



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LETICIA BOLDRIN MESTIERI

**Estudo das células primárias dentais, viabilidade celular e bioatividade de
materiais à base de silicato de cálcio.**

Araraquara

2014



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LETICIA BOLDRIN MESTIERI

Estudo das células primárias dentais, viabilidade celular e bioatividade de materiais à base de silicato de cálcio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara

2014

Mestieri, Leticia Boldrin

Estudo das células primárias dentais, viabilidade celular e bioatividade de materiais à base de silicato de cálcio / Leticia Boldrin Mestieri - Araraquara: [s.n.], 2014.

75 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

1. Polpa dentária 2. Saco dentário 3. Cimento de silicato 4. Nióbio I.Título

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

ESTUDO DAS CÉLULAS PRIMÁRIAS DENTAIS, VIABILIDADE CELULAR E
BIOATIVIDADE DE MATERIAIS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho

2º examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º examinador: Prof.^a Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva

Araraquara, 24 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

NASCIMENTO: 17/07/1989 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Devanir Mestieri e Rosa Maria Boldrin Mestieri

2007-2011: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara
– FOAr – UNESP

2010-2011: Atualização em Endodontia pela Fundação Araraquarense de Ensino e
Pesquisa Odontológica – FAEPO

2012-2014: Especialização em Endodontia pela Fundação Araraquarense de Ensino e
Pesquisa Odontológica – FAEPO

2012-2014: Mestrado em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara –
FOAr – UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar sempre meu caminho, permitir que este sonho se realizasse e me dar sempre força e fé para continuar na caminhada em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, Rosa e Devanir, por estarem sempre me apoiando em todos os momentos e participarem de cada etapa dessa conquista. Obrigada pelo amor incondicional, paciência e toda ajuda que vocês sempre me dão, vocês são essenciais e insubstituíveis.

À minha irmã Larissa, por ser minha grande companheira, sempre me acompanhando e ajudando em tudo que preciso, meu amor por você é imensurável, sou muito grata por tê-la ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho, por sua humildade, dedicação e paciência. O senhor é um grande exemplo para mim não só como profissional, mas também como pessoa. Obrigada por todo o aprendizado ao longo desses anos. Também agradeço a minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, pela sua grande ajuda e dedicação para que eu pudesse concluir os trabalhos da dissertação. Agradeço a ambos pela oportunidade de ajudar na construção do Laboratório de Cultura de Células, o aprendizado que obtive com isso é inestimável.

À minha família de laboratório, minhas grandes amigas Ana Livia Gomes Cornélio e Elisandra Márcia Rodrigues. Obrigada por toda ajuda e amizade durante o meu mestrado; juntas, aprendemos coisas novas, rimos, brigamos, choramos e zelamos uma outra, sem vocês nada disso seria possível!

Aos grandes mestres que muito me ajudaram e se tornaram grandes amigos: Prof.^a Gisele Faria, Prof. Renato Leonardo e Prof. Idomeo Bonetti Filho. Obrigada por todos os ensinamentos e todas as conversas que sempre me ajudaram muito!

Às melhores amigas que alguém poderia ter: Mariana Roedel e Nicolle Laffi. Obrigada por estarem presentes mesmo na distância, por me apoiarem nas minhas decisões e fazerem de tudo para me ajudar sempre.

Às grandes amizades que a pós-graduação me deu de presente: Camila Espir e Camila Nascimento; obrigada por estarem sempre postas a me ajudar em tudo que eu precisava, pela companhia todos os dias e pela confiança.

Aos amigos da minha turma de mestrado: Adinael Trindade Júnior, Ana Carolina Venção, Fernando Vazquez Garcia, Kátia Keine, Miriam Magro e Tiago Fonseca; pela convivência quase que diária e por tudo que vivemos ao longo dessa etapa que iremos terminar juntos.

Aos amigos da pós graduação pela convivência, amizade e bons momentos juntos; e aos demais professores da disciplina de Endodontia: Prof. Fábio Berbert e Prof. Milton Carlos Kuga; por todo o aprendizado que me passaram desde a minha graduação até hoje.

Aos professores da disciplina de Periodontia Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior e Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli; aos residentes da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial; aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora e a todos que colaboraram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho; e a Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – UNESP), que me acolheu durante sete anos e tornou possível a realização de muitos sonhos.

Mestieri LB. Viabilidade celular e bioatividade de materiais à base de cimento Portland em culturas primárias de células do folículo e da polpa dental humanos, fibroblastos e osteoblastos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram o isolamento e diferenciação de células da polpa (hDPCs) e do folículo (hDFCs) dentário de terceiros molares humanos e utilização para avaliação da citotoxicidade e bioatividade de novos cimentos endodônticos. **(Capítulo 1)** - Após a obtenção das culturas primárias foram realizados os ensaios vermelho de Alizarina, atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP). A expressão gênica de proteína morfogenética óssea (*bmp7*), sialofosfoproteína dentinária (*dspp*) e *alp* foi avaliada. Os ensaios de bioatividade demonstraram maior atividade para hDPCs, além de maior expressão de *dspp* e *alp*; a expressão de *bmp7* foi semelhante nas duas linhagens. Conclui-se que hDPCs demonstram maior capacidade de diferenciação em células com potencial de mineralização, quando comparadas com hDFCs. **(Capítulo 2)** – Foram utilizadas linhagens primárias (hDPCs e hDFCs), em comparação com linhagens imortalizadas (células osteoblásticas humanas Saos-2, e do ligamento periodontal de ratos mPDL) para análise dos materiais: 1) Cimento Portland branco (CP); 2) MTA; 3) CP/ óxido de nióbio microparticulado ($Nb_2O_5\mu$); 4) CP/ óxido de nióbio nanoparticulado (Nb_2O_5n). A citotoxicidade foi avaliada pelos ensaios MTT e Azul de Trypan e a bioatividade pela atividade da ALP. Viabilidade celular foi observada em todas as linhagens; e a atividade de ALP apresentou maior resposta na linhagem Saos-2. Conclui-se que as diferentes linhagens celulares são similares para avaliação da citotoxicidade; entretanto, para avaliação da bioatividade o uso de uma linhagem celular

osteoblástica é mais indicado. Além disso, observa-se que materiais à base de $Nb_2O_5\mu$ e Nb_2O_5n mostram potencial como radiopacificador alternativo no MTA.

Palavras-chave: polpa dentária, saco dentário, cimento de silicato, nióbio.

