



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CAMILA MAURA MORAIS LIMA DOS SANTOS

**ANÁLISE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NA PROLIFERAÇÃO E
VIABILIDADE DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

UBERLÂNDIA

2023

CAMILA MAURA MORAIS LIMA DOS SANTOS

**ANÁLISE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NA PROLIFERAÇÃO E
VIABILIDADE DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de Odontologia
da UFU, como requisito parcial para
obtenção do título de Graduado em
Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula
Turrioni Hidalgo

Coorientador: Washington Henrique
Themoteo da Silva.

UBERLÂNDIA

2023

ANÁLISE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE
DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS

Trabalho de conclusão de curso aprovado para
obtenção do título de Graduado em
Odontologia (Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Uberlândia) pela
banca examinadora formada por:

Uberlândia, 26 de maio de 2023.

Prof. Dr. Álex Moreira Herval

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia

Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia

Prof.^a Dr.^a. Fabiana Sodré de Oliveira

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus e toda espiritualidade amiga que me ampara e protege. Agradeço a Ele também por cada prova que me oferta como oportunidade de crescimento e evolução.

Com muita gratidão e admiração agradeço a minha mãe, Tania Morais meu exemplo de ser humano, aquela em que posso confiar e me ensina a ter força e ir atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos Julieta e Matheus, a minha família que amo tanto, não viemos juntos ao acaso, a nossa afinidade trespassa a essa existência! Sempre estão na torcida e sendo meu refúgio para compartilhar as vitórias e recarregar as energias e seguir adiante.

Aqui em Uberlândia, cidade que aprendi amar pelas amizades feitas, meu muito obrigada por tudo:

Minha amiga Camila Mariotti, parceria formada desde o primeiro dia de aula, nunca esquecerei da dupla *das Camila's*. Juntas inicialmente pelos sentimentos das incertezas que vivíamos, a mudança de cidade, longe da família e dos amigos. Mas, com decorrer dos anos, considero como uma irmã postiça, solidificada em cada dificuldade e alegria vivida.

Meus amigos Angelo, Clinton, Mariana, João Marcos, Amanda Soares que tornaram a essa jornada mais leve e alegre. Compartilhamos experiências e desabafos importantes para nosso crescimento e sempre levado com muitas risadas e rodízios de pizza. Espero que nossos destinos possam se cruzar novamente.

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me auxiliaram na conclusão deste trabalho, em especial:

À Professora Ana Paula Turrioni, que me deu a oportunidade de fazer parte do presente estudo, em meio a loucura dos períodos finais da graduação devido a pandemia. Disponível para dúvidas e elucidava com muita paciência e calma. Também agradeço ao seu mestrando, Washington Themoteo que me auxiliou com explicações e conselhos além de servir de inspiração.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro, aos professores e servidores da FOUFU obrigada pela convivência e conhecimentos transmitidos.

Aos docentes componentes da defesa que, de maneira tão gentil, disponibilizaram seu precioso tempo para avaliar e colaborar com este trabalho, por meio da partilha generosa de seus conhecimentos, capacidades e experiências.

RESUMO

As inovações de biomateriais em reparos teciduais na odontologia, está associada aos avanços nas abordagens terapêuticas que tem como finalidade a máxima preservação de estruturas saudáveis, chamada de Odontologia Minimamente Invasiva. Concomitantemente, a fitoterapia ganha-se espaço e os biomateriais de origem natural possui maiores chances de biocompatibilidade com o hospedeiro. Neste contexto, o presente estudo buscou analisar o efeito direto da própolis verde brasileira (PVB) em células pulpares humanas, a fim de avaliar o potencial de viabilidade celular e reparo tecidual. Desse modo, células pulpares foram semeadas em placas de 96 poços (10.000/poço) e após 24h foram submetidas à aplicação direta dos materiais: PVB em diferentes concentrações (5, 10 e 50 µg/mL), DMSO 0,5% (controle de diluente da própolis), Peróxido de carbamida (PC - grupo controle negativo) 0,018% e DMEM (controle positivo). A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT, 24 horas após a aplicação. Também, o ensaio de migração celular (Wound healing) comparou o contato imediato e após 24h e 48h após uma lesão do meio. A análise de dados utilizou o teste One Way ANOVA complementado por Tukey ($\alpha = 5\%$). Em relação aos resultados de viabilidade e migração celular, não houve diferença estatística entre o grupo experimental (PVB) e o controle positivo ($p < 0,05$). Diferente do grupo controle negativo (PC), onde apresentou espaços intercelulares, causado pela diminuição da quantidade de células, alterações na forma da membrana original e formatos celulares irregulares. Concluiu-se que as PVB apresentaram baixa citotoxicidade, alta tolerância celular e capacidade de indução de proliferação celular em tecidos pulpares.

Palavras-chave: Própolis; Cultura Primária; Sobrevivência Celular, Ensaio de Migração Celular.

ABSTRACT

The innovations of biomaterials for tissue repair in dentistry are associated with advances in therapeutic approaches aimed at maximum preservation of healthy structures, called Minimally Invasive Dentistry. At the same time, phytotherapy is gaining ground and biomaterials of natural origin have greater chances of biocompatibility with the host. In this context, the present study aimed to analyze the direct effect of Brazilian green propolis (BGP) on human pulp cells, in order to assess the potential for cell viability and tissue repair. Thus, the pulp cells were seeded in 96-well plates (10,000/well) and after 24h they were submitted to the direct application of the materials: PVB in different concentrations (5, 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$), 0.5% DMSO (control of propolis diluent), carbamide peroxide (PC - negative control group) 0.018% and DMEM (positive control). Cell viability was evaluated by the MTT test, 24 hours after application. In addition, the cell migration test (wound healing) compared immediate contact and after 24h and 48h after an injury in the environment. Data analysis used the One-Way ANOVA test complemented by Tukey ($\alpha= 5\%$). Regarding cell viability and migration results, there was no statistical difference between the experimental group (PVB) and the positive control ($p<0.05$). Unlike the negative control group (PC), which presented intercellular spaces, caused by the decrease in the number of cells, alterations in the format of the original membrane and irregular cell formats. It was concluded that PVB showed low cytotoxicity, high cell tolerance and ability to induce cell proliferation in pulp tissues.

