



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

BRUNO DAS NEVES CAVALCANTI

BIOLOGIA PULPAR: da agressão à reparação

2014

BRUNO DAS NEVES CAVALCANTI

BIOLOGIA PULPAR: da agressão à reparação

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de LIVRE-DOCENTE na Disciplina de Endodontia, junto ao Departamento de Odontologia Restauradora.

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

C314b Cavalcanti, Bruno das Neves
Biologia pulpar: da agressão à reparação / Bruno das Neves Cavalcanti. - São
José dos Campos: [s.n.], 2014.
131 f. : il.

Tese (livre-docência) – Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos
Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, 2014.

1. Polpa dentária. 2. Patologia pulpar. 3. Regeneração. I. Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. II.
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. III. UNESP – Univ
Estadual Paulista. IV. Título

tD242

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 01 de outubro de 2014
E-mail: bruno.cavalcanti@fosjc.unesp.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera Garakis

Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos
UNESP – Univ. Estadual Paulista

Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos
UNESP – Univ. Estadual Paulista

Profa. Titular Márcia Martins Marques

Faculdade de Odontologia
USP – Universidade de São Paulo

Prof. Titular Giulio Gavini

Faculdade de Odontologia
USP – Universidade de São Paulo

Prof. Associado Caio Cezar Randi Ferraz

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

São José dos Campos, 01 de outubro de 2014.

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Márcia Sampaio Campos**, eterna companheira, amiga e cúmplice, responsável pelo meu crescimento e sempre levando a sério os votos de “na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, por todos os dias de minha vida”.

Aos meus filhos **Rafael e Lisa**, que são parte de mim e a razão de querer sempre ser melhor em tudo que eu faço. Vocês são o motivo maior de minha felicidade e força para superar qualquer desafio.

Aos meus pais **Dinarte de Souza Bezerra Cavalcanti e Neide Renó das Neves Cavalcanti**, que nunca mediram esforços e dedicação para permitir meu desenvolvimento como ser humano e profissional, sempre ensinando princípios morais.

Ao meu irmão **Samuel das Neves Cavalcanti**, melhor amigo e porto seguro para contar, na certeza de que nos admiramos e suportamos mutuamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representado por todos os diretores e administradores que aqui passaram durante os anos de minha graduação e mestrado, e que hoje é minha casa profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, que por meio de suas diversas linhas de fomento, financiou e permitiu a realização desta coletânea de trabalhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por ter dado suporte financeiro para realização de meu estágio pós-doutoral no exterior.

Aos colegas da disciplina de Endodontia, Ana Paula Martins Gomes, Carlos Henrique Ribeiro Camargo, Cláudio Antônio Talge de Carvalho, Frederico Canato Martinho e Márcia Carneiro Valera Garakis, pelo companheirismo e condição de trabalho nestes pouco mais de dois anos como colega.

À Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala, chefe do Departamento de Odontologia Restauradora e responsável direta por apoiar esta etapa de minha carreira, bem como cuidar com dedicação e carinho de nosso departamento.

Aos professores da Disciplina de Dentística, Alessandra Bühler Borges, Carlos Rocha Gomes Torres, Cesar Rogério Pucci, Clóvis Pagani, Eduardo Bresciani, José Roberto Rodrigues, Maria Amélia Máximo de Araújo, Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves e Taciana Marco Ferraz Caneppele, pelo companheirismo e bom ambiente de trabalho em que vivemos.

A todos os colaboradores dos trabalhos aqui apresentados dentre colegas de pós-graduação, alunos e professores, que tornaram estas publicações possíveis e enriquecidas com a troca de conhecimentos.

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora: Ana Paula, Fernanda, Josiana, Marinete e Rosângela que, em suas funções, mantém o nosso departamento funcionando de forma adequada e nos dão todo o suporte necessário para que as atividades administrativas, clínicas e laboratoriais sejam realizadas a contento.

Aos professores Paulo Isaías Seraidarian, Sigmar de Mello Rode, Márcia Martins Marques e Jacques Eduardo Nör, por terem acreditado em mim e dado o conhecimento e orientação necessária para que eu alcançasse este estágio em minha carreira.

A Deus, que me deu a vida e todos os dias me dá as forças necessárias para que eu possa sempre dar o melhor de mim.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 TRABALHOS SELECIONADOS	13
2.1 Artigo 1 - Cavalcanti BN, Seraidarian PI, Rode SM. Water flow in high-speed handpieces. Quintessence Int. 2005;36(5):361-4	15
2.2 Cavalcanti BN, Otani C, Rode SM. High-speed cavity preparation techniques with different water flows. J Prosthet Dent. 2002;87(2):158-61.....	20
2.3 Cavalcanti BN, Lage-Marques JL, Rode SM. Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces. J Prosthet Dent. 2003;90(5):447-51	25
2.4 Artigo 4 - Martins GR, Cavalcanti BN, Rode SM. Increases in intrapulpal temperature during polymerization of composite resin. J Prosthet Dent. 2006;96(5):328-31	31
2.5 Artigo 5 - Vanderlei AD, Borges AL, Cavalcanti BN, Rode SM. Ultrasonic versus high-speed cavity preparation: analysis of increases in pulpal temperature and time to complete preparation. J Prosthet Dent. 2008;100(2):107-9	36
2.6 Artigo 6 - Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. Int Endod J. 2005;38(8):505-9	40
2.7 Artigo 7 - Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. J Oral Sci. 2010;52(1):33-8.....	46

2.8 Artigo 8 - Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. J Appl Oral Sci. 2009;17(5):527-32	53
2.9 Artigo 9 - Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. J Dent Child (Chicago). 2009;76(3):194-8.....	60
2.10 Artigo 10 - Cavalcanti BN, Rode SM, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. Braz Oral Res 2011;25(1):13-8.....	66
2.11 Artigo 11 - Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Braz Dent J. 2011;22(1):3-13.....	73
2.12 Artigo 12 - Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater. 2012;28(4):341-8.....	85
2.13 Artigo 13 - Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. Dent Mater 2013;29(1):97-102	94
2.14 Artigo 14 - Cavalcanti BN, Silva GO, Pavanello MB, Campos MS. Differentiation aspects of selected and unselected heterogenic dental pulp cell populations.....	101
3 DISCUSSÃO	119
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
5 REFERÊNCIAS	127

Cavalcanti BN. Biologia pulpar: da agressão à reparação [tese de livre-docência]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

O estudo da polpa dentária pode se desdobrar desde fatores relacionados à sua agressão até àqueles relacionados a novos conceitos de regeneração. A proposta desta compilação de estudos é a de apresentar a evolução de uma linha de pesquisa desde a agressão até o reparo. Inicialmente, estudos demonstrarão a capacidade de procedimentos odontológicos em gerar calor e consequentemente afetar a polpa dental. Em sequência, estudos apresentarão alguns efeitos de diferentes materiais de capeamento pulpar em células da polpa dentária, relacionados à citotoxicidade e potencial inflamatório destes materiais. Finalmente, como um assunto emergente que vem ganhando importância na literatura, esta compilação apresentará dados de estudos recentes sobre o papel de células progenitoras na regeneração e reparo da polpa dentária, bem como uma alternativa de *scaffold* que pode ser utilizado para translação clínica da pesquisa neste campo. Em resumo, o profissional de odontologia deve estar atento para estes diferentes aspectos e para o fato de que o conhecimento de fatores e mecanismos envolvidos na agressão da polpa dentária podem também servir de base para o entendimento dos aspectos da regeneração.

Palavras-chave: Polpa dentária. Patologia pulpar. Regeneração.

Cavalcanti BN. *Pulp biology: from damage to repair [thesis]*. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

The study of the dental pulp can be extended from factors related to its aggression to those related to new concepts of regeneration. The purpose of this compilation of studies is to present the evolution of a research subject from damage to repair. Initially, studies will demonstrate the ability of dental procedures to generate heat and consequently affect the dental pulp. In sequence, studies will also present some effects of different pulp capping materials on dental pulp cells, related to the cytotoxicity of these materials and inflammatory potential. Finally, as the subject is emerging and gaining importance in the literature, this compilation will present data from recent studies on the role of dental pulp progenitor cells in the regeneration and repair of dental pulp, as well as an alternative for a scaffold that could be used for clinical translation of research in the field. In summary, dentists must be aware of these different aspects and that the knowledge on factors and mechanisms involved in the aggression of the dental pulp can also serve as basis for understanding aspects for regeneration.

Keywords: Dental pulp. Dental pulp pathology. Regeneration.

1 INTRODUÇÃO

As peculiaridades da polpa dentária como tecido tornam seu estudo fascinante e ao mesmo tempo intrigante. Estas características advêm do fato de que, de forma bastante objetiva, podemos considerar este tecido como a parte viva do órgão dentário, capaz de responder a estímulos e agressões.

Dentro deste contexto, ressalta-se que a polpa, isoladamente, não se diferencia muito de outros tecidos conjuntivos no que diz respeito à sua composição. Dentre os tipos celulares, conta com predominância de fibroblastos, diferentes tipos de fibras e outros componentes da matriz extracelular (Nanci, 2012). Na realidade, as peculiaridades deste tecido conjuntivo tão importante para a Odontologia estão relacionadas à existência de uma relação de interdependência entre a polpa dentária e a dentina, o que leva a muitos autores a chamarem este *duo* de complexo dentino-pulpar (Hargreaves, Berman, 2010). Este complexo se constitui com base nas proximidades embriológica, anatômica e funcional existentes entre os dois tecidos. Embriológica, uma vez que ambos se originam da papila dentária, compartilhando a mesma origem mesenquimal (Nanci, 2012); adicionalmente, pode-se afirmar que a polpa dentária somente é constituída, a partir da formação da primeira camada de dentina produzida pelos odontoblastos, que são células altamente diferenciadas da polpa dentária. Anatômica, por motivos óbvios de proximidade física, com ênfase na presença dos prolongamentos odontoblásticos no interior da dentina. E funcional, uma vez que todo o estímulo provocado sobre um dos tecidos terá repercussão no outro, seja na forma de sensibilidade ou na forma de produção adicional de dentina.