Mestieri LB. Cell viability and bioactivity of Portland cement-based materials in human dental follicle and pulp stem cells, fibroblasts and osteoblasts [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

The aims of this study were to isolate and differentiate pulp (hDPCs) and follicle (hDFCs) cells obtained from human third molars and to use them in cytotoxicity and bioactivity assays of new dental materials. (**Chapter 1**) - After obtaining the stem cultures, Alizarin Red, alkaline phosphatase (ALP) activity and gene expression by Real Time PCR of bone morphogenetic protein (BMP7), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and ALP were performed. The bioactivity assays showed greater activity for hDPCs, and increased expression of *dspp* and *alp*; the expression of *bmp7* was similar in both cell lines. We conclude that hDPCs demonstrate greater ability to differentiate into cells with mineralization potential when compared with hDFCs. (**Chapter 2**) - stem lineages (hDPCs and hDFCs) were used, compared to immortalized lineages (human osteoblastic cells Saos-2, and periodontal ligament of mice cells mPDL) for analysis of the following materials: 1) white Portland cement (PC); 2) MTA; 3) C/ microparticulated of niobium oxide ($\text{Nb}_2\text{O}_5\mu$); 4) CP/nanoparticulated niobium oxide (Nb_2O_5n). Cytotoxicity was performed by MTT and Trypan Blue assays and bioactivity by ALP activity assay. Cell viability was observed in all cell lines, and ALP activity showed greater response in Saos-2. We conclude that the different cell lines are similar in cytotoxicity, however, to evaluate the bioactivity, using an osteoblastic cell line is more appropriate. Moreover, it is observed that materials based on $\text{Nb}_2\text{O}_5\mu$ and Nb_2O_5n show potential for alternative use to MTA.

Keywords: dental pulp, dental sac, silicate cement, niobium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 CAPÍTULO 1: Bioatividade e potencial osteogênico de células primárias do folículo e polpa dentária humana	18
3 CAPÍTULO 2: Bioatividade e potencial osteogênico de células primárias do folículo e polpa dentária humana	40
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÃO	67
6 REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A procura por células mesenquimais indiferenciadas despertou o interesse pelas células presentes nos tecidos dentários, que são fontes de células mesenquimais para terapias regenerativas. A literatura descreve diferentes tipos de células mesenquimais obtidas dos tecidos dentários: dentes decíduos exfoliados (SHED), ligamento periodontal (PDLSCs e PDLPs), folículo dentário (DFPCs), papila dentária (SCAPs) e polpa dentária (DPSCs e DPPSCs)^{41,44,60}.

As células do folículo dental têm sido estudadas por serem tecidos ricos em células mesenquimais indiferenciadas (células tronco adultas) podendo ser usadas na avaliação de potencial bioativo e aplicações clínicas⁵⁰. Esse tecido de origem ectomesenquimal, derivado do tecido de conexão ao redor da estrutura do órgão do esmalte e da papila dental³⁴ apresenta importante função biológica coordenando a erupção dental⁵⁵. Além disso, o folículo dental armazena as células precursoras do periodonto, que suporta toda a estrutura dental⁵¹.

A teoria clássica de formação do periodonto sugere que as células do folículo dental dão origem aos cementoblastos, que secretam a matriz cementária após a penetração através da bainha epitelial de Hertwig^{12,39,40}. Wise et al.⁵⁴, isolaram e caracterizaram células do folículo dental de molares de ratos, observando morfologia semelhante à de fibroblastos derivados de células mesenquimais indiferenciadas.

Viale-Bouroncle et al.⁵³ investigaram a adesão, proliferação e diferenciação de células do folículo dentário humano em *scaffolds* de β -tricálcio-fosfato. Os autores observaram que além da adesão e proliferação celular, essas células também

apresentaram diferenciação osteogênica, mostrando elevados níveis do marcador osteogênico sialoproteína óssea, com potencial para uso em regeneração tecidual.

Propondo avaliar a capacidade de regeneração tecidual dessas células, Yang et al.⁵⁸ combinaram as mesmas com matriz dentinária em subcutâneo de camundongos. A análise histológica revelou resultados positivos para colágeno tipo I, integrina $\beta 1$, fibronectina e fosfatase alcalina (ALP), sugerindo a formação de uma matriz extracelular. Além disso, essas células expressaram fosfoproteína da matriz dentinária e sialoproteína óssea, indicando seu potencial odontogênico e osteogênico, despertando o interesse na utilização das mesmas para a regeneração dental. Resultados semelhantes foram observados por Guo et al.¹⁶.

Outra linhagem de células estudada e com função formadora de matriz mineralizada são as células da polpa dental. Durante a formação dentária, Gronthos et al.¹⁵ observaram que as interações entre células epiteliais e da papila dental promovem a morfogênese dentária por meio da estimulação de uma subpopulação de células mesenquimais para diferenciação em odontoblastos, que por sua vez formam a dentina primária. Outros autores também obtiveram sucesso no isolamento de células tronco (primárias) da polpa dental que se diferenciaram em células tipo-odontoblastóides, obtendo resultados morfológicos e funcionais por meio de ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência^{9,45}.

A biocompatibilidade de materiais empregados durante a terapia endodôntica tem importância na reparação dos tecidos pulpare e periapicais²⁵. Estudos em culturas celulares representam ferramenta importante para avaliação de possíveis efeitos tóxicos destes materiais com excelente custo-benefício, sendo alternativas para experimentos *in vivo*^{6,22,59}.

Embora existam várias linhagens celulares, respostas biológicas envolvendo células humanas como fibroblastos do ligamento periodontal^{5,21,63} ou células osteoblásticas humanas⁶⁴ permitem maior proximidade da realidade clínica, uma vez que estes tipos celulares estão diretamente envolvidos na reparação dos tecidos periapicais^{7,18,47}. Desta forma, osteoblastos, células pulpares, cementoblastos e células do ligamento periodontal apresentam grande importância devido ao envolvimento no processo de reparo e formação de tecidos dentais e periapicais^{1,24,49,65}.

Estudos em cultura celular são usados para avaliação de biomateriais como o MTA (Mineral Trióxido Agregado). Pelliccioni et al.³⁸ empregaram células osteoblásticas (Saos-2) em estudo de adesão celular, viabilidade, proliferação e secreção de colágeno quando em contato com MTA, SuperEBA e amálgama. As análises realizadas nos períodos de 24 e 72h mostraram que o MTA, além de permitir a proliferação celular, induziu a formação de colágeno no período de 72h.

Utilizando células ósseas (ROS 17/2.8) e fibroblastos (mPDL) de ratos, Gomes-Cornélio et al.¹⁴ avaliaram os efeitos citotóxicos do cimento Portland (CP) associado com diferentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio). O resultado da viabilidade celular demonstrou citotoxicidade apenas para elevadas concentrações dos cimentos (100mg/mL), exceto para o CP puro, que foi citocompatível em todas as concentrações analisadas. Na análise da morfologia celular, não foi observada nenhuma alteração morfológica nos materiais avaliados. Os autores concluíram que a associação do CP com os radiopacificadores analisados representam excelentes alternativas ao óxido de bismuto.