Keywords: Propolis; Primary Cell Culture; Cell Survival, Cell Migration Assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultados absolutos de viabilidade celular, considerando os diferentes estudos experimentais do estudo.....	14
Figura 2: Valores absolutos do fechamento progressivo das bordas da ferida, em estado imediato, 24 e 48 horas após a irrigação com as soluções estudadas.....	15
Figura 3: Imagens do fechamento progressivo das bordas da ferida, para os grupos DMEM, PVB 50ug/mL e PC, em estado imediato, 24 e 48 horas após a irrigação com as soluções estudadas.....	16
Figura 4: Imagens representativa dos grupos DMEM (a), PVB50 (b) e Peróxido de carbamida 0,018% (c) (Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, 500x).....	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
Extrato hidroalcolico da própolis verde brasileira	11
Obtenção da linhagem celular.....	11
Viabilidade celular (ensaio MTT formazan)	11
Ensaio de migração celular	12
Análise Morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	12
Análise estatística	13
3 RESULTADOS	14
Viabilidade celular	14
Ensaio de migração celular	14
Análise Morfológica e Microanálise Elementar - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	16
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21
ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	26

1 INTRODUÇÃO

As inovações de biomateriais em reparos teciduais na odontologia, está associada aos avanços nas abordagens terapêuticas que tem como finalidade a máxima preservação de estruturas saudáveis, chamada de Odontologia Minimamente Invasiva (OMI) (TUMENAS et al., 2014). Dessa forma, a aplicação de biomateriais é variável em cada caso, mas possuem algumas características que contribui para o uso seguro quando utilizado. Segundo Guastaldi e Aparecida (2010), para aplicação de biomateriais considera-se três características básicas: (1) bioatividade, a capacidade do material em se unir com o tecido do hospedeiro; (2) alta osteocondutividade, sua presença induz crescimento celular ósseo; e (3) biocompatibilidade, propriedades físicas e biológicas do material sejam compatíveis ao tecido biológico, sem gerar respostas adversas.

Na endodontia, a OMI está presente na terapia pulpar vital (TPV), termo clínico genérico que denomina os protocolos de, remoção seletiva de dentina amolecida, capeamento pulpar (direito/indireto) ou pulpotomia (parcial/completa) (TAHA & ABDELKHADER, 2018). Conceitualmente, é uma abordagem conservadora com o intuito de manter a vitalidade da polpa remanescente promovendo a cicatrização e funcionamento do complexo dentino-pulpar (ZHANG & YELICK, 2010). O biomaterial mais indicado, em TPV é o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), seu lado positivo é o tempo de presa, ocorre quando está em contato com fluidos (GANDOLFI et al. 2009).

Concomitantemente, há um fomento no desenvolvimento de biomateriais de origem natural. A fitoterapia é o ramo da ciência que desenvolve medicamentos com princípios ativos de plantas ou derivados vegetais para o tratamento de doenças (DE PASQUALE, 1984). Ademais, a ciência possui reconhecimento pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como potencial alternativa para uso, uma vez que substâncias fitoterápicas apresentam maior biocompatibilidade, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2002). Um dos materiais estudados é a Própolis, atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, cicatrizante, antitumoral e imunomodulatória são descritas na literatura (BANKOVA et al., 2005; ALENCAR et al., 2007).

A própolis é fabricada por abelhas da espécie *Apis mellifera* (aquelas que produzem mel), após a coleta de flores, brotos e outros tipos de plantas. Que ao retornarem a colmeia, manipulam esse substrato complexo e acrescentam cera, pólen e secreções salivares (TORETI et al., 2013), formando assim, um composto sólido e resinoso. Sua coloração e consistência é

variada, consequência dos agentes externos como o território, clima da região, índices pluviométricos, flora e estação do ano, além das características genéticas da abelha que a produz (TEIXEIRA et al., 2003; PARK et al., 2004; SALATINO et al., 2011). No Brasil, existem 13 tipos de própolis catalogadas, que varia de coloração do verde, vermelho ao marrom escuro. (FERREIRA, 2017).

A Própolis Verde Brasileira (PVB), é produzida no sudeste do Brasil, após a coleta de brotos jovens de *Baccharis dracunculifolia* L. (também chamada por alecrim-do-campo ou vassourinha), que lhe dá a coloração característica verdeada. Sua composição básica não se difere das demais já catalogadas: substâncias resinosas, ceras, ácidos graxos, álcoois, ésteres, vitaminas e compostos fenólicos (DIEDRICH et al., 2015). No entanto, uma substância fenólica chamada de Artepillin C é encontrada apenas neste tipo de própolis (NOBUSHI et al., 2012). Estudos sugerem que presença de Artepilin C, oferece um valor terapêutico maior em relação à própolis chamada de comum (própolis marrom) no mercado nacional e internacional (SALGUEIRO et al 2016, NOBUSHI et al., 2012, SZLISZKA, et al., 2013; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Cerca de 10 a 15% de todos os tipos de própolis consumidos no mundo, vem do Brasil. E desse montante, 70% advêm de Minas Gerais, das quais 20 toneladas são de própolis verde (SEBRAE, 2014).

Neste contexto, o presente estudo buscou analisar o efeito direto da própolis verde brasileira em células pulpares humanas. A fim de avaliar a eficiência e segurança do composto, com interesse de possível desenvolvimento de biomaterial odontológico a base de PVB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliou o efeito direto em células pulpares humanas da própolis verde brasileira, com finalidade de determinar se o composto é eficaz e seguro o suficiente para ser desenvolvido como material odontológico indicado para terapias pulpares.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de células pulpares (teste de MTT) após aplicação direta da PVB.
- Avaliar a capacidade de migração celular após ser submetida a injúria mecânica e possível estimulação após aplicação direta da PVB.
- Avaliar a morfologia celular das células após aplicação direta da PVB.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato hidroalcolico da própolis verde brasileira

Por meio da associação de apicultores de Canavieiras (Cooperativa de Apicultores de Canavieiras, COAPER, Bahia, Brasil), foi adquirido a Própolis Verde Brasileira (PVB) na forma *in natura*. Para posterior extração, ocorreu-se a maceração dinâmica das amostras previamente picadas e congeladas, a 30 °C e 120 rpm em incubadora shaker (INNOVA 4300), adicionado à solução de etanol hidroalcolico a 70%. E finalmente, concentrado à vácuo pelo evaporador rotativo e liofilizado, resultante a um extrato concentrado e seco.

Obtenção da linhagem celular

Este trabalho de conclusão de curso está vinculado a pesquisa principal de maior amplitude que têm como título; Atividade antibacteriana e efeito direto em células pulpare humanas de três diferentes tipos de Própolis Brasileira. Aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) sob CAAE: 47122321.3.0000.5152/Parecer nº4955919.

Assim, a obtenção de linhagens celulares fora coletada mediante a doação de 3 terceiros molares extraídos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, com indicação prévia. Onde o paciente foi orientado e fornecido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para leitura e necessário assinatura em caso de aceite. Dessa forma, o dente foi submetido a técnica de explante tecidual (ARORA et al., 2022). Anteriormente ocorreu a odontoseção e a remoção mecânica do tecido pulpar. Após a expansão e ao atingir a sexta passagem as células serão submetidas aos ensaios.

Viabilidade celular (ensaio MTT formazan)

Previamente, as células foram semeadas em 96 poços com concentração 10.000 células/poço para realização do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (KLEIN-JUNIOR et al., 2021) a fim de avaliar a viabilidade celular. A PVB, em concentrações definidas em estudo piloto (5, 10, 50 µg/ml), sob as amostras foram categorizadas como grupo experimental, também os grupos DMSO 0,5%, TNF- α 10µg/mL e DMEM (grupo controle) e Peróxido de Carbamida 0,018% (PC) como grupo controle negativo. As células foram mantidas em contato por 24 horas com os materiais, onde, o sobrenadante foi aspirado após o período em contato. Em sequência, cada poço recebeu 90

μ L de DMEM sem soro bovino fetal e 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL em PBS-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Submetido por 4 horas de incubação a 5% CO₂ e 37°C, seguido da remoção do sobrenadante e adicionado 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO, LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) para dissolução dos cristais de formazan produzidos em cada compartimento. Utilizou-se o espectrofotômetro para avaliação da densidade óptica, com auxílio de um leitor de microplacas de multimodal GLOMAX® (Promega Corporation, São Paulo, Brasil) usando um filtro de 560 nm.