Com toda esta correlação, além da importância da

manutenção da vitalidade deste tecido no que diz respeito à própria longevidade do elemento dental – mais precisamente pela presença do alerta da dor bem como do aumento da resistência do dente – o estudo da polpa tem várias nuances que vão desde a existência de fatores envolvidos na agressão deste tecido, até as mais recentes possibilidades do estudo de sua regeneração.

No que diz respeito à agressão, inúmeros fatores podem estar envolvidos, a exemplo da presença do dente na cavidade bucal em oclusão, de traumas recebidos pelo paciente, da ocorrência de cáries e mesmo da atuação do profissional. Dentre estas possibilidades, iniciamos o desenvolvimento deste trabalho apresentando resultados de pesquisas quanto aos efeitos de procedimentos odontológicos na forma dos preparos cavitários e como estes podem elevar as temperaturas da câmara pulpar o que, de fato, afeta diretamente a probabilidade deste tecido sobreviver ou não (Zach, Cohen, 1965). Além disso, tendo em vista a gama de procedimentos e materiais restauradores, particularmente relacionados à presença de exposição pulpar, apresentamos também os diferentes efeitos de materiais capeadores sobre células da polpa dental, o que ainda é objeto de estudo bastante relevante na literatura (Modena et al., 2009).

Apesar do conhecimento dos fatores que estão envolvidos na agressão, recentemente, com a descoberta da presença de células tronco na polpa dentária, tanto de dentes permanentes (Gronthos et al., 2000) quanto de dentes decíduos (Miura et al., 2003), estudos relacionados ao papel destas células e às possibilidades de regeneração/neoformação da polpa dentária começaram a ganhar importância na última década. Assim, apresentaremos também trabalhos discutindo as novas possibilidades de regeneração, mostrando a influência de diferentes fatores como a origem e a seleção das células ou o uso de *scaffolds* para a engenharia do tecido pulpar. Além disso, é abordada a influência de fatores externos agressores sobre células tronco

da polpa dentária, de modo a promover o melhor entendimento do papel destas no processo de reparação.

Com isso, o objetivo do presente trabalho é o de compilar a produção científica deste autor no que diz respeito ao estudo da polpa dentária, seguindo a linha de evolução de aspectos envolvidos desde a agressão até o reparo e regeneração.

2 TRABALHOS SELECIONADOS

Artigo 1 - Cavalcanti BN, Seraidarian PI, Rode SM. Water flow in high-speed handpieces. Quintessence Int. 2005;36(5):361-4.

Artigo 2 - Cavalcanti BN, Otani C, Rode SM. High-speed cavity preparation techniques with different water flows. J Prosthet Dent. 2002;87(2):158-61.

Artigo 3 - Cavalcanti BN, Lage-Marques JL, Rode SM. Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces. J Prosthet Dent. 2003;90(5):447-51.

Artigo 4 - Martins GR, Cavalcanti BN, Rode SM. Increases in intrapulpal temperature during polymerization of composite resin. J Prosthet Dent. 2006;96(5):328-31.

Artigo 5 - Vanderlei AD, Borges AL, Cavalcanti BN, Rode SM. Ultrasonic versus high-speed cavity preparation: analysis of increases in pulpal temperature and time to complete preparation. J Prosthet Dent. 2008;100(2):107-9.

Artigo 6 - Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. Int Endod J. 2005;38(8):505-9.

Artigo 7 - Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. J Oral Sci. 2010;52(1):33-8.

Artigo 8 - Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. J Appl Oral Sci. 2009;17(5):527-32.

Artigo 9 - Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. J Dent Child (Chicago). 2009;76(3):194-8.

Artigo 10 - Cavalcanti BN, Rode SM, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. Braz Oral Res 2011;25(1):13-8.

Artigo 11 - Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Braz Dent J. 2011;22(1):3-13.

Artigo 12 - Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater. 2012;28(4):341-8.

Artigo 13 - Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. Dent Mater 2013;29(1):97-102.

Artigo 14 - Cavalcanti BN, Silva GO, Pavanello MB, Campos MS. Differentiation aspects of selected and unselected heterogenic dental pulp cell populations.

2.1 Artigo 1 - Cavalcanti BN, Seraidarian PI, Rode SM. Water flow in high-speed handpieces. Quintessence Int. 2005;36(5):361-4.

RESUMO

Objetivos: Este estudo mensurou o fluxo de água usado comumente em peças de mão de alta-rotação para avaliar a influência deste na geração de temperatura. Fluxos de água distintos foram avaliados entre turbinas com diferentes números de orifícios de refrigeração. **Métodos e materiais:** Duas amostras de água foram coletadas de cada peça de mão de alta-rotação em consultórios particulares e na Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. A primeira amostra foi coletada no fluxo de água habitual e a segunda coletada com o terminal aberto para fluxo máximo. As duas amostras foram coletadas em recipientes de vidro após 15 segundos de operação da turbina. Os recipientes foram pesados novamente e a diferença entre os pesos foi anotada para calcular o fluxo de água em mL/min e para posterior análise estatística. **Resultados:** O fluxo médio de água para 137 amostras foi 29,48 mL/min. O fluxo obtido foi de 42,38 mL/min para turbinas com um orifício de refrigeração; 34,31 mL/min para turbinas com dois orifícios; e 30,44 mL/min para turbinas com três orifícios. Existiram diferenças estatísticas entre turbinas com um e três orifícios de refrigeração (teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer com $P < ,05$). **Conclusão:** Peças de mão com um orifício de refrigeração distribuíram maior fluxo de água para as brocas que turbinas de alta rotação com mais orifícios.

Palavras-chave: Equipamento de alta-rotação. Preparo cavitário em alta-rotação. Patologia pulpar.

2.2 Artigo 2 - Cavalcanti BN, Otani C, Rode SM. High-speed cavity preparation techniques with different water flows. J Prosthet Dent. 2002;87(2):158-61.

RESUMO

Identificação do problema. Preparos cavitários e dentais geram calor devido à fricção causada pelos instrumentos rotatórios em tecidos dentais. Polpas dentárias não podem sobreviver a aumentos de temperatura superiores a 5,5°C. Objetivo. Este estudo avaliou a eficiência de três fluxos de água e duas técnicas de preparo dentário para determinar quais seriam seguros para uso. Materiais e métodos. Termopares foram colocados na câmara pulpar de 30 dentes bovinos e uma de duas técnicas de preparo foi utilizada: uma de baixa carga, intermitente e outra de alta carga sem intervalos. Fluxos de água de 0, 30, and 45 mL/min foram associados com cada técnica, totalizando 6 grupos diferentes. Os resultados foram então analisados por ANOVA 2-fatores ($P < ,05$). Resultados. Os aumentos de temperatura com a técnica de alta carga foram 16,40°C sem refrigeração (grupo I), 11,68°C com 30 mL/min de refrigeração por spray de água (grupo III), e 9,96°C com 45 mL/min de refrigeração (grupo V). Com a técnica de baixa carga, um aumento de 9,54°C foi resultado de não refrigeração (grupo II), aumento de 1,56°C com 30 mL/min de refrigeração com spray de ar-água (grupo IV), e uma redução de 0,04°C com refrigeração em 45 mL/min (grupo VI). A técnica de baixa carga foi associada a mudanças de temperatura mais adequadas. Conclusão. Os resultados deste estudo confirmam a necessidade de se utilizar uma técnica de baixa carga e refrigeração a água durante procedimentos de preparo cavitário e dental.

Palavras-chave: Equipamento de alta-rotação. Preparo cavitário em alta-rotação. Patologia pulpar.

2.3 Artigo 3 - Cavalcanti BN, Lage-Marques JL, Rode SM. Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces. J Prosthet Dent. 2003;90(5):447-51.

RESUMO

Identificação do problema. Durante o preparo dentário, tanto as turbinas de alta-rotação quanto os lasers geram calor, o qual, se não controlado, pode causar necrose pulpar. Objetivo. O objetivo deste estudo foi comparar os aumentos de temperatura gerados por uma turbina de alta-rotação odontológica com aqueles gerados por um instrumento relativamente novo, o laser de Er:YAG (erbium: yttrium-aluminum-garnet). Materiais and métodos. Trinta incisivos mandibulares bovinos foram reduzidos para uma espessura de dentina/esmalte de 2,5 mm. Preparos cavitários classe V foram realizados em uma profundidade de 2,0 mm, medidos por um espessímetro ou por uma marca nas brocas. Um termopar foi colocado dentro da câmara pulpar para determinar os aumentos de temperatura (°C). A análise foi feita nos seguintes grupos (n=10): Grupo I, turbina de alta-rotação sem refrigeração, Grupo II, turbina de alta-rotação com refrigeração a água (30 mL/min), e Grupo III, laser de Er:YAG sem contato (2,94 μ m a 350 mJ/10 Hz) com refrigeração a água (4,5 mL/min). Os aumentos de temperatura foram gravados por um computador conectado ao termopar. Dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste de comparações múltiplas de Dunn foi usado como teste post hoc ($\alpha = ,05$). Resultados. Os aumentos médios de temperatura foram de: 11,64°C ($\pm 4,35$) para o Grupo I, 0,96°C ($\pm 0,71$) para o Grupo II e 2,69°C ($\pm 1,12$) para o Grupo III. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos II e III; ambos diferiram do Grupo I significativamente (P=,000 e P=,002, respectivamente). Conclusão. Os preparos feitos com os instrumentos de alta rotação e laser geraram aumentos de temperatura similares quando refrigerados por água. A refrigeração a água foi essencial para evitar aumentos de temperatura destrutivos com os dois equipamentos.

Palavras-chave: Equipamento de alta-rotação. Preparo cavitário em alta-rotação. Laser. Patologia pulpar.

2.4 Artigo 4 - Martins GR, Cavalcanti BN, Rode SM. Increases in intrapulpal temperature during polymerization of composite resin. J Prosthet Dent. 2006;96(5):328-31.