Empregando células do ligamento periodontal de humano (PDL), Hakki et al.¹⁷ compararam o efeito sobre células dos seguintes materiais: amálgama, Dyract, IRM,

Super Bond C&B e MTA. O ensaio de MTT foi realizado após 48 e 96 horas da exposição aos cimentos, demonstrando maior viabilidade celular para o MTA.

A cultura primária de células pulparens dentais humanas tem sido utilizada para estudo de citotoxicidade de materiais odontológicos²⁹. Min et al.³² avaliaram os efeitos do CP em cultura de células da polpa dentária humana, comparando-o com materiais tradicionalmente usados em capeamento direto (cimento de hidróxido de cálcio - CaOH) e indireto (cimento de ionômero de vidro - CIV). No ensaio de MTT não foi observada citotoxicidade para o CP quando comparado ao grupo controle, enquanto que os grupos contendo CaOH2 e CIV apresentaram uma taxa de viabilidade menor que 40% no período de 12h. O grupo CP, na análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), mostrou adesão celular, numerosas extensões citoplasmáticas; além de expressão de osteonectina e sialofosfoproteína (DSPP). Concluíram que além de biocompatível, o CP é capaz de expressar genes relacionados ao processo de mineralização, sendo indicado para uso em capeamentos direto e indireto.

Este mesmo grupo de pesquisadores, em 2009, avaliou a capacidade mineralizadora do CP associado ao radiopacificador óxido de bismuto em culturas de células da polpa dentária humana por meio da análise da morfologia em MEV, expressão da ALP e marcação de nódulos de mineralização pelo ensaio Alizarin Red. Observaram adesão das células ao material, bem como aumento na atividade da ALP e expressão de proteínas associadas à mineralização, como a DSPP, e concluíram que a adição deste radiopacificador não interferiu nas propriedades biológicas do CP³³.

Zhao et al.⁶² avaliaram os efeitos do MTA na viabilidade de células da polpa dentária humana por meio do ensaio de MTT e PCR em tempo real. Os resultados mostraram que elevadas concentrações de MTA foram tóxicas para as células; sendo que em baixas concentrações, foi demonstrado um aumento na produção de ALP, bem como

produção de DSPP, colágeno do tipo I, osteocalcina e sialoproteína óssea. Resultados similares também foram observados por Paranjpe et al.³⁷, demonstrando que além de induzir a diferenciação odontoblástica das células da polpa dentária de humanos, o MTA participa do processo de reparo do complexo dentino-pulpar, tornando possível a formação de barreira dentinária.

Seo et al.⁴² avaliando o MTA em células indiferenciadas da polpa relataram que este material também participa do processo de migração celular e da resposta do fator de transformação do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); estimulando a diferenciação odontogênica. Woo et al.⁵⁶ observaram que células primárias da polpa dentária humana, quando cultivadas em meio de cultura contendo esse material associado a um vasodilatador (nifedipina), também são capazes de se diferenciar em células odontoblastóides e produzir uma estrutura mineral semelhante com a dentina, sendo a expressão dos genes DSPP e proteína da matriz dentinária 1 maior quando o MTA foi utilizado na concentração de 1 mg/mL.

As propriedades biológicas do nióbio têm sido analisadas em culturas celulares por diversos autores^{10,43,57}. A biocompatibilidade e capacidade de adesão, proliferação e mineralização em células osteoblásticas MC3T3-E1 foi analisada por Obata et al.³⁵, que avaliaram o comportamento dessa linhagem de células quando em contato com meio de cultura em placas contendo vidro revestido com nióbio. Foi observado aumento na produção de ALP nos grupos contendo nióbio, bem como maior quantidade de depósitos de cálcio. Os autores concluíram que o nióbio é capaz de estimular a adesão e proliferação celular, bem como a diferenciação e produção de nódulos mineralizados nesta linhagem.

Jirka et al.²⁰ demonstraram que a associação do nióbio em ligas de titânio aumenta a energia, polaridade e molhabilidade da superfície, propriedades que influenciam

diretamente a adesão celular através da mediação de moléculas da matriz extracelular. Kushwaha et al.²³ avaliaram a resposta de células tronco humanas quando em contato com uma cerâmica de fluorapatita tratada com nióbio; por meio da atividade enzimática da ALP, análise da morfologia celular pela MEV e análise da mineralização utilizando a coloração Alizarin Red. Os resultados mostraram proliferação celular, morfologia normal e presença de grânulos de cálcio mineralizados com rede de fibrilas nas células em contato com a cerâmica tratada com nióbio; indicando que este material demonstra qualidades de adesão, proliferação e diferenciação celular.

Além disso, Godley et al.¹³ observaram que o nióbio, uma vez associado à materiais com elevada alcalinidade como o CP, pode induzir a formação de uma camada superficial de fosfato de cálcio, favorecendo o processo de reparo de tecidos duros.

Novos materiais à base de CP utilizando o óxido de nióbio como radiopacificador são propostos sendo importante o estudo de suas propriedades biológicas. Também, é necessário maior entendimento das células primárias provenientes da polpa e folículo dentário humanos e sua aplicação em estudos com biomateriais em comparação a outras linhagens celulares.

2 CAPÍTULO 1

Bioatividade e potencial osteogênico de células primárias do folículo e polpa dentária humana*

Artigo que será submetido no periódico *Archives of Oral Biology

RESUMO

Objetivo: Avaliar e comparar a bioatividade e potencial osteogênico de células do folículo (hDFCs) e da polpa (hDPCs) obtidas de terceiros molares humanos com formação radicular incompleta.

Design: Foram realizados os ensaios Alizarin Red S e atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em células primárias da polpa e do folículo dentário de terceiros molares humanos. Também foi analisada a expressão gênica dos seguintes marcadores moleculares de osteogênese: proteína morfogenética óssea (BMP-7), sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e ALP por meio do ensaio PCR Real Time, utilizando GAPDH como controle endógeno. Para a análise estatística, foi utilizado teste t de Student com 5% de nível de significância.

Resultados: As hDPCs apresentaram mais intensa formação de nódulos de mineralização nas culturas primárias pelo Alizarin Red S e maior atividade de ALP. A análise em PCR Real Time demonstrou expressão dos genes avaliados para cada linhagem celular. A *dspp* e *alp* foram mais expressos nas hDPCs, e a expressão de *bmp7* foi semelhante nas duas linhagens.

Conclusão: As hDPCs demonstram maior capacidade de diferenciação em células com potencial de mineralização, quando comparadas com hDFCs.

Palavras-chave: células primárias do folículo dentário, células primárias da polpa dentária, fosfatase alcalina, reação em cadeia da polimerase

INTRODUÇÃO

As células dos tecidos dentários podem ser usadas como células mesenquimais para terapias regenerativas. Diferentes tipos de células mesenquimais obtidas dos tecidos dentários são descritos: dentes decíduos exfoliados (SHED), ligamento periodontal (PDLSCs e PDLPs), folículo dentário (DFPCs), papila dentária (SCAPs) e polpa dentária (DPSCs e DPPSCs) [1,2].

