturalmente, ela é bastante semelhante às dentinas

primária e secundária (4). Já a dentina reparadora é secretada por células com fenótipo semelhante a odontoblastos. Esse tipo de dentina terciária é produzido em casos de agressões pulpares mais intensas que levam à morte de odontoblastos primários. Nessa situação, células-tronco/progenitoras presentes no tecido pulpar são recrutadas para a região agredida, diferenciando-se em células semelhantes a odontoblastos. Essas células são capazes de secretar uma matriz análoga à dentina, porém, com estrutura e composição diversas, podendo tanto ter características tubulares semelhantes às dentinas primária e secundária, quanto uma aparência mais desorganizada e atubular, lembrando matriz óssea (osteodentina) (4).

A origem exata das células-tronco/progenitoras que participam do processo de reparo dentinário permanece indefinida, mas os potenciais nichos sugeridos incluem, além da camada rica em células (zona de Höhl), as regiões perivasculares e a zona central da polpa dentária. A possibilidade da participação de células indiferenciadas provenientes de outros locais, fora do tecido pulpar, também não pode ser descartada (5).

Agressões pulpares mais intensas que levam à morte de odontoblastos primários, invariavelmente, resultam na destruição de células-tronco/progenitoras próximas ao local agredido. Assim, para adequada formação de dentina terciária reparadora, células progenitoras localizadas em outros nichos, distantes da área agredida, devem ter habilidade de migrar para o sítio afetado a fim de substituir as células perdidas (6). Além disso, a reorganização do tecido pulpar subjacente à lesão inclui a proliferação e migração de fibroblastos e subsequente secreção de colágeno e outros componentes da matriz extracelular da polpa (7).

Portanto, a migração celular representa um dos eventos essenciais para o processo de reparo do complexo dentina-polpa, sendo imprescindível para que este seja bem-sucedido.

Falhas na regulação da migração celular podem resultar em diferentes processos, incluindo cronificação da inflamação, além de disfunções da resposta imune (8).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a regulação da migração celular são complexos e ainda não foram totalmente esclarecidos. Mas o que se sabe é que diversas vias de sinalização e moléculas envolvidas com a resposta imune/inflamatória participam também da regulação da migração celular e que, dependendo de sua intensidade, a resposta inflamatória pode ser benéfica ou maléfica para a migração (9). Em geral, pequenas concentrações de mediadores pró-inflamatórios podem estimular o recrutamento de células-tronco/progenitoras pulpares. Em contrapartida, uma inflamação de maior intensidade e/ou persistente pode prejudicar ou mesmo inibir esse evento celular e, consequentemente, o processo de reparo tecidual (4).

Assim, o que se propõe atualmente são alternativas terapêuticas, capazes de modular os eventos celulares envolvidos com o processo de reparo. Nesse sentido, mediadores quimiotáticos específicos, e proteínas da matriz poderiam ser utilizadas para mediar o processo de regeneração do dente após uma agressão, podendo fazer parte de uma possível terapia regenerativa pulpar (8). Outras alternativas são medicamentos e moléculas com atividade anti-inflamatória, que poderiam ter um papel importante na modulação da resposta celular, protegendo as células pulpares, reduzindo a resposta inflamatória e criando condições para o reparo tecidual (6).

Nesse contexto, foi recentemente sugerida a utilização de um agonista do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPARγ), a rosiglitazona, para o controle da inflamação pulpar (10-12). O PPARγ assim como a isoforma PPARβ/δ são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes, sendo, nos últimos anos, considerados alvos terapêuticos promissores para o controle da

resposta imune inflamatória e para a modulação de eventos celulares diversos, como proliferação, migração, diferenciação e apoptose em diversas células e tecidos (13-15). Porém, em relação a ambos isotipos, não existe uma investigação detalhada acerca do impacto dos mesmos nos eventos celulares relacionados com o reparo dentinário. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da rosiglitazona (agonista do PPARγ) e do GW0742 (agonista do PPARβ/δ) sobre a migração de células da polpa dentária humana.

Deve-se ressaltar que esse trabalho faz parte de um projeto maior que visa estudar o papel das isoformas PPARγ e β/δ sobre eventos relacionados com a resposta inflamatória e de reparo, tanto no tecido pulpar quanto do ligamento periodontal. A pesquisa teve início durante o mestrado da pós-graduanda Caroline Lourenço de Lima e, atualmente, encontra-se em execução como projeto de doutorado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, parecer número 044/10, de 04 de maio de 2010 (ANEXO II), e parecer número 1400631, de 02 de fevereiro de 2016 (ANEXO III).