RESUMO

Identificação do problema. A polimerização de resinas compostas pode gerar aumentos na temperatura intrapulpar que podem causar danos à polpa. O desenvolvimento de novos equipamentos de polimerização como o laser de argônio torna a avaliação dessas temperaturas importante. Objetivo. Este estudo comparou aumento de temperaturas geradas por um laser de argônio e uma lâmpada de luz halógena quando polimerizando um sistema adesivo e uma resina composta, e também procurou determinar se os dois tipos de luz para polimerização geram aumentos de temperatura abaixo do limite seguro de 5,5°C. Materiais e métodos. Termopares ligados a um sistema de leitura de temperaturas foram posicionados na câmara pulpar de 10 incisivos bovinos extraídos. Cavidades classe V foram preparadas, condicionadas e preenchidas com um sistema adesivo de um frasco (Single Bond) e uma resina composta (Z-100). Os grupos testados foram (n=5 para todos os grupos): lâmpada halógena para o sistema adesivo (HB); lâmpada halógena para a resina composta (HC); laser de argônio para o sistema adesivo (LB), e laser de argônio para a resina composta (LC). Os parâmetros de polimerização foram a lâmpada halógena operada a 600 mW/cm² por 40 segundos, a qual serviu como controle e o laser de argônio operado a 200 mW por 10 segundos. Os dados foram analisados por ANOVA 2 fatores (tipo de luz versus material) ($\alpha=,05$). Resultados. Os aumentos de temperatura médios foram 2,35°C (HB), 2,69°C (HC), 1,25°C (LB), e 1,5°C (LC). Diferenças significantes foram encontradas entre a luz halógena e o laser de argônio ($P=,002$), mas não entre o compósito e o sistema adesivo. Conclusões. O laser de argônio produziu aumentos de temperatura significativamente menores que a luz halógena, independente da espessura do material polimerizado.

Palavras-chave: Polimerização. Laser. Patologia pulpar.

2.5 Artigo 5 - Vanderlei AD, Borges AL, Cavalcanti BN, Rode SM. Ultrasonic versus high-speed cavity preparation: analysis of increases in pulpal temperature and time to complete preparation. J Prosthet Dent. 2008;100(2):107-9.

RESUMO

Identificação do problema. O uso de pontas ultrassônicas se tornou uma alternativa para o preparo cavitário. Entretanto, há dúvidas sobre este tipo de equipamento, particularmente no que diz respeito às temperaturas intrapulpare e tempo de preparo. Objetivo: A proposta deste estudo foi a de analisar os aumentos de temperatura gerados por preparo cavitário ultrassônico com pontas de deposição química de vapor (CVD) em comparação a preparos feitos com uma turbina de alta rotação e ponta diamantada. O tempo levado para completar o preparo com cada sistema também foi avaliado. Materiais e métodos: Termopares foram posicionadas nas câmaras pulpares de 20 terceiros molares humanos extraídos. Cavidades tipo slot (3 x 3 x 2 mm) foram preparadas nas superfícies vestibular e lingual de cada dente. Os grupos testados foram: preparo em alta-rotação com pontas diamantadas (n=20) e preparo ultrassônico com pontas CVD (n=20). Durante os preparos, os aumentos de temperatura intrapulpar e o tempo levado no preparo foram anotados e analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas (alfa=,05). Resultados: Os aumentos médios de temperatura pulpar foram 4,3 °C para o preparo em alta-rotação e 3,8 °C para o preparo ultrassônico, os quais foram semelhantes estatisticamente (P=,052). Entretanto, diferenças significantes (P<,001) foram encontradas para o tempo levado no preparo (3,3 minutos para a broca em alta-rotação e 13,77 minutos para o equipamento de ultrassom). Conclusões: As temperaturas intrapulpare produzidas durante o preparo cavitário com pontas ultrassônicas e turbina de alta-rotação foram similares. Entretanto, o uso do equipamento ultrassônico requereu 4 vezes mais tempo para o término de uma cavidade.

Palavras-chave: Equipamento de alta-rotação. Preparo cavitário em alta-rotação. Patologia pulpar. Ultrassom.

2.6 Artigo 6 - Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. Int Endod J. 2005;38(8):505-9.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos citotóxicos de substâncias liberadas ou dissolvidas por materiais de capeamento pulpar em fibroblastos de polpa humanos. Metodologia: As substâncias foram aplicadas sobre as culturas na forma de meios condicionados. Os grupos experimentais foram: GI (controle; n = 24) - culturas tratadas com meio fresco; GII (n = 24) - culturas tratadas com cimento de hidróxido de cálcio; GIII (n = 24) - culturas tratadas com resina adesiva e GIV (n = 24) - culturas tratadas com ácido ortofosfórico a 37%. Os meios de cultura foram condicionados colocando-se os materiais frescos em contato por 1 h. A análise de citotoxicidade foi feita usando ensaio de exclusão por corante azul de Trypan em tempos de 0, 6, 12 e 24 h para ensaio de viabilidade e 1, 3, 5 e 7 dias para ensaio de sobrevivência. Os dados foram tratados por ANOVA ($P < 0,05$) e teste de Tukey ($P < 0,05$). Resultados: GI e II apresentaram viabilidade e crescimento celulares similares. GIII e IV exibiram porcentagens estatisticamente menores de viabilidade celular: GIV somente no tempo experimental de 0 h, enquanto no GIII esta viabilidade reduziu expressivamente alcançando valores de 10% em 12 h. O crescimento celular foi prejudicado somente nas culturas do GIII. Conclusões: As substâncias dissolvidas do sistema adesivo foram citotóxicas para fibroblastos de polpa humana em cultura, ao passo que substâncias liberadas do hidróxido de cálcio foram biocompatíveis.

Palavras-chave: Cultura celular. Capeamento da polpa dental. Hidróxido de cálcio. Polpa dental.

2.7 Artigo 7 - Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. J Oral Sci. 2010;52(1):33-8.

RESUMO

A terapia laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido descrita como capaz de promover reparo tecidual e pode, portanto, ser útil no capeamento pulpar após trauma. Nós avaliamos os efeitos de um laser diodo de baixa intensidade ($\lambda = 680 \text{ nm}$) e substâncias para o capeamento da polpa dental na proliferação celular. Hidróxido de cálcio e resina adesiva foram aplicadas como meios condicionados sobre as culturas. Metade das amostras recebeu irradiação com laser diodo, numa fluência de 4 J/cm^2 por 60 s. Usando um hemocitômetro, as células foram contadas em tempos de 1, 3, 5, e 7 dias e os dados foram analisados por ANOVA. Todas as culturas exibiram crescimento contínuo, exceto aquelas tratadas com resina adesiva. Quando comparadas com os outros grupos, a proliferação foi significativamente baixa em culturas tratadas com o adesivo; também foi significativamente baixa em culturas tratadas com o hidróxido de cálcio, se comparada ao grupo controle. Quando combinada com materiais de capeamento pulpar, a LLLT não teve efeitos na proliferação de células L-929.

Palavras-chave: Cultura celular. Capeamento da polpa dental. Hidróxido de cálcio. Laser. Polpa dental.

2.8 Artigo 8 - Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. J Appl Oral Sci. 2009;17(5):527-32.

RESUMO

Depois da agressão à polpa dental, algumas células produzem citocinas para iniciar e controlar o processo inflamatório. Dentre estas citocinas, a interleucina-1 beta (IL-1beta) e a interleucina-8 (IL-8) são importantes. Objetivo: A proposta desse trabalho foi analisar a localização, distribuição e concentração destas citocinas em polpas saudáveis e inflamadas. Material e métodos: Vinte polpas, obtidas de terceiros molares saudáveis (n=10) e de pulpectomias (n=10) foram usadas neste estudo, com metade de cada grupo processado para imunohistoquímica e metade para extração de proteínas e ELISA. Fibroblastos obtidos de polpas dentárias saudáveis, estimulados ou não por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, de modo a simular agressão às culturas celulares, foram usados também e analisados por ELISA para IL-1 beta e IL-8 como informação complementar. Dados obtidos na imunohistoquímica foram analisados qualitativamente. Dados obtidos do ELISA (tecidos e células) foram tratados estatisticamente pelo teste t ($p < 0,05$). Resultados: Imunohistoquimicamente, observou-se que polpas inflamadas foram fortemente marcadas para as duas citocinas nas células inflamatórias, enquanto polpas saudáveis não tiveram imunomarcagem. ELISA dos tecidos confirmou a maior presença das citocinas nos tecidos inflamados, para as duas citocinas. Adicionalmente, os fibroblastos estimulados pelo LPS também produziram mais citocinas que as células controle. Conclusões: Pode-se concluir que polpas inflamadas apresentam maiores quantidades de IL-1beta e IL-8 que polpas saudáveis e que fibroblastos pulpares estimulados por LPS bacteriano produzem níveis maiores de IL-1 beta e IL-8 que o grupo controle.

Palavras-chave: Citocinas. Inflamação. Polpa dental.

2.9 Artigo 9 - Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. J Dent Child (Chicago). 2009;76(3):194-8.

RESUMO

Objetivo: Depois da exposição do tecido pulpar, citocinas são produzidas para regular a resposta inflamatória. A literatura odontológica, entretanto, tem poucas informações sobre a participação de fibroblastos de dentes decíduos neste processo. A proposta deste estudo foi verificar a participação de fibroblastos pulpares de dentes decíduos no processo inflamatório, através da avaliação da produção de interleucina-1 beta (IL-1 beta) e interleucina 8 (IL-8) destas células. Métodos: Agentes de pulpotomia foram aplicados como meios condicionados sobre as culturas celulares nos seguintes grupos: (1) controle negativo; (2) controle positivo (Lipopolissacarídeo - LPS); (3) hidróxido de cálcio (pó); (4) agregado de trióxidos minerais (MTA); (5) resina adesiva; e (6) formocresol. Depois de 24 horas em contato com as células, o meio condicionado foi removido, as proteínas extraídas das células e a IL-1 beta e IL-8 quantificadas por ELISA (Enzyme linked immuno-sorbent assay). Resultados: Os dados foram analisados por ANOVA ($P < 0,05$) e teste de Tukey ($P < 0,05$). Observou-se que o hidróxido de cálcio estimulou a produção de IL-1 beta, sem estimular IL-8. Ao contrário, a resina adesiva e o formocresol estimularam a produção de IL-8, sem estimular IL-1 beta. O MTA estimulou as duas citocinas em um nível intermediário, quando comparado aos outros materiais. Conclusão: Os fibroblastos da polpa de dentes decíduos podem responder imunologicamente, e materiais de capeamento diferentes podem ajudar neste processo.