Culturas primárias de células da polpa dentária são utilizadas como modelo *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de diferentes materiais odontológicos [3], desenvolvimento de novos materiais em engenharia tecidual [4] e estudo de expressão de diferentes genes [5,6]; com potencial uso em terapias regenerativas [7].

A avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e a expressão gênica dos marcadores moleculares para osteogênese como osteocalcina (OCN) e sialofosfoproteína dentinária (DSPP) foram avaliadas em cultura primária de células da polpa demonstrando atividade de ALP e expressão gênica dos marcadores [8]. Também avaliando a expressão gênica dessas células, Lin *et al.* [9] observaram que o cultivo das células com proteína morfogenética óssea 7 (BMP7) aumenta a atividade osteogênica dessas células, aumentando a atividade de ALP e a expressão de DSPP.

Células do folículo dentário também são estudadas por serem tecidos ricos em células mesenquimais indiferenciadas, podendo ser usadas na avaliação de potencial bioativo de materiais [10]. A análise do potencial de diferenciação osteogênica de células do folículo dentário humano obtido de terceiro molar incluso, bem como a expressão de marcadores moleculares da osteogênese e dentinogênese, como ALP e DSPP, demonstram potencial para utilização dessas células em engenharia tecidual [11,12].

Ambas as linhagens apresentam grande capacidade de proliferação e diferenciação. A comparação entre as mesmas é importante uma vez que apresentam potencial para uso em medicina e odontologia regenerativa [13]. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a bioatividade e potencial osteogênico de células do folículo e da polpa dentária de terceiros molares humanos com formação radicular incompleta por meio de testes de potencial para mineralização e expressão gênica de marcadores moleculares da osteogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP (protocolo 33/10), foram selecionados três pacientes na faixa etária de 18 a 25 anos, com indicação de exodontia de terceiros molares inclusos com estágio de formação radicular incompleto e presença de folículo dentário. O folículo foi coletado logo após a exodontia, sendo separado da coroa dental utilizando um descolador do tipo Molt. As polpas dentárias foram coletadas de dois molares para cada paciente via abertura apical com auxílio do instrumento Hedström (Maillefer, Dentsply, Chemin du Verger, Ballaigues, Suíça). Os tecidos foram armazenados em placa de Petri 35x10 mm contendo meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 1% de penicilina e streptomina (PenStrep, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (meio de cultura α -MEM convencional) para transporte até o fluxo laminar.

Em seguida, os mesmos foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e submetidos à digestão enzimática com colagenase tipo I (3 mg/mL), conforme protocolo descrito por Kanoza *et al.* [14]. O meio de cultura foi trocado após 24 h da coleta e, posteriormente, a cada 48 h. Passagens sucessivas foram realizadas para expansão celular, sendo os experimentos realizados na quarta passagem celular.

Potencial osteogênico

Para avaliação das hDPCs e hDFCs quanto ao seu potencial de síntese de matriz mineralizável, as mesmas foram cultivadas em meio de cultura osteogênico: meio de cultura α -MEM convencional com adição de 0,05 μ M de ácido L-ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato (ambos Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [15] e foram realizados os

ensaios atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) (kit Fosfatase Alcalina, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) e coloração com vermelho de Alizarina 2%, pH 4.2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para isso, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/ poço em placas de 12 poços (TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) (n= 3) e os ensaios realizados após 15 dias de cultura. Como controle para estes ensaios, foram utilizadas células cultivadas em meio de cultura convencional.

Também foi avaliada a expressão dos marcadores moleculares proteína morfogenética óssea 7 (BMP7), sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e ALP. Para isso, as células foram cultivadas em meio de cultura convencional e o RNA total das células foi extraído utilizando o reagente Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o kit para extração de RNA SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). O RNA total extraído foi quantificado e avaliado quanto a sua qualidade em espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) e 1000 ng/ μ L foram tratados com DNase tipo I (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). A obtenção do cDNA foi realizada utilizando o kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os ensaios BMP7, DSPP e ALP foram avaliados pelo método da comparação do limiar dos ciclos ($\Delta\Delta$ CT), sendo realizados 50 ciclos, utilizando Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR, StepOnePlus Real Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), de acordo com a expressão do controle endógeno GAPDH (ensaios: Taqman, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), conforme a Tabela 1.

Todos os resultados obtidos foram analisados quanto a sua aderência a curva normal e teste paramétrico t de Student por meio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2012) com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Atividade da enzima fosfatase alcalina

As culturas primárias cultivadas em meio α -MEM osteogênico apresentaram aumento da atividade da enzima ALP quando comparadas as culturas em meio α -MEM convencional, sendo maior para as hDPCs, conforme demonstrado na Tabela 2.

Ensaio Alizarin Red

As imagens ilustrativas da Figura 1 evidenciam a formação de nódulos de mineralização nas culturas primárias cultivadas em meio osteogênico, o que não foi observado nas culturas em meio α -MEM convencional. A análise estatística (Tabela 3) demonstrou semelhança estatística para as linhagens avaliadas ($p>0,05$).

Real Time PCR

A análise dos genes *bmp7*, *dspp* e *alp* (Figura 2) evidenciou a expressão destes marcadores em ambas as linhagens avaliadas. Os genes *dspp* e *alp* foram mais expressos nas hDPCs, e a expressão de *bmp7* foi semelhante nas duas linhagens.

DISCUSSÃO

Células dos tecidos dentários podem ser utilizadas em terapias regenerativas, incluindo a endodôntica [16,17]. Sedgley, Botero [18] relatam a presença de células mesenquimais indiferenciadas em diversos tecidos dentários, incluindo a polpa e o folículo.

O ensaio de ALP das células demonstrou aumento da atividade desta enzima, bem como formação de nódulos de mineralização por meio do Alizarin Red S, sendo mais intenso para a hDPCs. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores ao avaliarem a formação de nódulos de mineralização em células coletadas da polpa e do folículo dentário humanos [19,20]. Também com a finalidade de avaliar a bioatividade das hDFCs e hDPCs, Patil *et al.* [21] realizaram os ensaios Alizarin Red e Von Kossa, observando a formação de nódulos mineralizados para as duas linhagens.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima detectada em pré-osteoblastos e osteoblastos considerada marcador inicial para a diferenciação óssea e relacionada ao processo de deposição de minerais e calcificação no tecido ósseo, sendo encontrada nos tecidos ósseo, hepático e também em anexos do órgão dentário, como polpa e folículo dentários [22,23]. A coloração com Alizarin Red S identifica depósitos de cálcio e fosfato em cultura celular [24], permitindo a identificação de células com características osteogênicas em cultura celular. A literatura demonstra elevados níveis de ALP em células da polpa dentária humana [25-27], justificando a atividade observada no presente estudo.