Obtenção da cultura primária

As culturas primárias utilizadas no presente estudo foram estabelecidas pela doutoranda Caroline Lourenço de Lima durante a execução do seu projeto de mestrado e de doutorado. As polpas dentárias foram obtidas a partir de terceiros molares inclusos de pacientes com idade entre 15 e 23 anos, extraídos por razões clínicas. A doação dos dentes foi autorizada pelos pacientes ou responsáveis por meio de assinatura do Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO IV e V). Apenas dentes hígidos e saudáveis que pertenciam a pacientes que não faziam uso de medicação sistêmica foram utilizados. As linhagens primárias foram obtidas pela cultura de pequenos fragmentos da polpa, técnica denominada *explant* (16). As linhagens foram congeladas na segunda passagem em solução de congelamento constituída por soro fetal bovino (SFB) (*Invitrogen*) e dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma Aldrich*) a 10%. Os criotubos (*Corning*) foram mantidos em freezer a 80°C negativos até que a utilização das células fosse necessária. Para esta pesquisa, apenas células entre a terceira e quinta passagens foram utilizadas, sendo cada ciclo de tripsinização e subcultura considerado como uma passagem celular.

Descongelamento e plaqueamento

Para realização dos experimentos, os criotubos contendo células pulpares foram descongelados em banho-maria a 37°C e, após isso, o conteúdo foi transferido para um tubo de polietileno de 50 mL e ressupendido em 10 mL de meio de cultura composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (*Gibco®, Invitrogen*), SFB 10% e antibióticos. A suspensão de células foi homogeneizada e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm), por 5 minutos para remoção do DMSO. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 5mL de meio de cultura. As células foram transferidas para placas de cultura de 100 mm (KASVI, Curitiba, PR, Brasil) e o volume foi completado com mais 5mL de meio de cultura. As culturas foram mantidas em uma incubadora a 37ºC e com 5% de CO2 e atmosfera umidificada, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias. As células foram utilizadas para os experimentos quando atingiram cerca de 90% de confluência.

Tratamentos

A rosiglitazona e o GW0742, apresentados na forma de pó cristalizado, foram obtidos a partir da *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, MI, EUA) e dissolvidos em DMSO para realização dos ensaios de migração celular.

Para os experimentos relacionados ao PPARγ, foi utilizada a concentração de 10μM de rosiglitazona. Para os experimentos relacionados ao PPARβ/δ foram utilizadas duas concentrações diferentes de GW0742, 0,1μM e 1μM. Um grupo experimental foi tratado apenas com DMSO a 0,1%, sendo utilizado como controle.

Ensaio de cicatrização de ferida – *Scratch*

O efeito dos agonistas dos PPARγ e PPARβ/δ sobre a migração celular foi avaliado por meio de ensaio de cicatrização ou fechamento de ferida, que se baseia na criação de uma interrupção de continuidade em uma monocamada celular (17). Para realização dos ensaios experimentais, foram utilizadas placas de 6 poços (KASVI, Curitiba, PR, Brasil), previamente tratadas *overnight* com solução de fibronectina diluída em PBS na concentração final de 10μg/ml.

Para verificar o efeito da rosiglitazona sobre a migração celular, aproximadamente $7x10^5$ células/poço foram distribuídas nas placas de 6 poços e mantidas em meio DMEM contendo 10% de SFB, por um período de 24 horas. Para verificar o efeito do GW0742, aproximadamente $5x10^5$ células/poço foram distribuídas nas placas de 6 poços e mantidas em meio DMEM contendo 10% de SFB, por um período de 24 horas. Após esse período e com 100% de confluência, as células do ensaio com GW0742 foram privadas de soro por um período de 24 horas. Assim, para ambos os tratamentos e grupo controle (veículo), realizou-se manualmente um risco (ferida) com uma ponteira plástica de 200μl, em linha reta, utilizando-se de uma régua como apoio (Figura 1). Os poços foram então lavados com PBS

e preenchidos com meio DMEM acrescido de SFB (10% para os ensaios da rosiglitazona e 2% para os ensaios do GW0742). O fechamento da ferida (e, consequentemente, a migração celular) foi igualmente registrado por meio de fotos realizadas com câmera digital acoplada a microscópio de luz invertida em objetiva de 10x, nos seguintes tempos: 0, 12, 18, 24 e 36 horas após o tratamento. Durante o intervalo entre as fotos, as placas foram mantidas em incubadora a 37ºC, 5% de CO2 e atmosfera umidificada.