Palavras-chave: Citocinas. Fibroblasto. Capeamento da polpa dental.

2.10 Artigo 10 - Cavalcanti BN, Rode SM, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. Braz Oral Res 2011;25(1):13-8.

RESUMO

O reparo pulpar é um processo complexo cujos mecanismos ainda não estão completamente compreendidos. As primeiras células imunes a atingir a polpa agredida são neutrófilos, que têm papel importante na liberação de citocinas e na fagocitose. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito de diferentes materiais de capeamento pulpar na secreção de interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-8 (IL-8), por neutrófilos humanos. Os neutrófilos foram obtidos do sangue de três doadores saudáveis. Os grupos experimentais foram hidróxido de cálcio [Ca(OH) $_2$], um sistema adesivo (Single Bond), e o agregado de trióxidos minerais (MTA). Células não tratadas foram usadas como controle. Câmaras *transwell* foram usadas para realização de ensaios simulando a quimiotaxia. Os materiais de capeamento foram colocados na câmara inferior e os neutrófilos na câmara superior. As células foram contadas e o meio de cultura analisado por ELISA para detecção e quantificação de IL-1 β e IL-8. Dados foram comparados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). A secreção de IL-8 foi significativamente maior para todos os grupos, quando comparados ao controle ($p < 0,05$). O sistema adesivo mostrou mais IL-8 que o grupo do MTA ($p < 0,05$). A secreção de IL-1 β foi significativamente maior somente no grupo de MTA ($p < 0,001$). Concluiu-se que somente o MTA é capaz de induzir a secreção IL-1 β , e que todos os materiais testados aumentaram a produção de IL-8. Estes resultados, combinados com as outras vantagens biológicas do MTA indicam que este pode ser considerado o material de escolha para capeamento pulpar.

Palavras-chave: Capeamento da polpa dental. Interleucina-1. Interleucina-8.

2.11 Artigo 11 - Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Braz Dent J. 2011;22(1):3-13.

RESUMO

A polpa dentária é um tecido mesenquimal altamente especializado que possui capacidade de regeneração limitada devido ao seu arranjo anatômico e natureza pós-mitótica dos odontoblastos. A remoção completa do tecido e o preenchimento com um material artificial causam a perda de uma quantidade significativa de dentina, deixando o dente enfraquecido como uma sequela para toda a vida. Entretanto, a endodontia regenerativa é um campo emergente na moderna engenharia tecidual que tem mostrado resultados promissores usando células tronco associadas à *scaffolds* e moléculas responsivas. Assim, este artigo revisa os avanços mais recentes para regenerar o tecido pulpar, baseando-se em princípios de engenharia tecidual e provendo novas informações ao leitor sobre os diferentes aspectos envolvidos na engenharia tecidual. Aqui, nós especulamos que a busca por uma combinação ideal de células, *scaffolds* e fatores morfogenéticos para a engenharia do tecido pulpar podem ser estendidos aos anos futuros e resultar em avanços significantes em outras áreas da pesquisa dental e craniofacial. Os achados coletados nesta revisão de literatura mostram que nós estamos agora num estágio no qual a engenharia de um tecido complexo não é mais um objetivo inatingível e que a próxima década certamente será um período excitante para a pesquisa dental e craniofacial.

Palavras-chave: Angiogênese. Células-tronco. Endodontia.
Odontoblastos.

2.12 Artigo 12 - Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater. 2012;28(4):341-8.

RESUMO

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que combina princípios de engenharia, materiais e ciências biológicas em direção ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas e substitutos biológicos que restauram, mantêm, substituem ou melhoram funções biológicas. A associação de biomateriais, células tronco, fatores de crescimento tem permitido o desenvolvimento de novas oportunidades de tratamento na maioria das áreas biomédicas, incluindo a Odontologia. O objetivo deste trabalho é apresentar os princípios que guiam a engenharia tecidual e o cenário atual, os desafios e as perspectivas para esta área da Odontologia. Significância: O crescimento da engenharia tecidual como um campo de pesquisa tem viabilizado um novo conjunto de estratégias terapêuticas para aplicações biomédicas. De fato, a engenharia tecidual pode levar a novas estratégias para o cuidado clínico de pacientes com necessidades dentais e craniofaciais no futuro.

Palavras-chave: Células-tronco. Engenharia tecidual. Odontoblastos.

2.13 Artigo 13 - Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. Dent Mater 2013;29(1):97-102.

RESUMO

Objetivos: A translação clínica da Endodontia Regenerativa baseada em células tronco demanda o desenvolvimento de *scaffolds* injetáveis adequados. Puramatrix™ é um hidrogel autopolimerizável de peptídeos que polimeriza instantaneamente em condições fisiológicas normais. Aqui, nós avaliamos a compatibilidade de Puramatrix™ com o crescimento e diferenciação de células tronco da polpa dentária (DPSC). **Métodos:** DPSC foram cultivadas em concentrações de 0,05-0,25% de Puramatrix™. A viabilidade celular foi medida colorimetricamente usando o ensaio de WST-1. A morfologia celular foi observada em modelagem 3D usando microscopia confocal. Adicionalmente, usamos o modelo de “fatias dentais humanas” com a Puramatrix™ para verificar a diferenciação de DPSC em células tipo odontoblasto, avaliando a expressão de DSPP e DMP-1. **Resultados:** As DPSC sobreviveram e proliferaram na Puramatrix™ por pelo menos três semanas em cultura. A microscopia confocal revelou que as células em Puramatrix™ apresentaram características de células saudáveis, e algumas células exibiram alongamentos do citoplasma. Notavelmente, depois de 21 dias nas fatias dentais contendo Puramatrix™, as DPSC expressaram DMP-1 e DSPP, marcadores característicos da diferenciação odontoblástica. **Significância:** Coletivamente, estes dados sugerem que hidrogéis autopolimerizáveis podem ser *scaffolds* injetáveis adequados para a Endodontia Regenerativa baseada em células tronco.

Palavras-chave: Células-tronco. Endodontia regenerativa. Engenharia tecidual. Odontoblastos. Polpa dentária.

2.14 Artigo 14 - Cavalcanti BN, Silva GO, Pavanello MB, Campos MS. Differentiation aspects of selected and unselected heterogenic dental pulp cell populations*

RESUMO

O advento das células tronco trouxe novas teorias sobre o papel destas células no processo de reparo da polpa. Pesquisas têm mostrado que tanto populações não selecionadas (uDPC) quanto populações selecionadas de células “tronco” (sDPC) podem se diferenciar em odontoblastos, participando no reparo pulpar. A proposta deste estudo foi a de investigar se uDPC e sDPC, obtidas de um único terceiro molar mas selecionadas de forma diferente, podem se diferenciar em odontoblastos quando estimuladas por BMP-2. Métodos: As duas linhagens celulares foram inicialmente caracterizadas quanto à expressão de marcadores de células mesenquimais (CD73, CD90 and CD105) e potencial de diferenciação (osteogênica, condrogênica e adipogênica). A diferenciação odontogênica foi observada pela expressão gênica de DMP-1 e DSPP e pela produção de nódulos mineralizados e atividade de fosfatase alcalina. Resultados: Observou-se que as duas linhagens apresentam potencial de diferenciação odontogênica, sendo que as uDPC foram funcionalmente menos ativas que as sDPC. No nível molecular, as duas linhagens expressaram DMP-1 e DSPP, sempre em níveis mais baixos para as uDPC. As uDPC não apresentaram potencial de diferenciação multilinhagem e não expressaram os marcadores mesenquimais de forma consistente. Conclusão: Conclui-se que o reparo da polpa pode ser mediado pelas células tronco; entretanto, populações heterogêneas não selecionadas também seriam capazes de responder a estímulos, se diferenciando em odontoblastos e produzindo tecido mineralizado.

Palavras-chave: Células-tronco. Diferenciação. Polpa dentária.

* Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico: Journal of Endodontics (Print version ISSN 0099-2399).

**Differentiation aspects of selected and unselected heterogenic dental
pulp cell populations**

Bruno Neves Cavalcanti¹

Gleyce Oliveira Silva¹

Marcella Batista Pavanello¹

Marcia Sampaio Campos²

¹ Department of Restorative Dentistry, Institute of Science and Technology, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Sao Jose dos Campos, Brazil

² School of Dentistry, University of Vale do Paraiba, Sao Jose dos Campos, Brazil

- 1) **Short title:** Differentiation of heterogenic dental pulp cells
- 2) **Key words:** Dental pulp; Cell differentiation; Stem cells
- 3) **Words in the abstract:** 204
- 4) **Words in the abstract and the text:** 2515
- 5) **Tables and figures:** 1 table and 3 figures
- 6) **References:** 21

Corresponding author:

Bruno Neves Cavalcanti, DDS, MS, PhD

Assistant Professor – Endodontics

Dept. Restorative Dentistry – Institute of Science and Technology

Univ. Estadual Paulista

Av. Eng. Francisco Jose Longo, 777

Sao Jose dos Campos, SP, 12245-000

Brazil

Phone: (5512) 39479077

FAX: (5512) 39479010

e-mail: bruno.cavalcanti@fosjc.unesp.br

Introduction

The maintenance of pulp vitality after pulp capping or pulpotomy is essential to achieve repair, generally observed by the production of a dentin barrier (1). This process demand the differentiation of cells and can be induced by pulp capping materials, some of them used with high level of success, such as calcium hydroxide or MTA (1,2). It is reported that pulp-capping procedures with calcium hydroxide, for example, can stimulate the mobilization of molecules from dentin, which can induce cell differentiation and consequent repair (3). Among these molecules, BMP-2 seems to play a key role, given its cell differentiation potential (4) and specific property in the odontogenic differentiation when released from dentin (5,6).