Ensaio de migração celular

Para avaliação da capacidade de migração celular foi utilizado o método de Wound Healing. (BASSO et al., 2016). No qual a medição da área da ferida de cada amostra foi avaliada através do software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). De antemão, realizado a semeadura das células em 48 poços com concentração de 30.000 células/poço. Passado 24h, a cultura foi submetida a uma ferida mecânica linear com auxílio da ponta de uma micropipeta (após 24 horas). Seguido por exposição as soluções de acordo com os grupos experimentais no período de 24 e 48 horas, mantidas em uma incubadora a 37°C. Utilizado o microscópio invertido EVOS fl (Advanced Microscopy Group (AMG) com aumento de 4x, foram fotografadas três vezes em cada amostra em diferentes regiões da injúria. Quatro réplicas foram avaliadas em cada grupo, e os resultados expressos em μ m².

Análise Morfológica - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análise de cunho qualitativo, ocorreu a semeadura das células em lamínulas de vidro, após 24h foram submetidas a aplicação dos materiais definindo cada grupo experimental (PVB em 50 μ g/ml, DMSO 0,5%, TNF- α 10 μ g/mL e DMEM e Peróxido de Carbamida 0,018%). Neste método, a solução sobrenadante foi aspirada após 24 horas em contato, seguida pela fixação por 1h em glutaraldeído a 2,5% (Sigma- Aldrich). Cada poço foi lavado 3x com 1 mL de PBS (5 min por lavagem), foram então pós-fixadas por 60 min em 200 μ L de tetróxido de ósmio a 1% (Sigma- Aldrich). Partido para a desidratação das amostras com trocas de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 min em cada solução), depois secas com o solvente 1,1,1,3,3,3- hexametildissilazano (HMDS - ACROS Organics, Rutherford, NJ, EUA). As amostras foram fixadas em stubs, metalizadas com ouro, e

analisados em escaneamento em microscopia eletrônica de varredura (SEM, Tescan, Vega 3 LMU, Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido) (Haupt et al. 2020).

Análise estatística

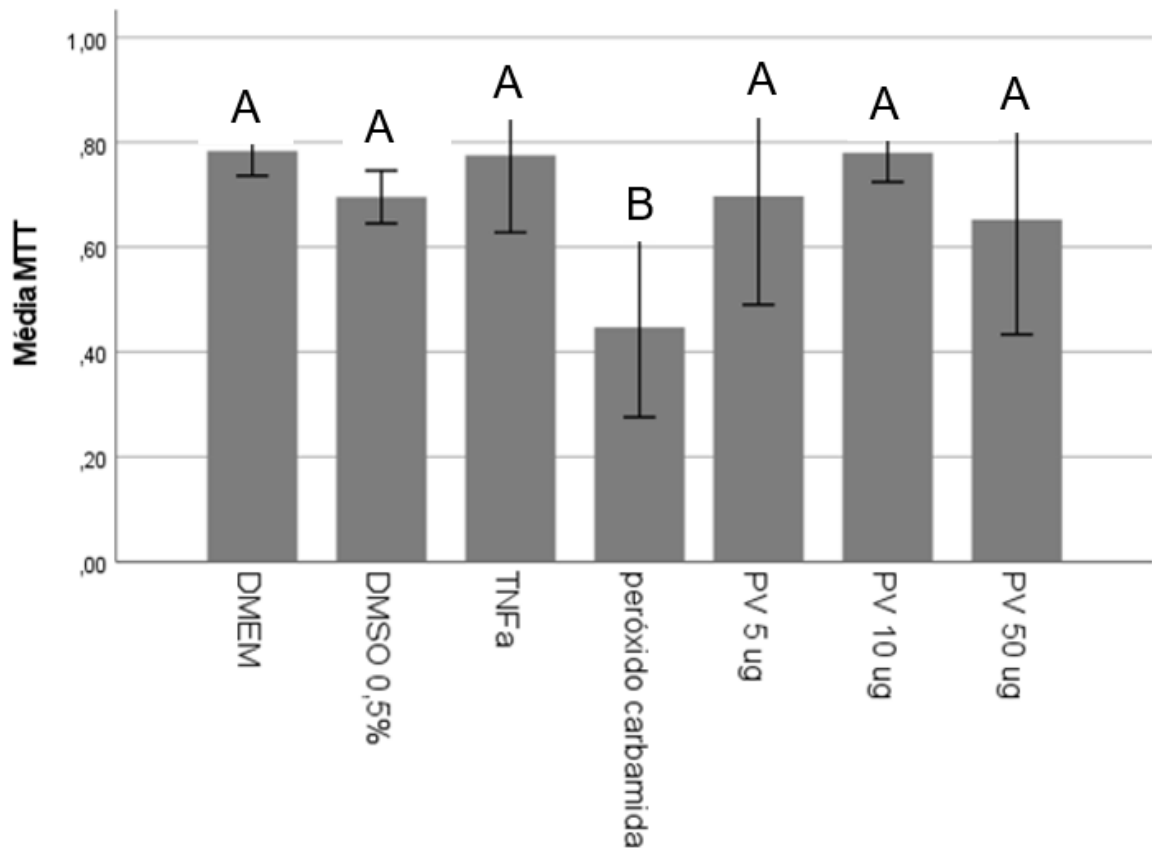
Os dados foram coletados e computados com auxílio do software Microsoft Excel versão 2019 e analisados no programa JAMOVI, versão 1.6.23 e SPSS, versão 22.0. Submetidos a aplicação de testes One Way ANOVA, complementado por Tukey com significância de 5%.

3 RESULTADOS

Viabilidade celular

Baseado no teste de viabilidade celular MTT formazan, a PVB nas diferentes concentrações (5, 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$) não demonstraram diferença estatística significativa quando comparadas ao DMEM (controle positivo para viabilidade). No entanto, quando comparado ao grupo PC (grupo negativo para viabilidade), apresentou-se diferenças estatísticas relevantes (**Figura 1**).