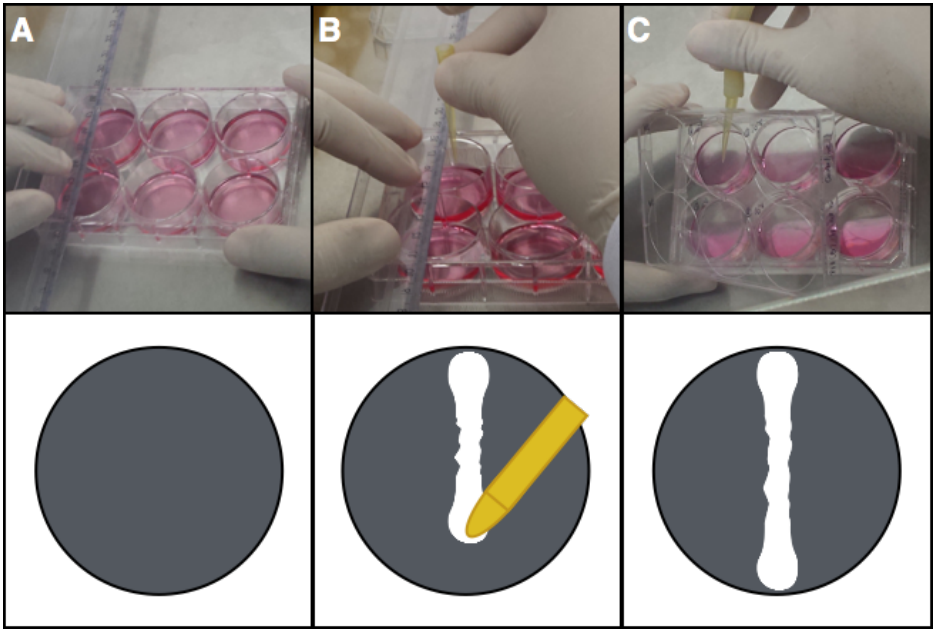

Figura 1. Passos referentes ao ensaio de cicatrização da ferida – *Scratch.* A. Posicionamento da régua. B. Utilização de uma ponteira plástica de 200µl apoiada sobre a régua para realização da ferida. C. Ferida realizada, lavagem com PBS e substituição do meio de cultura por meio contendo tratamento ou veículo (DMSO).

Análise estatística

A análise estatística levou em consideração a taxa de migração das células em porcentagem, calculada a partir da média da distância entre as bordas da ferida em traçados realizados na região superior, média e inferior de cada fotografia. Considerou-se a hora zero (valor de A da fórmula) como o marco para comparação da taxa de fechamento em porcentagem, sendo utilizado para relativizar o valor de todos os outros tempos (valor B da fórmula).

$$\text{Taxa de migração das células (\%)} = \frac{(A - B) * 100\%}{A}$$

O ensaio de cicatrização de ferida foi realizado três vezes de forma independente (n=3) para os ensaios com rosiglitazona e cinco vezes de forma independente (n=5) para os ensaios com GW0742, sendo cada repetição realizada com células de pacientes diferentes. Cada experimento (cada “n”) relacionado à rosiglitazona foi realizado em triplicata, enquanto os relacionados ao GW0742 foram realizados em duplicata, tanto em relação ao controle quanto ao tratamento.

Os resultados obtidos, tanto da rosiglitazona quanto do GW0742, foram apresentados como média ± erro padrão da média das replicatas da taxa de migração dos grupos tratados com os ligantes, comparados com o grupo controle (veículo).

Para a realização da análise estatística, foi utilizada análise de variância simples (teste t de *Student)* para a rosiglitazona e *one way ANOVA* seguida da comparação múltipla de *Newman-Keuls para o GW0742*, ambos através do programa *GraphPad* 5.0 para o sistema operacional *Windows*. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a migração de células pulpares

O tratamento com rosiglitazona na concentração de 10μM não apresentou alteração estatisticamente significativa em relação ao processo de migração celular quando comparado com o grupo controle (Figura 2).