The advent of dental pulp stem cells, selected by enzymatic digestion/cell straining or surface markers, has brought new insights on the mechanisms of pulp defense and regeneration, particularly on how these cells may participate on the tertiary/reparative dentin formation (7). Understanding these mechanisms may be one of the keys for successful dental pulp tissue engineering, by odontoblastic differentiation and control of mineralization processes (8). Independently of the location of these cells in the pulp, they are supposedly recruited to the aggression area, in order to differentiate and start the repair process (9).

Despite all this knowledge on the participation of dental pulp stem cells in the repair, the literature has examples on the fact that even unselected dental pulp cell populations can also be active in the differentiation process (10-12). These studies may be an indication that part of the repair process and consequent dentin formation is not totally dependent on the stem cell niches or, more likely, that stem cells present in the heterogenic populations may have an important role. Based on these data and on the fact that there are no studies comparing unselected pulp cell populations (uDPC) and selected dental pulp “stem” cells (sDPC), we have hypothesized that both uDPC and sDPC can differentiate into odontoblasts and be functionally active regarding the mineralization process.

The purpose of this study was to investigate if uDPC and sDPC, obtained from a single third molar but differentially selected, may incur in odontoblastic differentiation when stimulated by BMP-2. In addition, both cell lines were characterized regarding their stem cell potential.

Materials and Methods

In general, all methods used in this study are already established and are valid for the purposes. All experiments were conducted under approval of our Institutional Ethics Board (#46420), and were repeated independently for 3 times, in order to assure reproducibility. Both cell types used in this study were obtained from a single extracted third molar (from

a 18 years-old patient). The pulp tissue was split in two equal parts, discarding the apical portion of the tissue. To obtain the unselected pulp cell population (uDPC), one of the fragments of the tissue was minced and put on a cell culture dish after being treated for 10 minutes with Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fragments were left on the dish and the media (DMEM supplemented by 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution) was changed every other day until the explant of cells was observed. Cells were then transferred to a culture flask.

The other pulp fragment was used to select dental pulp “stem” cells (sDPC) as previously described, with slight modifications in the protocol (13). Briefly, the tissue fragment was minced and enzymatically digested in a solution of 3 mg/ml collagenase type I (Worthington Biochem, Lakewood, NJ, USA) and 4 mg/ml dispase (Worthington Biochem) for 1 h at 37°C. Cells were passed through a 70 µm cell strainer (Ref. 352350, BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA) and the suspension was diluted 10 times in culture media (MEM-alpha, supplemented with 20% HI-FBS, 100 µM L-ascorbic acid 2-phosphate, 2 mM L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic solution) in order to seed the cells in 24-well plates. After cell adhesion to the plates, the wells were screened and only the wells containing one single cell were selected for follow-up (Figure 1A). Cells selected for the experiments were those obtained from the most proliferative cell colony, from one single well.

Characterization of cell lines

To assess cell growth rate, cells were seeded into wells of a 96-well plate (3,000 cells per well), using three wells for each time point. After 24, 48 and 72 hours, cells were then fixed with a 10% trichloroacetic acid solution and incubated for one hour (4°C). The cell proteins were then stained by the addition of a 0.4% sulforhodamine B (SRB) solution in acetic acid, incubated for 1 hour at room temperature. The excess inbound dye was removed with 1% acetic acid washing, plates were dried and the SRB was solubilized in 10 mmol/L Tris-base. The optical density was read in a microplate reader at 560 nm and the results were normalized by the controls (day 1 cells). Data were statistically compared by two way ANOVA ($p < 0.05$).

Adipogenesis was induced by plating 2×10^5 cells in 6-well plates and treating them with cell culture media containing human recombinant insulin, L-glutamine, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine and indomethacin (PT-3004, Lonza, Wakersville, MD, USA). Cells were induced for 3 days, followed by 3 days of maintenance in regular media (no supplements). After 3 cycles (18 days), cells were washed with PBS, fixed in 10% formalin (60 minutes at RT), washed and permeabilized with 60% 2-propanol for 5 minutes. Cells were then stained with Oil Red-O solution (0.3% in 99% 2-propanol) for 5 minutes at RT, followed by

removal of the dye and addition of water. Lipids were stained in red, observed under phase microscope.

Chondrogenesis was performed on cell pellets containing approximately 2×10^5 cells in 500 μ l of media, cultured in 15 ml tubes (round bottom). Pellets were washed and treated with cell culture media supplemented by dexamethasone, ascorbate, sodium pyruvate, proline, L-glutamine and 10ng/ml of TGF β -3 (PT-3003, Lonza). Culture media was replaced every 3 days and pellets were collected after 28 days, embedded in paraffin and processed for Alcian Blue staining, to identify glycosaminoglycans.

Osteogenesis was induced on monolayer cell cultures. 3×10^4 cells were plated in 6-well plates and induced by culture media containing dexamethasone, L-glutamine, ascorbate and β -glycerolphosphate, during 14 days, replacing the media every other day. Calcium deposits were observed by Alizarin Red Staining. Briefly, cells were washed in PBS, fixed in 10% formalin (pH 7.4) for 1 hour at RT, washed again twice and stained with alizarin red for 20 minutes. Cells were washed and observed under phase microscope to detect mineralized nodules (in red).

Expression of surface receptors was observed by Western Blotting. Protein (20 μ g) was collected in RIPA Buffer on ice (plus 1% EDTA and 1% protease inhibitor, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Primary antibodies were: mouse anti-human

CD73 (NBP1-60135, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), mouse anti-human CD90 (NBP1-42068, Novus Biologicals), mouse anti-human CD105 (NB100-60135, Novus Biologicals) and mouse anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH (MAB374, Millipore, Billerica, MA, USA). Immunoreactive proteins were visualized by WesternDot 625 fluorescent substrate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Functional and molecular effects of BMP-2 on uDPC and sDPC

Functional mineralization was observed by both alkaline phosphatase activity and alizarin red staining. The first one was assessed by using p-Nitrophenyl phosphate (*p*NPP) as the colorimetric substrate (#83369, Abcam, Cambridge, UK). After incubation with 50ng/ml of BMP-2 (355-BM, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for seven days, cells lysates collected in the kit lysis buffer and added (50µl) in triplicate, in a 96-well plate. The substrate was added on each well and standards were prepared for reading in a microplate reader at 405 nm. Data was tabled as nmol of activity per well.

Detection of mineralized nodules was performed as described above for the osteogenic assay. In this case, both uDPC and sDPC were plated in 6-well plates (3×10^4 cells per well). After adhesion, monolayers were treated with cell culture media containing 50ng/ml of BMP-2,

replaced every 3 days, for 14 days. Alizarin Red staining was made after 1, 7 and 14 days, to identify the mineralization activity.

In addition, to the functional data, cell differentiation was assessed by RT-PCR for DSPP and DMP-1. Cells were plated in 35 mm dishes and serum starved overnight after attachment. Cells were then treated with 50 ng/ml of BMP-2. After 7 days, the RNA was collected by Trizol® and 0.2 µg was used in a reverse transcriptase polymerase chain reaction (SuperScript™ III Platinum®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The human-specific sense and anti-sense primers were designed according to published cDNA sequences of GenBank (Table 1). The following PCR cycles were used: denaturation, 94° C for 45s; annealing, 57° C for 45s; and extension, 72° C for 60s, for 35 cycles, then 72° C for 5 min and held at 4° C. The PCR products were separated by using 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Safe (Invitrogen); digital images were taken using blue light background.

Results

Characterization of cell lines

As expected, the selection protocol was effective in isolating cells with “stem” potential. This was confirmed by the faster growing rate, multilineage differentiation and expression of stem cell markers. In figure 1B, it can be observed that sDPC had faster population growth, when compared to uDPC, with statistical differences in 72 hours. Regarding the

multilineage differentiation, sDPC were able to differentiate in all three tissues, while the uDPC were only able to respond to the osteogenic assay (Figure 2A). The expression of surface markers was also differential between sDPC and uDPC: only the selected cells expressed CD73 and CD105, and the amount of CD90 expressed by uDPC was lower than that observed for sDPC (Figure 2B).

Functional and molecular effects of BMP-2 on mineralization

Functionally, both cell lines presented differentiation potential when induced by 50ng/ml of BMP-2. The alkaline phosphatase activity was significantly increased for both cell lines, with statistical differences between the treated uDPC and sDPC (Figure 3A). Qualitative analysis of the mineralized nodule formation presented the same pattern, with more intense staining for the treated sDPC, in all experimental periods (Figure 3B). In the molecular level, both cells expressed the odontoblast differentiation markers (DSPP and DMP-1), again more significant for the sDPC (Figure 3C).

Discussion

To our current knowledge, this is the first study to determine differentiation potential from selected and unselected dental pulp cells, both obtained from the same tooth. In general, it was observed that both lines have odontogenic potential; however, only the enzymatic digested,

strained and clonogenic line presented the multilineage potential and expressed mesenchymal stem cell markers consistently. In addition, odontogenic differentiation was observed for both cell lines, but with more expressive data for the sDPC.

Gronthos et al. (13), were the first to identify the stem cell population in the dental pulp. They have established a method to harvest the cells by enzymatic digestion, followed by cell straining, which has proved to be effective, with similar results to outgrowing methods (14). Recently, many studies have suggested the use of flow cytometry to select these cells, using a specific marker, such as Stro-1 (15,16) or others (17). These methods also seemed to be effective, as these studies have achieved stemness potential with the selected cells. However, one limitation for all of these studies is the absence of consensus regarding which is the specific marker for DPSC (18). Of course, these cells are mesenchymal stem cells and should express markers consistently with them, being expected to express CD73, CD90, CD105 and not express CD34, CD45 and HLA-DR (19). Thus, independently of the selection method used, it is clear that the definition of “stem cell” populations in the pulp is based in more than one characterization method. In our study, we were able to characterize the cells by using a single cell clonogenic selection, multilineage differentiation and expression of CD73, CD90 and CD105. With this data, we proved the effectiveness of the selection, since

cells from the same tissue and simply explanted did not present the same characteristics.

