

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

***LOISE PEDROSA SALLES***

**ASPECTOS BIOLÓGICOS E BIOATIVIDADE DE MATERIAIS  
A BASE DE MTA EM CULTURA DE CÉLULAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Mario Tanomaru-Filho

**Orientador PDEE:** Prof. Dr. Ricardo Battaglino

***Araraquara***

2012

**LOISE PEDROSA SALLES**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS E BIOATIVIDADE DE  
MATERIAIS A BASE DE MTA EM CULTURA DE  
CÉLULAS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardi

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Battaglino

4º Examinador: Profa. Dra. Leslie Morse

5º Examinador: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Araraquara, 10 de agosto de 2012.

## **DADOS CURRICULARES**

### ***LOISE PEDROSA SALLES***

**NASCIMENTO** 26.01.1968 Rio de Janeiro, RJ

**FILIAÇÃO** Cleiber de Oliveira Leite

Marilene Pedrosa Leite

- 1998 – 2000** Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)  
Universidade de Brasília, UNB, Brasil.  
Grande área: Ciências Biológicas  
Especialidade: Biotecnologia.
- 1998 – 2012** Pesquisadora, Laboratório de Biologia Molecular  
Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia  
Universidade de Brasília, UnB, DF, Brasil.
- 1995 – 1996** Especialização em Endodontia e Cirurgia Parendodôntica  
PROFIS, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1996 – 2012** Professora de Endodontia, Clínica Integrada.  
Faculdades Integradas do Planalto Central, FACIPLAC, DF, Brasil.
- 1993 – 1993** Aperfeiçoamento em Endodontia  
PROFIS, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

- 1993 – 1993** Aperfeiçoamento em Cirurgia Parendodôntica  
PROFIS, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1987 – 1992** Graduação em Odontologia  
Faculdades Integradas do Planalto Central  
Brasília, DF, Brasil.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus dois orientadores, inteligentíssimos, gentis, atenciosos, pessoas maravilhosas: Mario Tanomaru-Filho e Ricardo Battaglino. Por compartilharem comigo algo que não tem preço: Conhecimento. Pelo carinho e amizade com os quais me guiaram para o ingresso de fato na vida acadêmica. O carinho e amizade por vocês são recíprocos e eternos. Vocês escreveram comigo estas páginas da minha vida. Os exemplos de vocês como professores e pesquisadores sempre vão me acompanhar.

Aos anjos da guarda que me direcionaram à Unesp/FOAr e ao Instituto Forsyth.

Ao Oswaldo Henrique, meu esposo. Por apoiar todos os meus sonhos e ser companheiro presente; mesmo quando fisicamente distantes, por eu estar em Araraquara ou nos USA. Você é especial!

Aos meus pais, Cleiber e Marilene, pelo amor infinito. Pela minha formação, Pela infância maravilhosa, vocês me permitiam dar asas a imaginação! Por sua sabedoria ao educar. Pela minha existência! Desculpe por provocar em vocês tanta saudade...

Aos meus falecidos avós, Oswaldo, Augusto e Silvia, os anjos da minha infância (era assim que os via quando criança). Em especial a minha avó Silvia, pelas seguintes palavras: "Todo sonho é possível de ser realizado, basta você querer muito, com toda a força do seu coração e trabalhar por ele". As palavras de minha avó sempre me acompanham a cada novo sonho.

A minha avó Olga, por ser tão carinhosa comigo, pelos doces gostosos, pelas coisas engraçadas que você diz e que tanto ajudam a descontrair.

Ao meu irmão Cleiber Junior, meu companheiro de aventuras, bagunças e travessuras, companheiro de odontologia e endodontia. Por seu amor e amizade.

Aos meus sogros Oswaldo e Teresinha, pelo carinho e apoio em todos os momentos alegres e difíceis.

Ao querido tio Edson Lobão, por também apoiar meus estudos. Sempre demonstrando carinho e interesse na evolução das minhas pesquisas.

Aos demais docentes da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Profa. Dra. Gisele Faria. Pelos ensinamentos tão importantes para a formação de todos nós.

A Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, especialmente por sua amizade, atenção e carinho.

Ao Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, sempre nos incentivando a ir adiante. Não poupa palavras de elogios aos seus alunos quando fazem por merecer e faz questão de demonstrar sua grande amizade.

Agradeço especialmente, aos professores Dr. Joni Augusto Cirelli e Dr. Carlos Rossa Junior da área de Periodontia, por abrirem as portas do laboratório de Biologia Molecular, por seus conselhos e ensinamentos.

A todos os funcionários do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por sua dedicação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial a Mara e o Alexandre, pela paciência e disposição para ajudar em todos os momentos.

Aos companheiros da pós-graduação Adriana, Arieli, Arnaldo, Arturo, Bruno, Carolina, Carol, Érika, Fausto, Flávia, Gisselle, Guilherme, João, João Paulo, Morgana, Norberto, Paula, Raqueli, Rafael, Regina, Roberta, Rodrigo, Rosymere, Sabrina, Sérgio. Vocês estiveram presentes nas festas, nos momentos de dificuldades, alegria e descontração. Alguns estiveram presentes até durante experimentos. Obrigada por terem feito meus dias em Araraquara tão felizes e prazerosos. Amizade é o maior tesouro.

Agradecimento especial para Ana Livia, minha grande amiga e também parceira de experimentos. Obrigada por ser companheira de todas as horas em Araraquara. Pode contar comigo para o que der e vier. Agradeço também a sua mãe, Rita, que sempre está torcendo por nosso sucesso.

A Universidade de Brasília (UnB), em especial ao Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas. A profa. Dra. Sonia Nair Bao que me recebeu de portas abertas e aos amigos que fiz no laboratório, Ingrid e Felipe. A ajuda de vocês foi fundamental para o sucesso do trabalho com o MTA-Fillapex. Muito obrigada!

Ao Instituto Forsyth que me recebeu para a realização do estágio PDEE, em especial ao Dr. Philip Stashenko.

A Profa. Dra. Leslie Morse, seu apoio e ensinamentos foram extremamente importantes para os experimentos realizados no Forsyth.

A Justine, figura tão querida no Forsyth, que me ensinou a manusear o microscópio confocal e o programa de processamento de imagens.

Ao Daniel Nguyen por sua gentileza em ajudar nas análises do ensaio de cálcio por fluorescência.

Aos amigos que fiz no Forsyth, que me receberam de braços abertos, com os quais compartilhei momentos inesquecíveis no laboratório, nas estações de esqui e até no Six Flags: Tracy Zhu, Ana Duran, Li, Liyang, Ali, Mako, Sueli, Ariane, Mark, Hakeshi, Leilah, Lili, Erin, Daniel, Dan, Yan Vonkurs, Agassit, Harmet, Geisla, Sheila, Francisco, Luciano e Tina. Em especial ao Jonah Saltzman, *summer student* que tive a alegria de poder ajudar em seu projeto de iniciação científica no Forsyth. Agora, meu parceiro em futuro projeto de pesquisa e amigo.

Aos demais professores e pesquisadores do Forsyth pela atenção, carinho e ensinamentos: Dr. Hajime Sasaki, Dr. Antonio Campos-Neto, Dra. Susan Rittling, Dr. John Bartlett, Dr. Toshihisa, Dr. Jorge Frias-Lopez, Dr. Alpdogan Kantarci, Dr. Ricardo Teles e Dra. Flavia Teles.

A todos do Instituto Forsyth, funcionários e pesquisadores. De alguma forma cada um de vocês contribuiu para minha formação e estudo no exterior. Em especial a Joyce, pelo apoio técnico na esterilização dos materiais.

A Heidi e a Doty, que me receberam com carinho e paciência nos primeiros dias de Forsyth e burocracias.

To my dear and special new friends: Patricia, Isabel, Ana, Arlen, Jackie and Sammy. Many thanks for the wonderful times we spent together in USA, for showing us such a beautiful places. You make easy, very happy for us to stay and very hard to leave. Friends forever!

Ao querido Prof Dr. Alexandro Galdino. Sempre pronto a oferecer seu ombro amigo e iluminar nossos caminhos. Seus conselhos e sua grande amizade foram essenciais para eu chegar até aqui.

Aos queridos: Monica Colombi, Vivis, Junior, Tulio, Rosângela, Ingrid, Roselli, Landerson, Leticia Alonso, Paulo, Vanessa Rezende, Beto, Claudia, Vitor, Marilia, Rodrigo, Ariel, Juliane, Leticia Macedo, Beto Macedo, Luiz Cesar e Alessandra. Obrigada pela força, apoio, carinho e amizade de todos vocês. Ainda que eu estivesse distante, vocês estiveram sempre presentes, via e-mail, viber, facebook ou skype. Viva a tecnologia!

Ao querido Parreira, por ter me levado de carro a Araraquara, por ajudar com a minha turminha do barulho, por ajudar no transporte das células, na mudança da geladeira para a sala de cultura. Você é show!

Fernando Araripe e Lidia Pepe, meus orientadores no mestrado, obrigada por sua amizade e pelos ensinamentos de biologia molecular. Vocês já são importantes em minha vida!

Ao CNPQ e a CAPES (PDEE) pela concessão de bolsas de estudos, que tornaram possível a concretização deste sonho.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus três filhos, Thiago Henrique, Gustavo Henrique e João Henrique. Vocês são minha alegria e razão de vida. A coragem, a luz, a energia que emanam de vocês são contagiantes e tornaram possível a realização deste sonho. Reconheço que vocês também se sacrificaram e mudaram suas rotinas por mim. Dedico a vocês este trabalho, o meu amor eterno e infinito...

“Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought.”

Albert Szent-Györgyi

## SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	18
PROPOSIÇÃO.....	29
CAPÍTULO 1.....	31
CAPÍTULO 2.....	59
CAPÍTULO 3.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS.....	136



# Resumo

Salles LP. Aspectos biológicos e bioatividade de materiais a base de MTA em cultura de células [Tese de Doutorado].

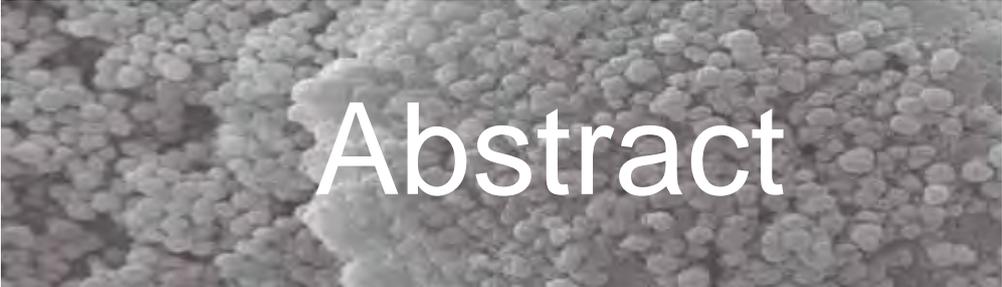
Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar as respostas biológicas `a materiais utilizados em Endodontia que apresentam na formulação Mineral Trióxido Agregado (MTA) ou cimento Portland (PC) utilizando sistemas de cultura de células. O estudo foi dividido em três capítulos: No capítulo 1 foram avaliados bioatividade e biocompatibilidade de dois novos cimentos endodônticos comercialmente disponíveis; MTA Fillapex (MTA-F, cimento endodôntico à base de MTA, Ângelus) e Ephiphany SE (EP-SE, cimento endodôntico a base de resina metacrilato, SybronEndo). A linhagem de osteoblastos humanos (Saos-2) foi utilizada como modelo de estudo. Os resultados de MTT mostraram uma taxa significativa de morte celular nas primeiras horas de exposição para todos os materiais avaliados. Entretanto, o grupo MTA-F apresentou aumento de células viáveis após 7 dias de presa. As imagens de microscopia eletrônica de varredura e o resultado de EDS (energia de dispersão atômica) mostraram diferenças na morfologia dos nódulos minerais formados pelos osteoblastos expostos ao MTA-F. No capítulo 2, células de folículo dental humanos (hDFCs) de dois terceiros molares inclusos indicados para exodontia por razões ortodônticas foram isoladas para avaliação da bioatividade e da biocompatibilidade do PC associado a diferentes agentes radiopacificadores em cultura primária de células. Os materiais estudados foram

o cimento Portland branco (PC) e as associações de PC com: óxido de bismuto (CPBi), óxido de zircônio (CPZir) e tungstato de cálcio (CPCa). Além dos resultados de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina, a biocompatibilidade do PC e das associações com agentes radiopacificadores foi analisada por imagens de microscopia eletrônica de varredura, que mostraram as hDFCs aderidas aos materiais. O capítulo 3 apresenta um estudo original de pesquisa básica, no qual foi avaliada a hipótese de ativação do fator de transcrição gênica NFATc1 em células de linhagem de osteoblastos humanos após exposição ao PC. O NFATc1 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação celular de osteoclastos, o qual é ativado por calcineurina. Curiosamente, estudos recentes demonstraram que os fatores NFAT também desempenham um papel importante na diferenciação e atividade dos osteoblastos. Os resultados obtidos no capítulo 3 com ensaios de *western blotting*, microscopia confocal, expressão gênica de marcadores moleculares de osteogênese e a co-localização de Osterix com NFATc1 no núcleo de Saos-2 expostas ao eluído de PC forneceram evidências que comprovaram a hipótese proposta. O PC estimulou a ativação de NFATc1 em Saos-2, devido ao influxo de  $Ca^{+2}$  para o ambiente intracelular.

**Palavras-chave:** Endodontia, materiais biocompatíveis, bioensaios, teste de materiais e técnicas de cultura de células.



# Abstract

Salles LP. Biological aspects and bioactivity of MTA based materials in cell culture systems [Tese de Doutorado].

Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to analyze the biological responses to new endodontic materials based on Portland cement (PC) and the PC itself in cell culture systems. The study was divided into three chapters as follows: The first chapter describes a research in which the bioactivity and biocompatibility of two new commercially available sealers; MTA Fillapex (MTA-F, PC-based sealer, Angelus) and Ephiphany SE (EP-SE, resin-based sealer, SybronEndo); were evaluated in human osteoblast-like cells (Saos-2). The MTT results showed a significant cell death rate during the first hours of exposure to all test materials. After 7 days of exposure, MTA-F group showed a suitable increasing rate of cell viability. Interestingly, the images of scanning electron microscopy and the result of EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy) showed morphological differences in the mineralized nodules formed by osteoblasts exposed to MTA-F. In Chapter 2, human dental follicle cells (hDFCs) were isolated from two included third molars, which were extracted for orthodontic reasons. The hDFCs were suitable to assess the bioactivity and biocompatibility of PC associated with different radiopacifying agents in primary cell culture system. The materials tested were the white Portland cement (PC) and PC associations with radiopacifying agents: bismuth oxide (PCBi), zirconium oxide (PCZir) and calcium

tungstate (PCCa). Besides the results of cell viability and alkaline phosphatase activity, the biocompatibility of the PC was corroborated by the images of scanning electron microscopy, which allowed us to visualize the hDFCs adhered to the material surfaces. Chapter 3 presents an original study of basic research, aimed to evaluate the hypothesis of the transcription factor NFATc1 activation in human osteoblast-like cells as a result of exposure to PC. The NFATc1 is a transcription factor essential for osteoclasts differentiation, which is activated by Calcineurin. Curiously, recent studies have shown that NFAT transcription factors play an important role in differentiation and activity of osteoblasts as well. The results obtained with western blotting assay, confocal microscopy, expression of molecular markers of osteoblasts differentiation and the co-location of NFATc1 with Osterix in the nuclei of Saos-2 exposed to PC elute provided evidences that supported the hypothesis proposed. PC stimulated the activation of NFATc1 in Saos-2 due to the influx of  $Ca^{+2}$  to the intracellular environment.

Keywords: Endodontics, biocompatible materials, bioassays, materials test, cell culture techniques.



# Introdução

## INTRODUÇÃO

No início da década de 90, surgiu um novo material indicado como cimento retro-obturador de canais radiculares e tratamento de perfurações - O MTA ou Agregado de Trióxido Mineral. O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda e foi aprovado pela *Federal Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América para uso humano após demonstrar excelentes propriedades físico-químicas e biológicas em diversos estudos<sup>3,29,46,47</sup>. A primeira descrição do MTA na literatura científica data de 1993<sup>29</sup> e sua aprovação como material odontológico ocorreu em 1998<sup>39</sup>.

O MTA é um material endodôntico derivado do cimento Portland amplamente utilizado em engenharia civil. A versão inicial do MTA era cinza e atualmente o material disponível é composto pelo cimento Portland branco. Mais precisamente, o pó do MTA é constituído por finas partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, silicato dicálcico, tricálcio de alumínio, óxido tricálcico, óxido de bismuto, gypsum (sulfato de cálcio dihidratado) e outros óxidos minerais<sup>35</sup>. A presença do sulfato de cálcio pode ser modificada para adequar o tempo de presa do material<sup>16</sup>. O MTA apresenta na sua composição, além do PC, o óxido de bismuto no MTA como agente radiopacificador. Desde que o cimento Portland foi identificado como o principal componente do MTA, diversos estudos demonstram que as propriedades físico-químicas e, em particular, as propriedades biológicas dos cimentos MTA e Portland são semelhantes<sup>5-8,17,23,31</sup>.

As avaliações *in vitro* de biocompatibilidade e potencial bioativo dos cimentos à base de MTA têm sido amplamente divulgadas na literatura. Uma vez que este material demonstra resposta tecidual favorável e capacidade de

estimular reparação, o interesse no desenvolvimento de materiais à base de MTA ou CP com propriedades cada vez melhores é intensa. Apesar do MTA apresentar algumas das propriedades ideais de um material para preenchimento de obturações retrógradas e perfurações, sua consistência granular e consistência dificultam a manipulação<sup>9</sup>. Ainda, o MTA apresenta alto custo quando comparado ao cimento Portland.

Novos cimentos à base de MTA ou Portland são desenvolvidos para aperfeiçoar algumas propriedades do material. Estas novas formulações devem ser avaliadas por ensaios de biocompatibilidade e de bioatividade. No caso do cimento Portland como substituto do MTA, é necessária a adição de agente radiopacificador, o qual não deve interferir com as propriedades do PC, ou até mesmo proporcionar maior potencial bioativo. No entanto, para o desenvolvimento de cimentos obturadores de canais radiculares baseados no MTA outros componentes são acrescentados, como resinas, o que torna necessária a avaliação de suas propriedades biológicas.

Pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar possíveis agentes radiopacificadores adicionados ao cimento Portland. Duarte et al.<sup>19</sup> (2005), avaliaram diferentes compostos (óxido de bismuto, óxido de zinco, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio e óxido de zircônio) que demonstraram maior radiopacidade do que a dentina e potencial para adição ao cimento Portland como agentes radiopacificadores. Os mesmos pesquisadores também avaliaram o cimento Portland quanto à liberação de arsênio, que poderia ser prejudicial aos tecidos, e verificaram que a liberação desse metal foi insignificante, similar ao MTA. Esses resultados ainda foram reforçados por Ribeiro et al.<sup>37</sup> (2005) que não verificaram genotoxicidade in

vitro para o cimento Portland e MTA em análises de biocompatibilidade usando o teste do cometa alcalino e o teste de exclusão azul de trypan em células de linfomas de ratos. Os resultados do teste cometa revelaram integridade no DNA depois do tratamento das células com os cimentos MTA e Portland em concentrações acima de 100 µg/mL. Os resultados sugerem que nenhum dos compostos testados foram citotóxicos. Braz et al.<sup>9</sup> (2008) também avaliaram por meio do teste do cometa a genotoxicidade do sulfato de bário, óxido de zircônia e óxido de bismuto como agentes radiopacificadores isoladamente, em linfócitos primários humanos. Os pesquisadores puderam concluir que nenhum dos radiopacificadores estudados induziu dano ao DNA.

A biocompatibilidade de diversos cimentos endodônticos têm sido avaliada por meio de análise da atividade enzimática de desidrogenase mitocondrial. Este teste é denominado MTT (*3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*) e parece estar se tornando um padrão para determinar a taxa de viabilidade celular e a biocompatibilidade de novos fármacos na área de saúde em geral. Cornélio et al.<sup>15</sup> (2011) analisaram em cultura de células de ligamento periodontal de murinos (mPDL) e osteoblastos de ratos (ROS 17/2.8) a biocompatibilidade de diversos agentes radiopacificadores associados ao cimento Portland (óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio) pelo teste MTT. Os resultados demonstraram biocompatibilidade para todas as associações avaliadas, na seguinte ordem, considerando as duas linhagens de células: Portland puro > óxido de zircônio > tungstato de cálcio > óxido de bismuto. Karimjee et al.<sup>28</sup> (2006) avaliaram a citotoxicidade do MTA com diferentes veículos, do amálgama de prata e do cimento Fuji II em cultura de células de ligamento periodontal por meio do MTT e lactato desidrogenase

mitocondrial. Independente do veículo com o qual o PC e MTA foram associados, estes materiais apresentaram os melhores resultados de biocompatibilidade quando comparado aos cimentos resinosos/ionomérico e amálgama de prata. Também estudando MTA e Portland, De Deus et al.<sup>18</sup> (2005) avaliaram os efeitos citotóxicos das duas marcas de MTA (Pro-Root e Angelus) e cimento Portland em linhagem celular endotelial de humanos (ECV 304). Os efeitos dos materiais nas funções mitocondriais foram mensurados nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. O teste MTT (*dimetil-thiazol-diphenyl tetrazolium bromid*) foi conduzido para mensurar a viabilidade celular. Todos os MTA analisados e o CP mostraram um efeito citotóxico inicial que decresceu gradualmente com o tempo e não houve diferença estatística significativa entre os materiais analisados. Gorduysus et al.<sup>21</sup> (2007), avaliaram a biocompatibilidade de quatro diferentes materiais endodônticos em fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDL): ProRoot Agregado trióxido mineral (MTA/Denstply; Tulsa Dental, Memphis, TN), Diaket (ESPE, Seefeld, Germany), Endion (VOCO, Cuxhaven, Germany), e CYMED 8410 (NANO, Kaohsiung, Taiwan). O efeito desses quatro materiais na viabilidade dos fibroblastos (PDL) foi determinado pela análise MTT. As células expostas ao MTA por 24, 48 e 72 horas não demonstraram redução significativa no número de células viáveis comparado com o controle. Entretanto, o tratamento de fibroblastos PDL com Diaket, Endion, e CYMED 8410 resultaram em marcante redução do número de células viáveis comparado aos outros grupos em todos os tempos avaliados. Os resultados demonstraram que o MTA é um material de preenchimento biocompatível. Entretanto, Diaket, Endion, e CYMED 8410 são tóxicos para Fibroblastos PDL in vitro. Miranda et al.<sup>33</sup> (2009) estudaram a biocompatibilidade

do MTA em células L929 responsáveis ao reparo de perfurações radiculares; comparando a citotoxicidade de um cimento experimental a base de resina-epóxica (MBPc) com o MTA ProRoot (Dentsply/Tulsa Dental, Tulsa,OK, USA) e MTA Angelus (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil). As células L929 foram incubadas com os materiais após 48hs de presa. Os valores médios foram comparados e convertidos em graus para qualificar os resultados conforme a tabela de graus de citotoxicidade padrão de procedimentos operacionais (SOP) da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil. Os resultados mostraram grau 1 (leve citotoxicidade) para os dois tipos de MTA e grau 2 (moderada) para o MBPc. Jafarnia et al.<sup>26</sup> (2009) avaliaram a biocompatibilidade do MTA empregando vários aditivos com o intuito de melhorar as características de manuseio do MTA em células L929. Os aditivos testados incluíram água estéril (Baxter Helathcare Corporation, Deerfield, IL), solução salina (0.9% Sodium Chloride, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL), 5% CaCl<sub>2</sub> (SigmaAldrich, St. Louis, MO), Gel K-Y (Johnson & Johnson, Langhorne, PA), 2% de lidocaína com 1:100.000 epinefrina (Xylocaine), e 3% de gel NaOCl (ChlorCid V, Ultradent Products, Inc. South Jordan). A viabilidade celular foi avaliada por teste MTT e calculada em porcentagem sobre o grupo controle. Para o MTA solidificado, não houve diferenças significantes quanto à viabilidade celular entre os vários aditivos. De maneira interessante, o gel de MTA com 3% NaOCl demonstrou menor viabilidade celular que todos os outros grupos (29% - 50%). Este estudo mostrou que os vários aditivos testados, exceto o gel 3% NaOCl, não promoveram efeito na citotoxicidade do MTA quando incorporado à mistura fresca. Como pode ser observado existem muitos estudos que comprovam a biocompatibilidade dos cimentos Portland e MTA, a necessidade

de melhora de certas propriedades físico-químicas e o interesse em desenvolver cimentos obturadores de canais a base destes materiais.