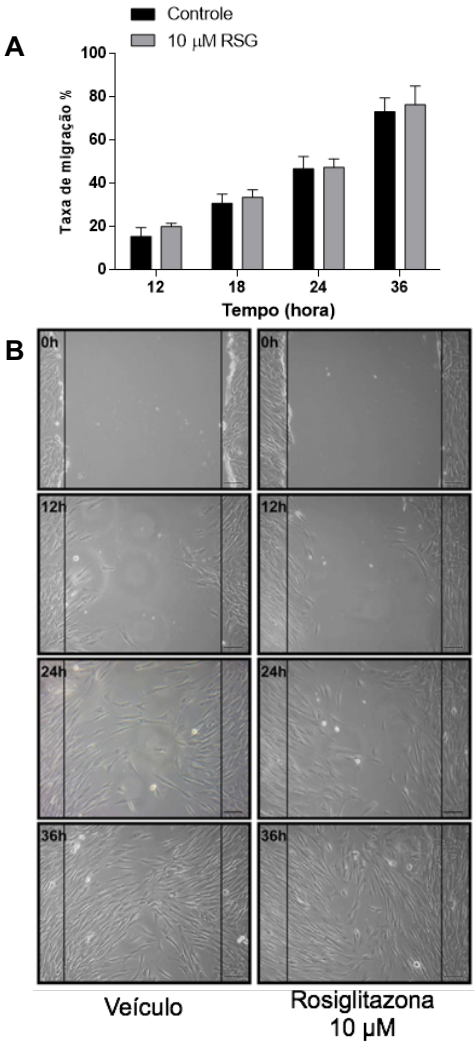

Figura 2. A. Representação gráfica do ensaio de cicatrização de ferida referente ao tratamento das células pulpares com rosiglitazona (RSG) a 10µM e veículo (DMSO). Não houve alteração significativa no processo de migração celular ($p > 0,05$). Dados de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, representados como a média ± erro padrão da média e analisados por teste t de *Student*. B. Representação fotográfica do mesmo ensaio, imediatamente após a realização da ferida e 12, 24 e 36 horas após tratamentos. Microscopia invertida com contraste de fase. Barra de escala = 50µm.

Efeito do tratamento com GW0742 sobre a migração de células pulpares

O tratamento com GW0742 na concentração de 1μM ou 0,1μM não apresentou alteração estatisticamente significativa sobre a migração celular quando comparado com o grupo controle (Figura 3).