In the context of cell selection, it is important to emphasize that the unselected cells also presented some differentiation potential. Although they did not express CD73 and CD105, did not present multilineage differentiation and had a slower growth rate, they were able to achieve odontogenic potential when treated by BMP-2 (4,6). This is in agreement with the literature published previous to the advent of dental pulp stem cells, where cells were able to express odontogenic markers and be functionally active when treated by this protein (10-12). Obviously, this potential was much more evident for the selected population, what may suggest the stemness of a small portion of the cells in the pulp tissue. Our study supports this statement, since both populations came from the same single tissue. The only difference is that unselected cells may not express the stemness markers consistently, maybe because of the small number of cells in the total population.

Clinically, the importance of this study is related to the choice between conservative and radical treatments, being confirmatory on the presence of “stem cells” throughout the tissue (20). One data is that we have removed the apical portion of the tissue before processing for cell selection. Thus, mediation of pulp repair may be more dependent on the cells present in the tissue than from cells in the remaining apical papilla. One limitation would be on how the clinician could establish if the

damaged tissue has a reserve of “stem cells”, which would be enough to promote repair. It is important to emphasize that donor age may not be a reliable way to define repair potential of the pulp, since DPSC were isolated successfully from patient up to 67 years old (21).

In conclusion, we observed that pulp repair may be mainly mediated by dental pulp “stem cells”; however, unselected heterogenic pulp cell populations are also capable to respond to stimuli, differentiating in odontoblasts and producing mineralized tissue.

References

1. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod* 2010;36:1042-7.
2. Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L; Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry (NWP). Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *J Dent Res* 2013;92:16S-22S.
3. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006;27:2865-73.
4. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003;21:1025-32.
5. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentine-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 2010;89:603-8.
6. Yang W, Harris MA, Cui Y, Mishina Y, Harris SE, Gluhak-Heinrich J. Bmp2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. *J Dent Res* 2012;91:58-64.
7. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007;13:151-7.
8. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater* 2012;28:341-8.

9. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR. Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 2012;318:2397-406.
10. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod* 2004;30:205-8.
11. Min KS, Yang SH, Kim EC. The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 2009;35:847-51.
12. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012;38:1220-6.
13. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-30.
14. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 2013;353:65-78.
15. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007;13:767-73.
16. Yang X, van den Dolder J, Walboomers XF, Zhang W, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:66-73.
17. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One* 2012;7:e39885.
18. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol* 2012;57:1439-58.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
20. Kaneko T, Arayatrakoollikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-

associated markers in rat dental pulp. Cell Tissue Res 2013;351:425-32.

21. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, Sivoilella S, Zavan B. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. PLoS One 2012;7:e49146.

Table 1: Differentiation markers.

Gene	GenBank cDNA sequence Sense/ Antisense		base pairs
GAPDH	5'gaccccttcattgacctcaact3'	5'caccaccttcttgatgtcatc3'	683
DSPP	5'gaccccttcattgacctcaact3'	5'tgccatttgctgtgatgttt3'	181
DMP-1	5'caggagcacaggaaaaggag3'	5'ctggtggtatcttgggcact3'	213

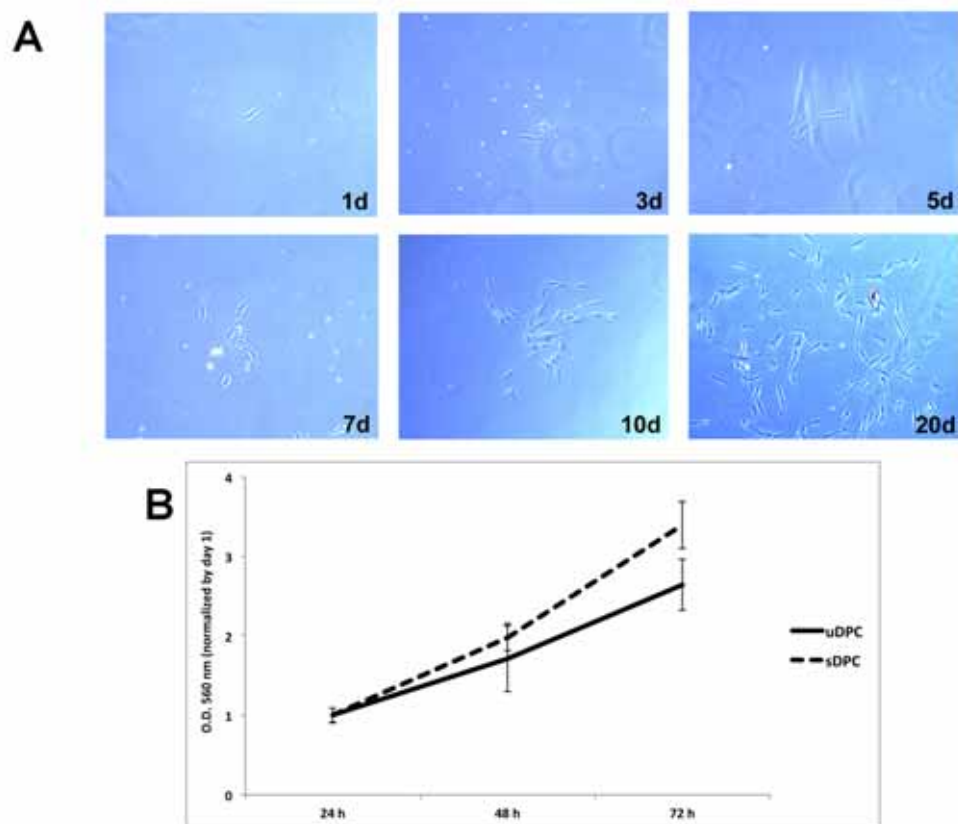


Figure 1 – Characterization of uDPC and sDPC. A) Colony formation ability from sDPC. B) Cell growth for uDPC and sDPC. Note the faster growth rate for sDPC, with statistical differences in day 3 (* $p < 0.05$).

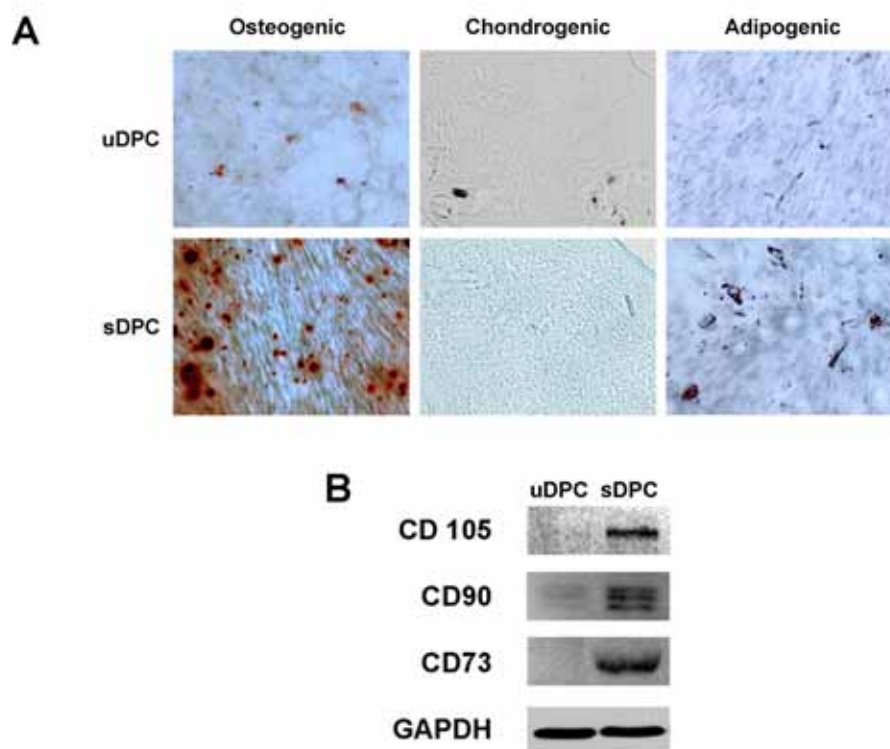


Figure 2 – Stemness of uDPC and sDPC – A) Osteogenic differentiation (Alizarin Red staining under phase microscopy; 40x); Chondrogenic Osteogenic differentiation (Alcian Blue staining, 40x) and Adipogenic Osteogenic differentiation (Oil Red O staining under phase microscopy, 100x). Note slight osteogenic ability from uDPC, and no chondrogenic or adipogenic potential from this population. sDPC were able to differentiate into the three tissues. B) Protein expression for CD73, CD90 and CD105, showing the clear differences in the expression patterns for uDPC and sDPC.