Além de boa radiopacidade, selamento hermético e tempo de trabalho ideal, os novos cimentos à base de MTA devem promover reparo dos tecidos periapicais estimulando a proliferação e atividade de celular. Ou seja, é desejável que os mesmos apresentem potencial bioativo. Quanto à bioatividade, a literatura apresenta menor quantidade de estudos, principalmente quanto ao cimento Portland que não é um material aprovado para uso em odontologia. Alguns estudos comprovaram a grande similaridade entre o MTA e CP quanto aos efeitos biológicos no estímulo ao reparo dos tecidos periapicais em estudos *in vivo*, mas existem poucos estudos comparativos entre os dois materiais em nível molecular que avaliem aumento de expressão gênica de proteínas da matriz óssea como, por exemplo, colágeno do tipo I, osteocalcina, osteopontina e proteínas morfogenéticas ósseas que desempenham funções importantes na osteogênese e odontogênese. A maioria dos estudos avalia o MTA isoladamente ou comparando-o a outros cimentos endodônticos comercialmente disponíveis.

Thomson et al.<sup>45</sup> (2003) investigaram os efeitos do MTA no crescimento de cementoblastos e produção de osteocalcina em cultura de cementoblastos. A morfologia e biocompatibilidade das células foram demonstradas por análises de microscopia eletrônica de varredura, que demonstrou células com morfologia normal aderidas ao material. Uma vez comprovada a indução de expressão gênica e síntese protéica pelo MTA, os pesquisadores concluíram que o MTA poderia ser considerado um material “cimento-condutivo” além de biocompatível. Bonson et al.<sup>4</sup> (2004) investigaram os efeitos biológicos dos cimentos retro-obturadores MTA e de ionômero de vidro (HICR) em fibroblastos

de ligamento periodontal e gengiva. Os materiais avaliados inicialmente demonstraram citotoxicidade que foi reduzido em 2 semanas de exposição. O MTA induziu a expressão de fosfatase alcalina tanto nas células do ligamento periodontal quanto nos fibroblastos gengivais. O cimento HICR inibiu a expressão e a atividade de fosfatase alcalina. Este estudo demonstrou que, não apenas os materiais podem provocar estímulos diversos, as diferentes linhagens de células também respondem de forma diferenciada. Al-Rabeah et al.<sup>1</sup> (2006) avaliaram a resposta celular do ProRoot MTA e MTA branco em células ósseas coletadas do osso alveolar também por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que os dois materiais estimularam adesão celular em sua superfície, com formação de extensos prolongamentos citoplasmáticos conectando as células entre elas mesmas e o material endodôntico. Hakki et al.<sup>22</sup> (2009) investigaram os efeitos do MTA na sobrevivência, no potencial de mineralização e na expressão de genes relacionados a mineralização também em cultura de cementoblastos imortalizados. Os resultados demonstraram que a concentração mais alta de MTA (20mg/mL) foi citotóxica para as células; enquanto as concentrações mais baixas de MTA (0.02mg/mL e 0.002mg/mL) mantiveram a viabilidade celular, induziram significativamente a produção de nódulos minerais em cultura quando corados por Von Kossa e potencializaram a expressão gênica de sialo-proteína óssea e colágeno do tipo I. Paranjpe et al.<sup>36</sup> (2010) cultivaram células pulpares com o MTA cinza e avaliaram os níveis de expressão gênica, secreção de fator de crescimento endotelial vascular e morfologia das células. O MTA apresentou maior regulação da expressão gênica do fator de transcrição Runx2, osteocalcina, fosfatase alcalina e também sialo-proteína de dentina. Estes genes são importantes marcadores de osteogênese,

o que demonstrou a habilidade do MTA em promover diferenciação das células pulpares em células similares a odontoblastos. O MTA induziu um aumento de 1.7 vezes a secreção de fatores de angiogenese, essenciais no processo de cicatrização e regeneração. As imagens de microscopia eletrônica revelaram diferenças morfológicas na superfície das células entre o grupo controle e o MTA. O MTA apresentou aspecto menos fibroso e de células mais diferenciadas do que as células do grupo controle.

Como relatado anteriormente e comprovado pelas evidências científicas apresentadas, o cimento MTA parece deter as melhores respostas celulares em termos de reparo. Entretanto, o MTA originalmente descrito não é indicado como material obturador de canais radiculares. O MTA apresenta desvantagens quanto a propriedades físico-químicas para este propósito: Além do custo relativamente elevado do material, seu tempo de presa é reduzido, bem como adesividade e consistência. Diante dessa premissa, o grupo de pesquisa do Departamento de Odontologia Restauradora da FOAR/Unesp, tem procurado desenvolver novas formulações de cimentos endodônticos a base do cimento Portland também para obturação de canais radiculares, o qual demonstra propriedades físico-químicas adequadas quando comparado com cimentos endodônticos convencionais<sup>32</sup>, embora falhe quanto a radiopacidade.

Vários agentes radiopacificadores têm demonstrado potencial para adição ao cimento Portland<sup>7,8,20,41-43</sup>. Porém, a possibilidade de interferência dos radiopacificadores e de novos aditivos nas propriedades físico-químicas e biológicas do cimento Portland necessitam de avaliação. Diante dessa premissa o objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial bioativo de novas formulações derivadas do cimento Portland e do próprio cimento Portland

em cultura de células de mamíferos. Estudos *in vitro* podem representar uma ferramenta importante para melhor conhecimento e previsão de possíveis efeitos dos materiais em seres humanos. Além disso, são simples de executar, reproduzíveis e podem ser alternativas adequadas para substituir experimentos *in vivo*. Há inúmeros tipos de linhagens celulares sendo estudadas e avaliadas. Porém estudos que avaliam as respostas biológicas envolvendo células humanas como fibroblastos do ligamento periodontal<sup>2,27,30,49</sup> ou osteoblastos humanos<sup>49,50</sup> podem aproximar os resultados da realidade clínica, uma vez que envolvem no experimento as células diretamente relacionadas com o processo de reparo. Em endodontia, pode-se considerar como células de interesse devido a suas funções formativas e de reparo dos tecidos dentais e periapicais: osteoblastos, células pulpares, cementoblastos e células do ligamento periodontal. Estudos recentes têm mostrado um grande potencial também para as células do folículo dental, por serem tecidos ricos em células progenitoras.

Desta forma, o capítulo I refere-se a um estudo realizado em linhagem de células ósseas humanas para avaliação biológica do novo cimento obturador de canais radiculares: MTA Fillapex. O segundo capítulo é o primeiro trabalho em cultura primária de células do folículo dental humano para avaliação da biocompatibilidade e bioatividade do cimento Portland associado a diferentes agentes radiopacificadores. O terceiro capítulo é um estudo original, de pesquisa básica, em que foi avaliada a hipótese de ativação do fator de transcrição NFATc1 em células ósseas humanas de linhagem osteoblástica devido a exposição ao cimento Portland e consequente aumento da concentração de cálcio intracelular. Curiosamente, o fator NFATc1 foi primeiramente descrito como característico de osteoclastos. Os resultados dos experimentos de *western*

*blotting*, PCR em tempo real (qPCR) e microscopia confocal deste estudo corroboram achados recentes que sugerem a importância dos fatores NFAT também para a diferenciação e atividade de osteoblastos.



Proposição

## PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

1. Avaliar a resposta biológica de novos cimentos endodônticos à base de MTA, de cimento Portland e de novas formulações de cimento Portland associado a agentes radiopacificadores por meio de ensaios de biocompatibilidade e avaliação de atividade osteo-indutora em cultura de células de mamíferos.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade do novo cimento MTA Fillapex em cultura de células de mamíferos com MTT, fosfatase alcalina, formação de cristais de cálcio em cultura de células Saos-2 (método colorimétrico *Alizarim Red*) e análise por microscopia eletrônica de varredura dos nódulos formados.
2. Isolar células do folículo dental humano e estabelecer um sistema de cultura primária para testar a biocompatibilidade do cimento Portland associado com diferentes agentes radiopacificadores por meio dos ensaios: MTT, adesão celular à superfície dos cimentos e análise morfológica das células por MEV.
3. Confirmar a hipótese de ativação do fator de transcrição NFATc1 em células de linhagem osteoblásticas em decorrência da exposição ao cimento Portland, pelo ensaio de *western blotting*, análise quantitativa por PCR em tempo real da expressão gênica de marcadores moleculares de osteogênese e microscopia confocal.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing a dense field of coral polyps. The polyps are small, rounded structures with a textured, porous appearance, arranged in a somewhat regular pattern. The lighting creates shadows that emphasize their three-dimensional structure.

# Capítulo 1

**Cimento Endodôntico Baseado em MTA**

**Estimula a Nucleação de Hidroxiapatita em**

**Cultura de Células Humanas Tipo Osteoblastos\***

**\*Artigo publicado no periódico Journal of Endodontics (JOE);**

**Volume 8(7): 971-976, julho de 2012.**

## RESUMO

**Introdução:** O objetivo principal deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e bioatividade de um novo cimento endodôntico baseado em MTA, MTA Fillapex (MTA-F), em cultura de células humanas. **Métodos:** Células humanas tipo osteoblastos (Saos-2) foram expostas durante 1, 2, 3 e 7 dias aos cimentos MTA-F, Epiphany SE (EP-SE, a base de resina metacrilato) e cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE). As culturas não expostas constituíram o grupo controle (CT). Avaliou-se a viabilidade das células por meio do ensaio MTT e análise morfológica com microscopia eletrônica de varredura (MEV). A bioatividade do MTA-F foi avaliada com ensaio de atividade de fosfatase alcalina (ALP) e detecção de depósitos de cálcio na cultura (ARS). A análise de energia de dispersão atômica (EDS) foi utilizada para caracterizar quimicamente os cristalitos de hidroxiapatita (HAP). As células Saos-2 foram cultivadas durante 21 dias para o ARS e SEM/EDS. Resultados ARS foram expressos como número de nódulos corados por área. A análise estatística foi realizada com ANOVA e testes de Bonferroni ( $p < 0.01$ ). **Resultados:** A exposição ao MTA-F nos períodos de 1, 2 e 3 dias resultou em alta citotoxicidade. Em contraste, a viabilidade aumentou após 7 dias de exposição ao MTA-F. A exposição ao EP-SE e ao ZOE foi citotóxica em todos os tempos avaliados. No dia 7, o aumento da atividade de ALP foi significativa no grupo MTA-F. O grupo MTA-F apresentou o maior percentual de nódulos corados no ARS (MTA-F > CT > EP-SE > ZOE). A análise de SEM / EDS mostrou cristais de hidroxiapatita apenas no MTA-F e grupo CT. No grupo MTA-F, foram observados cristalitos com composição química e morfologia diferentes em relação ao CT. **Conclusões:** Após a presa inicial, a

citotoxicidade do MTA-F diminuiu e o cimento apresentou bioatividade capaz de estimular a nucleação de cristais de HAP.

Palavras-chave: cimento de agregado de trióxido mineral; biocompatibilidade, bioatividade; hidroxiapatita.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** *The main purpose of this study was to evaluate the biocompatibility and bioactivity of a new MTA-based endodontic sealer, MTA Fillapex (MTA-F), in human cell culture.* **Methods:** *Human osteoblast-like cells (Saos-2) were exposed for 1, 2, 3, and 7 days to MTA-F, Epiphany SE (EP-SE, self-etch resin-based) and zinc oxide-eugenol sealer (ZOE). Unexposed cultures were the control group (CT). We assessed the viability of the cells by MTT assay and the morphology by scanning electron microscopy (SEM). The bioactivity of MTA-F was evaluated by alkaline phosphatase activity (ALP) and detection of calcium deposits in the culture (ARS). Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was used to chemically characterize the hydroxyapatite crystallites (HAP). Saos-2 cells were cultured for 21 days for ARS and SEM/EDS. ARS results were expressed as the number of stained nodules per area. Statistical analysis was performed with ANOVA and Bonferroni tests ( $p < 0.01$ ).* **Results:** *MTA-F exposure*

for 1, 2, and 3 days resulted in increased cytotoxicity. In contrast, viability increased after 7 days of exposure to MTA-F. Exposure to EP-SE and ZOE was cytotoxicity at all time points. At day 7, ALP activity increase was significant in the MTA-F group. MTA-F presented the highest percentage of ARS-stained nodules (MTA-F>CT>EP-SE>ZOE). SEM/EDS analysis showed hydroxyapatite crystals only in the MTA-F and CT groups. In the MTA-F group, crystallite morphology and chemical composition were different from CT. **Conclusions:** After setting, the cytotoxicity of MTA-F decreased and the sealer presented suitable bioactivity to stimulate HAP crystal nucleation.

**Keywords:** Mineral trioxide aggregate sealer; biocompatibility; bioactivity; hydroxyapatite.

## INTRODUÇÃO

O agregado trióxido mineral (MTA) surgiu como o material de escolha para reparos de perfurações radiculares e material retrobturador nos anos 90, um período revolucionário marcado por muitos avanços em Endodontia (1). O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda e recebeu aprovação da Federal Drug Administration (FDA, EUA) para uso humano em 1998 (2, 3). Desde então, o MTA tem mostrado excelentes propriedades biológicas em vários estudos in vivo e in vitro (4-9). Nos sistemas de cultura de células, por exemplo, o MTA tem demonstrado aumentar a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal (6), induzir a diferenciação de osteoblastos (7, 8), e estimular a mineralização em células de polpa dentária (9). Esta biocompatibilidade e potencial bioativo têm interessado cientistas em todo o mundo, não só no sentido de melhoria das características de manipulação deste material dental, mas também de suas propriedades físico-químicas para expandir sua aplicabilidade em endodontia. Assim, novos cimentos retrobturadores baseados no MTA e cimentos endodônticos foram propostos (10-12), como o MTA Fillapex (MTA-F, Angelus, Londrina, Brasil).

Os cimentos obturadores baseados no MTA refletem uma exigência atual de obter materiais capazes de estimular o processo de reparo dos tecidos apicais e periapicais após a terapia endodôntica, não apenas materiais inertes ou biocompatíveis. Por conseguinte, o MTA-F representa o esforço da combinação de um material de excelentes propriedades biológicas como MTA com resinas e outros componentes para melhorar diversas propriedades

requeridas a um cimento endodôntico: adesividade, estabilidade dimensional, tempo de trabalho, radiopacidade, resistência à compressão e efeito antimicrobiano. De acordo com a informação do fabricante, o MTA-F é composto de resina de salicilato, resina diluente, resina natural, óxido de bismuto como agente radiopacificador, nanopartículas de sílica, MTA, e pigmentos. O agregado de trióxido mineral consiste em finas partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, óxido tricálcico de alumínio, óxido de tricálcio, gypsum (sulfato de cálcio dihidratado) e outros óxidos minerais (3).

Além da necessidade de avaliação de novos materiais endodônticos por meio de ensaios de biocompatibilidade, é importante investigar se a adição destas resinas e outros constituintes são capazes de influenciar o potencial bioativo do MTA na formulação do novo cimento endodôntico. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade do MTA-F em estimular a mineralização em cultura de células Saos-2, comparando com os cimentos endodônticos Epiphany SE e óxido de zinco e eugenol. Saos-2 é uma célula do tipo osteoblasto humano que se comporta como modelo para o estudo de eventos tardios de diferenciação celular dos osteoblastos (13). O Epiphany SE (EP-SE) é um cimento obturador de canais radiculares à base de resina metacrilato (14). O óxido de zinco e eugenol (ZOE) é um cimento endodôntico comumente utilizado e conhecido por apresentar citotoxicidade (15). O último material dental foi utilizado como controle negativo de biocompatibilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Preparo das amostras de cimentos endodônticos*

O MTA Fillapex (MTA-F, Angelus, PR, Brasil), o Epiphany SE (EP-SE, SybronEndo, CA, EUA), e o Endofill (preparado de acordo com as recomendações do fabricante, Dentsply, RJ, Brasil) foram inseridos em moldes estéreis de polietileno medindo 6 milímetros de diâmetro e 2 milímetros de espessura (tampas de tubos de microcentrífuga). Após 1 dia de presa inicial a 37 °C, humidade de 95% e CO<sub>2</sub> a 5%, as amostras de cimento foram removidas dos moldes e colocadas na parte inferior de suportes permeáveis do tipo *transwell inserts* (membranas de 0.4 µM, Corning, Union City, CA) em placas de cultura de 12 poços contendo meio de cultura para exposição das células durante 1, 2, 3 e 7 dias. Antes de realizar os ensaios de mineralização (coloração com vermelho de Alizarina e microscopia eletrônica de varredura), as amostras de cimento foram mantidas durante 7 dias para presa nas mesmas condições descritas acima, previamente à adição das células. O padrão de 7 dias de presa para os ensaios de nódulos minerais foi estabelecido em conformidade com os resultados do ensaio MTT.

### **Cultura de células**

Células do tipo osteoblastos humanos (Saos-2 linha ATCC HTB-85) foram cultivadas como uma cultura em monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA) contendo meio Dulbecco Eagle Modificado (DEMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI / mL), e estreptomicina (100 µg / mL), até confluência. As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37 °C, umidade de 95%, CO<sub>2</sub> a 5% (todos suplementos de cultura, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). As células aderidas, quando em fase de crescimento logarítmico, foram destacadas com tripsina / EDTA (0,25%) a 37 °C durante 2 minutos. As células coletadas foram semeadas em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA) a uma densidade de  $2 \times 10^5$  por poço, determinada em hemocitômetro. Em seguida, as células foram incubadas nas mesmas condições descritas acima, durante 24 horas, para se obter o crescimento celular exponencial antes da exposição aos cimentos. As células não expostas às amostras de cimentos formaram o grupo controle positivo. O meio de cultura foi renovado a cada 3 dias. Para investigar o efeito de cimentos sobre o fenótipo de Saos-2 e analisar a formação de nódulos mineralizados com microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de energia de dispersão atômica (EDS), as células foram semeadas sobre lamínulas de vidro, depositadas no fundo dos poços em placas de 12 poços (n = 3 amostras/grupo para a cultura em meio osteogênico ou não osteogênico). Após 1 dia em cultura, as células foram expostas aos cimentos depositados em *transwell* no meio osteogênico (DMEM, FBS a 10%, 100 IU/mL penicilina, estreptomicina 100 µg/mL, 0,0023 g/mL β-glicerofosfato, 0.055mg/mL L-ascorbato; Sigma Chemicals, St Louis, MO) ou

não-osteogénico (DMEM, FBS a 10%, 100 IU/mL penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina). Durante os ensaios, o meio de cultura foi renovado a cada 24 horas durante 1 semana e mais tarde, a cada 2 dias.

### ***Viabilidade celular***

A proliferação celular foi determinada pelo ensaio MTT. Este ensaio baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal de tetrazólio solúvel em água e de cor amarela, 3-(4,5-dimetil-thiazoyl)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO), em compostos de cor roxa denominados formazan. A absorbância medida é proporcional à quantidade de células viáveis. Depois de 0, 1, 2, 3 e 7 dias de exposição das células aos cimentos (ou não, grupo controle), os *transwells* com as amostras de cimentos foram removidos e o meio de cultura foi alterado para DEMEM contendo 0,55 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas durante mais 4 horas nas mesmas condições descritas acima. Depois deste período de tempo, cada poço foi lavado com 1 mL de tampão fosfato (PBS 1X) e 500 µL de álcool isopropílico acidificado (HCl: álcool isopropílico, 0.04N) foram adicionados para extrair e solubilizar o formazan. Alíquotas de 150 µL da solução de formazan de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços (Corning) e a densidade óptica (OD = 570 nm) foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT). As amostras foram preparadas em triplicata para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O ensaio foi repetido 3 vezes (n = 9/grupo). Os dados obtidos foram exportados para

planilhas Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA) e submetidos à análise estatística.

### ***Atividade de fosfatase alcalina (ALP)***

A atividade de ALP foi determinada usando um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Resumidamente, a ALP hidrolisa o monofosfato de timolftaleína, liberando timolftaleína em meio alcalino. Depois de 1, 2, 3 e 7 dias de exposição aos cimentos, as células Saos-2 foram lavadas com tampão fosfato (PBS 1X) e imersas em 1 mL de lauril sulfato de sódio (1mg/mL; SLS, Sigma Chemicals, St Louis, MO) durante 30 min à temperatura ambiente, sem agitação. Alíquotas de cada solução de amostras (50 µL) foram adicionadas aos componentes do kit, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 590 nm e a atividade de ALP foi calculada como µmol de timolftaleína/min/L. Triplicatas foram preparados para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O experimento foi repetido 3 vezes (n = 9/grupo). Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pelo número de células viáveis para cada respectivo tempo de cultivo (OD = 570nm) (16).

### ***Mineralização e coloração com vermelho de alizarina S (ARS)***

O vermelho de alizarina é um corante que tem afinidade por cálcio e permite identificar os depósitos de cálcio na cultura de células. Após 21 dias de exposição das células aos cimentos, estas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos cada com PBS 1X e fixadas em 10% (v/v) de formaldeído (Sigma) à temperatura ambiente durante 15 min. As monocamadas foram então lavadas duas vezes com destilada (dH<sub>2</sub>O) da mesma forma como anteriormente descrita antes da adição de 1 mL de ARS (2%, pH 4.1) por poço (n = 6/grupo, incluindo o controle). As placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente durante 20 min para expor os nódulos mineralizados ao corante. Em seguida, os poços foram lavados 5 vezes com 2 mL dH<sub>2</sub>O. Os nódulos corados foram observados utilizando um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100) com ampliação de 40x, e os poços fotografados (Canon EOS-1D). As imagens digitais foram processadas e dois examinadores realizaram de forma independente a contagem dos nódulos corados em cada amostra utilizando o software ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA).