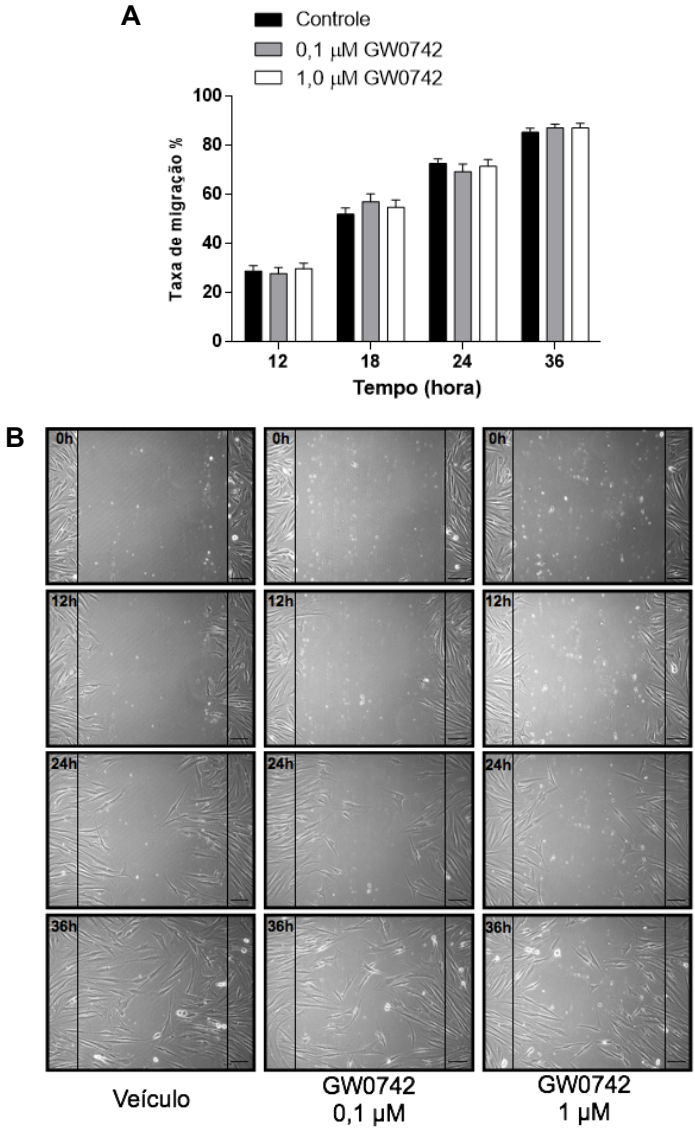

Figura 3. A. Representação gráfica do ensaio de cicatrização de ferida referente ao tratamento das células pulpares com GW0742 a 0,1μM e 1μM e veículo (DMSO). Não houve alteração significativa no processo de migração celular ($p>0,05$). Dados de 5 experimentos independentes realizados em duplicata, representados como a média ± erro padrão da média e analisados por *one way ANOVA* e pós teste de *Newman-Keuls*. B. Representação fotográfica do mesmo ensaio, imediatamente após a realização da ferida e 12, 24 e 36 horas após tratamentos. Microscopia invertida com contraste de fase. Barra de escala = 50μm.

DISCUSSÃO

A formação de dentina terciária, observada muitas vezes na forma de ponte de dentina, faz parte do processo de reparo do complexo dentina-polpa e envolve a participação de células-tronco/progenitoras presentes no tecido pulpar. Quando devidamente induzidas, essas células são recrutadas de seus nichos para os sítios lesados e, em seguida, são estimuladas a se diferenciar. Por fim, adquirem competência para produzir e secretar matriz mineralizada (18). Portanto, nesse processo, a migração celular apresenta-se essencial para reestabelecer a camada odontoblástica lesionada, permitindo a produção de dentina terciária reparadora e consequente reparo da estrutura dentinária (6). Diante disso, buscando melhor elucidar os mecanismos de sinalização que regulam o potencial de migração dessas células para os sítios de lesão tecidual, o presente trabalho buscou investigar o papel de dois potenciais alvos terapêuticos para o controle da inflamação pulpar, o PPARγ e o PPARβ/δ, na migração de células da polpa dentária.

Para responder os objetivos propostos, foi utilizado como modelo de estudo cultura primária de células da polpa dentária humana. A escolha de um modelo celular in vitro deveu-se à facilidade em relação a observação e análise dos experimentos, além do fato de ele permitir investigar os efeitos de um tratamento (no caso, utilizando os agonistas do PPAR) em células alvo específicas (células pulpares), sem a interferência de outras células ou tecidos, fato inviável de ser realizado em modelos in vivo (animal ou humano), devido a sua grande complexidade (19). Além dos motivos acima, a opção pela utilização de células humanas torna a realização dos ensaios em modelos in vivo dificultada por questões éticas e legais.

Em relação ao tipo de cultura celular, esta pode ser primária ou baseada em uma linhagem imortalizada de células pré-estabelecidas. Diferentemente da cultura de células

primárias, as linhagens de células imortalizadas escapam do controle normal do ciclo celular, dividindo e crescendo continuamente. Elas podem ter origem tumoral, ou resultar de incorporação de sequências gênicas virais (20). Como vantagens, linhagens imortalizadas apresentam 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. Entretanto, estas células perdem algumas de suas características fenotípicas durante o processo de imortalização (19). Mudanças fenotípicas somadas à divisão celular descontrolada podem, em tese, interferir na migração celular. Assim, a decisão de se utilizar culturas primárias da polpa dentária foi fundamentada no fato de que esse modelo permite a manutenção de muitas das propriedades biológicas existentes *in vivo*, conservando características muito similares ao tecido original (20), incluindo a presença de células-tronco/progenitoras mesenquimais (21). Tais propriedades são importantes para a real caracterização do perfil dos ligantes testados, mesmo que este modelo 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 (19, 20).

Para avaliar o efeito da ativação do PPARγ e PPARβ/δ sobre a migração celular, foi utilizado o ensaio de cicatrização da ferida (*Scratch*). O método se baseia na criação de uma ferida em uma camada confluente de células, e posterior acompanhamento da migração das células das bordas da ferida recém-criada em direção ao espaço vazio, até que haja o reestabelecimento do contato célula-célula (17). Esta metodologia foi escolhida por ser uma técnica bem estabelecida na literatura, versátil e de fácil execução, além de ser um dos métodos mais utilizados em publicações a respeito da migração celular (22). Além disso, ela permite que a migração seja

regulada tanto pela interação entre as células, quanto pela interação com a matriz extracelular (17). Como desvantagens, destacam-se o monitoramento do ensaio por um período relativamente longo, de 24 a 48 horas, e a impossibilidade de se criar um gradiente quimiotático para a área da ferida (17).