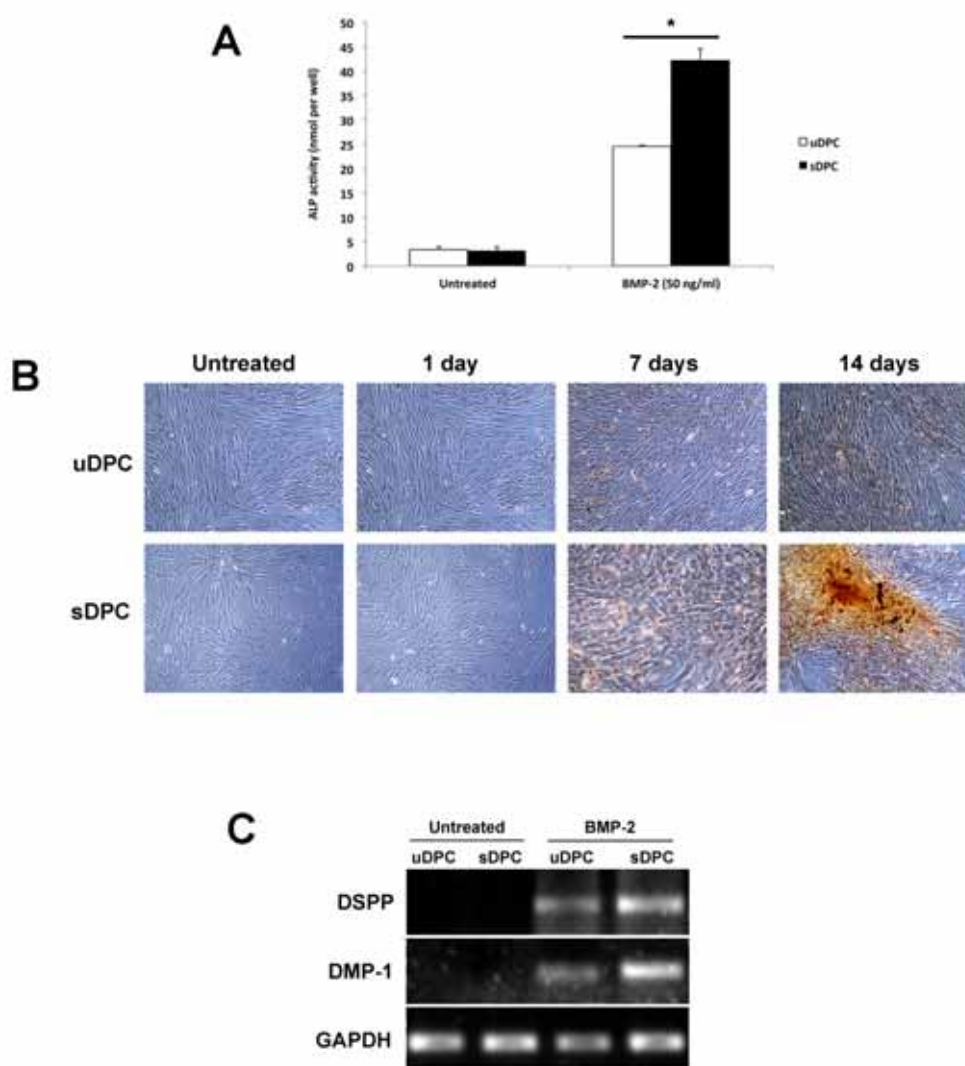


Figure 3 – Functional and molecular effects of BMP-2 on uDPC and sDPC. A) Alkaline phosphatase activity (nmol/well) on untreated and BMP-2 treated uDPC and sDPC, after 7 days. Statistical differences are marked by *. B) Alizarin red staining after 1, 7 and 14 days of BMP-2 treatment. C) Expression of DSPP and DMP-1, odontoblast differentiation markers, on both cell lines, after 7 days of BMP-2 treatment.

4 DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, o estudo da polpa dentária tem nuances que vão desde os aspectos relacionados à agressão deste tecido, até àqueles ligados a novos conceitos de regeneração e reparação. Neste trabalho, procurou-se apresentar a evolução de uma linha de pesquisa baseada neste tema, abordando principalmente fatores de agressão relacionados à geração de calor em preparos cavitários; o papel de materiais capeadores e sua influência sobre células da polpa; e, finalmente, os aspectos envolvidos na regeneração/reparação da polpa com os conceitos de engenharia tecidual.

Neste contexto, a linha de pesquisa iniciou-se com o entendimento do papel do fluxo de água usado em preparos com alta-rotação. Apesar de não ser um tema exatamente novo na literatura, com estudos datando da década de 50 (Peyton, 1958), a preocupação com a capacidade de geração de calor e das técnicas envolvidas se fazia necessária, uma vez que, em 1965, num trabalho clássico utilizando macacos, Zach e Cohen estabeleceram uma correlação entre as temperaturas da câmara pulpar e o percentual de polpas necróticas. Neste estudo, os autores observaram que aumentos de temperatura acima de 5,5 °C (ou 11 °F como publicado) seriam suficientes para provocar necrose em 40% dos tecidos estudados, fato bastante relevante e que, por si só, já contribui para a definição de um limite no que diz respeito à geração de calor em procedimentos restauradores. Desta forma, minha linha de pesquisa começou com um trabalho de iniciação científica, que buscava aferir qual fluxo de água estava sendo utilizado por profissionais em procedimentos com alta rotação (Cavalcanti et al., 2005a). Neste trabalho inicial, foram observados valores máximos de até

45 ml/min de água, com uma média de 30 ml/min nas 137 turbinas avaliadas. Na literatura, observa-se que diferentes estudos utilizaram valores de fluxo variando de 1,5 ml/min (Peyton, 1958) a 50 ml/min (Lauer et al., 1990). Em nosso trabalho, verificamos que os valores utilizados na realidade clínica estavam dentro do que já havia sido utilizado em estudos prévios de outros grupos. Por esse motivo, optamos por utilizar os valores obtidos em nosso primeiro trabalho como referência para o estudo subsequente (Cavalcanti et al., 2002).

Nesse estudo seguinte, além da avaliação da capacidade do fluxo de água em reduzir os aumentos de temperatura na câmara pulpar, também estudamos a influência das técnicas de preparo sobre a geração de calor. Sabe-se que técnicas com alta pressão ou que removam, no corte, grande quantidade de tecido mineralizado têm influência na geração de calor (Peyton, 1958; Stanley, Swerdlow, 1959; Laforgia et al., 1991). Assim, desenvolvemos duas técnicas de preparo, sendo uma considerada “ideal” e a outra “abusiva”, e observamos que somente a associação dos dois fatores (técnica e presença de água) seriam capazes de manter os aumentos de temperatura em condições seguras à polpa. Este estudo teve algumas derivações como a avaliação do potencial de geração de calor do laser de Er:YAG em preparos cavitários (Cavalcanti et al., 2003); do potencial de geração de calor de equipamentos de preparo ultrassônico (Vanderlei et al., 2008); e mesmo de equipamentos para a polimerização de resinas compostas (Martins et al., 2006). Especificamente, observamos que a refrigeração possui importância não somente em preparos utilizando a alta-rotação, como também com o laser de Er:YAG, equipamento incapaz de realizar ablação de tecido mineralizado sem a presença de umidade, fato já relatado na literatura (Visuri et al., 1996). No caso da ausência de água, as temperaturas geradas com esse laser alcançaram 40,86 °C acima da temperatura basal, o que inviabilizaria qualquer procedimento conservador. Por outro lado, o preparo ultrassônico de cavidades

mostrou-se seguro, com temperaturas aquém do limite de 5,5 °C, sendo que o mesmo foi observado para os dispositivos testados para polimerização de resinas – uma lâmpada halógena convencional de 600 mW/cm² e um laser de argônio.

Dando sequência a investigação de fatores que possuem potencial de agressão pulpar, passamos a estudar o impacto de diferentes materiais de capeamento sobre culturas de células da polpa dentária. Este tema foi bastante discutido na literatura, no fim da década de 90 e início deste século, principalmente em relação a afirmação, realizada por alguns autores, de que adesivos dentinários seriam superiores para esta finalidade (Cox, Suzuki, 1994; Akimoto et al., 1998). Até então, o hidróxido de cálcio figurava como o material de eleição para capeamento pulpar direto dadas suas características bacteriostáticas e de indução de mineralização (Rode, Cavalcanti, 2001). No entanto, o fato desses cimentos serem dissolvidos com o tempo trazia uma limitação ao seu sucesso clínico neste caso. Assim, os adesivos dentinários poderiam ser superiores nesse sentido uma vez que promoveriam um melhor selamento cavitário sem serem dissolvidos. Entretanto, como demonstrado em nossos estudos (Cavalcanti et al., 2005b; Ferreira et al., 2009; Ferriello et al., 2010), os adesivos dentinários possuem alto potencial citotóxico sobre cultura de células. Este fato é também confirmado por um bom número de estudos que demonstraram o potencial citotóxico e de necrose destes materiais quando aplicados diretamente sobre a polpa (Trope et al., 2002; Modena et al., 2009). Além do potencial citotóxico apresentado pelos adesivos dentinários, o hidróxido de cálcio demonstrou superioridade em relação às propriedades biológicas, fato também confirmado na literatura (Demarco et al., 2001). Ressalta-se, ainda, que esta qualidade biológica também foi observada com o agregado de trióxidos minerais (Mineral Trioxide Aggregate – MTA), material inicialmente desenvolvido com finalidade endodôntica, mas que tem sido indicado rotineiramente para o capeamento pulpar (Parirokh,

Torabinejad, 2010). Passo importante em minha linha de pesquisa foi estabelecido num de nossos estudos (Cavalcanti et al., 2005b), no qual desenvolvemos uma técnica de exposição de meio condicionados sobre as culturas celulares. Isso foi realizado tentando nos aproximar de uma situação real na qual o ambiente (fluidos, meio extracelular e mesmo a circulação linfática/sanguínea) também influenciaria na citotoxicidade dos materiais. Esta técnica foi utilizada em estudos subsequentes (Ferreira et al., 2009; Ferriello et al., 2010) com resultados satisfatórios e se mostrou como mais uma alternativa na análise da citotoxicidade de materiais. Além disso, mesmo numa situação de citotoxicidade mais controlada, os adesivos dentinários mostraram-se mais citotóxicos o que, como já foi descrito acima, é corroborado pela literatura. Adicionalmente, avaliamos o efeito do laser de baixa intensidade sobre a citotoxicidade quando associado a materiais de capeamento. Observamos com isso que, mesmo essa associação é incapaz de permitir a redução de efeitos citotóxicos tão agressivos como aqueles causados pelos adesivos dentinários (Ferriello et al., 2010).

Ainda com relação aos materiais capeadores, direcionamos a linha para avaliar o papel destes na produção de citocinas inflamatórias, especificamente a interleucina 1 beta (IL-1 β) e a interleucina 8 (IL-8). Estas citocinas são importantes moduladoras da inflamação de um modo geral, e por esse motivo, mereceram uma análise mais detalhada em relação à sua participação no processo inflamatório da polpa dentária. Inicialmente, avaliamos como estas proteínas eram expressas em tecidos saudáveis e inflamados, demonstrando claramente que ambas citocinas têm papel em tecidos pulparem inflamados (Silva et al., 2009). Adicionalmente, neste mesmo estudo, comprovamos que células da polpa possuem potencial de responder com a produção das duas citocinas quando estimuladas por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), o que serviu de base para estudos posteriores com os materiais capeadores. Assim, verificando os efeitos dos materiais capeadores na

produção de citocinas por fibroblastos da polpa (Ferreira et al., 2009) ou por granulócitos do sangue (Cavalcanti et al., 2011), observamos que há sim uma capacidade diferenciada de modulação do processo inflamatório de acordo como material utilizado.