### ***Análise morfológica dos nódulos mineralizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia de dispersão atômica (EDS)***

Após a exposição das células aos cimentos por 21 dias, em meio osteogênico ou não-osteogênico (controle), as lamínulas de células foram

lavadas três vezes em PBS 1X e fixadas em glutaraldeído a 2.5% durante 2 h. As amostras foram então desidratadas em séries de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 20 min para cada concentração e secas num secador de ponto crítico (DLAL 28.000; DLAL, Williston, VT). As lamínulas foram então montadas em *stubs* e revestidas com ouro por pulverização catódica. Em seguida, as amostras preparadas foram observadas em MEV para caracterização morfológica de Saos-2 (n = 3 slides/grupo). Os cristalitos das células expostas ou não aos cimentos endodônticos (grupo controle) foram avaliadas por EDS para caracterização da sua composição química (n = 30 nódulos/grupo). O sistema foi operado a uma voltagem de 15 kV (SEM-EDS JSM-7001F, JEOL, Tóquio, Japão).

### ***Análise estatística***

Os resultados do MTT, dados sobre a atividade de fosfatase alcalina, contagem de nódulos corados com vermelho de alizarina e percentagem atômica de elementos químicos (EDS dos nódulos mineralizados) foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA). A média das diferenças entre todos os grupos de tratamento de células foram comparados por teste de Bonferroni (*post hoc*) e foram consideradas significativas quando  $p < 0.01$ .

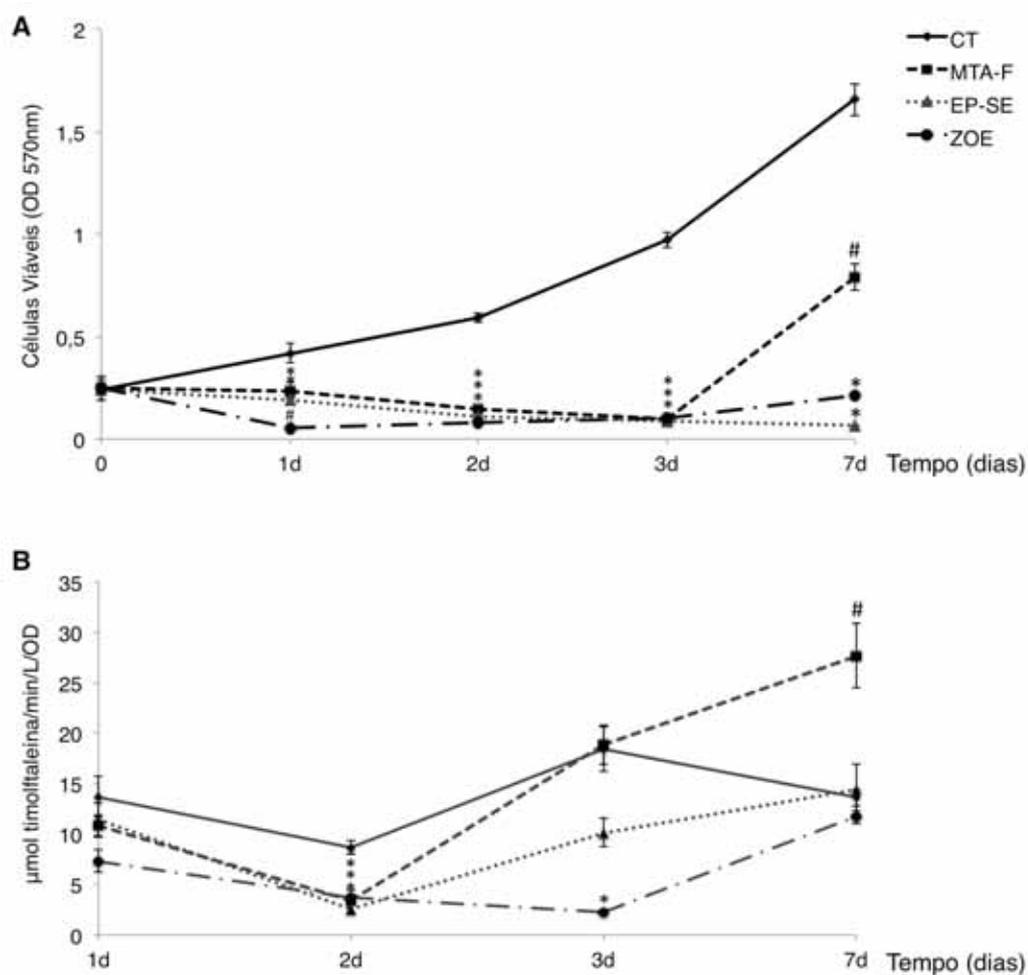
## RESULTADOS

### *Viabilidade celular*

O ensaio de MTT mostrou um decréscimo significativo na viabilidade celular para todos os grupos de cimentos avaliados após 1, 2 e 3 dias de exposição das células, em comparação com o grupo controle. No dia 7, as Saos-2 expostas ao MTA-F revelaram uma recuperação do efeito citotóxico (Fig.1A). O ZOE e o EP-SE apresentaram resposta citotóxica em todos os tempos, demonstrado por declínio significativo na viabilidade celular após a exposição a estes materiais endodônticos. A exposição ao EP-SE reduziu significativamente a viabilidade das células de uma forma tempo-dependente.

### *Atividade de fosfatase alcalina*

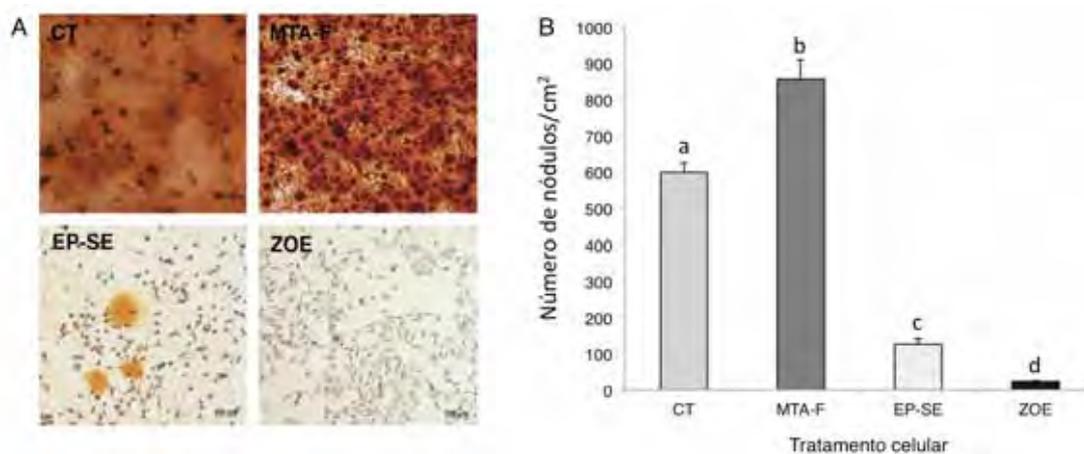
As Saos-2 tratadas com todos os cimentos testados apresentaram uma menor atividade metabólica e níveis reduzidos de atividade da enzima fosfatase alcalina significativos quando comparados com o grupo controle, após 1 e 2 dias de exposição (Fig. 1B). Após 7 dias de exposição, apenas o grupo MTA-F mostrou aumento da atividade de ALP (cerca de duas vezes maior em relação ao controle,  $p < 0.01$ ).



**Figura 1A e B. Viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina.** Imagem representando os dados de MTT e da atividade de ALP após exposição das células aos cimentos. As células sem qualquer tratamento de materiais odontológicos constituíram o grupo controle (CT). Grupos de cimentos: MTA Fillapex (MTA-F), Epiphany SE (EP-SE) e Zinco Eugenol cimento endodôntico (ZOE). Média  $\pm$  SEM ( $n = 6/\text{grupo}$ ), "\*" representa diferença significativa entre o tratamento com cimento endodôntico e o grupo controle. "#" Representa diferença significativa em comparação com os outros grupos de tratamento e também o grupo controle. ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.01$ ).

### **Nódulos de mineralização e coloração vermelho de alizarina (ARS)**

Após 21 dias de exposição das células, somente o MTA-F induziu a formação de um maior número de nódulos mineralizados do que o grupo controle (Fig. 2A). A análise estatística dos dados de ARS mostraram diferenças significativas entre os cimentos (Fig. 2B). Além disso, os nódulos do grupo MTA-F apareceram mais intensamente corados na análise microscópica do que os do grupo de controle (Fig. 3). Alguns nódulos corados de ARS foram observados na cultura de células expostas ao EP-SE, embora em quantidade significativamente menor do que no MTA-F e no grupo controle. Escassos nódulos mineralizados foram observados em células expostas ao ZOE (MTA-F > CT > EP-SE > ZOE).



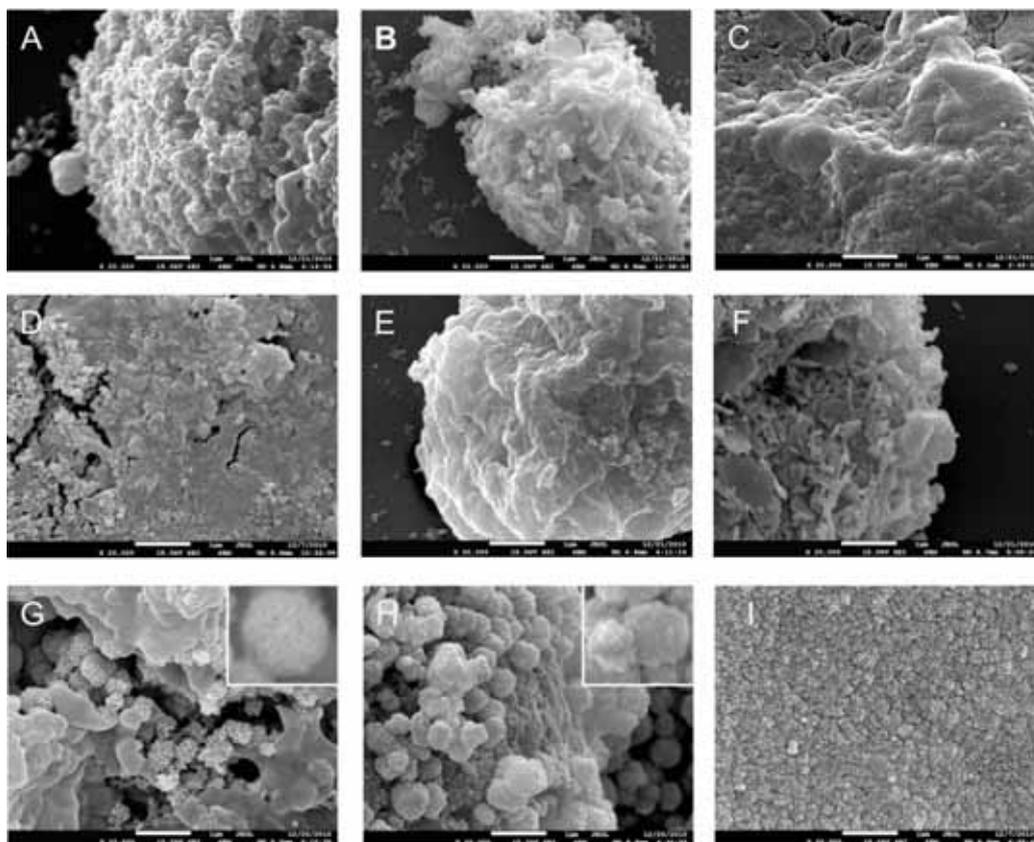
**Figura 2A e B. Nódulos de cálcio sobre cultura de Saos-2 corados com vermelho de alizarina (ARS 2%) e análise quantitativa de nódulos mineralizados após 21 dias em cultura, respectivamente. CT, grupo controle. MTA-F, Saos-2 expostas ao MTA Fillapex; EP-SE, Saos-2 expostas ao Epiphany SE e ZOE, Saos-2 expostas ao cimento de óxido de zinco e eugenol. Dados**

apresentados como média +/- SEM (n = 6), letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. ANOVA, Bonferroni pós-teste ( $p < 0.01$ ).

### ***Análise morfológica dos nódulos de mineralização por MEV***

Nos grupos EP-SE e ZOE, não foi observada diferença na morfologia celular entre as células cultivadas em meio não-osteogênico (Fig. 3A e B, respectivamente) ou osteogênico (Fig. 3E e F). No entanto, Saos-2 expostas ao EP-SE e ao ZOE exibiram morfologia diferente do controle, nenhum nódulo mineralizado foi observado nestes grupos. Resumidamente, foram observadas células de tamanho reduzido, com perda de integridade da membrana plasmática, sugerindo aspecto de morte celular por necrose (Fig. 3A, B, E e F). No grupo MTA-F/non-osteogenic, observou-se uma camada tipo gel com precipitado de nanopartículas (Fig. 3D). As análises de MEV mostraram integridade da membrana plasmática e adesão de Saos-2 nas lâminas de vidro depois de 21 dias de exposição ao MTA-F em meio osteogênico (Fig. 3H); embora tenha sido observado um número menor de células no grupo MTA-F, quando comparado com o controle. A análise por MEV confirmou a presença de numerosos cristais semelhantes a hidroxiapatita (0.2-0.8  $\mu\text{m}$ ) depositados sobre a lamínula e aderidos às membranas celulares de Saos-2 em meio osteogênico, tanto não expostas (CT) como expostas ao MTA-F (Fig. 3G e H, respectivamente). No entanto, os cristais no grupo MTA-F apresentaram características morfológicas diferentes das observadas no grupo controle. Os nódulos mineralizados no grupo MTA-F mostraram uma superfície de forma irregular formada por nanopartículas esféricas compactadas, enquanto que os

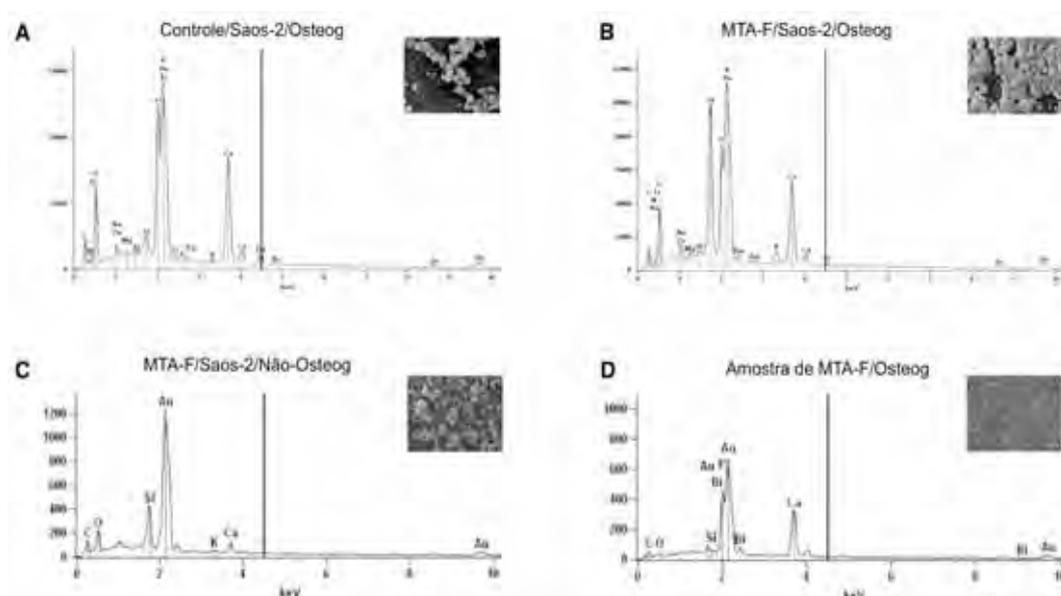
nódulos no grupo controle mostraram superfície áspera formada por um agregado de nanopartículas em forma de bastões e não compactadas.



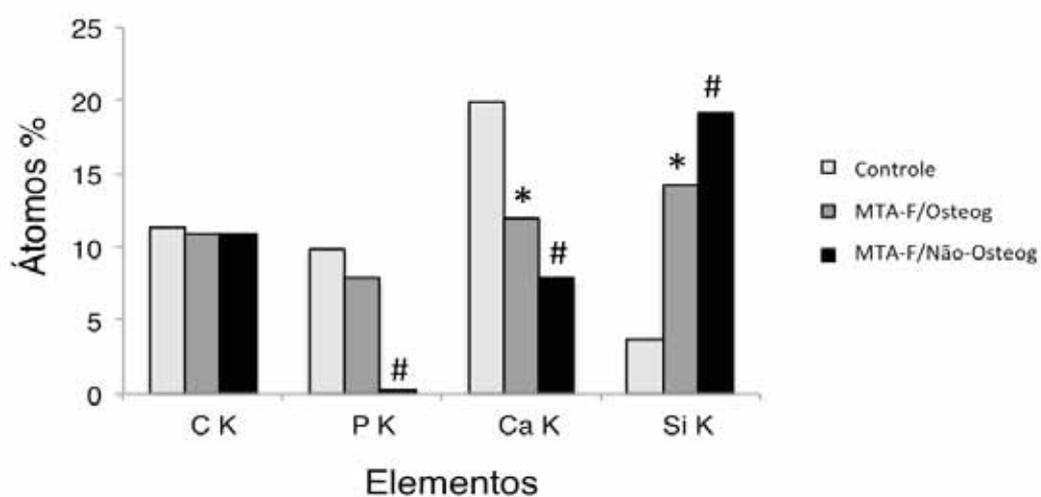
**Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de Saos-2 em meio não osteogênico (A-D) e meio osteogênico (E-H).** A e E, Saos-2 com rompimento da membrana plasmática após a exposição ao EP-SE. B e F, Saos-2 com aspecto de necrose no grupo ZOE. C e G, Saos-2 e cristálicos de HAP no grupo controle. D e H são micrografias da camada de hidrogel e da membrana plasmática de Saos-2 com cristálicos após exposição ao MTA-F, respectivamente. "I", SEM da superfície de uma amostra de MTA-F, que foi incubada em meio osteogênico nas mesmas condições das células para efeitos comparativos. Bar=1 $\mu$ m (X20.000).

### **EDS dos nódulos mineralizados**

A análise de EDS dos cristalitos de Saos-2 nos grupos controle e MTA-F em meio osteogênico confirmou a formação de cristais de hidroxiapatita (HAP) e as diferenças na composição dos elementos químicos entre os cristais formados nestes dois grupos (Fig. 4A e B). EDS em cristalitos de HAP do grupo MTA-F/osteogênico exibiu picos proeminentes de Ca, P, S, e Si. Vestígios de K, Z, N, Na e Mg também foram detectados. As células expostas ao MTA-F mostraram depósitos de cristalitos mesmo em meio não-osteogênico. No entanto, os principais minerais neste grupo foram Ca e Si (Fig. 4C); P não foi detectado. Apenas o EDS da amostra do *pellet* de MTA-F exibiu pico de Bi (Fig. 4D). A análise estatística dos elementos químicos demonstrou diferenças significativas nas percentagens de Si, P, e átomos de Ca nos cristais do grupo MTA-F em comparação com os do controle (Fig. 5). As razões atômicas de Ca/P nos cristalitos de HAP do controle e do grupo MTA-F em meio osteogênico foram 2.01 e 1.5, respectivamente. As razões de Si/Ca foram 0.18, 1.8 e 2.43 para os nano-cristalitos de HAP em meio osteogênico do grupo controle, MTA-F/Saos-2 e MTA-F/Saos-2 em meio não-osteogênico, respectivamente.



**Figura 4. Análise de energia de dispersão atômica dos cristaltos de hidroxiapatita em cultura de Saos-2.** Cristaltos de Saos-2 em meio osteogênico não expostas (A) e expostas ao MTA-F (B) exibindo picos elevados de Ca, P e O. (C) EDS de nano-cristaltos no grupo MTA-F em meio não-osteogênico. (D) EDS de uma amostra do *pellet* de MTA-F para efeitos comparativos.



**Figura 5. Percentual átomos nos cristaltos.** "\*" e "#" representam diferença

significativa em P, Ca e Si entre os cristais de diferentes grupos. ANOVA, Bonferroni pós-teste ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSSÃO

Novos cimentos a base de MTA têm sido o foco de muitos estudos no campo endodôntico desde as primeiras publicações de Torabinejad (1, 2). O forte interesse no desenvolvimento de materiais endodônticos à base de MTA é devido à excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade do MTA (17). Neste estudo, avaliou-se a bioatividade do novo cimento endodôntico, MTA Fillapex, em induzir mineralização no sistema de cultura de células humanas, Saos-2. Saos-2 é uma linhagem celular que tem caracterização bem documentada, especialmente no que diz respeito à sua elevada expressão de fosfatase alcalina óssea e sua capacidade para depositar matriz extracelular mineralizável (13).

Os resultados de MTT revelaram que todos os materiais, MTA-F, EP-SE e ZOE, exibiram um efeito citotóxico. A citotoxicidade do MTA-F foi provavelmente relacionada com a presença de resina neste material ou com a liberação de arsênio, um metal pesado que pode ser encontrado como contaminante no MTA (18). O Arsênio reage com grupos tióis de proteínas e a exposição a altas concentrações deste elemento pode induzir genotoxicidade. Após 7 dias de exposição ao MTA-F, a cultura de células mostrou evidente recuperação da viabilidade. Neste tempo de avaliação, a amostra de MTA-F

havia tomado presa. Isto sugere que o tempo de presa longo do MTA Fillapex pode desempenhar um papel na sua citotoxicidade, devido à difusão de compostos tóxicos para o microambiente por um longo período. O MTA-F manteve atividade antimicrobiana durante 7 dias após seu preparo (19). Após este período, no entanto, nenhum efeito antibacteriano foi detectado. O efeito antibacteriano do MTA-F foi relacionado com seu componente resinoso e com o pH de 10.14-10.5 que o MTA-F promoveu na suspensão. A citotoxicidade observada no presente estudo para o EP-SE e ZOE foi descrita também em outros estudos (14, 20, 21). Duas possíveis razões para a elevada citotoxicidade do EP-SE incluem resíduos de monômeros que não reagiram, tais como a liberação de 2-hydroxietyl-metacrilato (HEMA) a partir do composto de resina dual e de lixiviação de pequenas partículas (21). OS cimentos ZOE são conhecidos por causar inflamação e reabsorção óssea in vivo. Além disso, o eugenol demonstrou capacidade para ativar o fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), induzir a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), vacuolização e toxicidade em células de osteosarcoma humano in vitro (15).

A ALP é um marcador reconhecido de diferenciação de osteoblastos e uma enzima essencial no processo de nucleação dos cristais de hidroxiapatita. No entanto, o efeito citotóxico inicial do MTA-F influenciou negativamente não só a viabilidade celular, mas também a atividade de ALP nos primeiros 3 dias de exposição ao material. Após 7 dias de exposição ao MTA-F, as Saos-2 mostraram um aumento significativo de ALP, o qual suporta a hipótese de biocompatibilidade e recuperação da bioatividade uma vez que o MTA-F tenha tomado presa completa. A atividade de ALP neste estudo foi semelhante à das Saos-2, quando expostas a cimentos retrobturadores a base de MTA após 3 dias

de tratamento (22).

O aumento da atividade de ALP foi consistente com o número significativamente elevado de nódulos corados (ARS) observados em cultura de Saos-2 expostas ao MTA-F. Além disso, a coloração dos nódulos mineralizados no grupo MTA-F pareceu mais intensa sob microscopia de luz. Estes achados sugeriram que o MTA-F apresentava potencial para induzir a formação dos nódulos mineralizados. Para investigar esta possibilidade, os nódulos mineralizados foram caracterizados por MEV/EDS.