A participação dos receptores PPARγ e PPARβ/δ no processo de migração de células da polpa dentária foi investigada por meio da utilização dos respectivos agonistas, rosiglitazona e GW0742. Tais ligantes foram escolhidos por serem descritos como agonistas de alta afinidade dos receptores PPARγ e PPARβ/δ, respectivamente, capazes de ativá-los de forma potente e eficaz (23, 24). As concentrações utilizadas foram baseadas em ensaios de transativação realizados por nosso grupo de pesquisa ou previamente descritos na literatura (23-25) e são concentrações saturantes que ativam de forma significativa o receptor, sendo consideradas adequadas para se investigar inicialmente o efeito da ativação desses receptores sobre a migração de células pulpares.

Em relação à rosiglitazona, agonista total do PPARγ, foi demonstrado em cultura primária de células pulpares humanas efeitos anti-inflamatórios pela ativação do PPARγ após inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (10). Além disso, foi demonstrado que a ativação do PPARγ, também por rosiglizatona, foi capaz de reduzir a expressão de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico sintetase induzível (INOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo a utilização desse receptor como alvo farmacológico para o controle da inflamação pulpar (26). No entanto, nenhum desses estudos investigou os efeitos de agonistas do PPARγ nos eventos celulares relacionados com o reparo dentinário e, mais especificamente, a migração celular.

Quanto ao GW0742, agonista total do PPARβ/δ, ainda não existem estudos demonstrando o seu papel no controle da

resposta inflamatória do tecido pulpar e em relação ao processo de recrutamento e diferenciação de células-tronco/progenitoras capazes de mediar o reparo dentinário. Entretanto, o PPARβ/δ parece atuar nos processos de osteogênese, estimulando a diferenciação osteoblástica e a produção e secreção de matriz osteogênica (27, 28). Além disso, sugere-se participação do PPAR β/δ no processo de cicatrização de feridas (29). Dessa forma, a falta de evidências identificada na literatura embasou a escolha e execução do tema de pesquisa do presente trabalho.

Os resultados obtidos sugeriram que, tanto a rosiglitazona (agonista total do PPARγ) quanto o GW0742 (agonista total do PPARβ/δ) não apresentaram efeito significativo na migração de células da polpa dentária, contrastando com os resultados encontrados na literatura referentes a outros tipos celulares. Em cultura de células de fibroblastos pulmonares humanos, estudo sugeriu, por meio de ensaio de cicatrização de ferida, que o tratamento com rosiglitazona foi capaz de inibir a migração celular estimulada por SFB a 10% (30). Outro estudo, utilizando modelos experimentais de camundongos, também demonstrou que a ativação do PPARγ pela rosiglitazona inibiu a migração de células de Langerhans (células dendríticas), previamente estimuladas por TNF-α (31). Além disso, evidências obtidas também a partir de modelos animais indicam que o PPARγ pode inibir a migração e proliferação de tumores gástricos malignos (32). Em relação ao PPARβ/δ, existem estudos em modelos animais que demonstraram efeito pró-migratório em células epiteliais (29). Assim, devido a ausência de efeitos observado nas condições testadas, pressupõe-se que a ativação do PPARγ e PPARβ/δ não interfere no processo de migração de células da polpa dentária humana. Deve, contudo, ser ressaltado que o ensaio de cicatrização de ferida foi realizado com células em condições basais. Sendo assim, não se sabe se a ativação do PPARγ e PPARβ/δ concomitantemente à indução de resposta

inflamatória poderia resultar em uma resposta diferente.

Em relação às dificuldades percebidas durante a execução e análise dos ensaios, pode-se destacar o padrão de fechamento da ferida, observado para as células pulpares. Tais células não apresentam uma movimentação linear em direção ao centro da ferida, mas um padrão migratório irregular e com o surgimento de várias projeções celulares. Esse padrão de crescimento e migração dificultou a mensuração e obtenção dos resultados. Outra dificuldade foi a relacionada com o posicionamento da área de interesse a ser fotografada. O método utilizado, que consistiu na marcação em caneta da posição da placa de cultura sobre a platina do microscópio, embora relativamente confiável, é um método subjetivo e, consequentemente, com precisão limitada.

Em relação às diferenças metodológicas entre os dois tratamentos quanto à utilização ou não de SFB, optou-se por seguir os ensaios do GW0742 com privação de soro por 24 horas anteriores ao tratamento, a fim de sincronizar o ciclo celular, permitindo, dessa forma, uma resposta mais linear referente ao tratamento. A concentração do SFB durante o tratamento também foi reduzida para 2% no mesmo ensaio, devido evidências que comprovam que o SFB interfere no processo de migração celular (8). Além disso, por estimular a proliferação celular, a presença de a SFB a 10% poderia ser uma fonte de viés para os resultados (17).