O ensaio PCR Real Time consiste na análise quantitativa do RNA transcrito nas células, por meio da leitura de sinal fluorescente de uma ou mais reações em cadeia da polimerase em um determinado número de ciclos [28]. A avaliação dos genes associados à osteogênese, *bmp7*, *alp* [11]; e um associado à odontogênese, *dspp* [29] foi realizada em meio de cultura convencional.

A expressão de *bmp7* e *alp* está associada à diferenciação osteogênica [30]. As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), expressas no tecido ósseo, participam do processo de osteoindução, principalmente em estágios iniciais, sendo importante para a diferenciação celular em osteoblastos [31]. No presente estudo, *bmp7* foi expresso em ambas às linhagens avaliadas, sem diferença estatística entre as mesmas. A expressão deste gene nessas células é relatada [32-34], sugerindo células capazes de diferenciação em células produtoras de matriz mineralizada.

Gopinathan *et al.* [35] avaliaram o potencial de diferenciação osteogênica de células da polpa e do folículo dentário humanos, observando a formação de nódulos de tecido mineralizado para ambas células, sendo maior nas células da polpa. Esses autores também avaliaram a expressão gênica de *bmp7* e *alp*, verificando expressão destes marcadores ósseos em ambas as linhagens, em maior proporção para as células da polpa, concordando com os resultados do presente estudo.

A DSPP é uma das proteínas não formadoras de colágeno presente em processos que envolvem a mineralização, sendo altamente expressa em odontoblastos. Através da sua clivagem, são originadas as proteínas sialoproteína da dentina (DSP) e fosfoproteína da dentina (DPP) [36]. Qin *et al.* [37] detectaram a presença de DSPP no osso, na proporção de 1/400 quando comparada à expressão em dentina. Apesar da baixa expressão em células ósseas, existe forte evidência de que a DSPP participa de um processo importante durante a dentinogênese, sendo considerada marcador específico da diferenciação odontogênica [38].

A expressão de *dspp* em células primárias isoladas da polpa [39-41] e do folículo dentário humanos [3,35,42] por meio do ensaio transcriptase reversa (RT-PCR) tem sido observada, sendo associada ao processo de dentinogênese. Neste estudo, houve maior expressão deste gene nas hDPCs, justificando pelo seu papel exercido na formação do órgão dentário: diferenciação em odontoblastos e secreção de pré-dentina [43].

CONCLUSÃO

Conclui-se que células primárias do folículo e da polpa dentária apresentam capacidade de diferenciação em células com potencial para formação de tecido mineralizado, destacando as células da polpa dentária, que apresentaram maior atividade da enzima fosfatase alcalina, bem como maior expressão de *alp* e *dspp*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (processo: 2012/08961-7), que financiou o desenvolvimento deste trabalho e ao Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior por sua colaboração com o trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? Arch Oral Biol. 2012 Nov;57(11):1439-58.
2. Young F, Sloan A, Song B. Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair. J Neurosci Res. 2013 Nov;91(11):1383-93.
3. Guven EP, Yalvac ME, Sahin F, Yazici MM, Rizvanov AA, Bayirli G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. J Endod. 2011 May;37(5):650-6.
4. Park BW, Kang EJ, Byun JH, Son MG, Kim HJ, Hah YS, et al. In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. Differentiation. 2012 Jun;83(5):249-59.
5. Patel M, Smith AJ, Sloan AJ, Smith G, Cooper PR. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. Arch Oral Biol. 2009 Oct;54(10):898-908.
6. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Arch Oral Biol. 2011 Jul;56(7):709-21.

7. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature. *Arch Oral Biol.* 2013 Dec;58(12):1818-27.
8. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):703-8.
9. Lin ZM, Qin W, Zhang NH, Xiao L, Ling JQ. Adenovirus-mediated recombinant human bone morphogenetic protein-7 expression promotes differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2007 Aug;33(8):930-5.
10. Morszeck CO, Drees J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 2012 Dec;57(12):1595-601.
11. Aonuma H, Ogura N, Takahashi K, Fujimoto Y, Iwai S, Hashimoto H, et al. Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell Tissue Res.* 2012 Nov;350(2):317-31.
12. Takahashi K, Ogura N, Aonuma H, Ito K, Ishigami D, Kamino Y, et al. Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Arch Oral Biol.* 2013 Jun;58(6):690-8.
13. Brizuela C, Galleguillos S, Carrion F, Cabrera C, Luz P, Inostroza C. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and follicle. *Int J Morphol.* 2013 Jun;31(2):739-46.
14. Kanoza RJ, Brunette DM, Purdon AD, Sodek J. Isolation and identification of epithelial-like cells in culture by a collagenase-separation technique. *In Vitro.* 1978 Sep;14(9):746-53.

15. Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Martínez S, Moraleda JM. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *J Craniofac Surg*. 2012 Nov;23(6):e571-5.
16. Atari M, Barajas M, Hernández-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Ferrés Padró E, et al. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol*. 2011 Aug;26(8):1057-70.
17. Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M. Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch Oral Biol*. 2014 Feb;59(2):158-66.
18. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):549-61.
19. Navabazam AR, Nodoshan FS, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med*. 2013 Mar;11(3):235-242.
20. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013 Jul;101(2):121-32.
21. Patil R, Kumar BM, Lee WJ, Jeon RH, Jang SJ, Lee YM, et al. Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Exp Cell Res*. 2014 Jan;320(1):92-107.
22. Goseki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Oida S. Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int*. 1999 Feb;64(2):160-2.

23. Magnusson P, Larsen I, Magnusson M, Davie MWJ, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res.* 1999 Nov;14(11):1926-33.
24. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1969 Feb;17(2):110-24.
25. Spoto G, Fioroni M, Rubini C, Tripodi D, Di Stilio M, Piattelli A. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. *J Endod.* 2001 Mar;27(3):180-2.
26. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010 Dec;20(12):715-22.
27. Wang Y, Yan M, Wang Z, Wu J, Wang Z, Zheng Y, et al. Dental pulp stem cells from traumatically exposed pulps exhibited an enhanced osteogenic potential and weakened odontogenic capacity. *Arch Oral Biol.* 2013 Nov;58(11):1709-17.
28. Tevfik Dorak M. *Real-time PCR (Advanced Methods)*. 1st ed. Newcastle: Taylor & Francis; 2006.
29. Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EH. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. *J Endod.* 2012 Apr;38(4):454-63.
30. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Li L, Tan W, et al. TNF- α triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- κ B signaling pathway. *Cell Biol Int.* 2013 Dec;37(12):1267-75.
31. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Expression of bone morphogenic protein in the course of osteinduction by recombinant human bone morphogenic protein-2. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Feb;13(1):80-5.

32. Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, et al. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblasts lineages. *Biol Cell*. 2008 May;100(5):291-302.
33. Yagyuu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, et al. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol*. 2010 Jan;55(1):68-76.
34. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):700-8.
35. Gopinathan G, Kolokythas A, Luan X, Diekwisch TG. Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. *Stem Cells Dev*. 2013 Jun 15;22(12):1763-78.
36. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol*. 2009 May;28(4):221-9.
37. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res*. 2002 Jun;81(6):392-4.
38. Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res*. 2007 May;86(5):392-9.
39. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

40. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(20):3766-81.
41. Min JH, Ko SY, Cho YB, Ryu CJ, Jang YJ. Dentinogenic potential of human adult dental pulp cells during the extended primary culture. *Hum Cell*. 2011 Mar;24(1):43-50.
42. Guo L, Li J, Qiao X, Yu M, Tang W, Wang H, et al. Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4):e62332.
43. Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*. 2013 Dec 18. pii: S0014-4827(13)00529-6.

FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa da coloração com Alizarin Red S 2% após cultivo em meio osteogênico por 15 dias. No grupo controle, nota-se a ausência de nódulos mineralizados nas hDPCs (A) e hDFCs (C). Nas células cultivadas em meio osteogênico, é possível observar a formação de nódulos de mineralização nas hDPCs (B) e hDFCs (D).

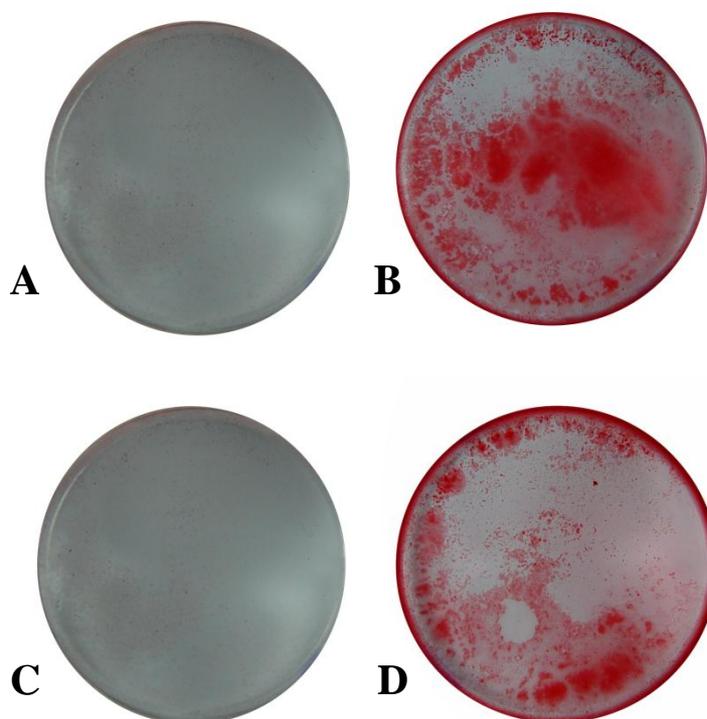
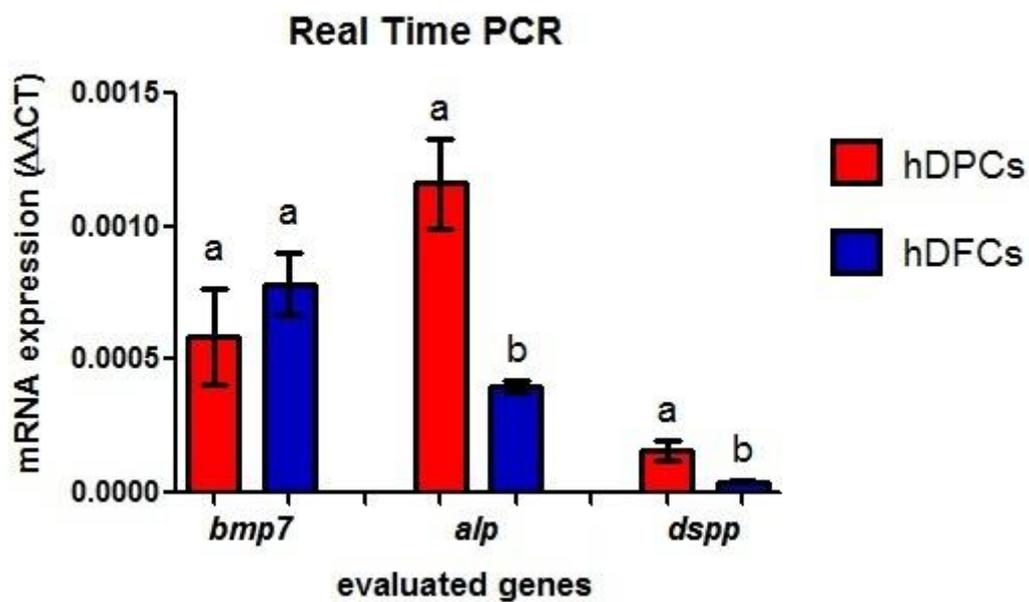


Figura 2: Média dos valores de expressão gênica nas culturas primárias em relação ao controle endógeno. Letras iguais para o mesmo gene representam semelhança estatística entre as linhagens ($p > 0,05$).



TABELAS

Tabela 1: Informações dos primers e sondas que foram utilizados no Real Time PCR.

Gene	Primer Taqman	Assay ID	RefSeq
proteína morfogenética óssea 7	<i>BMP7</i>	Hs00233476_m1	NM_001719.2
sialofosfoproteína dentinária	<i>DSPP</i>	Hs00171962_m1	NM_014208.3
fosfatase alcalina	<i>ALP</i>	Hs01029144_m1	NM_000478.4
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (controle endógeno)	<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	NM_002046.3

Tabela 2: Atividade da enzima fosfatase alcalina (U/L) nas culturas primárias.

LINHAGEM CELULAR	MEIO DE CULTURA	
	convencional	osteogênico
hDPCs	22.22 ± 1.139 (Ba)	67.78 ± 1.351 (Aa)
hDFCs	17.99 ± 1.405 (Bb)	26.17 ± 1.800 (Ab)

Letras maiúsculas diferentes representam resultados estatisticamente diferentes para uma mesma linhagem celular; letras minúsculas diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre as linhagens celulares ($p < 0,05$).

Tabela 3: Valores médios e desvio padrão da porcentagem de área corada pelo corante Alizarin Red S 2%.

LINHAGEM CELULAR	RESULTADOS
hDPCs	85.30 ± 3.442 (A)
hDFCs	66.51 ± 4.521 (A)

Letras iguais representam semelhança estatística ($p > 0,05$).

3 CAPÍTULO 2

Citotoxicidade e bioatividade do MTA e Cimento Portland associado ao óxido de nióbio em diferentes linhagens celulares*

Artigo que será submetido no periódico *International Endodontic Journal

RESUMO

Objetivo O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade da associação de material à base de cimento Portland (CP) e óxido de nióbio (Nb_2O_5) nas formas micro e nanoparticulada, em comparação ao MTA, comparando a resposta em diferentes linhagens celulares.