Surpreendentemente, a maioria dos nódulos mineralizados observados nas imagens de MEV do grupo MTA-F tinham morfologia diferente dos nódulos mineralizados no grupo controle. As diversas condições de nucleação dos cristais de hidroxiapatita podem explicar essa diferença na morfologia dos nanocristalitos. Nucleação é o primeiro passo da biomineralização e requer que uma barreira de energia livre seja superada, o que resulta no tamanho e padrão dos cristalitos minerais através do papel mediador de muitos substratos orgânicos e inorgânicos (23). Super-saturação, concentração de íons, membranas celulares e biomoléculas, tais como proteínas da matriz óssea, podem atuar como agentes regulatórios no controle do padrão de formação dos cristais de HAP. No grupo controle, a confluência das Saos-2 associada com a presença maciça de biomoléculas da matriz, forneceu suporte e sítio necessários para um processo de nucleação heterogênea. A presença de biomoléculas reduz a barreira de energia contra a nucleação e melhora a combinação estrutural entre a fase cristalina e o substrato, promovendo a sinergia estrutural dos cristais de HAP. Por outro lado, é possível que o MTA-F tenha promovido um ambiente altamente saturado de íons estranhos, com um

menor número de células, e um sítio de nucleação de hidrogel de Ca-Si. Foi demonstrado que uma super-saturação pode dar origem a um conjunto compacto e aleatório de cristais de HAP (23). Em adição, o silicato de cálcio hidratado é o principal subproduto da reação do MTA com cimentos de cálcio silicato (24). Portanto, a caracterização morfológica diferente em MEV dos cristais de HAP no grupo MTA-F, em conjunto com a análise de EDS, mostraram que o Ca e o Si dispersados a partir do material dentário participaram no processo de nucleação dos cristais de HAP, provavelmente através da formação de sítios de nucleação no hidrogel de Ca-Si. Estudos anteriores demonstraram que os íons Ca e Si prontamente migram do MTA e dos cimentos de cálcio silicato em solução (24). O biovidro e o tricálcio silicato demonstraram liberar silício a uma concentração de 50-100 mg/L em meio de cultura de células (25).

Os fortes picos de Ca, P e Si nas análises de EDS dos cristalitos nos grupos controle e MTA-F são indicativos de deposição de fosfato de cálcio. A relação Ca/P de 1.5 a 2.0 observada na análise de elementos químicos dos cristalitos nos grupos MTA-F e controle, respectivamente, é consistente com a fase de maturação da apatita, em que íons carbonato podem substituir os íons fosfato (apatita carbonatada tipo B, ou tipo B CAp) ou íons hidroxila (apatita carbonatada tipo A, tipo A CAp) na estrutura da apatita (26). Diferenças significativas nas razões atômicas de Si/Ca foram observadas entre o grupo controle e os grupos MTA-F/osteog e MTA-F/non-osteog. Duas possibilidades distintas poderiam explicar a razão Si/Ca elevada nos cristalitos do grupo MTA-F/osteog: uma é a ocorrência de co-precipitação do silicato com a apatita. O metasilicato é solúvel em meio aquoso, onde reage com o cálcio formando o gel de silicato insolúvel polimerizado (25). A outra possibilidade é a substituição do

fósforo pelo silício na estrutura da apatita em alguns cristais (27), embora não tenha havido diferença estatística no conteúdo de P entre cristalitos do controle e do grupo MTA-F/osteog neste estudo. No grupo MTA-F/não-osteog, a razão de Si/Ca de 2.43 reflete a presença do gel hidrato de cálcio-silicato, um gel hidratado de silicato com aspecto granular fino e altamente desorganizado contendo grupamentos Si-OH que podem proporcionar sítios de nucleação para formação de apatita (28, 29). Interessantemente, a presença de silício proveniente do MTA-F na estrutura dos cristalitos de HAP, aumenta o potencial bioativo deste material, uma vez que o silício é um elemento essencial para o crescimento normal do tecido ósseo e tecidos conjuntivos. O silício demonstrou estimular a síntese de DNA, a atividade de ALP, a expressão de osteocalcina, e a proliferação de fibroblastos (30, 31).

## **CONCLUSÕES**

Apesar do efeito citotóxico inicial durante o período de presa, o cimento endodôntico MTA Fillapex pode ser considerado um material promissor para o tratamento de canais radiculares, quanto ao seu potencial bioativo. Neste estudo, o MTA-F demonstrou clara capacidade de estimular a formação de sítios de nucleação para a formação dos cristais de apatita em cultura de células humanas do tipo osteoblastos. Análises futuras adicionais são necessárias para elucidar se o silício e outros componentes minerais deste material são incorporados na estrutura dos cristais de apatita.

## REFERÊNCIAS

1. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.
2. Torabinejad M, White DJ. United States Patent 5, 415, 547 USPTO. Patent Full Text and Image Database 1995.
3. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part I: Chemical, physical, and antibacterial. *J Endod* 2010;36:16-27.
4. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4.
5. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel Filho E, Coutinho Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J* 2006;39:293-6.
6. Bonson S, Jeansonne BG, Laillier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83:408-13.
7. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behavior of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J* 2005;38:203-10.
8. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Barnabé PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, Moraes-Costa MM, Cannon M. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62-5.
9. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kodowaki T, Takashi S. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008;34:1057-60.
10. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH.

Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:628-32.

11. Cornélio ALG, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod* 2011;37:203-10.

12. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2008;41:151-7.

13. McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (Saos-2). *Bone* 1995;16:415-26.

14. Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin-based root canal sealers. *Int Endod J* 2010;43:148-53.

15. Lee Y, Yang S, Ho W, Lee YH, Hung S. Eugenol modulates cyclooxygenase-2 expression through the activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts. *J Endod* 2007;33:1177-82.

16. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981;27:493-501.

17. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review – Part II: Leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.

18. Bramante CM, Demarchi ACCO, Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LSW, Duarte MAH. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:909-13.

19. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:1128-33.

20. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AHPlus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J* 2006;39:464-71.

21. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T.

Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:669-75.

22. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: A study of cellular response. *J Endod* 2008;34:39-44.

23. Jiang H, Liu XY. Principles of mimicking and engineering the self-organized structure of hard tissues. *J Biol Chem* 2004;279:41286-93.

24. Camilleri J. Hydration characteristics of calcium silicate cements with alternative radiopacifiers used as root-end filling materials. *J Endod* 2010;36:502-8.

25. Wang X, Ito A, Sogo Y, Li X, Oyane A. Silicate-apatite composite layers on external fixation rods and in vitro evaluation using fibroblast and osteoblast. *J Biomed Mater Res* 2010;92A:1181-9.

26. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J* 2010;43:917-29.

27. Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1999;44:422-8.

28. Oliveira AL, Malafaya PB, Reis RL. Sodium silicate gel as a precursor for the in vitro nucleation and growth of a bone-like apatite coating in compact and porous polymeric structures. *Biomaterials* 2003;24:2575-84.

29. Carlisle EM. Silicon: A possible factor in bone calcification. *Science* 1970;167:279-80.

30. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HF, Evans BA, Thompson RP, Powell JJ, Hampson GN. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003;32:127-35.

Hanasono MM, Lum J, Carroll LA, Mikulec AA, Koch RJ. The effect of silicone gel on basic fibroblast growth factor levels in fibroblast cell culture. *Arch Facial Plast Surg* 2004;6:88-93.

**Resposta das Células do Folículo Dental Humano  
ao Cimento Portland e às Associações com  
Diferentes Radiopacificadores:  
Um Estudo de Biocompatibilidade.\***



**\*Artigo submetido ao periódico**

**Journal of Biomedical Materials Research – part B.**

## RESUMO

Pesquisadores em todo o mundo têm grande interesse em células do folículo dental e materiais odontológicos baseados no cimento Portland (PC) para a odontologia regenerativa. No entanto, o PC não apresenta radiopacidade e o agente radiopacificador ideal necessita ser identificado. Este estudo teve por objetivo avaliar viabilidade, morfologia e adesão de células do folículo dental humano (hDFCs) em contato com cimento Portland branco (W-PC) associado com 3 radiopacificadores diferentes. As hDFCs foram expostas durante 1, 2, 3 e 7 dias ao W-PC, W-PC associado a óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio. A biocompatibilidade e a bioatividade foram avaliadas com ensaios de MTT e fosfatase alcalina (ALP), respectivamente. Análise estatística: ANOVA e Bonferroni *post hoc* ( $p < 0.01$ ). As taxas de viabilidade das hDFCs após a exposição ao W-PC e todas associações W-PC/agentes radiopacificadores foram excelentes ( $> 100\%$ ). As hDFCs expostas mostraram aumento significativo da atividade de ALP e morfologia consistente com intensa síntese proteica em imagens de microscopia eletrônica de transmissão. O número de mitocôndrias nas hDFCs expostas tiveram forte associação com a taxa de viabilidade (coeficiente de Pearson,  $r = 0.84$ ). A microscopia eletrônica de varredura mostrou forte adesão de hDFCs na superfície das amostras. Por conseguinte, o óxido de zircônio e o tungstato de cálcio são potenciais agentes radiopacificadores para novos materiais à base de PC. Além disso, as hDFCs podem ser consideradas uma alternativa adequada para impressão celular em materiais de arcabouços baseados em PC para odontologia regenerativa.

**Palavras-chave:** cimento Portland, agentes radiopacificadores, folículo dental, hDFCs, biocompatibilidade.

## **ABSTRACT**

Researches worldwide have great interest in dental follicle cells and dental materials based on Portland cement (PC) for regenerative dentistry. However, PC lacks radiopacity and the ideal radiopacifying agent has yet to be identified. This study aimed to assess for the first time the viability, morphology and adherence of human dental follicle cells (hDFCs) on White-PC (W-PC) associated with 3 different radiopacifiers. The hDFCs were exposed for 1, 2, 3, and 7 days to W-PC, W-PC plus bismuth oxide, zirconium oxide and calcium tungstate. The biocompatibility and bioactivity were evaluated with MTT and alkaline phosphatase (ALP) assays, respectively. Statistical analysis: ANOVA and Bonferroni post-hoc ( $p < 0.01$ ). The hDFCs viability rates after exposure to W-PC and all W-PC/radiopacifying agents were excellent ( $>100\%$ ). The exposed hDFCs showed significantly increase in ALP activity and morphology consistent with intense protein synthesis in transmission electron microscopy images. The numbers of mitochondria in exposed hDFCs were strong associated with viability rate (Pearson's coefficient,  $r=0.84$ ). The scanning electron microscopy showed close attachment of hDFCs on pellet samples. Accordingly, zirconium oxide and calcium tungstate are potential radiopacifying agents to new PC-based materials.

In addition, hDFCs can be a suitable approach to cell printing on PC-scaffolds for regenerative dentistry.

**Key words:** Portland cement, radiopacifying agents, dental follicle, hDFCs, biocompatibility.

## INTRODUÇÃO

O tecido do folículo dental humano e o cimento Portland são dois temas de interesse atual no campo da odontologia regenerativa. O tecido do folículo dental tem atraído atenção como fonte de células-tronco adultas<sup>1</sup> e o cimento Portland (PC) devido a sua excelente bioatividade<sup>2</sup>. O potencial do PC para induzir regeneração óssea e da estrutura dental despertou o interesse no desenvolvimento de uma variedade de materiais odontológicos baseados no PC, de arcabouço para engenharia de tecido ósseo<sup>3</sup> a materiais reparadores<sup>4</sup> e cimentos obturadores de canais radiculares<sup>5</sup>.

O folículo dental (DF) é um tecido ectomesenquimal compacto que envolve o órgão do esmalte e a papila do germe dental. Na fase de capuz do desenvolvimento dos dentes, uma população de células ectomesenquimais migra a partir da crista neural e dá origem ao folículo dental<sup>6</sup>. O próprio DF tem função formativa essencial para originar o periodonto. De acordo com a teoria clássica, o folículo dental armazena as células progenitoras dos três tecidos do

periodonto: osso alveolar, cimento e ligamento periodontal (PDL)<sup>7</sup>. O osso alveolar e o cimento são tecidos mineralizados, enquanto o PDL é um tecido conjuntivo especializado que une os outros dois tecidos periodontais entre si. Para realizar funções formativas diversas, o folículo dental é reconhecido como rico em células indiferenciadas, incluindo células do folículo dental completamente indiferenciadas, células multipotentes e células progenitoras mais restritas<sup>8</sup>.

Curiosamente, as células do folículo dental originam os tecidos que devem responder aos materiais odontológicos baseados no PC durante o tratamento endodôntico ou cirurgias periapicais. Portanto, ambos os temas podem estar muito relacionados. As células do folículo dental humano (hDFCs) têm aplicação potencial para a impressão celular tridimensional em engenharia de tecidos periodontais com arcabouços baseados em PC<sup>9,10</sup> e também podem ser adequadas para estudos biológicos preliminares com novos materiais à base do PC. Adicionalmente, as hDFCs podem ser facilmente isoladas de folículos dentais de terceiros molares inclusos indicados para exodontia por razões ortodônticas<sup>11</sup>.

O PC é um cimento comumente utilizado em engenharia civil que foi introduzido na odontologia como Agregado de Trióxido Mineral (MTA) para retrobturações em tratamento endodôntico<sup>12</sup>. O PC e o MTA têm a mesma constituição básica: tricálcio e dicálcio silicatos ( $3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$  e  $2\text{Ca}\cdot\text{SiO}_2$ ). A diferença entre os dois cimentos é a adição de óxido de bismuto como agente radiopacificador no MTA, uma vez que o inconveniente do PC é a sua falta de radiopacidade. Assim, para desenvolver um material odontológico baseado em PC, a associação de agente de radiopacificador é requisito para satisfazer as

normas do ISO. Estudos anteriores<sup>13,14</sup> avaliaram a radiopacidade do PC associado com óxido de bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), óxido de chumbo, subnitrato de bismuto, carbonato de bismuto  $\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_3$ , sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ ), iodofórmio ( $\text{CHI}_3$ ), tungstato decálcio ( $\text{CaWO}_4$ ), e óxido de zircônio ( $\text{ZrO}_2$ ). Exceto para PC +  $\text{BaSO}_4$ , todas as associações avaliadas apresentaram maior radiopacidade do que a dentina e foram sugeridos como potenciais agentes radiopacificadores em formulações baseadas no PC.

Apesar de todas as substâncias terem promovido radiopacidade satisfatória, a potencial interferência com as propriedades do PC deve ser investigada. Dependendo do radiopacificador adicionado ao PC, pode ocorrer efeito negativo no material, reduzindo resistência à compressão e modificação de suas propriedades biológicas<sup>15,16</sup>. Por exemplo, o radiopacificador óxido de bismuto pode ser genotóxico dependendo da concentração<sup>17</sup>. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade do cimento PC branco associado com três diferentes agentes radiopacificadores nas células que apresentam potencial de formativo de tecidos periodontais: hDFCs.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Cultura de Células hDFCs*

Dois folículos dentais (DF) foram dissecados de terceiros molares completamente impactados no estágio F1 do desenvolvimento dental<sup>18</sup>. As amostras foram obtidas de um paciente de 18 anos que foi encaminhado à clínica de cirurgia para extração destes elementos dentais por motivos ortodônticos. Os DFs foram doados para este estudo, em conformidade com a Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinki, após aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (FOAr / UNESP, Brasil). Imediatamente após as extrações dos dentes, os DFs foram limpos e seccionados com lâminas estéreis sobre placas de cultura de 10cm (Corning, Union City, CA, EUA) contendo meio mínimo essencial alfa ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 2 mM de glutamina, 15% de soro fetal de bovino (FBS), 0.1 mM de fosfato de ácido L-ascórbico, 100 U/mL de penicilina e estreptomicina 100 mg/mL (todos os suplementos de cultura, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). A papila dental foi descartada. Em sequência, os DFs seccionados foram coletados por centrifugação a 800 rpm durante 5 min e digeridos com 1mg/mL de colagenase tipo I (Roche, Mannheim, Alemanha) a 37 °C, humidade de 95% e 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 min. O sobrenadante dos explantes de DF foram semeados em placas de cultura de 6 cm (Corning) contendo  $\alpha$ -MEM (2 mM de glutamina, 15% de FBS, 0,1 mM de fosfato de ácido L-ascórbico, sem antibióticos) e cultivadas a 37 °C, humidade de 95% e CO<sub>2</sub> a 5%. As células não

aderidas foram removidas durante a troca de meio de cultura 24 horas após semeados as células. Em uma semana, os aglomerados de colônias de hDFCs foram destacados das placas de cultura por tripsinização com 0.25% de tripsina/EDTA (Gibco) e cultivados como culturas em monocamada em garrafas T25 (Corning), contendo  $\alpha$ -MEM. Quando confluentes, as células foram transferidas também por tripsinização para frascos T75 (Corning) e subcultivadas duas vezes por semana. Para os ensaios adicionais,  $2 \times 10^4$  hDFCs/poço, foram transferidas para placas de 24 poços (Corning) e incubadas nas mesmas condições descritas acima durante 24 horas até alcançar crescimento celular exponencial, antes da exposição ao material de teste. hDFCs não expostas foram os controles positivos.

### ***W-PC e Associações W-PC/radiopacificadores***

Os materiais de teste foram o cimento Portland branco (W-PC, Votorantim, São Paulo, SP, Brasil), W-PC-associado com óxido de bismuto (W-PCBi), óxido de zircônio (W-PCZir) e tungstato de cálcio (W-PCCA) como agentes radiopacificadores. Os agentes radiopacificadores (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados ao cimento Portland numa proporção de 20% em peso. O MTA Branco (MTA, Angelus, PR, Brasil) foi utilizado neste estudo para fins comparativos. Todos os cimentos foram preparados a 1 g (pó): 320  $\mu$ L de água MilliQ sobre placas de vidro estéreis e inseridos em moldes de polietileno estéreis com 6 milímetros de diâmetro e 2 milímetros de espessura (tampas de tubos de microcentrífuga). Após 30 min de tempo de presa inicial a 37 °C,

humidade de 95% e CO<sub>2</sub> a 5%; os *pellets* foram removidos dos moldes e expostos à luz UV durante 15 minutos adicionais, a fim de evitar a contaminação bacteriana. Em seguida, as amostras foram colocados em suportes permeáveis *transwell inserts* (membranas de 0.4 µm, Corning, Union City, CA) em placas de 24 poços de cultura contendo as monocamadas de hDFCs. As hDFCs foram expostas ao material de teste durante 1, 2, 3 e 7 dias (n = 6/grupo, incluindo o grupo controle). Para as análises de adesão com microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras de cimento foram deixadas tomando presa durante 24 horas a 37 °C, humidade de 95%, e CO<sub>2</sub> a 5% antes de semear as hDFCs.

### ***Ensaio MTT***

A viabilidade celular foi determinada com o ensaio enzimático de desidrogenase mitocondrial. Este ensaio baseia-se na capacidade da enzima mitocondrial em converter o sal de tetrazólio solúvel em água, que tem cor amarela, 3-(4,5-dimetil-thiazoyl)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em compostos solúveis de formazan, cuja absorbância é medida é proporcional à quantidade de células vivas. Depois de 1, 2, 3 e 7 dias de exposição das células às amostras de cimento (ou não, grupo controle), os *transwells* com W-PC ou associações W-PC/radiopacificadores foram removidos e o meio de cultura foi alterado para DEMEM contendo 0.55 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas durante 4 horas adicionais nas mesmas condições descritas acima. Transcorrido este tempo, cada poço foi lavado com 1 mL de

tampão fosfato (PBS 1X) e 500 µL de álcool isopropílico acidificado (HCl: álcool isopropílico, 0.04N) foram adicionados para extrair e solubilizar o formazan. Alíquotas de 150 µL da solução de formazan de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços (Corning) e a densidade óptica (OD = 570 nm) foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT). Amostras em triplicata foram preparadas para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O experimento foi repetido 3 vezes independentes (n = 9/grupo). Os dados foram então exportados para planilhas Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA) e a taxa de viabilidade celular foi calculada: taxa de viabilidade celular (%) = (OD da amostra x 100) / OD do grupo controle.

### ***Ensaio de atividade de fosfatase alcalina (ALP)***

A atividade de ALP foi determinada usando um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Resumidamente, a ALP hidrolisa o monofosfato de timolftaleína, liberando timolftaleína em meio alcalino. Depois de 1, 2, 3 e 7 dias de exposição aos cimentos, as células Saos-2 foram lavadas com tampão fosfato (PBS 1X) e imersas em 1 mL de lauril sulfato de sódio (1mg/mL; SLS, Sigma Chemicals, St Louis, MO) durante 30 min à temperatura ambiente, sem agitação. Alíquotas de cada solução de amostras (50 µL) foram adicionadas aos componentes do kit, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 590 nm e a atividade de ALP foi calculada como µmol de timolftaleína/min/L. Triplicatas foram preparados

para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O experimento foi repetido 3 vezes ( $n = 9/\text{group}$ ). Os dados foram expressos como a atividade de ALP normalizada pela OD de células viáveis em cada respectivo tempo de cultivo ( $\text{OD} = 570\text{nm}$ )<sup>19</sup>.

### ***Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

Após a exposição às amostras de cimento durante 7 dias, as hDFCs aderidas foram destacadas por tripsinização e centrifugadas a 3.000 g durante 5 min para formar *pellets* em microtubos de 1.5 mL. Os sedimentos de células foram lavados três vezes em PBS 1X e fixados durante 1 h à temperatura ambiente numa solução contendo glutaraldeído a 2.5%, paraformaldeído a 4%, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 3% de sacarose, tamponado em cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação, os sedimentos de células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, 0.8% ferricianeto de potássio, e 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  em tampão cacodilato de sódio 0.1 M. Em seguida, as hDFCs foram contrastadas em bloco com acetato de uranilo (0.5%) durante a noite em câmara escura. Os *pelets* de células foram desidratados em uma série de acetona (30, 50, 70, 80 e 100%) e embebidos em resina Epon 812. Seções ultra-finas das amostras de hDFCs foram analisadas com microscópio eletrônico JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão). Todos os produtos químicos eram da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O experimento foi preparado em triplicata e 30 células foram analisadas por grupo ( $n = 30$ ). As imagens de MET foram digitalizadas e processadas. O número de mitocôndrias em cada célula foi contado 3 vezes

independentes usando o software ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA). Os dados foram exportados para planilhas Excel para análise estatística (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA).

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Para investigar a adesão das hDFCs e também o efeito de W-PC e associações de W-PC/radiopacificadores no seu fenótipo, as células foram semeadas ( $2 \times 10^4$ /well) sobre as amostras de cimento em placas de 24 poços de cultura. Após 7 dias em cultura, as amostras de cimento contendo as hDFCs semeadas foram lavadas 3 vezes em PBS 1X e fixadas com glutaraldeído a 2.5% durante 2 horas. As amostras foram desidratadas e fixadas em séries de etanol (30, 50, 70, 90, 100%) durante 20 min a cada concentração, e secas num secador de ponto crítico (DLAL 28.000; DLAL, Williston, VT, EUA). As amostras de cimento contendo as hDFCs semeadas foram montadas em stubs, revestidas com ouro e, finalmente, observadas com MEV (JSM-7001F, Jeol, Tóquio, Japão). O microscópio foi operado a 15 kV. Todos os produtos químicos eram da Sigma-Aldrich. O experimento foi preparado em triplicata para cada grupo ( $n = 3$ /grupo). Amostras de cimento sem células semeadas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima como controle negativo.