Figura 1: Resultados absolutos de viabilidade celular, considerando os diferentes estudo experimentais do estudo



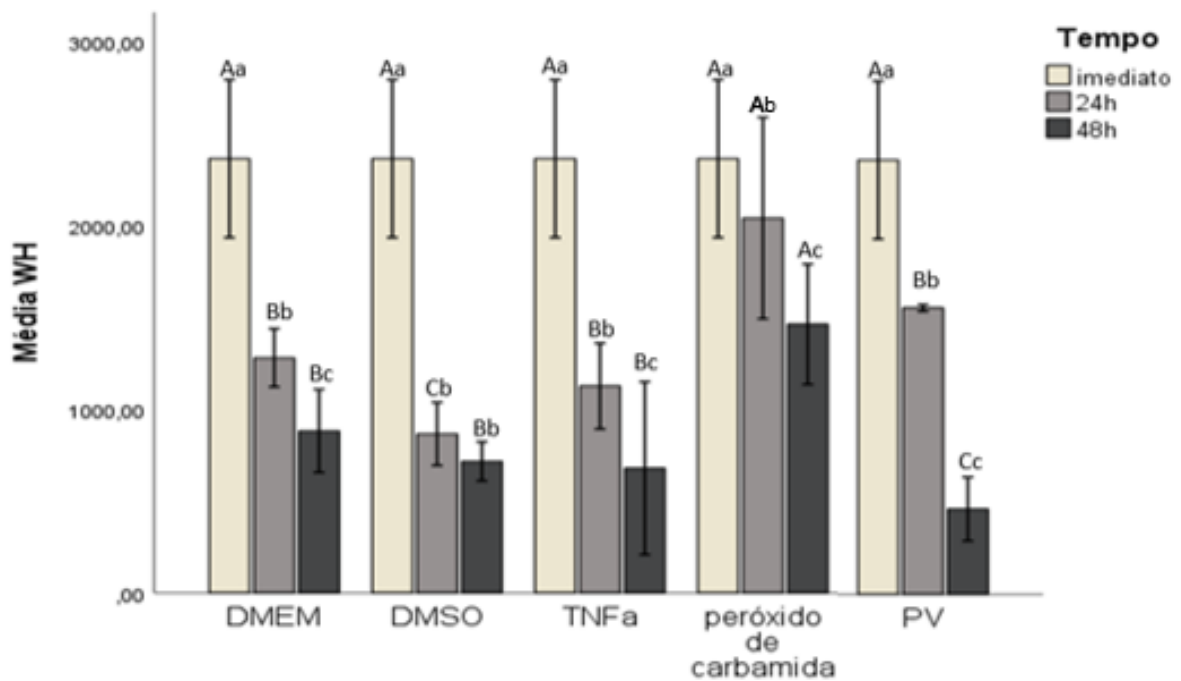
Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes, Tukey $p < 0,05$.

Ensaio de migração celular

A respeito do fechamento progressivo das bordas da ferida, em estado imediato, 24 e 48 horas após a irrigação com as soluções estudadas (**Figuras 2 e 3**). O grupo de PVB 50 $\mu\text{g/ml}$ e DMEM apresentaram resultados qualitativos semelhantes, resultando em migração

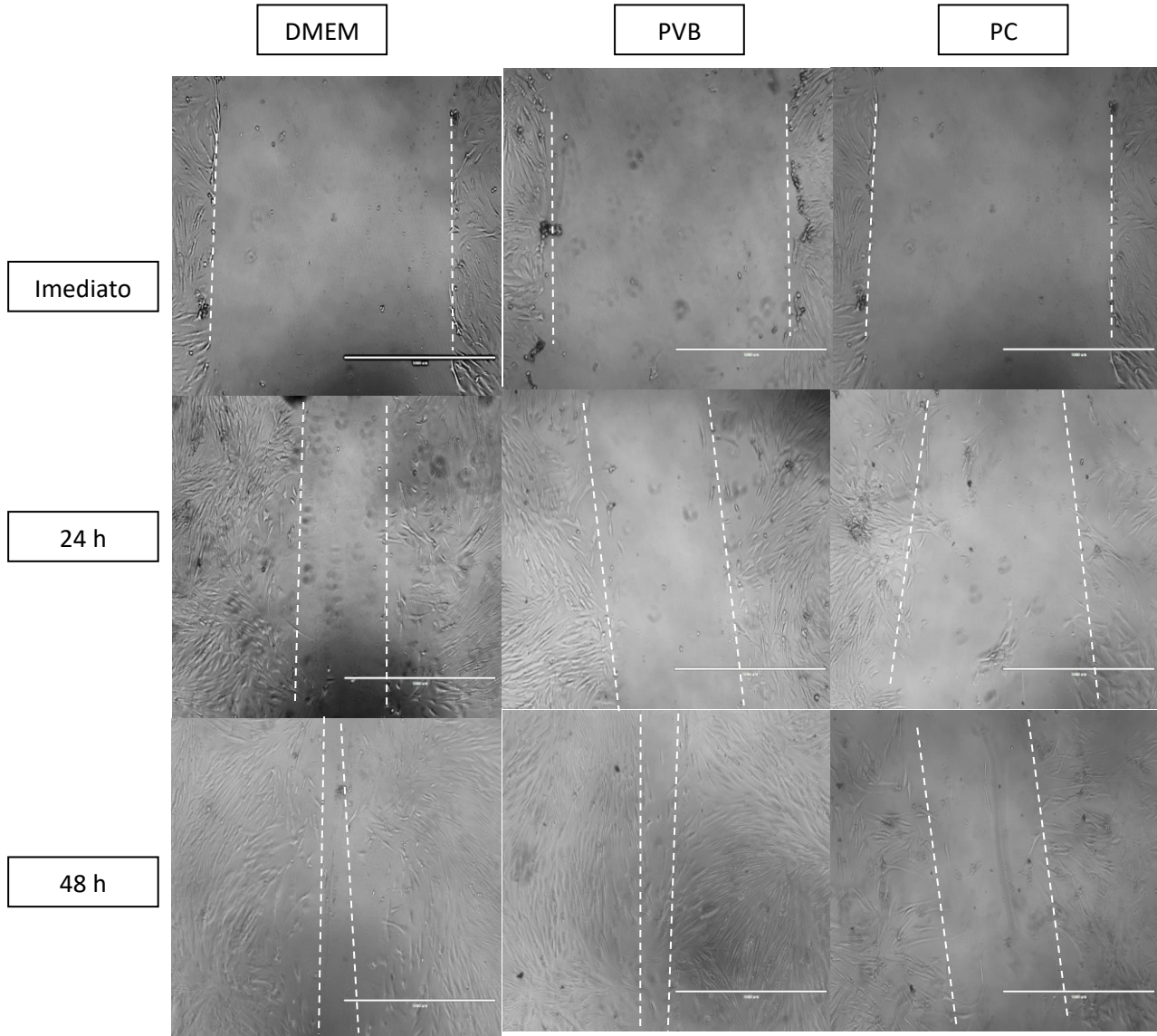
celular para região afetada. Também, quantitativamente, variou-se de 2428 μm imediato para 1557 μm a 428 μm , 1457 μm a 592 μm , 1278 μm a 789 μm , em 24h e 48 h, respectivamente. Entretanto, o grupo controle negativo PC, não demonstrou resultados coincidentes, variando de 2038 μm a 1461 μm em 24 e 48h. além de apresentar áreas acelulares, irregulares e elevada alteração morfológica de disposição celular.

Figura 2: Valores absolutos do fechamento progressivo das bordas da ferida, em estado imediato, 24 e 48 horas após a irrigação com as soluções estudadas



Letras maiúsculas indicam comparação entre as barras da mesma cor, letras minúsculas indicam comparação entre as barras de cores diferentes dentro de cada grupo experimental. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes, Tukey $p < 0,05$.