Metodologia Foram utilizadas quatro linhagens celulares, sendo duas culturas primárias (células da polpa – hDPCs – e do folículo – hDFCs – dentário humanos) e duas culturas imortalizadas (células osteoblásticas humanas Saos-2 e do ligamento periodontal de ratos mPDL) para análise dos seguintes materiais: 1) Cimento Portland branco (CP); 2) MTA; 3) CP/ óxido de nióbio microparticulado ($Nb_2O_5\mu$); 4) CP/ óxido de nióbio nanoparticulado (Nb_2O_5n). A citotoxicidade nas diferentes linhagens foi avaliada pelos ensaios MTT e Azul de Trypan pelo período de 24 h, e a bioatividade pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Os resultados obtidos foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados Viabilidade celular foi observada em todas as linhagens. A bioatividade avaliada pela atividade da enzima fosfatase alcalina apresentou maior resposta na linhagem osteoblástica (Saos-2) sendo maior a ALP após 7 dias para CP/ $Nb_2O_5\mu$.

Conclusão Conclui-se que as diferentes linhagens celulares apresentam resultados similares na avaliação da citotoxicidade. Entretanto, para avaliação da bioatividade por meio da atividade da ALP, o uso de uma linhagem celular osteoblástica é indicado. Materiais à base de óxido de nióbio micro e nanoparticulados mostram potencial para uso alternativo ao MTA.

Palavras-chave: Células da polpa dentária humana, células do folículo dentário humano, cimento Portland, citotoxicidade, fosfatase alcalina

INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é indicado para o tratamento de perfurações, reabsorções dentárias, proteção pulpar e obturação retrógrada por apresentar excelentes propriedades biológicas (Torabinejad & Parirokh 2010). As propriedades físico-químicas e biológicas dos cimentos de silicato de cálcio Mineral Trióxido Agregado (MTA) e cimento Portland (CP) são semelhantes (Oliveira *et al.* 2007). Entretanto, o CP apresenta baixa radiopacidade quando comparado com a dentina e o osso alveolar adjacente (Tanomaru-Filho *et al.* 2008), sendo necessária a associação com agente radiopacificador. Na composição do MTA, o óxido de bismuto utilizado promove aumento gradativo da porosidade do material (Coomaraswamy *et al.* 2007). Desta forma, novos agentes radiopacificadores são estudados como alternativa em substituição ao óxido de bismuto.

O óxido de nióbio (Nb_2O_5) é um elemento químico estudado para melhora das propriedades biológicas de materiais, e tem sido utilizado em ligas de titânio de implantes endósseos devido à sua biocompatibilidade e maiores resistências mecânica, à corrosão e desintegração (Challa *et al.* 2013). A incorporação de nanopartículas em materiais odontológicos visa melhorar as propriedades biológicas do material, como efeito antibacteriano (Cheng *et al.* 2012) e compatibilidade biológica (Opačić-Galić *et al.* 2013). Viapiana *et al.* (2013) demonstraram que o Nb_2O_5 na forma nanoparticulada usado como radiopacificador de um cimento endodôntico à base de silicato de cálcio promove resistência à compressão, escoamento e tempo de presa adequados.

Os materiais reparadores endodônticos podem entrar em contato direto com diversos tipos celulares, como células do ligamento periodontal, ósseas e células mesenquimais indiferenciadas (Gomes-Cornélio *et al.* 2011), sendo necessária a comparação da resposta dos diversos tipos celulares presentes no órgão dentário (Brackett *et al.* 2010).

Seo *et al.* (2013) avaliaram a resposta do MTA em cultura primária de células da polpa, observando a formação de nódulos mineralizados na coloração com Alizarin Red S 2% e expressão dos marcadores moleculares da odontogênese como fosfoproteína da matriz dentinária 1 (DMP1) e sialofosfoproteína dentinária (DSPP). Empregando células osteoblásticas humanas (Saos-2), Salles *et al.* (2012) estudaram material obturador à base de MTA e observaram viabilidade celular e bioatividade. Também avaliando materiais à base de MTA, Scelza *et al.* (2012) utilizaram osteoblastos humanos (hOB); e Yoshino *et al.* (2013) utilizaram fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL).

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade da associação entre material à base de CP e Nb₂O₅ nas formas micro e nanoparticulada, comparando a resposta em diferentes linhagens celulares primárias (polpa e folículo dentário humanos) e linhagens celulares imortalizadas (mPDL e Saos-2). A hipótese nula é a de que a resposta para os materiais seja similar para as diferentes linhagens celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram determinados os seguintes grupos experimentais de acordo com a Tabela 1. Foram utilizadas células primárias obtidas da polpa e do folículo dentário humanos obtidas de um paciente de 18 anos de idade, que apresentava indicação de exodontia e ápices radiculares abertos; e células imortalizadas Saos-2 (células osteoblásticas derivadas de osteossarcoma humano) e mPDL (fibroblastos do ligamento periodontal de rato).

Preparo dos eluídos dos cimentos

Para obtenção das nanopartículas de Nb₂O₅, foi utilizado o método precursor polimérico, no Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil). Solução aquosa de oxalato de nióbio de amônio (CBMM, Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração) foi preparada e foi adicionado hidróxido de amônio formando um precipitado de hidróxido de nióbio. Este foi filtrado e lavado para eliminar os íons oxalato, e em seguida dissolvido em solução aquosa de ácido cítrico. O conteúdo de nióbio presente na solução foi determinado pela análise gravimétrica, e a solução foi mantida em agitação por 2 h a 70 °C para reação. Etilenoglicol foi adicionado na proporção 60:40, e a solução foi mantida aquecida, em agitação. Essa solução foi aquecida em forno elétrico a 300 °C por 4 h e a massa resultante foi triturada e calcinada em forno elétrico a 700 °C sobre placas de alumínio por 2 h⁻¹ (Viapiana *et al.* 2013).

Os cimentos foram preparados de acordo com as proporções citadas na Tabela 1 para confecção de corpos de prova com diâmetro interno de 5 mm e altura de 1 mm, que foram mantidos em estufa a 37°C e 100% de umidade por 15 horas. Decorrido este período, foram expostos à luz ultravioleta (UV) em fluxo laminar por 30 minutos com a finalidade de desinfecção. Em seguida, 4 corpos de prova de cada material foram colocados em poços de

placa de 6 poços (TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça), preenchidos com 10 mL de meio de cultura e incubadas por 24 horas em estufa à 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para obtenção dos eluídos dos cimentos.

Plaqueamento das células

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade (MTT e Azul de Trypan), as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) (n= 3 para cada material). Para as culturas primárias, foi utilizado meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 1% de penicilina e streptomina (PenStrep, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (meio de cultura α -MEM completo). As culturas imortalizadas foram preparadas em meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 5% de FBS e 1% de PenStrep (meio de cultura DMEM completo). Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando diluições dos eluídos de 1:2, 1:3, 1:4, 1:6 e 1:8 em meio de cultura sem FBS (α -MEM para as culturas primárias e DMEM para as culturas imortalizadas) por 24 h. Como controles, foram utilizados peróxido de hidrogênio 1mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (positivo) e meio de cultura completo (negativo).