### ***Análise Estatística***

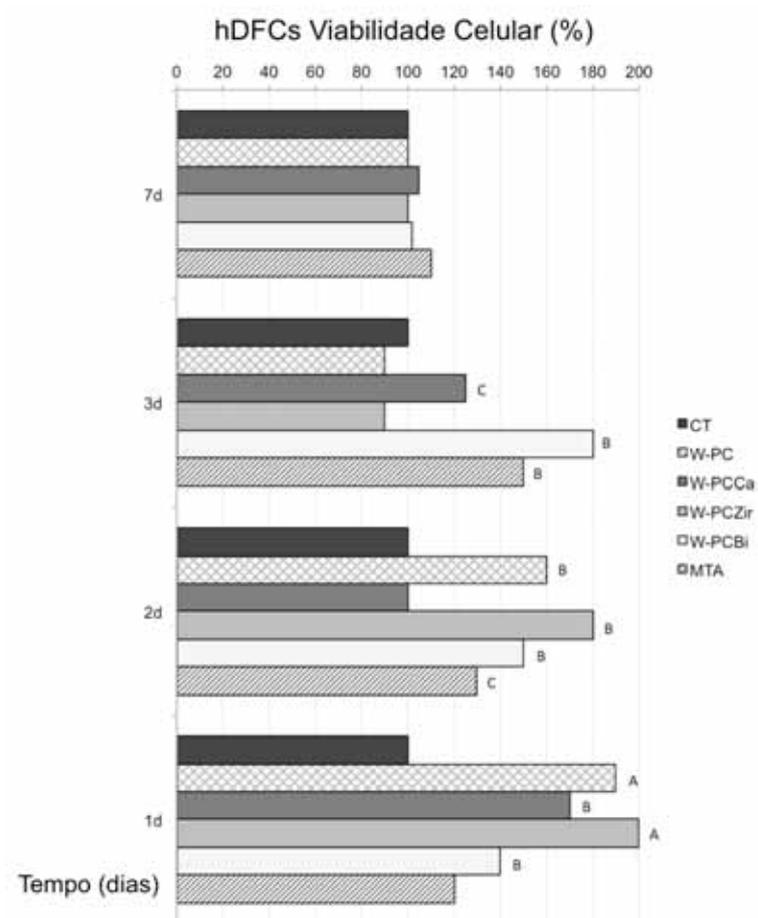
Os resultados de MTT e os dados sobre a atividade de ALP foram avaliados por análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de Bonferroni *post hoc*. A correlação linear de Pearson foi aplicada para estabelecer a associação entre o número de mitocôndrias contadas em cada grupo e da taxa de viabilidade média. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.01$ .

## **RESULTADOS**

### ***Viabilidade celular***

Os resultados de MTT mostraram biocompatibilidade para todo o material testado nos diferentes tempos de exposição em cultura de hDFCs (Figura 1). Curiosamente, as hDFCs expostas durante 1 dia ao W-PC, W-PCZir, W-PCCA e ao W-PCBi apresentaram alta taxa de viabilidade, com diferença significativa quando comparada ao grupo controle (CT, células não expostas) e MTA (W-PCZir > W-PC > W-PCCA > W-PCBi > MTA > CT). A taxa de viabilidade das hDFCs dos grupos W-PC e W-PCZir foi ainda significativamente maior do que os outros grupos de associações com radiopacificadores no dia 1. A viabilidade das hDFCs manteve-se elevada após 2 dias de exposição ao W-PC,

W-PCZir e W-PCBi. Após 3 dias, a taxa de viabilidade celular nos grupos MTA e W-PCBi apresentaram aumento significativo em relação ao CT e os outros grupos. No dia 7 de exposição, todos os grupos de material teste mantiveram excelentes taxas de viabilidade (100-115%).

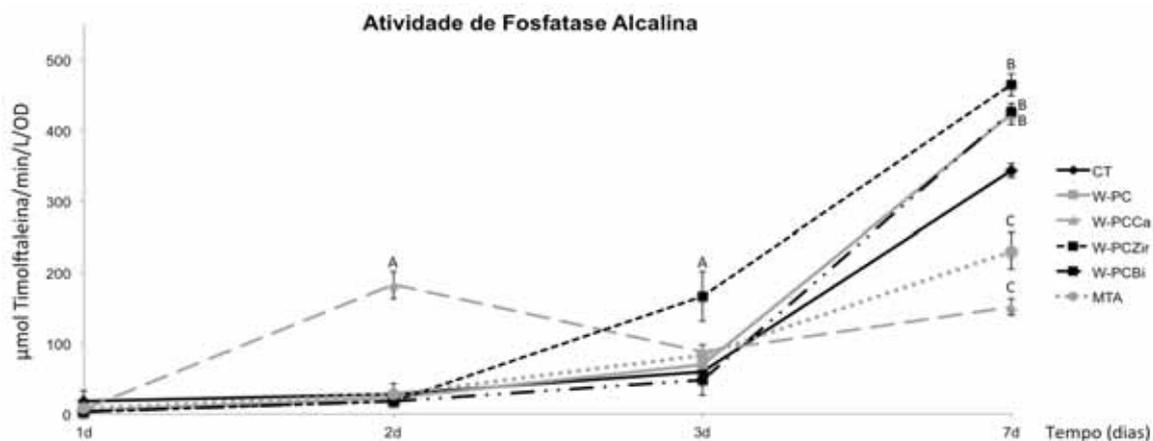


**Figura 1 - Taxas de viabilidade celular.** Imagem representativa das médias de viabilidade das hDFCs com o ensaio de MTT. Células não expostas constituíram o grupo controle (CT). Grupos de exposição hDFCs: Cimento Portland Branco (W-PC), W-PC associado a tungstato de cálcio (W-PCCa), W-PC mais óxido de

zircônio (W-PCZir), W-PC mais óxido de bismuto (W-PCBi) e agregado de trióxido mineral para fins comparativos (MTA). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos teste e CT (n = 9/grupo). ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.01$ ).

### ***Atividade de fosfatase alcalina***

As hDFCs expostas ao W-PC, W-PCZir, W-PCBi e MTA nos períodos de 1, 2 e 3 dias mostraram aumento da atividade de ALP de uma maneira tempo-dependente, semelhante às células não expostas (Figura 2). As hDFCs expostas ao W-PCCa mostraram um comportamento diferente na atividade de ALP. Neste grupo, a ALP foi significativamente elevada no dia 2 e diminuiu ao dia 3. No dia 7 de exposição ao W-PCCa, as hDFCs apresentaram ALP aumentada. No entanto, esta não foi suficiente para atingir o mesmo nível de ALP como em CT. Depois de 7 dias expostas aos grupos W-PC, W-PCZir e W-PCBi a atividade de ALP das hDFCs foi significativamente maior do que em CT ( $p < 0.001$ ). No grupo W-PCZir, a atividade de ALP das hDFCs foi maior do que a das células do grupo CT em 3 dias de exposição.



**Figura 2 - Atividade da fosfatase alcalina das hDFCs.** Imagem representando a atividade de ALP após exposição a células ao material de teste é mostrado. Células não expostas eram do grupo controle (CT). Grupos de exposição hDFCs: Cimento Portland Branco (W-PC), W-PC mais cálcio tungstato (W-PCCa), W-PC mais óxido de zircônio (W-PCZir), W-PC mais óxido de bismuto (W-PCBi) e agregado de trióxido mineral para fins comparativos (MTA). Dados de fosfatase alcalina foram normalizados com OD de células viáveis. Média  $\pm$  SEM ( $n = 9$ /grupo), letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos de teste e CT. ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.01$ ).

### **Análise morfológica MET**

As características morfológicas das hDFCs foram avaliadas com MET após 7 dias de exposição ao material de teste (Figura 3A). As hDFCs apresentaram núcleos lobulares, com cromatina fina e ligeiramente granular, e nucléolos claramente definidos em todos os grupos de teste e CT.

Diferentemente do CT, as células expostas exibiram longas extensões citoplasmáticas e organelas bem evidentes, tais como: aparelhos de Golgi, um grande número de mitocôndrias e vesículas de transporte. Além disso, grânulos eletrôn-densos, considerados como uma característica para a identificação das hDFCs, foram também observados em todos os grupos, incluindo as células CT. O número total de mitocôndrias foi significativamente maior em todos os grupos de material teste do que nas células não expostas, em especial para W-PC grupo (Figura 3B). O elevado número de mitocôndrias nas células expostas ao W-PC e associações W-PC/radiopacificadores foi fortemente associada à taxa de viabilidade elevada (> 100%), conforme análise por correlação linear de Pearson ( $r = 0.84$ ).

### ***Adesão Celular (MEV)***

A análise de MEV demonstrou biocompatibilidade para o W-PC e associações de W-PC/radiopacificadores em cultura de hDFCs. Incontáveis hDFCs foram observadas fortemente aderidas nas superfícies de todas as amostras de W-PC, associações de W-PC/radiopacificadores e MTA (Figura 4). As hDFCs aderidas apresentaram morfologia celular normal, assemelhando-se a células do ligamento periodontal. As extensões citoplasmáticas observadas em MET também foram identificadas nas imagens de MEV.

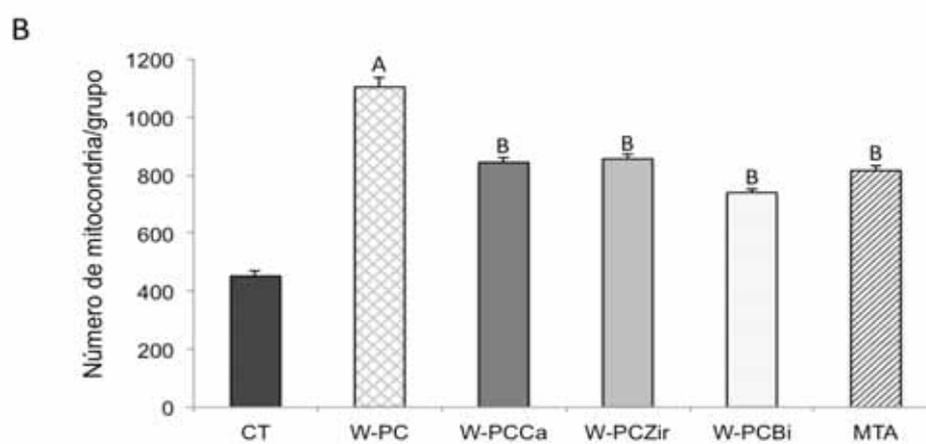
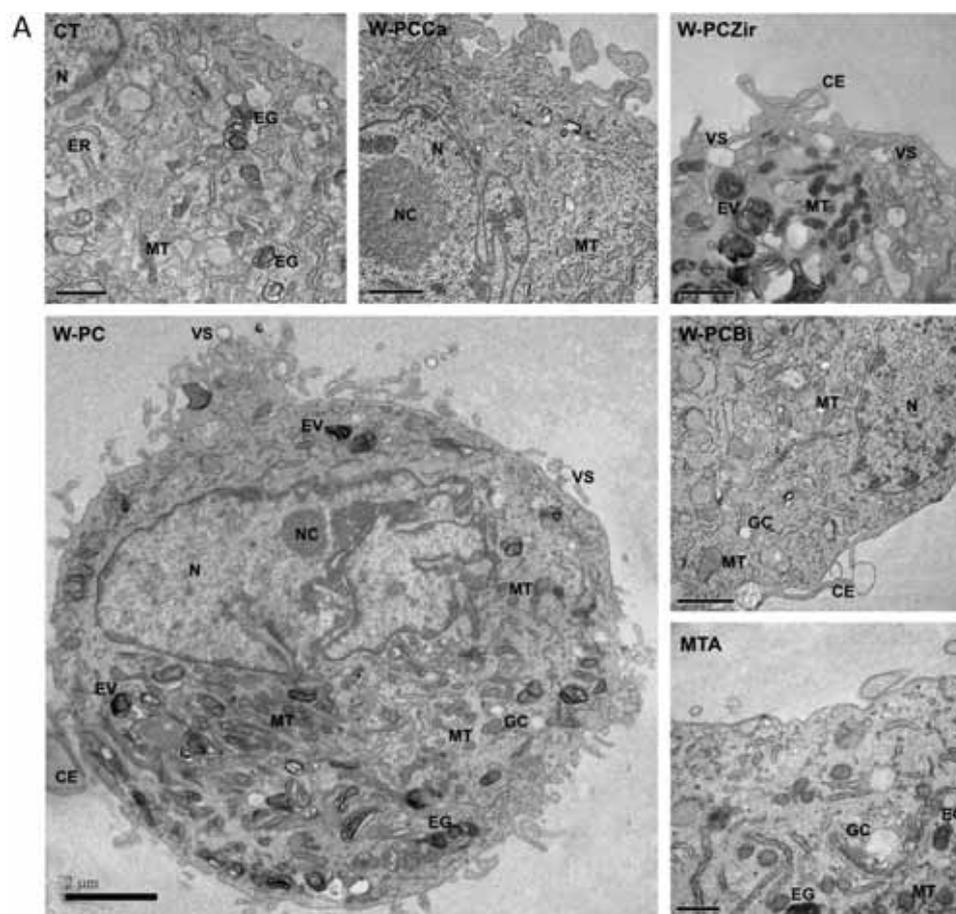
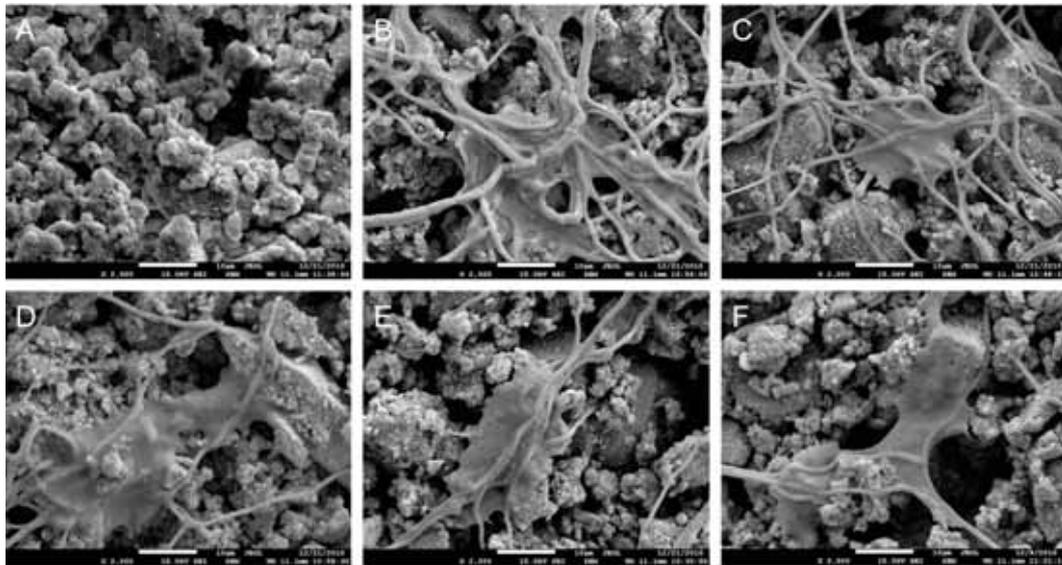


Figura 3A e B - Micrografia eletrônica de transmissão representativa de hDFCs e números totais de mitocôndrias em cada grupo. A: morfologia

normal de hDFCs no controle (CT; ampliação 25,000 X), cimento Portland branco (W-PC; 10.000 X), W-PC/cálcio tungstato (W-PCCa; 25.000 X), W-PC mais óxido de zircônio (W-PCZir; 30.000 X), W-PC mais óxido de bismuto (W-PCBi; 30.000 X) e Agregado Trióxido Mineral (MTA; 40.000 X), todos os grupos após 7 dias de exposição. Núcleo (N), nucléolos (NC), retículo endoplasmático (RT), mitocôndrias (MT), membrana nuclear, (NM), membrana plasmática (PM), aparelho de Golgi (GA), vesículas (VS), grânulos elétron densos (EG), vesículas de endocitose (EV), extensões citoplasmáticas (CE). Barras = 1µm(W-PC e W-PC/radiopacificadores), 2µm (W-PC) e 0.5µm (MTA). B: Números totais de mitocôndrias contadas em cada grupo. Média +/- SEM (n = 30 células/grupo), letras diferentes representam diferenças significativas dentro dos grupos de teste e CT. ANOVA, Bonferroni (p <0.01).

#### ***Adesão Celular (MEV)***

A análise de MEV demonstrou biocompatibilidade para o W-PC e associações de W-PC/radiopacificadores em cultura de hDFCs. Incontáveis hDFCs foram observadas fortemente aderidas nas superfícies de todas as amostras de W-PC, associações de W-PC/radiopacificadores e MTA (Figura 4). As hDFCs aderidas apresentaram morfologia celular normal, assemelhando-se a células do ligamento periodontal. As extensões citoplasmáticas observadas em MET também foram identificadas nas imagens de MEV.



**Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura representativa das hDFCs aderidas ao material de teste.** Micrografia da superfície do W-PC após 7d em condições de cultura sem células, com fins comparativos (A). hDFC em W-PC (B), W-PC mais tungstato de cálcio (C), W-PC mais óxido de zircônio (D), W-PC mais óxido de bismuto (E) e MTA (F). Barra = 10 $\mu$ m (2.000 X).

## DISCUSSÃO

As pesquisas para o desenvolvimento de novos materiais odontológicos, nos últimos anos, têm mostrado um crescente interesse em abordagens científicas e tecnológicas no sentido de avanço da odontologia regenerativa e engenharia de tecidos. Dentro desta revolução científica,

materiais odontológicos baseados no cimento Portland têm sido cada vez mais estudados no contexto das suas várias indicações: arcabouços para engenharia de tecido ósseo<sup>18,19</sup>, cimentos endodônticos<sup>20</sup>, materiais retrobturadores<sup>21</sup> e outros. Entretanto, apesar do PC ter mostrado excelente biocompatibilidade em estudos recentes<sup>22</sup>, ele tem baixa radiopacidade quando comparado ao tecido ósseo e a estruturas dentais mineralizadas<sup>23</sup>. Por esta razão, um componente radiopacificador deve ser associado a formulação do PC e conseqüentemente, a interferência das associações com agentes radiopacificadores nas propriedades biológicas do PC deve ser investigada. Este estudo foi o primeiro a avaliar a viabilidade, a morfologia e a adesão de células do folículo dental (hDFCs) no cimento Portland branco puro ou associado ao óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio como agentes radiopacificadores.

As hDFCs, foram facilmente isoladas de folículos de terceiros molares inclusos referidos para extração devido a fins ortodônticos. Esta abordagem pode ser considerada como uma técnica não invasiva promissora para obter culturas primárias de células humanas<sup>24</sup>. Culturas celulares primárias derivadas de tecidos vivos são convenientes para ensaios biológicos específicos no intuito de simular a situação in vivo e são recomendados pelo ISO para estudos preliminares de citotoxicidade<sup>25</sup>. Durante as primeiras semanas em condições de cultura, as hDFCs exibiram morfologia poligonal e tamanho pequeno sob microscopia de contraste de fase. Após a exposição ao W-PC, W-PC/radiopacificadores e MTA, as hDFCs apresentaram alterações na morfologia para células fusiformes com filopodia fixando-as no fundo dos poços da placa de cultura. Estas mudanças em aspectos morfológicos também foram observados

em estudos anteriores com hDFCs, assemelhando-se à morfologia das células de ligamento periodontal (PDL)<sup>26</sup>.

A taxa de viabilidade das hDFCs foi determinada com MTT, um ensaio padrão para avaliar a citotoxicidade dos materiais dentários em sistemas de cultura de células<sup>27</sup>. As medidas de absorvância indicaram taxas de viabilidade significativamente maior (1.4-2 vezes) para os grupos W-PCZir, W-PC, W-PCBi e W-PCCa, quando comparado ao grupo controle após um dia de exposição das células. Num estudo diferente, células do ligamento periodontal de murinos (mPDL) tratadas com W-PC e eluídos de associações W-PC/radiopacificadores, durante 1 dia, mostraram resultados semelhantes: Taxa de sobrevivência superior a 100% em concentrações de 0.1, 1 e 10 mg/mL<sup>28</sup>. Está bem estabelecido que os íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) marcadamente ativam e ampliam a cinética enzimática das desidrogenases mitocondriais<sup>29</sup>. Portanto, a atividade da desidrogenase mitocondrial intensa observada neste estudo para a W-PC e grupos W-PC/radiopacificadores provavelmente está relacionada com um aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  no meio de cultura, os quais se dispersaram do PC. Por conseguinte, pode ter ocorrido uma sobrecarga de ions  $\text{Ca}^{+2}$  para o citoplasma das hDFCs, aumentando a cinética das enzimas desidrogenases mitocondriais. Estudos anteriores demonstraram que  $\text{Ca}^{+2}$  facilmente são liberados pelo cimento Portland em solução aquosa<sup>30</sup>. A associação de W-PC /óxido de bismuto demonstrou libertar  $\text{Ca}^{+2}$  a uma concentração de 19.46 mg/L após 3 horas, caindo para 8.52 mg/L após 1 dia e 4.58 mg/L após 7 dias, em solução aquosa<sup>30</sup>. No presente estudo, a taxa de viabilidade atingiu níveis semelhantes ao controle no dia 7. Este comportamento pode estar relacionado a provável queda na liberação de cálcio para o meio de cultura de forma tempo-

dependente. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares de ativação de enzimas mitocondriais por íons  $\text{Ca}^{+2}$  liberados por materiais a base de PC.

A fim de avaliar a resposta das hDFCs quanto à diferenciação e mineralização após exposição ao W-PC e W-PC/radiopacificadores, a atividade de um dos primeiros marcadores de osteogenese<sup>31</sup>, ALP, foi mensurada em hDFCs expostas ou não aos materiais de teste. A atividade de ALP aumentou significativamente com o tempo em hDFCs expostas ao W-PC, W-PCZir e W-PCBi quando comparado com células não expostas. A expressão de ALP foi 2 vezes mais elevada nestes grupos do que em hDFCs expostas ao MTA. A atividade de ALP indica que materiais a base de W-PC são capazes de induzir a diferenciação de hDFCs. Além disso, a cultura de hDFCs provavelmente apresentou uma população de células capazes de se diferenciar em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do PDL. O aumento da atividade específica de ALP numa população de PDL reflete uma mudança para um estado mais diferenciado<sup>31</sup>. A atividade de ALP aumentada pode representar uma contribuição fundamental para a reconstrução óssea alveolar e regeneração do ligamento periodontal em terapias com materiais à base de W-PC.

A morfologia das hDFCs na análise de MET revelou a presença de grânulos elétrons-densos, um marcador fenotípico de células do folículo dental<sup>32</sup>, em todos os grupos de teste e nas células não expostas. Especialmente, nas células expostas ao W-PC, W-PC/radiopacificadores e MTA, os grânulos elétrons-densos formaram vesículas de endocitose. A mesma alteração morfológica nos grânulos elétron-densos foi observada para hDFCs expostas a arcabouços de matriz dentinária e considerados como estado de reparo e transformação

celular<sup>32</sup>. As hDFCs expostas ao W-PC, agentes W-PC/radiopacificadores e MTA apresentaram características morfológicas de diferenciação e intensa síntese de proteínas: núcleo e nucléolos bem definidos; reflexo de transcrição aumentada de RNA mensageiro e produção de ribossomos nos nucléolos; numerosas mitocôndrias, aparelho de Golgi proeminente e vesículas de secreção; o que reflete produção de energia aumentada, tradução e transporte de proteínas, respectivamente<sup>33</sup>. O número de mitocôndrias foi significativamente maior em hDFCs expostas a materiais de PC do que no grupo CT. O coeficiente linear Pearson mostrou forte correlação positiva entre a taxa de viabilidade e o número de mitocôndrias. Tal resultado sugere que cimentos a base de W-PC além de promover aumento da atividade das enzimas mitocondriais, podem também induzir fissão mitocondrial ou diferenciação celular característica destas organelas. Outros estudos são necessários para avaliar esta hipótese.