Finalmente, a linha de pesquisa evoluiu com o estágio pós-doutoral, onde foram estudados aspectos envolvidos na engenharia do tecido pulpar. Hoje em dia, o estudo do potencial de regeneração ou neoformação do tecido pulpar dentro do canal radicular tem ganhado evidência na literatura dadas as possibilidades clínicas de recuperação e manutenção de dentes, principalmente em casos de rizogênese incompleta. Este foco na regeneração ganhou ainda mais importância quando da descoberta da presença de células tronco na polpa dentária (Gronthos et al., 2000). De qualquer modo, considerando-se a importância e relevância do tema na atualidade, elaboramos duas revisões da literatura: a primeira, mais focada nos aspectos celulares envolvidos (Demarco et al., 2011) e a segunda relacionada, de forma mais evidente, aos materiais para a engenharia tecidual (Rosa et al., 2012). Assim, fomos de encontro à tríade clássica da engenharia tecidual (Lanza et al., 2007), onde os aspectos celulares, estruturais e do meio (ainda sem dados relevantes em nossa linha) foram abordados. De forma geral, sabemos que a oferta de células tronco que podem ser utilizadas para a engenharia do tecido pulpar passam pelas *dental pulp stem cells* (DPSC – células tronco da polpa dentária) e *stem cells from exfoliated teeth* (SHED – células tronco da polpa de dentes decíduos exfoliados), ambas observadas inicialmente pelo grupo do Professor Songtao Shi (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003). Neste caso, vale ressaltar que mesmo células não consideradas progenitoras (ou “tronco”), e não caracterizadas como tal pelos marcadores de superfície e de potencial de diferenciação multilinhagem, apresentam algum potencial de diferenciação e de produção de tecido mineralizado (dados apresentados no trabalho ainda não publicado, item 2.14). Esse fato pode ser de valor para o

entendimento do reparo pulpar uma vez que ainda não se sabe a origem das células participantes no processo, podendo também ser mediado por células migratórias da papila dental ou circulantes (Frozoni et al., 2012; Dimitrova-Nakov et al., 2014).

Já em relação aos materiais, a maior dificuldade para realização da engenharia do tecido pulpar reside na translação da pesquisa laboratorial para a prática clínica (Murray et al., 2007). Neste caso, as matrizes ou *scaffolds* desenvolvidos para esta finalidade devem apresentar boas propriedades biológicas, permitindo o crescimento celular e sua diferenciação, além de poderem ser injetáveis e apresentarem boa estabilidade dimensional. Em nossa última publicação citada nesta compilação (Cavalcanti et al., 2013), discutimos e demonstramos, *in vitro*, o uso de um hidrogel para a engenharia do tecido pulpar. Este hidrogel, comercialmente disponível, mostrou resultados promissores no que diz respeito à proliferação e à diferenciação de células tronco da polpa. Esses dados foram também demonstrados, *in vivo*, num estudo posterior, desenvolvido pelo mesmo grupo onde realizei meu estágio pós-doutoral (Rosa et al., 2013) no qual observou-se a formação de tecido semelhante à polpa dentária preenchendo parcialmente canais radiculares implantados em dorso de camundongos SCID.

Direções futuras de nossa linha apontam novamente para aspectos mais clínicos envolvidos na diferenciação de células tronco da polpa, quanto ao potencial de produção de dentina numa polpa neoformada/regenerada. Baseados em evidências de que os processos inflamatórios possuem importância também no processo de reparação, realizamos um estudo no qual observamos que as células da camada odontoblástica, mesmo numa polpa saudável, expressavam interleucina 1 beta de forma consistente (Silva et al., 2009). Além disso, também observamos neste estudo que materiais sabidamente biocompatíveis como o hidróxido de cálcio e o MTA, são capazes de levar a um aumento na produção desta citocina. Estas informações, associadas a um estudo

recente que mostra que mediadores químicos, como o LPS, também estimulam odontoblastos (Oliveira, Santos, 2012), nos fazem acreditar que os processos de reparo podem estar intimamente ligados ao processo de inflamação. Essa hipótese, apesar de parecer evidente para os pesquisadores da área de biologia pulpar, ainda carece de maior detalhamento e suporte científico.

Assim, o conhecimento de fatores envolvidos com a formação de dentina, dos materiais capazes de induzi-la de modo controlado, e mesmo o papel da infecção bacteriana em sua modulação estão sendo abordados em nossos estudos atuais. Estes serão, certamente, os próximos passos desenvolvidos em minha carreira de pesquisador consolidando meu trabalho investigativo do tecido pulpar e aprofundando, de forma mais evidente, o entendimento dos aspectos de agressão e reparação, desenvolvidos até o momento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente ao exposto, fica evidente que o estudo da polpa dentária, seja nos aspectos de agressão e/ou de reparação possui inúmeras variáveis envolvidas, algumas delas com bastante evidência e outras necessitando de mais estudos.

Pontualmente, ressalta-se que a confecção de preparos cavitários, fato rotineiro na Odontologia, tem grande potencial de causar danos sobre o tecido pulpar pelo aumento de temperatura. Sabe-se que alguns equipamentos para esta finalidade possuem maior potencial iatrogênico que outros, incluindo-se aí as turbinas de alta-rotação, mais utilizadas mundialmente. Por outro lado, o treinamento adequado e o uso de refrigeração à água são o suficiente para manter as condições de preparo seguras.

Quanto ao capeamento, destaca-se o potencial citotóxico e inflamatório dos adesivos dentinários, da mesma forma que corrobora-se a biocompatibilidade do hidróxido de cálcio e do MTA. Adicionalmente, vale enfatizar o número de técnicas laboratoriais diferentes usadas para se aplicar os materiais sobre culturas o que, de certa forma, indica sempre a complementação por estudos *in vivo*.

Finalmente, quanto aos novos conceitos de reparo e regeneração, observamos que há, com o uso de materiais comercialmente disponíveis, a possibilidade de se realizar a translação da pesquisa laboratorial para a prática clínica. Entretanto, fatores como o tipo celular a ser utilizado e a condição de obtenção e cultura destas células ainda representam um obstáculo, demandando maiores estudos para este fim.

8 REFERÊNCIAS*

Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Suzuki S, et al. Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. Quintessence Int. 1998;29(3):177-88.

Cavalcanti BN, Otani C, Rode SM. High-speed cavity preparation techniques with different water flows. J Prosthet Dent. 2002;87(2):158-61.

Cavalcanti BN, Lage-Marques JL, Rode SM. Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces. J Prosthet Dent. 2003;90(5):447-51.

Cavalcanti BN, Seraidarian PI, Rode SM. Water flow in high-speed handpieces. Quintessence Int. 2005;36(5):361-4.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. Int Endod J. 2005;38(8):505-9.

Cavalcanti BN, Rode Sde M, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. Braz Oral Res. 2011;25(1):13-8.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2013;29(1):97-102.

Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc.* 1994;125(7):823-31.

Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* 2001;32(3):211-20.

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3-13.

Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellermann O, Goldberg M. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S13-8.

Ferreira DC, Brito DG, Cavalcanti BN. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. *J Dent Child (Chic).* 2009;76(3):194-8.

Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. *J Oral Sci.* 2010;52(1):33-8.

Frozoni M, Zaia AA, Line SR, Mina M. Analysis of the contribution of nonresident progenitor cells and hematopoietic cells to reparative dentinogenesis using parabiosis model in mice. *J Endod.* 2012;38(9):1214-9.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13625-30.

Hargreaves K, Berman L. Cohen's Pathways of the pulp. 5 ed. St. Louis: Mosby; 2010.

Laforgia PD, Milano V, Morea C, Desiate A. Temperature change in the pulp chamber during complete crown preparation. *J Prosthet Dent*. 1991;65(1):56-61.

Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 3 ed. London: Academic Press; 2007.

Lauer HC, Kraft E, Trothlauf W, Zwingers T. Effects of the temperature of cooling water during high-speed and ultra-high speed tooth preparation. *J Prosthet Dent*. 1990;63(4):407-14.

Martins GR, Cavalcanti BN, Rode SM. Increases in intrapulpal temperature during polymerization of composite resin. *J Prosthet Dent*. 2006;96(5):328-31.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5807-12.

Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(6):544-54.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics:

a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007;33(4):377-90.

Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8 ed. St. Louis: Mosby; 2012.

Oliveira SH, Santos VA. Lipopolysaccharide-induced stem cell factor messenger RNA expression and production in odontoblast-like cells. *J Endod*. 2012;38(5):623-7.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010;36(3):400-13.

Peyton FA. Effectiveness of water coolants with rotary cutting instruments. *J Am Dent Assoc*. 1958;56(5):664-75.

Rode SM, Cavalcanti BN. Proteção do complexo dentina-polpa: o papel do hidróxido de cálcio e da hibridização. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, org. *Dentística/Laser*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 57-104.

Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater*. 2012;28(4):341-8.

Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res*. 2013;92(11):970-5.

Silva AC, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(5):527-32.

Stanley HR, Swerdlow H. Reaction of the human pulp to cavity preparation: results produced by eight different operative grinding techniques. *J Am Dent Assoc.* 1959;58(5):49-59.

Trope M, McDougal R, Levin L, May KN Jr, Swift EJ Jr. Capping the inflamed pulp under different clinical conditions. *J Esthet Restor Dent.* 2002;14(6):349-57.

Vanderlei AD, Borges AL, Cavalcanti BN, Rode SM. Ultrasonic versus high-speed cavity preparation: analysis of increases in pulpal temperature and time to complete preparation. *J Prosthet Dent.* 2008;100(2):107-9.

Visuri SR, Walsh JT Jr, Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg Med* 1996;18(3):294-300.

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19:515-30.