Figura 3: Imagens do fechamento progressivo das bordas da ferida, para os grupos DMEM, PVB 50 μ g/mL e PC, em estado imediato, 24 e 48 horas após a irrigação com as soluções estudadas

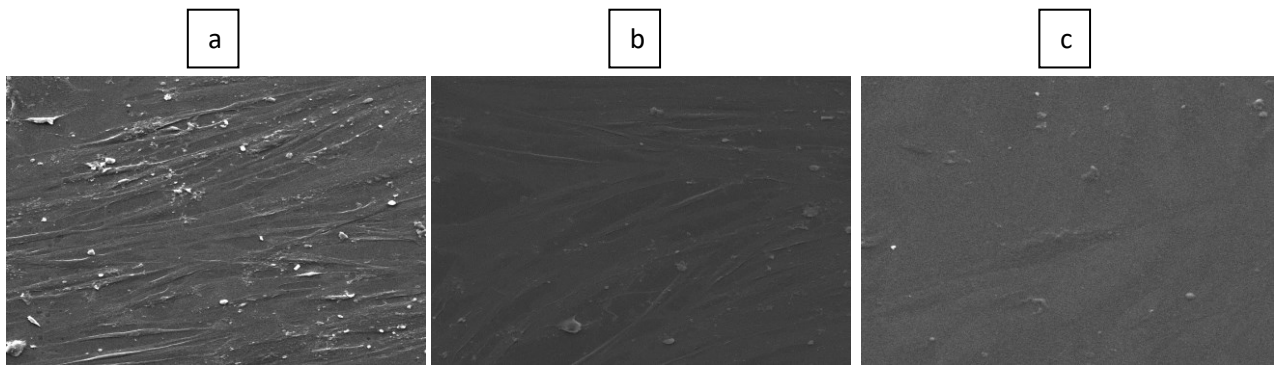


Análise Morfológica e Microanálise Elementar - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com auxílio da microscopia eletrônica de varredura, foi observado qualitativamente que o grupo da PVB 50 μ g/ml, apresentou-se semelhança morfológica celular, como proximidade entre os fibroblastos, membrana celular bem delimitada, expressando formato alongados e fusiformes comparado ao grupo controle DMEM (controle positivo para viabilidade). Porém, comparado ao grupo PC, este apresentou espaços intercelulares, causado

pela diminuição da quantidade de células, alterações na forma da membrana original e formatos celulares irregulares (Figura 4).

Figura 4: Imagens representativa dos grupos DMEM (a), PVB50 (b) e Peróxido de carbamida 0,018% (c) (Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, 500x)



4 DISCUSSÃO

Os biomateriais na Odontologia, necessitam de propriedades que possibilitam preservar a maior quantidade de estruturas dentárias (WALSH; BROSTEK, 2013). Aliado a essa meio científico, a busca por materiais de origem natural (PASSOS, R. et al., 2020), uma das substâncias que apresentam notoriedade, com trabalhos que avaliam a sua composição química e atividade biológica (SILVA et al., 2018) é a própolis. Pois a origem natural favorece a manutenção da vitalidade dos componentes celulares e de tecidos, quando ministrados em concentrações específicas (SIMÕES; ARAÚJO; ARAÚJO, 2008). Neste trabalho, os resultados mostraram-se promissores, semelhante aos encontrados na literatura.

Através do teste de viabilidade celular presente nesse experimento, observou-se alta tolerância das células pulpares irrigadas com soluções concentradas do extrato hidroalcoólico de PVB (concentrações de 5, 10 e 50 µg/ml), com expressão estatística semelhante ao grupo positivo DMEM. Desse modo, ocorre a validação dos dados satisfatórios presentes na literatura (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004). Tendo como exemplo, o ensaio clínico que cultivou células pulpares irrigadas com própolis brasileira (concentrações maiores que 10µg/ml) e apresentaram viabilidade celular semelhante ao MTA (diluído 1:8) após 24 horas (SHI et al., 2019). Vale lembrar que, o MTA é considerado biomaterial padrão-ouro para emprego na TVP (GANDOLFI et al. 2009).

Além de manter o funcionamento vital das células, a própolis utilizada como medicação intracanal, não causa fatores irritantes e retarda o processo inflamatório agudo em tecido pulpar e periapical, comparado ao Otosporin (Zest Pharmaceutics Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Esta medicação é uma associação de um anti-inflamatório corticosteroide, a hidrocortisona, e dois antibióticos, a neomicina e a polimixina B, comumente utilizada como curativo de demora. Porém, o estudo observou que a própolis (0,1ml - solução alcoólica a 10%) injetada via intradérmica em ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), apresentou-se redução do exsudato anti-inflamatório agudo comparada a substância (SILVA et al., 2004).

Desta maneira, o biomaterial demonstra bom indicativo para desenvolvimento de medicação intracanal em casos endodônticos de curta duração. A supressão da inflamação pode ser explicada pela presença de algumas substâncias como artemisinina, ácido salicílico, apigenina, ácido felúrico e galangina identificadas na própolis (PEREIRA et al., 2015). Parte desses bioativos têm a capacidade de inibir a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase, enzimas protagonistas da inflamação (BORRELLI et al., 2002). Também é encontrado na literatura, o

aumento da proliferação de fibroblastos (pertencentes ao tecido pulpar humano) sob efeito direto da própolis (FUNG et al., 2015).

Assim, produtos à base de própolis na odontologia é uma área promissora, como meio para armazenamento de dentes avulsionados e indicado reimplante mediato (GJERTSEN et al., 2011), em virtude das características citadas acima. Essa biocompatibilidade apresentada pela PVB, corrobora com os resultados da análise morfológica do presente estudo, o grupo experimental semelhante ao controle positivo (DMEM), demonstraram aspectos característicos de integridade dos fibroblastos. Biomateriais considerados citotóxicos costumam apresentar alterações conforme encontradas no grupo controle negativo desse estudo (ISTIFLI; ILA, 2019). Após serem irrigadas com material (peróxido de carbamida 0,018%), diminuíram em quantidade e sofreram alterações morfológicas na membrana plasmática, expressando formatos irregulares.

Quanto a resposta tecidual sob efeito direto da própolis, foi possível avaliar positivamente o grupo experimental com desempenho semelhante ao controle positivo, visto que ocorreu o fechamento gradual da injúria. Assimila com estudo que analisou feridas irrigadas com própolis (concentração de 10% e 20%) e gerou potencialização da capacidade de migração, comparada ao sem contato com o composto (ELKHENANY et al., 2019). Atualmente, existem artigos científicos sobre a própolis, mas é essencial estudos adicionais para prosseguimentos das evidências. Em adição, por se tratar de um estudo laboratorial in vitro, também ocorre limitações e necessidade de estudos in vitro e in vivo para maior segurança e capacidade de desenvolvimento de material odontológico.