A adesão e proliferação celular sobre a superfície do material correspondem à fase inicial da resposta celular<sup>25</sup>. Na análise de MEV, as hDFCs cultivadas sobre W-PC, W-PC/radiopacificadores e MTA apresentaram morfologia normal, adesão celular às suas superfícies com longas extensões citoplasmáticas, formando uma rede de ligação citoplasmática. Estas são características importantes que podem permitir a formação de uma rede tridimensional entre os tecidos adjacentes e o material odontológico em tratamentos regenerativos<sup>34</sup>. A motilidade, a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência das hDFCs na superfície do material avaliado representam uma importante resposta celular de interação com o ambiente promovido pelo W-PC e W-PC/radiopacificadores.

## CONCLUSÕES

As hDFCs apresentaram resposta biológica excelente pós exposição ao W-PC e todas as associações de W-PC/radiopacificadores testados neste estudo. O óxido de zircônio e o tungstato de cálcio exibiram resultados semelhantes ao W-PC e podem ser considerados radiopacificadores promissores para material odontológico baseado em PC. As hDFCs foram adequadas para os ensaios biológicos e demonstraram uso potencial para engenharia de tecidos dentais e odontologia regenerativa com material baseado em W-PC. Estudos adicionais devem ser desenvolvidos para investigar a hipótese de ativação das enzimas mitocondriais por ions cálcio dispersados do W-PC e os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

## REFERÊNCIAS

1. Honda MJ, Iamaizumi M, Tsuchiya S, Morsczech C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010;52:541-52.
2. Coleman NJ, Nicholson JW, Awosanya K. A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. *J Cem Concr Res* 2007;37:1518-23.
3. Gallego-Perez D, Higuera-Castro N, Quiroz FG, Posada OM, López LE, Litsky

- AS, Hansford DJ. Portland cement for bone tissue engineering: Effects of processing and metakaolin blends. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2011;98B:308-15.
4. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod* 2009;35:1412-7
  5. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2008;41:151-7.
  6. Ten Cate AR. The development of the periodontium - a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology* 1997;13:9-19.
  7. Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch T. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem cells Dev* 2006;15:595-608.
  8. Cahill DR, Marks SC Jr . Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol* 1980;9:189-200.
  9. Guo W, He Y, Zhang X, Lu W, Wang C, Yu H, Liu Y, Li Y, Zhou Y, Zhou J, Zhang M, Deng Z, Jin Y. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomater* 2009;30:6708-23.
  10. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
  11. Duarte MAH, El-Kadre GDO, Vivian RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 2009;35:737-40.
  12. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(4):628-

- 32.
13. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP, Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 2007;33:295-8.
14. Saliba E, Abbassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *Int Endod J* 2009;42:322–8.
15. Asakura K, Satoh H, Chiba M, Okamoto M, Zerizawa K, Nakano M, Omae K (2009). Genotoxic studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony. *J Occup Health* 2009;51:498-512.
16. Solari AC, Abramovitch K. The accuracy and precision of third molar development as an indicator of chronological age in Hispanics. *J Forensic Sci* 2002;47:531-5.
17. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981;27:493-501.
18. Mansur AAP, Mansur HS. Preparation and characterization of 3D porous ceramic scaffolds based on Portland cement for bone tissue engineering. *J Mater Sci* 2009;20:497-505.
19. Huan Z, Chang J, Zhou J. Low-temperature fabrication of macroporous scaffolds through foaming and hydration of tricalcium silicate paste and their bioactivity. *J Mater Sci* 2010;45:961-8.
20. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod* 2008;34:39-44.
21. Bortoluzzi E, Broon N, Bramante C, Garcia R, de Moraes I, Bernardineli N.

- Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 2009;32:897-900.
22. Hwang YC, Kim DH, Hwang IN, Song SJ, Park YJ, Koh JT, Son HH, Oh WM. Chemical constitutions, physical properties, and biocompatibility of experimentally manufactured Portland cement. *J Endod* 2011; 37:58-62.
23. Tanomaru-Filho M, Da Silva GF, Duarte MAH, Gonçalves M, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci* 2008;16:376-9.
24. Haddouti EM, Skroch M, Zippe IN, Müller C, Birova B, Pansky A, Kleinfeld C, Winter M, Tobiasch E. Human dental follicle precursor cells of wisdom teeth: isolation and differentiation towards osteoblasts for implants with and without scaffolds. *Mater Sci Eng Tech* 2009;40:732-7.
25. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res* 2007;327:301-311.
26. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: A scanning electron microscope study. *J Endod* 2003;30:25-9.
27. Donadio M, Jin Jiang, Jianing He, Yu-Hsiung Wang, Safavi KE, Qiang Zhu. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:74-78.
28. Cornelio ALG, Salles LP, Campos-da-Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 2011;37:203-10.

29. Contreras L and Satrustegui J. Calcium Signaling in Brain Mitochondria: Interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* 2009;284:7091-99.
30. Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, Tanomaru-Filho M, Moraes IG. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:250-6.
31. Sun W, Chu C, Wang J, Zhao H. Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;18:677-83.
32. Guo W, He Y, Zhang X, Lu W, Wang C, Yu H, Liu Y, Li Y, Zhou Y, Zhou J, Zhang M, Deng Z, Jin Y. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomater* 2009;30:6708-23.
33. Adams AM, Soames JV, Searle RF. Cultural and morphological characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archs Oral Biol* 1993;38:657-62.
34. Bae WJ, Chang SW, Lee SI, Kum KY, Bae KS, Kim EC. Human periodontal ligament cell response to a newly developed calcium phosphate-based root canal sealer. *J Endod* 2010; 36:1658-63.

**Translocação de NFATc1 para o Núcleo de  
Células Humanas tipo Osteoblastos após  
Exposição ao Cimento Portland: Ativação de  
NFATc1 Mediada por Influxo de  $\text{Ca}^{+2}$ .\***



**Capítulo 3**

**\*Artigo a ser submetido ao periódico**

**Biomaterials.**

## RESUMO

Doenças que acometem o sistema esquelético podem causar defeitos ósseos de difícil reparo, como por exemplo: periodontite, periapicopatias e, de forma sistêmica, osteoporose. A busca por materiais osteocondutivos capazes de suportar o crescimento das células ósseas e restabelecer a taxa normal de mineralização para reparo de defeitos ósseos tem conduzido ao desenvolvimento de materiais odontológicos e *scaffolds* baseados no cimento Portland (PC). Apesar do PC apresentar excelentes propriedades biológicas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as informações quanto aos mecanismos moleculares envolvidos no processo bioativo do PC são escassas, principalmente quanto a sinalização por  $Ca^{+2}$ . A concentração dose-resposta para o eluído de cimento Portland (PC) foi determinada pelo ensaio MTT. A localização subcelular de NFATc1 em Saos-2 após exposição ao PC (10mg/mL) durante 1, 3, 6 e 72 horas foi demonstrada por *western blotting*; comparando os extratos proteicos nucleares e citoplasmáticos, após hibridização com anticorpo específico anti-NFATc1. As análises de microscopia confocal com anti-NFATc1, corroboraram os resultados de *western blotting* que demonstraram a presença do componente nuclear de NFATc1, de aproximadamente 140 kDa, no núcleo das Saos-2 expostas ao PC por 72h. As células expostas por 72 h ao PC apresentaram um aumento na concentração diferencial de  $Ca^{+2}$  de aproximadamente 524 nM em relação ao grupo controle, células não expostas (CT) com Fluo-4. A expressão de mRNA avaliada por PCR em tempo real revelou *upregulation* significativa dos genes de Osterix, sialo-proteína óssea, osteocalcina e de NFATc1 após

exposição de Saos-2 ao PC. Osterix apresentou pontos de co-localização com NFATc1 no núcleo de Saos-2 expostas ao PC nas imagens de microscopia confocal. A adição do inibidor de calcineurina FK506 ao eluído de PC, aboliu a localização de NFATc1 no núcleo e a expressão dos marcadores e osteogênese em Saos-2, provando que o PC estimula a ativação da via NFAT. No presente estudo, nós demonstramos pela primeira vez que o PC é capaz de estimular a ativação e translocação de NFATc1 para o núcleo de células humanas tipo osteoblastos, Saos-2, em decorrência de influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o meio intracelular. O conhecimento destes mecanismos moleculares envolvidos no processo de mineralização contribui com o aprimoramento e desenvolvimento de novos biomateriais para uso odontológico e ortopédico.

**Palavras-chave:** cimento Portland, NFATc1, NFAT2, calcineurina, Osterix.

## **ABSTRACT**

Diseases of the skeletal system may cause critical bone defects difficult to repair, for example: periodontitis, periapical pathosis and, systemically, osteoporosis. The challenge to develop osteoconductive materials able to support the bone cells growth and to restore the normal rate of mineralization, promoting repair of critical bone defects, has lead the development of new scaffolds and dental material based on Portland cement (PC). Although PC has

presented excellent biological properties in vitro and in vivo, the molecular mechanisms involved in PC bioactive potential still lack information, especially with regards to  $\text{Ca}^{+2}$  signaling. The dose-response concentration for Portland cement elute (PC) was determined with MTT assay. The subcellular localization of NFATc1 in Saos-2 following exposure to PC (10mg/mL) for 1, 3, 6 and 72 hours was shown with western blotting, comparing cytoplasmic and nuclear protein extracts after hybridization with specific antibody against NFATc1. The confocal microscopy analysis with anti-NFATc1, corroborated the western blotting results which showed the presence of the nuclear component of NFATc1, with approximately 140 kDa, in the nucleus of Saos-2 exposed for 72h to PC. The cells exposed for 72 hours to PC showed a differential increase in  $\text{Ca}^{+2}$  concentration of approximately 524 nM compared to unexposed cells, control group (CT), with Fluo-4. The mRNA fold of expression in Real time PCR revealed significant upregulation of Osterix, bone-sialo protein, osteocalcin and NFATc1 genes after exposure of Saos-2 to the PC. Osterix showed co-localization points with NFATc1 in the nucleus of Saos-2 exposed to the PC in confocal microscopy images. Interestingly, the addition of calcineurin inhibitor FK506 in PC elute abolished NFATc1 localization in the nucleus and the expression of osteogenesis markers in Saos-2, proving that Portland cement stimulates activation of NFAT pathway. In the present study, we demonstrated for the first time that PC is able to stimulate the activation and translocation of NFATc1 to the nucleus of human osteoblasts-like cells, Saos-2, due to influx of  $\text{Ca}^{+2}$  to the intracellular environment. The knowledge of these molecular mechanisms, involved in mineralization and production of bone matrix proteins, is essential for the

improvement and development of new biomaterials for dental and orthopedic purposes.

**Keywords:** Portland cement, NFATc1, NFAT2, calcineurin, Osterix.

## 1. INTRODUÇÃO

A homeostase do sistema esquelético é mantida pelo processo de remodelação óssea conhecido como *bone turnover*. A taxa de *turnover* é o determinante da mineralização óssea [1]. Este processo é dependente do equilíbrio entre a atividade de duas linhagens de células: osteoblastos (produtores de matriz óssea mineralizada) e osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) [2]. Desta forma, a mineralização óssea pode ser prejudicada por diversas doenças, como a osteoporose e a periodontite, que causam desequilíbrio entre a atividade destes dois tipos de células e podem determinar defeitos ósseos críticos e até mesmo defeitos nas estruturas dentais. Embora, os pesquisadores tenham feito progressos consideráveis no desenvolvimento de novas terapias de reparação de fraturas traumáticas, a regeneração de tecido ósseo em defeitos críticos, devido a periodontite ou lesões periapicais, e o tratamento de fraturas espontâneas em osteoporose ainda são um desafio [3-5].

Os materiais reparadores em contato direto com o osso devem agir como osteocondutores para as células ósseas promovendo remodelação óssea

normal [6]. Neste contexto, o cimento Portland comumente utilizado em engenharia civil pode expandir sua aplicabilidade na área médica, como novos cimentos e materiais base para *scaffolds*, devido a excelente biocompatibilidade e osteocondutividade demonstrada em pesquisas recentes [7-9]. O cimento Portland foi primeiro introduzido em odontologia como uma nova classe de biomaterial reparador denominado agregado de trióxido mineral (MTA), indicado como retrobturador em cirurgia parendodôntica e perfurações radiculares. Basicamente, o MTA apresenta cimento Portland na composição, adicionado de 20% de óxido de bismuto para proporcionar radiopacidade [10]. Os relatos recentes da biocompatibilidade e potencial bioativo do MTA e do próprio cimento Portland indicam que estes cimentos podem suportar formação de novo tecido mineralizado e tecido mole in vivo, causando mínima resposta inflamatória [11]. Alguns estudos demonstraram que o MTA e o cimento Portland são capazes de induzir aumento da expressão gênica de fatores osteogênicos importantes, como proteínas morfogenéticas ósseas, proteínas colágenas e do próprio fator de transcrição gênica Runx2 [12-14]. Entretanto, os mecanismos moleculares da bioatividade deste material ainda não estão bem estabelecidos, principalmente aqueles relacionados às respostas celulares aos sinais de cálcio.

Recentemente foi demonstrado que o fator de transcrição NFATc1, reconhecido como fator de transcrição específico de osteoclastos, é expresso também em osteoblastos e forma complexo transcricional com Osterix, que se liga ao DNA para cooperativamente ativar a transcrição de genes importantes para a formação óssea [15]. Osterix (Osx, Sp7) é uma proteína que pertence a família de fatores de transcrição Sp/XKLF, essencial para a diferenciação de osteoblastos e formação de osso, bem como para ossificação endocondral [16].

NFATc1 ou NFAT2 pertence a família de fatores nucleares de células T ativadas (NFAT) e sua atividade é modulada pela serina/treonina fosfatase  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina dependente calcineurina [17]. A calcineurina (CaN) é o fator-chave que dirige o fluxo de informações de sinais locais ou globais de  $\text{Ca}^{+2}$  para NFATc1. A ativação de calcineurina por  $\text{Ca}^{+2}$  inicia uma sequência linear de eventos sinalizadores que compreendem: a defosforilação de resíduos de fosfoserina conservados no domínio regulatório de NFAT, alteração conformacional de NFAT para expor a sua sequência de localização nuclear, a translocação de NFAT para o núcleo e ativação da transcrição de genes alvo [17].

Associações de cimento Portland ao óxido de bismuto demonstraram libertar  $\text{Ca}^{+2}$  a uma concentração de 19.46 mg/L após 3 horas, 8.52 mg/L após 1 dia e 4.58 mg/L após 7 dias em solução aquosa [18]. Dessa forma, o cimento Portland poderia estimular a ativação e translocação de NFATc1 para o núcleo de células humanas tipo osteoblastos, ativando a transcrição de marcadores moleculares de osteogênese em decorrência de influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o citoplasma. Para avaliar esta hipótese, células humanas tipo osteoblastos, Saos-2, foram expostas a eluídos de cimento Portland. Após diferentes períodos de exposição, foram investigados a translocação de NFATc1 para o núcleo, o influxo de cálcio para o citoplasma e a expressão de marcadores de osteogênese osteocalcina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I e Osterix. O conhecimento destes mecanismos moleculares controladores da diferenciação das células ósseas são importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças como osteoporose e periodontite.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultura de células

Células tipo osteoblastos humanos (Saos-2 linhagem ATCC HTB-85) foram cultivadas como cultura em monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA) contendo meio Dulbecco Eagle Modificado (DEMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI / mL), e estreptomicina (100 µg/mL), até confluência. As células foram subcultivadas duas vezes por semana a 37 °C, humidade de 95%, CO<sub>2</sub> a 5% (suplementos de cultura, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). As células aderidas, quando em fase de crescimento logarítmico, foram destacadas com tripsina/EDTA (0,25%) a 37 °C durante 2 minutos. As células coletadas foram semeadas em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA) a uma densidade de  $2 \times 10^5$  por poço, determinada em hemocitômetro, para todos os grupos testes dos diferentes tempos de exposição e concentrações. Em seguida, as Saos-2 foram incubadas nas mesmas condições descritas acima, durante 24 horas, para obter aderência aos poços da placa de cultura antes da exposição aos eluídos de cimento Portland. As células não expostas formaram o grupo controle. Para os ensaios de imunofluorescência com microscopia confocal, as células foram semeadas sob lamínulas depositadas no fundo dos poços da placa de cultura.

## **2.2. Preparo dos eluídos de PC**

O cimento Portland branco (PC, Votorantim, SP, Brasil) foi preparado pela mistura de 1g (pó): 320 µl do veículo (Água destilada, Sigma) em placa de vidro estéril. Após o preparo, 1g do material teste foi pesado e colocado em tubo Falcon de 50 ml (BD Company, Franklin Lakes, NJ) e expostos a luz UV por 20 minutos para prevenir a contaminação microbiana. Os tubos Falcon contendo a amostra do cimento foram preenchidos com 10 ml de meio DMEM e incubados por 3 horas à 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> para obter a solução estoque de eluído do cimento fresco (100 mg do cimento preparado/mL de DMEM). Posteriormente, diluições do eluído do cimento Portland foram preparadas em DMEM a partir da solução estoque para estabelecer a relação de dose-resposta no ensaio enzimático da desidrogenase mitocondrial, MTT, (diluições teste: 1/2, 1/10, 1/50). Para os experimentos de localização subcelular do NFATc1 e análise de expressão gênica, diluição de eluído do cimento Portland também foi preparada em meio DEMEM contendo 20µg/mL do inibidor de calcineurina, tacrolimus (FK506), como contra-prova da ativação de NFATc1 por PC através da via Ca<sup>+2</sup>/calmodulina [15].

## **2.3. Viabilidade celular**

A proliferação celular foi determinada pelo ensaio MTT. Este ensaio baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal de tetrazólio solúvel em água e de cor amarela, 3-(4,5-dimetil-thiazoyl)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO), em compostos de cor

roxa denominados formazan. A absorbância medida é proporcional à quantidade de células viáveis. Depois de 0, 1, 2, 3 e 7 dias de exposição das células aos eluídos de cimento PC, ou sem exposição (grupo controle), os *transwells* com as amostras de cimentos foram removidos e o meio de cultura foi alterado para DEMEM contendo 0,55 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas durante mais 4 horas nas mesmas condições descritas acima. Depois deste período de tempo, cada poço foi lavado com 1 mL de tampão fosfato (PBS 1X) e 500 µL de álcool isopropílico acidificado (HCl:álcool isopropílico, 0.04N) foram adicionados para extrair e solubilizar o formazan. Alíquotas de 150 µL da solução de formazan de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços (Corning) e a densidade óptica (OD = 570 nm) foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT). As amostras foram preparadas em triplicata para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O ensaio foi repetido 3 vezes (n = 9/grupo). Os dados obtidos foram exportados para planilhas Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA) e submetidos à análise estatística. A taxa de viabilidade celular foi calculada: taxa de viabilidade celular (%) = (OD da amostra x 100)/OD do grupo controle.

#### **2.4. Western blotting**

Para investigar a localização subcelular e expressão de NFATc1 estimulada pelo cimento Portland, células Saos-2 foram expostas a 10mg/mL (de acordo com dose-resposta estabelecida por ensaio de MTT) de eluídos de PC, PC/FK506 durante 1, 3, 6 e 72 horas. Saos-2 expostas a 20 µg/mL de FK506 e

não expostas constituíram os grupos controle. Após estes períodos de tempo, cada grupo de células foi coletado e os extratos de proteínas foram obtidos separadamente em frações citoplasmáticas e nucleares utilizando o kit NXTRACT Cellytic Nuclear Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os extratos proteicos nucleares e citoplasmáticos obtidos foram quantificados e 20µg/lane (Pierce 660nm Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) foram resolvidos em géis de poliacrilamida SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Mini-Protean TGX 4-15% Pre-cast gel, 0.2 µg Nitrocellulose Membrane, SDS-buffer and Transfer Buffer da Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente (5% leite desnatado em TBST 1X pH 7.6), lavadas 3 vezes de 5 minutos cada sob suave agitação em TBST 1X e hibridizadas com anticorpos específicos contra NFAT2 (*anti-hNFAT2 rabbit monoclonal AB*, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e GAPDH (*anti-hGAPDH rabbit polyclonal AB*, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) numa diluição de 1:1500 em TBST contendo 3% de leite desnatado e 0.1% de Tween 20 (tampão de diluição), *overnight* a 4°C. Após lavar com TBST 1X, as membranas foram então incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário em tampão de diluição, 1:2000 (*horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG*, Cell Signaling). As bandas imunoreativas foram visualizadas em filmes de raio X expostos às membranas durante 5-10 minutos, após o tratamento das mesmas com reagente quimio-luminescente por 1 minuto a temperatura ambiente (Novex ECL, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). O experimento foi repetido 3 vezes de forma independente (n=3/grupo).

## 2.5. Imunofluorescência

Para verificar a localização subcelular de NFATc1 no núcleo de Saos-2 após 72 horas de exposição aos eluídos de PC e PC/FK506, as lamínulas contendo as células expostas ou não (grupo CT) foram lavadas 1 vez com PBS 1X (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) diretamente nos poços das placas de cultura e fixadas com 4% de formaldeído tamponado (Sigma) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas com solução de Triton 0.1% em PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente. As lamínulas foram então incubadas com solução de bloqueio *Normal Goat Serum* 10% (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente e novamente lavadas 3 vezes em PBS 1X. As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos específicos contra NFATc1 (Anti-hNFATc1 rabbit monoclonal Ab, Cell Signaling) individualmente ou com Osterix (Anti-hSp7 mouse monoclonal Ab, Abcam, Cambridge, MA, USA), 1:500 em solução de diluição de anticorpo (PBST 1X contendo 0.1% Tween 20 e 0.5% de BSA, Sigma-Aldrich). No dia seguinte, as lamínulas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo (*Goat Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 Conjugate* e *Goat Anti-mouse IgG Alexa Fluor 555 Conjugate*, Cell Signaling), na diluição de 1:1000 em solução de diluição de anticorpo, durante 1 hora a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavadas 2 vezes com PBS 1X, os núcleos das células foram corados com o corante de DNA DRAQ5 (1,5-bis[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4,8-dihidroxi-antraceno-9,10-dione; Cell Signaling), diluído 1:1000 em PBS 1X, por incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e protegidas da

luz. Todas as amostras foram lavadas uma última vez com PBS 1X, cobertas com Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) e montadas em lâminas de vidro. Lamínulas preparadas da mesma forma descrita acima, entretanto, incubadas apenas com os anticorpos secundários constituíram o controle negativo do experimento e de *background*. As imagens foram adquiridas com microscópio confocal e objetiva de 60X (Leica TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope, Wetzlar, Germany). Para investigar a co-localização de NFATc1 com Osterix (Sp7), as imagens digitalizadas foram também processadas utilizando o software ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA). Os experimentos foram repetidos 3 vezes de forma independente (n=3/grupo).