Em conclusão, os resultados obtidos a partir do presente trabalho sugerem que, nas condições testadas, tanto o PPARγ como o PPARβ/δ não participam da regulação da migração de células da polpa dentária humana. Porém, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do efeito desses receptores nucleares no tecido pulpar com ou sem inflamação, como, por exemplo, o ensaio de cicatrização de ferida em células com inflamação previamente induzida por LPS bacteriano.

REFERÊNCIAS

1. Cate T. Histologia Oral. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2008. 397 p.
2. Katchburian E, Arana V. Histologia e Embriologia Oral. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2004. 365 p.
3. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. Journal of dentistry. 2000;28(2):77-92.
4. 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.
5. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. Oral diseases. 2007;13(2):151-7.
6. Cooper PR, Smith AJ. Molecular mediators of pulp inflammation and regeneration. Endodontic Topics. 2013;28(1):90-105.
7. Hargreaves KM, C. S. Caminhos da Polpa. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 928 p.
8. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. Journal of endodontics. 2010;36(12):1963-6.
9. Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. Dental clinics of North America. 2012;56(3):589-601.
10. 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. Journal of endodontics. 2009;35(4):524-8.
11. 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. Archives of oral biology. 2012;57(4):392-400.

12. Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. Journal of endodontics. 2013;39(2):236-41.
13. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. Pharmacological research. 2005;51(2):85-94.
14. Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. Reproductive toxicology (Elmsford, NY). 2009;27(3-4):246-57.
15. Neels JG, Grimaldi PA. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. Physiological reviews. 2014;94(3):795-858.
16. Cortes O, Garcia C, Perez L, Boj J, Alcaina A. Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry. 2006;7(2):96-9.
17. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature protocols. 2007;2(2):329-33.
18. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. Journal of endodontics. 2014;40(4 Suppl):S46-51.
19. Vertrees RA, Goodwin T, Jordan JM, Zwischenberger JB. Tissue Culture Models. In: Zander DS, Popper HH, Jagirdar J, Haque AK, Cagle PT, Barrios R, editors. Molecular Pathology of Lung Diseases. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 150-65.

20. Stacey G. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
21. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(25):13625-30.
22. Ashby WJ, Zijlstra A. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro. 2012;4(11):1338-50.
23. 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). The Journal of biological chemistry. 1995;270(22):12953-6.
24. Sznaidman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2003;13(9):1517-21.
25. de Lima CL, Coelho MS, Royer C, Resende AP, Borges GA, Rodrigues da Silva J, et al. Rosiglitazone Inhibits Proliferation and Induces Osteopontin Gene Expression in Human Dental Pulp Cells. Journal of endodontics. 2015;41(9):1486-91.
26. Kim TG, Lee YH, Bhattari G, Lee NH, Lee KW, Yi HK, et al. PPARgamma inhibits inflammation and RANKL expression in epoxy resin-based sealer-induced osteoblast precursor cells E1 cells. Archives of oral biology. 2013;58(1):28-34.
27. Still K, Grabowski P, Mackie I, Perry M, Bishop N. The peroxisome proliferator activator receptor alpha/delta

agonists linoleic acid and bezafibrate upregulate osteoblast differentiation and induce periosteal bone formation in vivo. Calcified tissue international. 2008;83(4):285-92.

28. Scholtysek C, Katzenbeisser J, Fu H, Uderhardt S, Ipseiz N, Stoll C, et al. PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover. Nature medicine. 2013;19(5):608-13.
29. Montagner A, Wahli W, Tan NS. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) beta/delta in skin wound healing and cancer. European journal of dermatology : EJD. 2015;25 Suppl 1:4-11.
30. Lin Q, Fang LP, Zhou WW, Liu XM. Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts. Experimental lung research. 2010;36(2):120-8.
31. Angeli V, Hammad H, Staels B, Capron M, Lambrecht BN, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2003;170(10):5295-301.
32. Guo F, Ren X, Dong Y, Hu X, Xu D, Zhou H, et al. Constitutive expression of PPARgamma inhibits proliferation and migration of gastric cancer cells and down-regulates Wnt/beta-Catenin signaling pathway downstream target genes TERT and ENAH. Gene. 2016;584(1):31-7.