5 CONCLUSÃO

A própolis verde brasileira apresentou características biocompatíveis como; alta tolerância celular, capacidade de proliferação e de migração celular em células pulpares de dentes humanas. No entanto, para maior segurança ao uso humano, faz-se necessário realização de pesquisas in vitro e in vivo, com finalidade de possível padronização das concentrações administradas e variedade de tipos presentes.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S.M., et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.I.], v. 113, p. 278-283, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>
- AL-SHAHER, A. et al. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. **Journal of endodontics**, [S.I.], v. 30, n. 5, p. 359-361, 2004. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00012>
- ARORA, S. et al. A critical review of in vitro research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell cultures. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 55, p. 3-13, 2022. <https://doi.org/10.1111/iej.13684>
- BANKOVA, V.. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh059>
- BASSO, F.G. et al. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 Impair In Vitro Migration and Induce Apoptosis of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells, Delaying Wound Healing. **J Periodontol**, v.87, n.8, p. 990-6, 2016. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150713>
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, p.53-63, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00191-0)
- DIEDRICH, C. et al. Atividade antibacteriana de extrato etanólico de própolis produzido por abelhas. **Revista Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR**, Dois Vizinhos-PR, v. 3, n. 3, p. 394-6, 2015. Trabalho apresentado na 3ª Semana Acadêmica de Ciências Biológicas, Dois Vizinhos, 2015

DE ARRUDA, C. et al. Características físico-químicas de méis da Chapada do Araripe/Santana do Cariri-Ceará. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 171-6, 2005. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i1.1264>

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 11, p. 1-6, 1984. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90092-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90092-8)

FERREIRA, J.M. et al. New propolis from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 97, p. 3552-8, 2017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8210>

FUNG, C. et al. Proliferative Effect of Malaysian Propolis on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: An In vitro Study. **British Journal of Pharmaceutical Research**, United Arab Emirates, v. 8, p. 1-8, 2015 . <https://doi.org/10.9734/BJPR/2015/19918>

GANDOLFI, M.G. et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 108, n. 6, p. 39-45, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.07.039>

GUASTALDI, A.C.; APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química nova**, São Paulo, v. 33, p. 1352-8, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>

HAUPT F. et al. Effectiveness of different activated irrigation techniques on debris and smear layer removal from curved root canals: a SEM evaluation. **Aust Endod J.**, Melbourne, v. 46, n. 1, p. 40-6, 2020. <https://doi.org/10.1111/aej.12342>

HUANG, S. et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*,

Basel, v.19, p. 19610-32, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>

ISTIFLI, E.S.; ILA, H.B. Cytotoxicity: Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. 1. ed. Londres: IntenchOpen, 2019.

KLEIN-JUNIOR C.A. et al. Cytotoxicity assessment of Bio-C Repair Íon+: A new calcium silicate-based cement. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**. Tabriz, v. 15, n.3, p. 152-6, 2021. <https://doi.org/10.34172/joddd.2021.026>

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>

NOBUSHI, Y. Determination of Artepillin-C in Brazilian Propolis by HPLC with Photodiode Array Detector. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**. Toronto, v. 2, p. 127-131, 2012. <https://doi.org/10.6000/1927-5951.2012.02.02.2>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, p. 67, 2002.

PARK, Y.K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 52, p. 1100-3, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf021060m>

PEREIRA, D.S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.

SABIR, A. et al. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. **Journal of oral science**, Tokyo, v. 47, n. 3, p. 135-8, 2005. <https://doi.org/10.2334/josnusd.47.135>

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**. Londres, v. 28, p. 925-936, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0np00072h>

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, p. 1-8, 2016.

SEBRAE. Boletim Informativo: O Mercado da própolis. <http://www.sebrae2014.com.br> - acessado em 16/04/23.

SHI, B. et al. Effects of MTA and Brazilian propolis on the biological properties of dental pulp cells. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 33, p. 117, 2019. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0117>

SILVA F.B.; ALMEIDA J.M.; SOUSA SM. Medicamentos naturais em endodontia: um estudo comparativo da ação antiinflamatória. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 18, p. 174-9, 2004.

SILVA, K.C.M. et al. Os diferentes tipos de Própolis e suas indicações: uma revisão da literatura. Tese (Mestrado em Sistemas agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Campina Grande, 2018.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 84-9, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100016>

SZLISZKA, Ewelina et al. Inhibition of inflammatory response by artemisin C in activated RAW264. 7 macrophages. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine**, Nova Iorque, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/735176>

TAHA, N. A.; ABDELKHADER, S. Z. Outcome of full pulpotomy using Biodentine in adult patients with symptoms indicative of irreversible pulpitis. **International endodontic journal**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 819-28, 2018. <https://doi.org/10.1111/iej.12903>

TORETI, V.C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical composition and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Nova Iorque, ID:697390, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/697390>

TUMENAS, I. et al. Odontologia minimamente invasiva. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 283-95, 2014.

WALSH, L. J.; BROSTEK, A. M. Minimum intervention dentistry principles and objectives. **Australian Dental Journal**, Sydney, v. 58, p. 3-16, 2013. <https://doi.org/10.1111/adj.12045>

ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turrioni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cariosas extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

características químicas, espécie produtora e diversidade do clima no país, sendo do tipo 1 ao 13, a própolis vermelha, marrom e verde são alvos da maioria dos estudos relacionados às propriedades desse produto⁹. A própolis vermelha brasileira (PVB) encontrada no litoral nordestino difere dos demais tipos devido à sua origem, a qual se deriva principalmente do exsudato resinoso vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum*¹⁰. Atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante e efeito citotóxico frente a linhagens tumorais já foram descritos^{11,12}. Acredita-se que tal potencial se dê em relação ao sinergismo existente entre os seus componentes da classe isoflavonóides, compostos estes que não são encontrados nas demais própolis¹³. A própolis verde brasileira (PVEB) é a espécie mais investigada e, também, a mais popular. É encontrada no sudeste brasileiro e possui como princípio ativo a artepelina C e se origina a partir da *Baccharis dracunculifolia*¹¹. Observou-se que a PVEB foi capaz de inibir a progressão de câncer pulmonar¹⁴, atividade antiviral¹⁵ e atividade anticariogênica contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*

sobrinus, *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus casei*^{16,17}, assim como ação antifúngica em relação à *Candida albicans*¹⁸. Apesar de comprovada antígeno toxicidade^{19,20}, atividade antimicrobiana^{21,22} e antioxidante^{23,24}, a própolis marrom brasileira (PMB) não é tão investigada quanto à verde e vermelha. É encontrada no sul do Brasil, apresenta sua composição química principalmente em benzofenonas poli-isopreniladas e têm origem botânica a partir da *Clusia rosea* pertencente à família *Guttiferaceae*²⁵. Em ensaio *in vitro*³ com células pulpares humanas, viu-se que a própolis brasileira exibiu viabilidade celular similar ao MTA e, além disso, mostrou-se capaz de induzir nódulos de mineralização e atividade anti-inflamatória superiores. A escolha do material nas pulpotomias irá influenciar na longevidade do dente afetado, portanto, o presente estudo pretende comparar as propriedades biológicas da PVB, PVEB e PMB e do MTA em contato direto com células pulpares humanas, assim como testar a atividade bactericida das própolis em relação a nove bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária.