## **2.6. Análise de $Ca^{+2}$ intracelular**

A detecção dos níveis de cálcio intracelular foi realizada com o kit Fluo-4 Direct (Invitrogen), este material baseia-se em fluorescência aumentada, num comprimento de onda de excitação visível, devido a penetração do indicador Fluor-4 nas células e sua ligação aos íons cálcio. Após exposição das células ao eluído de cimento Portland, ou não (grupo CT), nos períodos de 1, 3, 6 e 72 horas; o meio de cultura nos grupos controle e os eluídos de PC foram substituídos por novo meio de cultura adicionado de Fluor-4 Direct 1X e 2.5mM de Probenecid. O Probenecid é utilizado para inibir a extrusão do indicador de cálcio para o meio extracelular por transportadores aniônicos orgânicos. As placas de cultura com o indicador foram então incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente durante 40 minutos. Terminado este tempo, o

meio contendo o indicador foi substituído por DPBS 1X (DPBS/modified, sem  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mg}^{+2}$ , Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e as placas foram transferidas para um leitor de fluorescência ajustado para os comprimentos de onda de excitação a 494nm e emissão a 516 nm (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT, USA). Os dados obtidos foram exportados para planilhas Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA) e submetidos à análise estatística. Mudanças na concentração relativa de cálcio intracelular foram calculadas segundo a fórmula  $[\text{Ca}^{+2}] = K_d \{(F-F_{\text{min}})/(F_{\text{max}}-F)\}$ , onde  $K_d$  (afinidade aparente do indicador de  $\text{Ca}^{+2}$ ) = 345,  $F_{\text{min}}$ = fluorescência medida no grupo CT e  $F_{\text{max}}$ = fluorescência com 2mM de cálcio [19]. As amostras foram preparadas em triplicata e o experimento foi repetido 3 vezes de forma independente (n=9/grupo). Para os grupos de 72 horas de exposição ao eluído de W-PC ou não (CT), imagens de fluorescência foram obtidas diretamente das placas de cultura com microscópio invertido de fluorescência Axio Observer A1, objetiva de 40X e digitalizadas com o programa Axion Vision 4.3 (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Em seguida, as imagens foram exportadas para o software ImageJ 1.45 para análise de fluorescência e concentração relativa de  $\text{Ca}^{+2}$  no citoplasma e no núcleo das células. Em cada campo de imagem, foram avaliadas 3 áreas de background (região sem fluorescência próxima as células), a área do núcleo e 3 áreas de mesmas dimensões no citoplasma de cada célula (n=200 células analisadas/grupo). A fluorescência celular total corrigida (CTCF) para cada medida do núcleo ou citoplasma foi determinada pela fórmula: CTCF = densidade integrada - (área celular selecionada x média da fluorescência do background) [20]. Os dados obtidos foram exportados para planilhas Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA) e submetidos à análise

estatística.

## **2.7. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**

As células expostas aos eluídos de PC, PC/FK506 e grupo CT foram coletadas e as amostras de RNA total extraídas com o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). A concentração e a qualidade das amostras de RNA foram avaliadas com o espectrofotômetro NanoDrop 8000 (Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA). A partir de cada amostra, 2µg de RNA foram submetidos à transcrição reversa em cDNA utilizando o Kit de Transcrição Reversa QuantiTect (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os cDNAs obtidos foram utilizados como molde para qPCR, a fim de avaliar a expressão diferencial dos marcadores de osteogênese Osterix (gene SP7 ou OSX), Sialo-Proteína Óssea (gene BNSP), Colágeno Tipo I Alfa 1 (gene COL1A1), Colágeno Tipo I Alfa 2 (gene COL1A2), Osteocalcina (gene OC ou BGP) e do Fator Nuclear-Citoplasmático de Células-T Ativadas Calcineurina-dependente 1 (gene NFATC1). As reações foram realizadas no sistema de módulo óptico iCycler (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA) em placas de qPCR de 96 poços (ABgene, Epsom, Surrey County, Reino Unido) com um volume de reação final de 20 µL/poço. Cada amostra de reação incluiu Sybr-Green PCR Master Mix 1X (Bio-Rad), 50ng de cDNA e 0.25 M de *primers sense* e *antisense* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para o gene alvo SP7 (NM\_001173467), o desenho de primer *sense* foi 5' GGAAGCCCATCTAACAGGAG 3' e o desenho do primer *antisense* 5' GGCACCAGATCTAGCATAGTG 3'. Para o gene alvo BNSP (L24757.1), o primer *sense* foi 5' TGCATCGAAGAGTCAAAATAGAGG 3' e

primer *antisense* foi 5' GAGGATAAAAGTAGGCATGCTTG 3'. Para o gene alvo COL1A1 (NM\_000088), o primer *sense* foi 5' ATGAAGGGACACAGAGGTTTC 3' e o primer *antisense* foi 5' AGCTCCATTTTCACCAGGG 3'. Para o gene alvo COL1A2 (NM\_000089) o primer *sense* foi 5' CAGGCAGAGATGGTGAAGATG 3' e o primer *antisense* foi 5' GCCAAGTCCAACCTCCTTTTC 3'. Para o gene alvo OC (NM\_199173) o primer *sense* foi 5' CAGCGAGGTAGTGAAGAGAC 3' e o primer *antisense* foi 5' TGCTTGGACACAAAGGCTG 3'. Para o gene alvo NFATC1 (NM\_172390) o primer *sense* foi 5' CCTCTCCAACACCAAAGTCC 3' e o primer *antisense* foi 5' TCTCCTTTCCGAAGTTCAATGTC 3'. O gene da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (gene GAPDH) foi utilizado como controle endógeno, gene referência (NG\_007073). O desenho de primers para GAPDH foi: *sense* 5' TGAAGGTCGGAGTCAACG 3' e *antisense* 5' TGGGTGGAATCATATTGGAAC 3'. As condições otimizadas de ciclos térmicos foram: 95 °C durante 7 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C durante 15 s, 72 °C durante 15 s e ciclos finais de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 80 ciclos de 55 °C durante 10 s. Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido 3 vezes de forma independente (n=9/grupo). Para comparar os níveis de expressão de mRNA dos marcadores de osteogênese e NFATc1 entre os grupos PC, PC/FK506 e CT; o método  $\Delta\Delta C_t$  foi empregado ( $fold$  de expressão =  $2^{-(\Delta\Delta C_t \pm desvpad)}$ ).

## **2.8. Análise estatística**

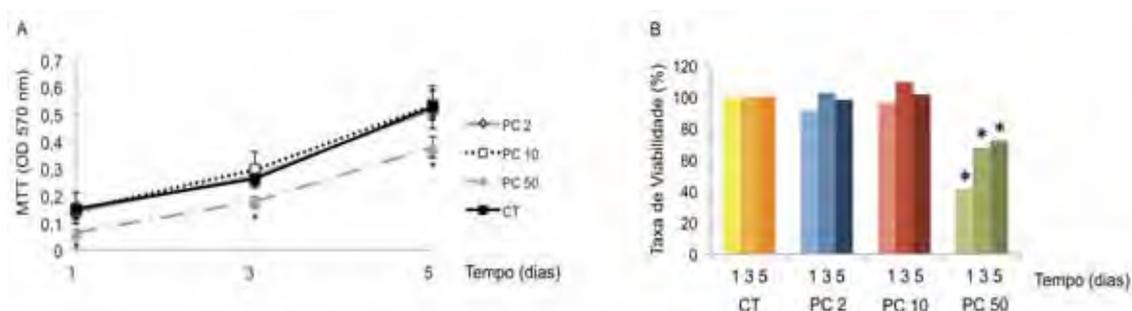
Os resultados de MTT, análises de diferenças na concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular por fluorescência e os dados de qPCR foram avaliados por

análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de Bonferroni *post hoc*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.01$ .

### **3. RESULTADOS**

#### ***3.1. Viabilidade celular***

Os resultados de MTT demonstraram queda da taxa de viabilidade celular de forma dose-dependente. A concentração de eluído do cimento Portland a 50mg/mL apresentou citotoxicidade considerável após 1 dia de exposição das Saos-2 ao material (Fig. 1). Entretanto, houve relativa recuperação da taxa de viabilidade celular após 2 e 3 dias de exposição (taxa de viabilidade > 70%). Nas concentrações de 2 e 10 mg/mL, a taxa de viabilidade celular das células Saos-2 foi excelente, não houve diferença estatística entre esses grupos e o grupo controle. Diante da dose resposta demonstrada, a concentração de eluído de PC a 10mg/mL foi selecionada como a concentração de estudo.

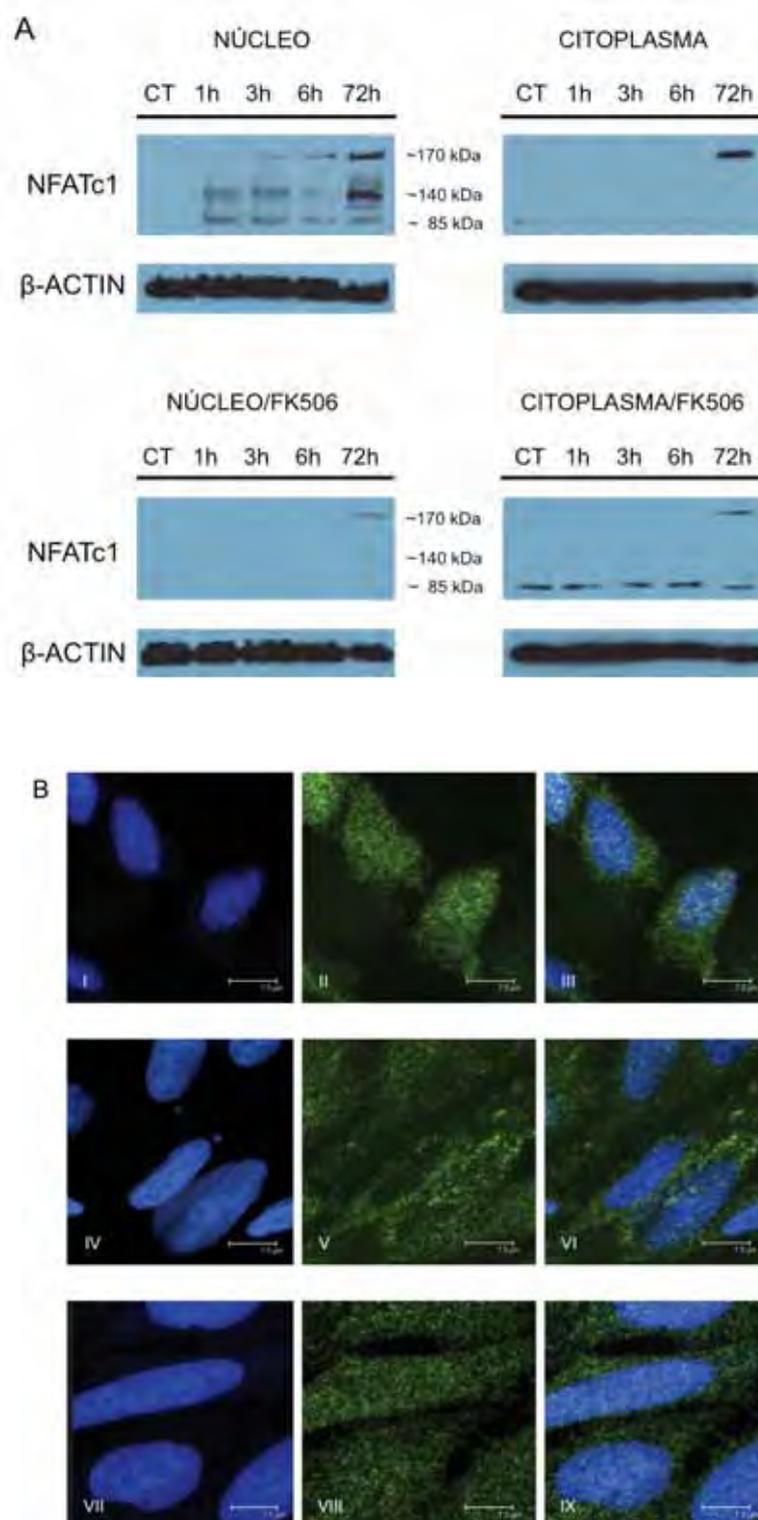


**Fig. 1A e B. Curvas de crescimento e Taxas de viabilidade celular.** Imagem representativa das médias de OD 570nm e taxas de viabilidade de Saos-2 estabelecidas com o ensaio de MTT. Células não expostas constituíram o grupo controle (CT). Grupos de exposição de Saos-2 aos eluídos de cimento Portland Branco (PC): 2 mg/mL (PC 2), 10 mg/mL (PC 10) e 50 mg/mL (PC 50). ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.01$ ). Média  $\pm$  SEM, “\*” representam diferenças significativas entre os grupos teste e CT ( $n = 9$ /grupo).

### 3.2. Expressão e translocação de NFATc1 para o núcleo de Saos-2

Os experimentos de *western blotting* com anticorpo específico contra NFATc1 para caracterizar a expressão proteica e presença do fator de transcrição no núcleo das células Saos-2, após exposição aos eluídos de PC, demonstrou a presença de 3 isoformas para NFATc1 (Fig. 2A), de aproximadamente: 170, 140 e 85 kDa. A banda de aproximadamente 140 kDa foi visualizada apenas nos extratos nucleares. Nas amostras de células tratadas com inibidor de calcineurina FK506: Todas as 3 isoformas estavam ausentes no extrato nuclear do grupo CT/FK506, a banda de 140 kDa se mostrou praticamente imperceptível e apenas no grupo PC/FK506 de 72 horas de

exposição pode ser fracamente visualizada, a banda de 85 kDa nos grupos PC/FK506 também se mostrou fracamente visível nas amostras de 1, 3 e 6 h e desapareceu na amostra de 72 h, decrescendo de intensidade ao longo dos tempos de exposição. Apenas as isoformas de 170 e 85 kDa foram visualizadas nos extratos citoplasmáticos. Enquanto a intensidade da banda de 85 kDa diminuiu ao longo dos tempos de exposição no extrato citoplasmático das células Saos-2 expostas ao eluído de PC a banda de 170 kDa aumentou marcadamente de intensidade. As frações citoplasmáticas nas amostras tratadas com FK506 demonstraram evidentes bandas de 85 kDa para todos os extratos avaliados, a banda de 140 kDa pode ser visualizada apenas no grupo de 72 h de exposição ao PC e se mostrou quase imperceptível no grupo CT/FK506. As análises qualitativas com microscopia confocal dos grupos de 72 h de exposição mostraram intensa expressão de NFATc1 nas células expostas ao PC e a localização subcelular deste fator de transcrição no núcleo das células, o grupo controle apresentou incontáveis células com presença de NFATc1 apenas no citoplasma e algumas células com presença insignificante de NFATc1 no núcleo. O grupo PC/FK506 apresentou células com localização de NFATc1 de forma dispersa nos compartimentos celulares e fluorescência menos intensa (Fig. 2B).



**Fig. 2A e B. Expressão e localização subcelular de NFATc1. A:** *Western blottings* dos extratos proteicos nucleares e citoplasmáticos de Saos-2 do grupo controle, Saos-2 cultivadas por 72 horas não expostas ao PC (CT),

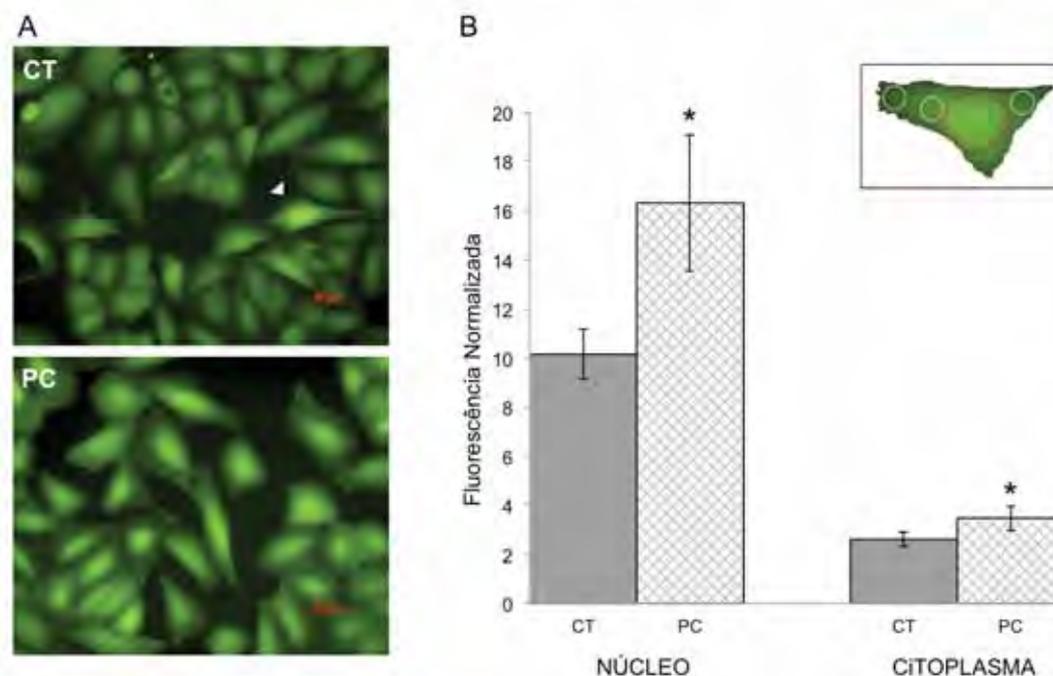
grupos de exposição ao cimento Portland durante 1, 3, 6 e 72 horas, não tratados com FK506 e *western blottings* dos extratos proteicos dos grupos adicionados com o inibidor de calcineurina, CT/FK506 e PC/FK506. **B:** Imagens de imunofluorescência com microscopia confocal para NFATc1 (Alexa Fluor 488, verde, imagens II, V e VIII), os núcleos aparecem em azul (DRAQ5, imagens I, IV e VII). I-III, grupo PC; IV-VI, grupo CT; VII-IX, grupo PC/FK506. As imagens III, VI e IX são as sobreposições das 2 imagens anteriores. (60X, zoom 8, barra=7.5 $\mu$ m)

### **3.3. Concentrações relativas de cálcio e fluorescência**

A Tabela 1 mostra o aumento médio das concentrações de cálcio intracelular dos grupos de exposição ao PC em relação ao grupo controle (Fmin), em função da fluorescência. O grupo que apresentou maior concentração de cálcio intracelular foi o grupo de Saos-2 expostas por 72 horas ao eluído de PC, ainda que os outros grupos tenham sido cultivados por 3 dias previamente à exposição de 1, 3 e 6 horas para garantir que todos estivessem com a mesma confluência celular quando da avaliação. A diferença da concentração de cálcio no citoplasma de Saos-2 após 72 horas de exposição ao PC, em relação ao grupo CT, foi cerca de 188 nM e no núcleo foi ainda maior, 390 nM. A fluorescência foi significativamente maior nos grupos de Saos-2 expostas ao eluído de PC por 72 horas do que no grupo controle (CT), Saos-2 cultivadas pelo mesmo período de tempo sem exposição ao material (Fig. 3A e B)

Tabela 1

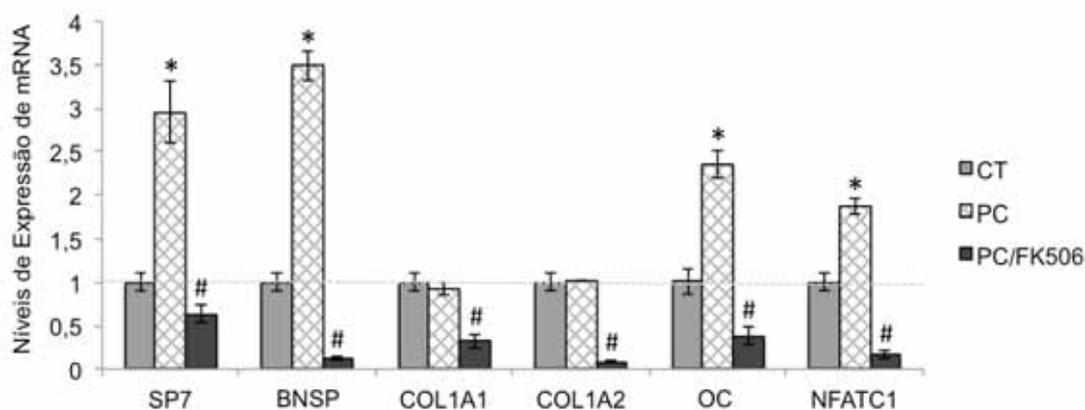
Concentração relativa de Ca <sup>2+</sup> (nM) após exposição ao PC					
1h	3h	6h	72h	72h Núcleo	72h Citoplasma
108 ± 20	254 ± 37	76 ± 9.5	524 ± 43	390 ± 55.5	188 ± 28



**Fig. 3A e B. Imagens representativas de microscopia de fluorescência e fluorescência média normalizada, respectivamente. A:** CT, grupo controle; PC, Saos-2 expostas ao eluído de PC, todos cultivados durante 72 h. A seta indica uma célula no campo do grupo CT com fluorescência semelhante à apresentada pelas células do grupo PC para efeito comparativo (barra = 50 µm, 40X). **B:** Fluorescência média obtida com a análise das imagens de microscopia de fluorescência conforme indicado no quadro menor no canto superior direito (n=200 células/grupo). Média ± SEM, “\*” representa diferenças significativas entre o grupos PC e CT. ANOVA, Bonferroni (p <0.01).

### 3.4. Expressão de mRNA dos marcadores de osteogênese, Osterix e NFATc1

O ensaio de qPCR indicou que os marcadores de osteogênese, BNSP e OC, e os fatores de transcrição, SP7 e NFATC1, foram super-expressos por fatores de aproximadamente 3,5, 2,5, 3 e 2 vezes nas células Saos-2 expostas ao eluído de PC durante 72 horas em relação ao grupo controle (CT). Não houve diferença de expressão no mRNA de COL1A1 e COL1A2 quando comparado com os níveis de expressão dos mesmos genes no grupo controle (Fig. 4).