ANEXOS

ANEXO I

Normas da Revista JOE (Journal of Endodontics)

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

1. **General Points on Composition**
    1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (*e.g.*, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:

2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)." In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.
5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often

associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”
8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.
9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation

marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author's own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. **Organization of Original Research Manuscripts**

Please Note: *All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold),* i.e.*, Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (*e.g.*, use "sodium hypochlorite" rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at *www.icmje.org*). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.
2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (*e.g.*,

PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review or the literature, and discussing the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (*e.g.*, antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published

method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol *or* specify any changes made to the protocol. If the study used an***in vitro* model** to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).

6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, “A,” “B,” etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007 1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures).

The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100%

inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

8. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
9. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (*e.g.*, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
10. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style,

which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

3. **Manuscripts Category Classifications and Requirements**

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

1. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at *www.consort-statement.org/*. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
2. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by extensive review of the literature will should be categorized as “Case Report/Clinical Technique”. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
3. Clinical Research (*e.g.*, prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods,

results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables *.
6. Case Report/Clinical Technique (*e.g.*, report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the *JOE* Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at*jendodontics@uthscsa.edu*.

Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available Resources:

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.

Day R. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.

Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar).

Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.

Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

ANEXO II

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

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro - CEP: 70.910-900
Telefone: (61)-33073799 Email: cepfs@unb.br

164.041.099.113

Anexo III

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:

Número do Parecer: 1400631 Pesquisar

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:
Estudo dos efeitos de agonistas dos PPARa e b/d sobre eventos relacionados com os

Número do CAAE: 52139115.5.0000.0030

Número do Parecer: 1400631

Quem Assinou o Parecer: Keila Elizabeth Fontana

Pesquisador Responsável: CAROLINE LOURENÇO DE LIMA

Data Início do Cronograma: 03/03/2017

Data Fim do Cronograma: 03/03/2017

Contato Público: Ana Carolina Acevedo Poppe

Voltar

ANEXO IV

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa "**Estudo dos efeitos de agonistas dos PPAR α e β/δ sobre eventos relacionados com os processos de defesa e reparo em células da polpa dentária e do ligamento periodontal de dentes humanos**". Os PPARs são proteínas que podem controlar a produção de outras proteínas no organismo. Eles podem iniciar essa produção quando são ativados por fármacos (ligantes). Assim, o presente estudo irá avaliar alguns ligantes de PPARα e β/δ, com possível ação anti-inflamatória, sobre células da polpa dentária e do ligamento periodontal, obtidas a partir de dentes extraídos por razões clínicas. Estas células serão cultivadas e, posteriormente, submetidas a testes com esses ligantes. Com esta pesquisa, espera-se verificar a possibilidade ou não de se utilizar essas substâncias como medicamento no controle da inflamação da polpa (pulpite) e do periodonto (periodontite).

Ao assinar este termo, o senhor (a) estará cedendo seu(s) dente(s) com indicação de extração para contribuir com esta pesquisa, consciente de que este(s) dente(s) foi(ram) extraído(s) por indicação terapêutica, para melhoria da sua saúde, não estando, portanto, a extração vinculada ao projeto em questão. Cabe ressaltar que o procedimento de extração dentária será realizado independente do aceite ou não em participar da pesquisa.

O senhor (a) não terá nenhum custo e não receberá nenhuma remuneração ao participar desta pesquisa. A sua participação ao ceder o dente não implica despesas, mas caso haja, serão ressarcidas pelo pesquisador responsável. Os riscos que este estudo oferece seriam os de vincular as células do(s) dente(s) a sua identidade. Porém, as amostras serão codificadas com números, garantindo, assim, a sua confidencialidade (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.

Somente as células do(s) dente(s) serão utilizadas na presente pesquisa. Os fragmentos remanescentes serão descartados como lixo biológico. Durante a realização dos experimentos e após sua conclusão, as células serão armazenadas e dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, poderão ser utilizadas em pesquisa futura. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos. No caso de pesquisa futura, o senhor(a) será contatado para novo consentimento e

ANEXO V

Universidade de Brasília -UnB
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa "**Avaliação *in vitro* do efeito de rosiglitazona, agonista do PPARgama, sobre células pulpares humanas".** O objetivo é avaliar os efeitos do medicamento rosiglitazona , com possível ação antiinflamatória, 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(ram) 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 cientificas, 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 Drª. Caroline Lourenço de Lima no telefone (61)8132-5450.

Eu,.....

autorizo doar meu(s) dente(s) para pesquisa "**Avaliação *in vitro* do efeito de rosiglitazona, agonista do PPARgamma, sobre células pulpares humanas",** ciente de que este(s) foi(ram) 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: _____