Hipótese:

As própolis brasileiras testadas não apresentarão citotoxicidade às células pulpares e terão alta atividade bactericida para as bactérias envolvidas na infecção endodôntica inicial.

Metodologia Proposta:

Obtenção das linhagens celulares Com o intuito de prevenir o contágio pelo novo coronavírus, a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 4.955.919

utilização de máscara PFF2/N95, óculos de proteção, gorro, luvas e avental descartável serão obrigatórios durante a anamnese e no momento de coleta das amostras, além de disponibilização de álcool em gel para higienização das mãos para toda a equipe. Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, a qual possui pacientes cadastrados por demanda

espontânea para exodontia de terceiros molares, e assim, abordar-se-á três pacientes no momento da anamnese conduzida pelo aluno responsável com o Instrumento de coleta de dados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para que um total de três terceiros molares possam ser obtidos. O dente será levado imediatamente ao laboratório imerso em solução apropriada. Com a utilização de alta- rotação e irrigação constante, os dentes serão submetidos a um desgaste cervical e levados ao fluxo laminar, onde serão divididos ao meio com o auxílio de dois fórceps. Os remanescentes dentais serão devidamente descartados e o tecido pulpar de cada dente será mecanicamente removido e, desta forma, submetido

ao isolamento das células, a partir da técnica de explante tecidual. Independentemente da condição pulpar, todos os dentes serão devidamente descartados em local apropriado. Àqueles tecidos que se apresentarem com aspecto necrótico,

não serão submetidos à técnica de isolamento das células pois a polpa de coloração avermelhada possui um maior número de células viáveis.

O número amostral de três participantes se justifica pelo fato de que as células pulpares humanas apresentam ótima taxa de proliferação. Diante disso, é possível utilizar as células de um mesmo doador para diferentes metodologias. Adicionalmente, estudos prévios têm utilizado número amostral semelhante 26-30.

Distribuição dos grupos experimentais

A PVEB, a PVB e a PMB serão utilizadas no presente estudo na concentração de 15 mg/mL aplicadas diretamente sobre as células pulpares humanas em diferentes concentrações. As células pulpares serão semeadas em placas de 96 poços (20.000/poço) e após 24 h, submetidas à aplicação direta dos materiais: PVEB, PVB e PMB, MTA (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8), DMSO 0,5% e DMEM (grupo controle).

Cada grupo experimental será composto por células de todos os doadores, ou seja, em um total de 9 compartimentos por grupo, três compartimentos conterão as células do doador 1, três

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

compartimentos conterão células do doador 2, e outros três compartimentos conterão células do doador 3. As mesmas células utilizadas para realizar o plaqueamento dos grupos experimentais serão as mesmas do controle. Os grupos experimentais e controles serão: PVB (DMEM sem soro + Própolis vermelha), PVEB (DMEM sem soro + Própolis verde), PMB (DMEM sem soro + Própolis marrom), MTA (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle negativo (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle positivo (DMEM sem soro).

Testes

Primeiramente, será feito a avaliação da viabilidade celular em diferentes concentrações. A partir dos resultados obtidos nesta análise, as melhores concentrações de PVEB, PVB e PMB serão submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), assim como avaliação da viabilidade celular (MTT), quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs, sonda DCFH-DA), óxido nítrico (ON, reagente de Griess), avaliação da morfologia celular (MEV) e ensaio de migração celular (Wound healing) 24 horas após a aplicação dos materiais. Após a realização de cada teste, as placas contendo as culturas celulares avaliadas serão descartadas em lixo próprio para material contaminado.

Critério de Inclusão:

- o Pacientes saudáveis;
- o Pacientes que possuam 3os molares hígidos;
- o Pacientes que estejam na faixa etária de 20 a 30 anos.

Critério de Exclusão:

- o Presença de doenças crônicas e alterações sistêmicas;
- o Presença de dentes cariados, com tratamento endodôntico ou doença periodontal;
- o Usuários de álcool e drogas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar as propriedades biológicas da PVB, PVEB e PMB e do MTA em contato direto com células pulpares humanas, assim como testar a atividade bactericida das própolis em relação a nove bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Em relação à exodontia de terceiros molares, tal procedimento pode acarretar em complicações ao paciente, como hemorragia, alveolite, infecção, fratura radicular, parestesia, fratura mandibular e lesão aos dentes vizinhos. Fatores que podem influenciar na origem de algum tipo de complicação como idade do paciente e seu estado de saúde, gênero, grau de impacção do dente, experiência do cirurgião, tabagismo, uso de medicação anticoncepcional, qualidade da higiene oral, técnica cirúrgica, entre outros, serão detectados durante a anamnese e caso algum fator agravante seja detectado, a cirurgia será contraindicada. Para que esses riscos sejam minimizados, a técnica cirúrgica será realizada de forma cautelosa, evitando a dilaceração dos tecidos e um longo período de exposição ao procedimento cirúrgico. Caso alguma das complicações citadas ocorra, os pesquisadores se responsabilizarão pelo atendimento e acompanhamento do caso até que o quadro do participante apresente melhoras. As células da polpa dentária serão utilizadas única e exclusivamente para o presente estudo e não serão realizados procedimentos com outras finalidades. Com

o objetivo de minimizar o risco de identificação dos pacientes, será atribuído um código numérico para cada participante/dente, o qual será utilizado para controle no armazenamento das células. Além disso, nenhum dado que favoreça a identificação dos pacientes será coletado (ex: nome, número de documento, endereço).

Benefícios:

Não há benefício direto ao participante da pesquisa, porém os testes realizados irão contribuir para que, futuramente, esses produtos naturais possam ser utilizados na clínica odontológica de modo a melhorar a reparação das células pulpares humanas afetadas por cárie ou trauma dental. O paciente é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem qualquer prejuízo ou coação. Até o momento da divulgação dos resultados, ele também será livre para solicitar a retirada dos seus dados da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pendências atendidas apontadas no parecer anterior:

1) Descrever as medidas tomadas para evitar o contágio pela COVID-19 (participante e equipe executora) durante o período de coleta de dados.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Obrigado pela orientação, trata-se de algo extremamente importante. Abaixo, segue o trecho adicionado ao projeto:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: “Com o intuito de prevenir o contágio pelo novo coronavírus, a utilização de máscara PFF2/N95, óculos de proteção, gorro, luvas e avental descartável serão obrigatórios durante a anamnese e no momento de coleta das amostras, além de disponibilização de álcool em gel para higienização das mãos para toda a equipe.”

2) Justificar o número amostral. Por que apenas 3 participantes?

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 5, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, terceiro parágrafo: “O número amostral de três participantes se justifica pelo fato de que as células pulpares humanas apresentam ótima taxa de proliferação. Diante disso, é possível utilizar as células de um mesmo doador para diferentes metodologias. Adicionalmente, estudos prévios têm utilizado número amostral semelhante 26-30”.