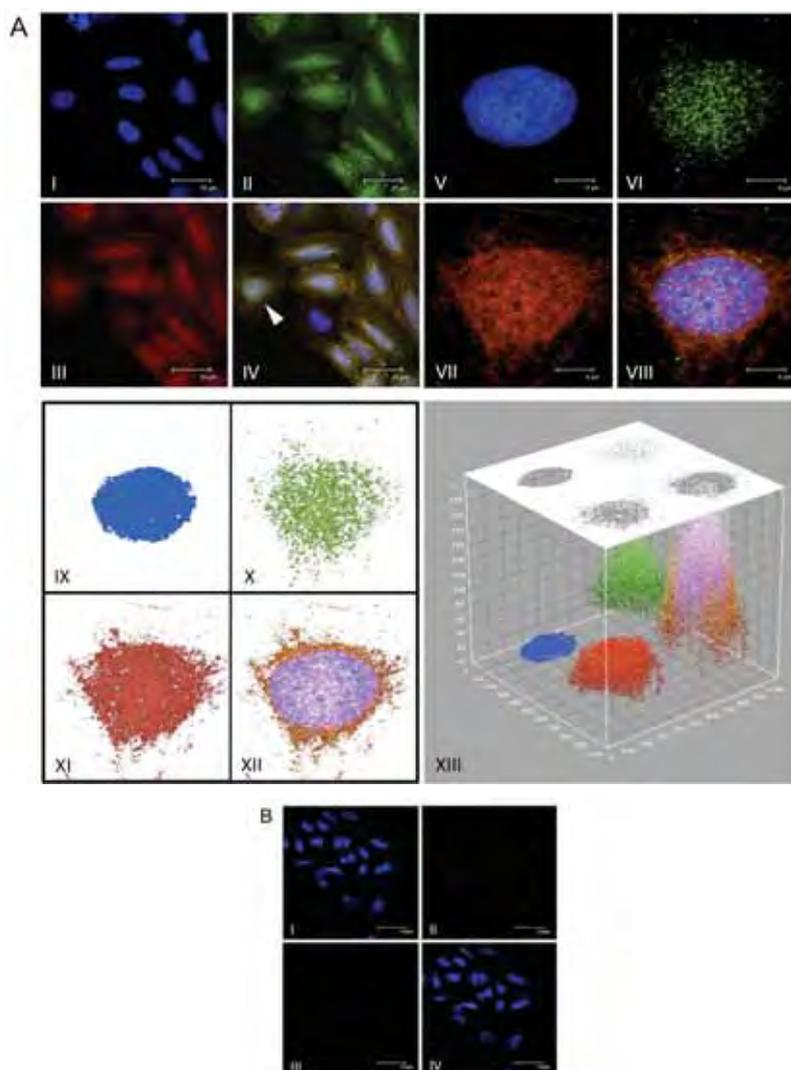
**Fig.4. Níveis de expressão de mRNA dos genes-alvo em Saos-2 expostas a eluídos do cimento Portland.** SP7, gene do fator de transcrição Osterix; BNSP, gene de Sialo-Proteína Óssea; COL1A1, gene de Colágeno Tipo I Alfa 1; COL1A2, gene de Colágeno Tipo I Alfa 2; OC, gene de Osteocalcina e NFATC1, gene do Fator Nuclear de Células-T Ativadas Calcineurina-dependente 1. CT, grupo controle; PC, grupo de Saos-2 expostas a eluído de PC (10mg/mL) e PC/FK506, grupo de Saos-2 expostas a eluído de PC (10mg/mL) contendo Tacrolimus (FK506, 20µg/mL).

### ***Co-localização de NFATc1 com Osterix em Saos-2 expostas a PC***

Os resultados de imunofluorescência com microscopia confocal e anticorpos específicos para os fatores de transcrição Osterix e NFATc1 foram consistentes com a expressão gênica detectada para Osterix e NFATc1 nos experimentos de qPCR. As imagens de microscopia confocal e o gráfico de pontos demonstraram co-localização de NFATc1 e Osterix em determinadas regiões no núcleo das células expostas ao eluído de PC após 72 horas de cultivo (Fig. 5A). A substituição da incubação das amostras com anticorpos primários específicos por soro de cabra não-imunizada resultou na ausência de fluorescência na emissão de 488 nm (verde, NFATc1) e 555 nm (vermelho, Osterix), apenas os núcleos foram visualizados com DRAQ5 (azul), controle negativo (Fig. 5B).

## **4. DISCUSSÃO**

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de osteocondutividade e no potencial bioativo do cimento Portland é importante para o desenvolvimento dos novos materiais baseados em PC para uso na área de saúde. O presente estudo demonstra pela primeira vez que o cimento Portland é capaz de induzir a ativação do fator de transcrição NFATc1 em células humanas do tipo osteoblastos, devido a influxo de cálcio para o meio intracelular promovido pelo próprio PC.



**Fig. 5A e B. Co-localização de NFATc1 e Osterix por microscopia confocal.** **A:** Imagens representativas de imunofluorescência das células Saos-2 expostas a eluídos de PC (10mg/mL) durante 72 horas. I-IV, aumento de 60X (barra = 35  $\mu$ m) e a seta indica a célula selecionada para as imagens seguintes em zoom. V-VIII, imagens do núcleo celular em zoom com objetiva 60X (barra = 4  $\mu$ m). IX-XII, imagens processadas em fundo branco para confecção do gráfico de pontos (XIII) e visualização da co-localização de Osterix e NFATc1 (pontos em amarelo). I e V, núcleo corado com DRAQ5 (azul). II e VI, NFATc1 (Alexa Fluor 488). III e VII, Osterix (Alexa Fluor 555). IV e VIII, sobreposição das 3 imagens anteriores. **B:** Imagem do grupo controle negativo onde os anticorpos primários foram substituídos por soro de cabra não imunizada, a fluorescência específica foi abolida.

As análises de atividade do complexo enzimático desidrogenase mitocondrial (MTT) demonstraram ótima biocompatibilidade para as concentrações de 2 e 10 mg/mL de eluídos do cimento Portland em todos os tempos avaliados. Na concentração de 50 mg/mL de PC a viabilidade de Saos-2 foi baixa após 1 dia de exposição (taxa de viabilidade de 50%), após 2 e 3 dias de exposição houve um aumento da taxa de viabilidade (>70%). A atividade metabólica reduzida pode estar relacionado ao maior pH promovido no micro ambiente da cultura pela liberação de íons hidroxila do PC e morte celular por necrose. O pH elevado (>10) promovido pelo cimento Portland em meio de cultura com células de ligamento periodontal de murinos e de osteosarcoma de ratos demonstrou forte correlação com o tipo de morte celular por necrose em outro estudo [21]. Diante dos resultados obtidos com o ensaio de MTT a concentração de 10 mg/mL foi eleita para o estudo.

NFATc1 demonstrou um comportamento induzível nas células da linhagem Saos-2 após diferentes períodos de exposição ao cimento Portland (Fig. 2A e B). O fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1) é um membro da família NFAT estritamente implicado no crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo. NFATc1 é um fator reconhecidamente essencial na osteoclastogênese [22]. No entanto, estudos atuais demonstram funções específicas de NFATc1 também na diferenciação dos osteoblastos [23]. Já foi demonstrado que NFATc1 está envolvido na regulação da transcrição gênica do receptor de estrogênio humano  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) em Saos-2 [24]. NFATc1 expressado por Saos-2 expostas ao eluído de cimento Portland apresentou-se como 3 bandas no ensaio de *western blotting*, de aproximadamente: 85, 140 e 170 kDa (Fig. 2A). Dentre elas, a banda de 140 kDa foi visível exclusivamente nos

extratos proteicos nucleares e deve representar a forma ativa de NFATc1 em Saos-2, correspondendo ao complexo NFATc1 defosforilado por calcineurina. As bandas de 170 e 85 kDa foram visíveis em extratos citoplasmáticos e nucleares. Nas amostras tratadas com inibidor de calcineurina, tacrolimus FK506, a expressão do componente de 140 kDa foi completamente abolida, sugerindo que esta banda realmente representa o complexo NFATc1 ativo. Ainda nas amostras tratadas com FK506, a presença da banda de 85 kDa é mais intensa no citoplasma enquanto a banda de 170 kDa diminuiu de intensidade nas amostras dos 2 compartimentos celulares. É possível que a banda de 170 kDa corresponda a forma inativa fosforilada do complexo NFATc1 ainda associado ao componente citoplasmático de 85 kDa. Ou seja, após ser defosforilado, NFATc1 deve se deslocar para o núcleo, onde forma complexo com o componente transcricional nuclear resultando aproximadamente em 140 kDa. Após ser novamente fosforilado, o complexo é transportado de volta ao citoplasma. Ou simplesmente, as bandas de 85 e 170 kDa podem representar isoformas de NFATc1. Alguns pesquisadores reportaram diferentes isoformas para NFATc1 corroborando nossos achados [25]. Neutrófilos humanos apresentaram uma única banda de aproximadamente 85 kDa, enquanto células PBLs e Jukart T exibiram a isoforma adicional de 140 kDa. Em adição, o fator de transcrição ubíquo AP-1 foi identificado como o componente nuclear do complexo NFAT:AP-1 e migra em gel SDS com aparente massa molecular de 120-140 kDa [26]. Estudos adicionais são necessários para investigar estas hipóteses e identificar a montagem do complexo NFAT em células osteoblásticas.

As proteínas da família NFAT são ativadas por meio da estimulação de receptores ligados a mobilização de ions  $Ca^{+2}$ , como os receptores de antígenos de células T e B, os receptores  $Fc\epsilon$  em mastócitos e basófilos, os receptores  $Fc\delta$  em macrófagos e células NK e os receptores acoplados a proteínas G [26]. A estimulação dos receptores e mobilização de cálcio resulta na ativação da enzima intracelular fosfatase Ser/Thr cálcio-calmodulina-dependente, calcineurina, o principal regulador *upstream* de proteínas NFAT [27]. As Saos-2 expostas ao eluído de cimento Portland mostraram um aumento na concentração de cálcio intracelular significativo em relação ao grupo controle, especialmente no tempo de 72 horas de exposição, conforme demonstrado por fluorescência com indicador Fluo-4 (Tab. 1 e Fig.3). O Fluo-4 é um indicador de muito utilizado para medir a sinalização de cálcio através de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) [28]. Os resultados com o Fluo-4 foram consistentes com nossa hipótese, demonstrando que o cimento Portland levou a aumento aproximado de 524 nM de  $Ca^{+2}$  intracelular comparado ao controle. As células após estimulação de receptores sensíveis a cálcio são induzidas a transcrever uma grande variedade de genes alvos associados e potenciais alvos para NFAT; muitos dos quais são genes codificadores de fatores de transcrição, citocinas, receptores da superfície celular e outras proteínas efetoras [29-31]. As análises de PCR em tempo real demonstraram que a exposição de Saos-2 ao PC levou a aumentos significativos na expressão do fator de transcrição Osterix, do próprio NFATc1, de sialoproteína óssea e osteocalcina (Fig. 4). Osterix é um fator de transcrição essencial para a diferenciação de osteoblastos, que já foi demonstrado formar complexo transcricional com NFATc1 importante para a expressão dos genes de sialo-proteína óssea e osteocalcina [15]. Mais

interessante, o status transcricional de Osterix é controlado também por calcineurina [32]. No presente estudo, a expressão destes mesmos genes foi inibida quando FK506 foi adicionado ao eluído de PC, resultados semelhantes aos achados de Koga *et al.* (2005), constituindo evidências de ativação do complexo transcricional NFAT/Osterix após exposição das células ao PC. Os genes de colágeno A1 e A2 não demonstraram aumento de expressão após exposição de Saos-2 ao PC, possivelmente o padrão de expressão gênica em relação ao tempo de exposição de 72 h seja diferente para estes genes, uma vez que a expressão de COL1A1 demonstrou ser induzida pelo complexo com Osterix no outro estudo [15]. Um outro estudo mostrou que a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) induziu a expressão de Osterix nos dias 3-9, mas não a expressão de BNSP [33]. Este achado sugere que a expressão de BNSP possa realmente estar sob domínio transcricional da via  $Ca^{+2}$ /calcineurina e é consistente com o *time-point* de expressão de Osterix em nosso estudo. A BMP-2 também estimulou significativamente a expressão de Dlx5, MSX2 e proteína de matriz Gla nos dias 3 e 6. Enquanto a expressão de Runx2, fosfatase alcalina e osteocalcina foi significativa nos dias 6 e 9 em cultura de células precursoras de osteoblastos (ROB-C26).

As análises de imagens ao microscópio confocal e o gráfico de pontos mostraram claramente co-localização de Osterix e NFATc1 no núcleo das células Saos-2 após exposição ao PC neste estudo (Fig. 5). Todos os resultados associados fornecem fortes evidências comprovando a hipótese de ativação do fator NFATc1 estimulada pela exposição das células ao PC.

## 5. CONCLUSÕES

Ao contrário dos relatos em osteoclastogênese, o papel de NFATc1 na diferenciação de osteoblastos não é bem compreendido, e alguns relatos nesse sentido são ainda contraditórios. Além deste estudo demonstrar pela primeira vez a ativação da via NFAT por exposição celular ao PC e fornecer informações importantes como subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas no PC, ele pode contribuir para esclarecer a participação de Calcineurina/NFAT na regulação e diferenciação dos osteoblastos.

## REFERÊNCIAS

- [1] Grynopas M. Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcif Tissue Int* 1993;53 Suppl 1:57-64.
- [2] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2:389-406.
- [3] Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials* 2012, in press;doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.048.
- [4] Santana RB, de Mattos CM, Van Dyke T. Efficacy of combined regenerative treatments in human mandibular class II furcation defects. *J Periodontol* 2009;80(11):1756-64.
- [5] Foote CJ, Sprague S, Schemitsch EH, Bhandari M. Future perspectives: the need for large clinical trials. *J Orthop Trauma* 2011;25S:95-8.
- [6] Abdullaha D, Pitt Ford TR, Papaioannouc S, Nicholsond J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomater* 2002;23: 4001-10.
- [7] Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 2005;31(8):605-7.
- [8] Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. *Aust Endod J* 2008;34:30-35.

- [9] Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Mineral trioxide aggregate–based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 2012;38:971-76.
- [10] Torabinejad M, White DJ. United States Patent 5, 415, 547 USPTO. Patent full text and image database. May 1995.
- [11] Coleman NJ, Nicholson JW, Awosanya K. A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. *Cem Concr Res* 2007; 37:1518-23.
- [12] Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J* 2005;38:203-10.
- [13] Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 2007;33:836-9.
- [14] Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:590-96.
- [15] Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature Med* 2005;11:880-5.

- [16] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhan Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
- [17] Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 2006;441:646-50.
- [18] Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, Tanomaru-Filho M, Moraes IG. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:250-6.
- [19] Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P. A comparison of fluorescent  $Ca^{+2}$  indicator properties and their use in measuring elementary and global  $Ca^{+2}$  signals. *Cell calcium* 2000;28:213-23.
- [20] Burgess A, Vigneron S, Brioudes E, Labbé J-C, Lorca T, Castro A. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B - Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:12564-69.
- [21] Cornélio ALG, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod* 2011;37:203-10.
- [22] Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40: 251-64.

[23] Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, and Crabtree GR. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 2006;10: 771-82.

[24] Penolazzi L, Zennaro M, Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Gambari R, Piva R. Induction of estrogen receptor  $\alpha$  expression with decoy oligonucleotide targeted to NFATc1 binding sites in osteoblasts. *Mol Pharm* 2007;71:1457-62.

[25] Vega A, Chacón P, Monteseirín J, Bekay RE, Alba G, Martín-Nieto J, Sobrino F. Expression of the transcription factor NFAT2 in human neutrophils: IgE-dependent,  $\text{Ca}^{+2}$ - and calcineurin-mediated NFAT2 activation. *J Cell Sci* 2007;120:2328-37.

[26] Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707-47.

[27] Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebajo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS, Zaidi M. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17130-35.

[28] Zhu T, Fang LY, Xie X. Development of a universal high-throughput calcium assay for G-protein- coupled receptors with promiscuous G-protein Galpha15/16. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:507-16.

[29] Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989;243:355-61.

[30] Cockerill GW, Bert AG, Ryan GR, Gamble JR, Vadas MA, Cockerill PN. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor

NFAT. *Blood* 1995;86:2689-98.

[31] Leonard DG, Ziff EB, Greene LA. 1987. Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:3156-67.

[32] Okamura H, Amorim BR, Wang J, Yoshida K, Haneji T, Calcineurin regulates phosphorylation status of transcription factor osterix. *Biochem Biophys Res Commun* 200;379:440-4.

[33] Takagi M, Kamiya N, Takahashi T, Ito S, Hasegawa M, Suzuki N, Nakanishi K. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx2 in cultured osteoblastic cells. *J Mol Histol.* 2004;35:81-90.

# Considerações Finais

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cimento Portland (PC) comumente utilizado em engenharia civil foi introduzido em odontologia na década de 90 por Torabinejad como componente básico do biomaterial denominado agregado de trióxido mineral (MTA)<sup>43</sup>. Os primeiros relatos sobre este material reparador não indicava o cimento Portland como seu componente. Esta descoberta associada ao potencial bioativo apresentado pelo MTA e PC em estudos recentes e à necessidade de melhorias em suas propriedades químico-físicas tem levado muitos pesquisadores a investigar a possibilidade de utilização do próprio cimento Portland como substituto do MTA<sup>5-8,12</sup>.

O MTA é relativamente caro quando comparado ao PC e apresenta algumas desvantagens: Dificuldades de manipulação e inserção, um longo tempo de presa e resistência a compressão inadequada<sup>11</sup>. Existem controvérsias no meio científico também quanto a desvantagens do PC, principalmente devido a existência de metais pesados que podem ser citotóxicos na sua composição<sup>12,38</sup>. Neste contexto, o objetivo do trabalho aqui apresentado foi avaliar as propriedades biológicas do cimento Portland e de novos materiais a base de PC, que estão sendo desenvolvidos para uso odontológico, quanto a biocompatibilidade e bioatividade, em sistemas de cultura de células.

Os dados obtidos no estudo realizado no primeiro capítulo deste trabalho revelaram um nível considerável de citotoxicidade para o novo cimento endodôntico a base de MTA no período que antecede sua presa final. Os resultados de análise do MTA Fillapex demonstraram alta citotoxicidade inicial,

entretanto após 7 dias mostrou uma bioatividade promissora - Os resultados de análise dos nódulos minerais formados na cultura de Saos-2 expostas ao material por EDS sugeriram fortemente a presença de componentes do cimento nos cristais de hidroxiapatita formados pelas células, um achado interessante principalmente levando em consideração a presença de sílica nanoparticulada na fórmula do MTA Fillapex e que fornece subsídios para investigações futuras para comprovar a participação de componentes químicos do MTA Fillapex na composição dos cristais de apatita formados pelas células. Também não fica descartada a necessidade de estudos futuros para investigar em nível molecular os efeitos da citotoxicidade inicial do MTA Fillapex e aprimoramento de sua formulação para solucionar este problema. De maneira geral, os resultados interessantes apresentados pelo MTA Fillapex quanto ao seu potencial bioativo justificam e fornecem subsídios para o desenvolvimento de novos cimentos obturadores de canais radiculares e reparadores a base do cimento Portland.

Os dois últimos capítulos deste trabalho revelaram excelente biocompatibilidade e bioatividade para o cimento Portland. O cimento Portland associado a diferentes agentes radiopacificadores apresentou fortes indícios de estímulo à diferenciação celular de células do folículo dental diante das observações em imagens de microscopia eletrônica. Isto pode representar objeto para um novo estudo a ser realizado no sentido de identificar a presença de células-tronco no isolado do folículo e caracterizar as células diferenciadas após exposição ao cimento Portland. As associações com os agentes radiopacificadores apresentaram ótima biocompatibilidade e são promissoras para a composição de novos materiais odontológicos a base de PC. O potencial bioativo e capacidade osteoindutiva do cimento Portland foram demonstrados

em diferentes estudos, em sua maioria relacionados ao pH básico ou ao aumento da concentração de hidróxido de cálcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  como substrato para a formação dos cristais de hidroxiapatita promovido pelo PC<sup>7,17,22,24</sup>. O cimento Portland foi capaz de promover um pH básico e liberar íons cálcio para a região adjacente em outro estudo<sup>32</sup>. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nos canais celulares de cálcio e o potencial bioativo do cimento Portland quanto ao estímulo a diferenciação celular e expressão gênica em resposta ao influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  são pouco conhecidos. O terceiro capítulo representou o primeiro estudo a demonstrar o aumento da expressão gênica de marcadores moleculares de osteogênese em resposta ao influxo de cálcio intracelular e ativação da via de transcrição NFAT, após exposição de células osteoblasticas ao cimento Portland.

Resumidamente, este trabalho apresentou no primeiro capítulo informações inovadoras quanto a metodologia para análise de EDS dos cristais produzidos pelas células em cultura sobre *coverslips*, ainda não apresentado desta forma em publicações conhecidas. Levantou novas hipóteses a serem investigadas em estudos futuros quanto a estrutura dos cristais de apatita decorrentes da exposição a material a base de MTA e caracterização de células tronco do folículo dental. Finalmente, demonstrou o envolvimento do cimento Portland nas vias de sinalização celular por íons cálcio.



# Referências

## REFERÊNCIAS\*

1. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. *J Endod.* 2006; 32: 872-5.
2. Balto H, Al-Nazhan S. Attachment of human periodontal ligament fibroblast to 3 different root-end filling materials: Scanning electron microscope observation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 222-7.
3. Barbosa SV, Araki K, Spängberg LSW. Citotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Surg.* 1993; 75: 357-61.
4. Bonson S, Jeansonne BG, Lalier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res.* 2004; 83: 408-13.
5. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod.* 2006; 32: 897-900.

---

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:  
[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

6. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru-Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod.* 2009; 35: 550-4.
7. Bortoluzzi EA, Duarte MAH, Demarchi ACCO, Bramante CM. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod.* 2006; 32: 1194-7.
8. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 628-32.
9. Braz MG, Marcondes JPC, Matsumoto MA, Duarte MAH, Salvadori DMF, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to radiopacifiers in vitro. *J Mater Sci.* 2008; 19: 601-5.
10. Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, Anic I. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endod J.* 2009; 42: 253-63.
11. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod.* 2009; 35: 1412-7.

12. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005; 21: 297-303.
13. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2008; 42: 227–37.
14. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement–based (MTA-like) system. *J Endod.* 2007; 33: 295-8.
15. Cornélio ALG, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod.* 2011; 37: 203-10.
16. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater.* 2005; 21: 731-8.
17. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel Filho E, Coutinho Filho, T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J.* 2006; 39: 293-6.

18. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*. 2005; 38: 604-9.
19. Duarte, MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99: 648-50.
20. Duarte MAH, El-Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35: 737-40.
21. Gorduysys M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2007; 33: 1450-4.
22. Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod*. 2009; 35: 513-9.
23. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral Trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod*. 2001; 27: 281-4.
24. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé, PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted

- dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-6.
25. Islam I, Chang HK, Yap AUJ. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod.* 2006; 32: 193-7.
26. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 739-44.
27. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000; 26: 288-91.
28. Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 115-20.
29. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993; 19: 541-4.
30. Lin CP, Chen YJ, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 71: 429-40.

31. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2008; 41: 72–7.
32. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, Guerreiro-Tanomaru JM. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod.* 2011; 37: 844-6.
33. Miranda RB, Fidel SR, Boller MA. L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay. *Braz Dent J.* 2009; 20: 22-6.
34. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro ALB, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18: 3-7.
35. Parirokh M e Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part I: chemical, physical, and antibacterial. *J Endod.* 2010; 36: 16-27.
36. 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.
37. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod.* 2005; 31: 605-7.

38. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2010; 36: 1210-5.
39. Schmitt D, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent.* 2001; 23: 326-30.
40. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod.* 2006; 32: 1094-6.
41. Tanomaru-Filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35: 1418-21.
42. Tanomaru-Filho M, Jorge E, Guerreiro-Tanomaru J, Gonçalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod.* 2007; 33: 249-51.
43. Tanomaru-Filho M, Jorge ÉG, Guerreiro-Tanomaru JM, Gonçalves M. Evaluation of the radiopacity of calcium hydroxide and glass-ionomer based root canal sealers. *Intern Endod J.* 2008; 41: 50-3.
44. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod.* 2007; 33: 836-9.

45. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2003; 29: 407-12.
46. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR, Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 349-53.
47. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKennedy DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997; 23: 225-8.
48. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kodowaki T, Takashi S. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod.* 2008; 34: 1057-60.
49. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells. *J Endod.* 1999; 25: 410-2.
50. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod.* 2000; 26: 404-6.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 10 de agosto de 2012.

LOISE PEDROSA SALLES