Referências utilizadas na Pendência 2:

1. Bonvicini JFS, Basso FG, de Souza Costa CA, Soares CJ, Turrioni AP. Photobiomodulation effect of red LED (630 nm) on the free radical levels produced by pulp cells under stress conditions. *Lasers Med Sci*. 2021 Apr 7. doi: 10.1007/s10103-021-03309-x. Epub ahead of print. PMID: 33826014.
2. de Souza GL, Moura CCG, Silva ACA, Marinho JZ, Silva TR, Dantas NO, Bonvicini JFS, Turrioni AP. Effects of zinc oxide and calcium-doped zinc oxide nanocrystals on cytotoxicity and reactive oxygen species production in different cell culture models. *Restor Dent Endod*. 2020 Oct 19;45(4):e54. doi: 10.5395/rde.2020.45.e54. PMID: 33294419; PMCID: PMC7691257.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

3. Oliveira LV, da Silva GR, Souza GL, Magalhães TEA, Barbosa GLR, Turrioni AP, Moura CCG. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *Int Endod J.* 2020 Aug;53(8):1140-1152. doi: 10.1111/iej.13308. Epub 2020 May 21. PMID: 32299123.

4. de Souza, G. L., Almeida Silva, A. C., Dantas, N. O., Silveira Turrioni, A. P., & Moura, C. C. G. (2020). Cytotoxicity and Effects of a New Calcium Hydroxide Nanoparticle Material on Production of Reactive Oxygen Species by LPS-Stimulated Dental Pulp Cells. *Iranian Endodontic Journal*, 15(4), 227-235. <https://doi.org/10.22037/iej.v15i4.28942>

3) Em relação a metodologia, não está descrito o tipo de estudo que será realizado.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: "... Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia ..."

4) Em relação aos participantes, apresentar um plano de abordagem e recrutamento dos doadores dos dentes: não há descrição de como eles serão convidados(as) para participar da pesquisa; em que momento os pacientes elegíveis serão abordados sobre a exodontia; descrever o local que ocorrerá essa abordagem e o registro de TCLE.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: "... Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, a qual possui pacientes cadastrados por demanda espontânea para exodontia de terceiros molares, e assim, abordar-se-á três pacientes no momento da anamnese

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

conduzida pelo aluno responsável com o Instrumento de coleta de dados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para que um total de três terceiros molares possam ser obtidos.”

5) Considerando a descrição de coleta e armazenagem do material, o pesquisador irá utilizar o dente apenas para realizar a cultura de celular. Apresentar uma declaração de armazenamento de material do tipo Biorepositório, destacando o tempo de guarda antes do descarte.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

O documento foi apresentado.

6) Em relação aos métodos não está descrito qual o desfecho e/ou destino que será dado ao dente que apresentar o tecido pulpar não viável para análise;

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Todos os dentes são devidamente descartados em local apropriado logo após a remoção do tecido pulpar independente da condição que a polpa se apresente. O parágrafo abaixo foi reformulado para atender à demanda apresentada:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, segundo parágrafo: “O dente será levado imediatamente ao laboratório imerso em solução apropriada. Com a utilização de alta- rotação e irrigação constante, os dentes serão submetidos a um desgaste cervical e levados ao fluxo laminar, onde serão divididos ao meio com o auxílio de dois fórceps. Os remanescentes dentais serão devidamente descartados e o tecido pulpar de cada dente será mecanicamente removido e, desta forma, submetido ao isolamento das células, a partir da técnica de explante tecidual. Independentemente da condição pulpar, todos os dentes serão devidamente descartados em local apropriado. Àqueles tecidos que se apresentarem com aspecto necrótico, não serão submetidos à técnica de isolamento das células pois a polpa de coloração avermelhada possui um maior número de células viáveis.”

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

7) Em relação aos métodos não está descrito como que ocorrerá a randomização entre grupo controle e experimental.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 5, Seção: Material e Métodos, Item 2.3 Distribuição dos grupos experimentais, segundo parágrafo: "Cada grupo experimental será composto por células de todos os doadores, ou seja, em um total de 9 compartimentos por grupo, três compartimentos conterão as células do doador 1, três compartimentos conterão células do doador 2, e outros três compartimentos conterão células do doador 3. As mesmas células utilizadas para realizar o plaqueamento dos grupos experimentais serão as mesmas do controle. Os grupos experimentais e controles serão: PVB (DMEM sem soro + Própolis vermelha), PVEB (DMEM sem soro + Própolis verde), PMB (DMEM sem soro + Própolis marrom), MTA (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle negativo (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle positivo (DMEM sem soro)."

8) Em relação aos métodos, no item 2.4, não está descrito qual o desfecho e/ou destino será dado ao material com concentração não satisfatória.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Para que possamos trabalhar com concentrações que mantenham as células pulpare viáveis, se faz necessário realizar o teste de MTT para que se possa descobrir quais das concentrações poderão ser utilizadas nos experimentos sem prejuízo às células, portanto, a análise de IC50 é requerida para determinar o ótimo parâmetro e assim, prosseguir o estudo com a utilização de concentrações adequadas. Ao final de cada procedimento, a placa de 96 poços é descartada em local apropriado uma vez que a análise já foi realizada e os dados quantitativos obtidos. Portanto, segue a adição da sentença abaixo:

Página 6, Seção: Material e Métodos, Item 2.4 Testes, primeiro parágrafo: "... Após a realização de cada teste, as placas contendo as culturas celulares avaliadas serão descartadas em lixo próprio para material contaminado."

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

9) Em relação ao instrumento de coleta de dados, ele está sem informações precisas sobre estado de saúde do participante, qual dente será extraído, a data da coleta do dente e as condições do dente extraído.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

O instrumento de coleta de dados foi modificado atendendo às demandas solicitadas.

10) Quanto ao cronograma e coleta de dados, considerar a possibilidade de coleta presencial em virtude do período de pandemia.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

O cronograma foi alterado de modo que a coleta se inicie apenas no próximo ano, onde acredita-se que a pandemia estará, de certo modo, controlada diante da previsão de vacinação da população no estado de Minas Gerais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências do parecer nº 4.785.732 de 16 de Junho de 2021 foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo as Resoluções CNS 466/12 e 510/16, o pesquisador deverá manter os dados da

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento as Resoluções CNS 466/12, 510/16 e suas complementares, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 e 510/16) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, destacando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, Resolução 510/16 e suas complementares, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: AGOSTO/2022.

* Tolerância máxima de 01 mês para atraso na entrega do relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1757687.pdf	13/07/2021 16:31:22		Aceito
Outros	Resposta_Parecer_CEP.docx	10/07/2021 09:25:36	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Outros	Instrumento_coleta_dados.docx	10/07/2021 09:24:52	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio.pdf	10/07/2021 09:24:31	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_propolis_corrigido.docx	10/07/2021 09:24:16	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes.pdf	20/05/2021 14:35:04	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	20/05/2021 14:34:41	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Equipe_Executora_assinaturas.pdf	20/05/2021 14:33:18	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinaturas.pdf	20/05/2021 14:31:51	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 4.955.919

UBERLANDIA, 06 de Setembro de 2021

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br