O ensaio de bioatividade foi realizado em diluição intermediária (1:4), e as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços (TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) (n= 3 poços para cada material) conforme descrito anteriormente. O ensaio foi realizado nos períodos de 1, 3 e 7 dias, realizando-se a renovação do meio de cultura aos 3 dias.

Ensaio de MTT

Depois da exposição das células aos eluídos dos cimentos avaliados, os mesmos foram substituídos por 100 µL de uma solução de MTT 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguido de incubação por 3h a 37°C. Após este período, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico solubilizado em 100 µL de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras solubilizadas foram quantificadas em leitor de ELISA (Elx800; Instrumentos Bio-Tek, WINOOSKI, VT), em 570 nm.

Ensaio Azul de Trypan

Após a remoção das células da placa de cultura, partes iguais (100 µL) do agente dissociador (Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free/ Hank's-based, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e da solução de Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionadas e 10 µL deste conteúdo foi transferido para uma câmara de Neubauer para contagem dos quatro quadrantes laterais em microscópio de luz invertida. O cálculo da viabilidade foi realizado de acordo com a seguinte fórmula: % células viáveis = (células vivas/total de células) x 100.

Atividade enzimática da fosfatase alcalina

As células foram lisadas por 30 minutos em temperatura ambiente utilizando solução de SDS 1:1 (Sodium Lauryl Sulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o ensaio foi realizado utilizando o kit Fosfatase Alcalina (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). Em tubos de ensaio, foram adicionados 50 µL de timolftaleína monofosfatada, 500 µL de solução tampão (pH 10,1) e, após incubação a 37°C por 2 minutos, 50 µL da amostra. Em seguida os tubos foram novamente incubados a 37°C por 10 minutos e foi adicionado 2,0 mL

de carbonato de sódio associado ao hidróxido de sódio (reagente de cor). A absorvância foi mensurada no comprimento de onda de 590 nm em leitor de ELISA.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade e aderência à curva normal pelos testes paramétricos ANOVA e Tukey, por meio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2012), sendo considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Ensaio de MTT

A Figura 1 demonstra aumento da viabilidade celular nas maiores diluições do eluído para todas as linhagens celulares. Os materiais experimentais contendo óxido de nióbio demonstraram resultados similares ao MTA em todas as linhagens avaliadas, com destaque para Nb₂O_{5n}, que além de apresentar viabilidade semelhante ao MTA nas menores concentrações, demonstrou ser mais citocompatível na linhagem óssea Saos-2, apresentando resultados superiores.

Ensaio Azul de Trypan

A Figura 2 evidencia que os materiais experimentais Nb₂O_{5μ} e Nb₂O_{5n} apresentaram resultados de viabilidade celular de forma semelhante ou superior ao MTA em todas as concentrações e linhagens celulares avaliadas ($p > 0,05$), exceto para a diluição 1:2 na linhagem celular Saos-2; além disso, observa-se que o aumento da viabilidade celular em todas as linhagens é proporcional à diluição do eluído.

Atividade enzimática da ALP

A Figura 3 demonstra que maior atividade da enzima ALP foi observada somente na linhagem óssea (Saos-2), com aumento da atividade nos períodos avaliados, e maior atividade no período final para o grupo experimental Nb₂O_{5μ}, sendo a maior atividade neste período para o grupo controle. Nas demais linhagens avaliadas, não houve diferença estatística entre os períodos avaliados ($p > 0,05$); exceto para o grupo controle das hDFCs, que apresentou maior atividade que os demais grupos avaliados no período final.

DISCUSSÃO

Células originadas de tecidos diferentes podem responder de forma diferenciada quando usadas para testes de citotoxicidade (Brackett *et al.* 2010). Neste estudo, fibroblastos do ligamento periodontal e células osteoblásticas são utilizadas por participarem no processo de reparo dos tecidos periapicais (Willershausen *et al.* 2000).

A utilização de células mesenquimais indiferenciadas da polpa e folículo dentário humanos tem sido realizada em função do seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares (Martens *et al.*, 2013). A avaliação da resposta das culturas primárias frente aos novos materiais endodônticos representa ferramenta importante para estudos de citotoxicidade (Güven *et al.* 2011).

O ensaio de MTT é o método *in vitro* mais utilizado para determinação da citotoxicidade por meio da mensuração da viabilidade celular (Yilmaz *et al.* 2012). O teste é baseado na transformação do sal tetrazólio em cristais de formazan com coloração violeta e insolúveis em água, reação catalisada pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial presente na mitocôndria de células viáveis (Hamid *et al.* 2004). O Azul de Trypan é um ensaio que permite a diferenciação entre as células viáveis e não viáveis pela avaliação microscópica. A análise por este método revela um rompimento na integridade da membrana celular, partindo da premissa de que células viáveis não permitirão a incorporação do corante no núcleo celular, mantendo a integralidade da membrana e demais organelas (Correa *et al.* 2009).

Os materiais reparadores avaliados pelos ensaios de citotoxicidade MTT e Azul de Trypan demonstraram viabilidade em todas as linhagens avaliadas. O cimento experimental Nb₂O₅n demonstrou resultados semelhantes ou superiores ao Nb₂O₅μ em todas as linhagens e concentrações avaliadas. Ainda, ambos apresentaram resultados de viabilidade celular

similares ou superiores ao MTA, indicando que os cimentos de CP associados ao óxido de nióbio apresentam potencial para uso após estudos adicionais.

Gomes-Cornélio *et al.* (2011) avaliaram a resposta de células osteoblásticas (ROS) e fibroblastos (mPDL) ao CP, quando associado a diferentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio), observando citocompatibilidade para todos os cimentos. Comparando a resposta entre osteoblastos e fibroblastos, Willershausen *et al.* (2013) avaliaram a viabilidade e morfologia dessas células frente ao MTA, ressaltando que apesar da sua citotoxicidade inicial, o mesmo demonstrou viabilidade e proliferação celular após 24h em ambas as linhagens estudadas, corroborando com o presente estudo. Resultados similares também foram descritos por AlAnezi *et al.* (2011) ao avaliarem o MTA em fibroblastos (L929) e células osteoblásticas (MC3T3-E1) de ratos.

A comparação das células primárias de polpa e folículo dentário com as culturas imortalizadas permite a análise da influência dos tipos celulares em testes de citocompatibilidade e bioatividade. Apesar da capacidade limitada de divisão celular e senescência apresentadas pelas células primárias (Kudo *et al.* 2002), não houve diferença na resposta das linhagens primárias quando comparadas com linhagens imortalizadas, que apresentam características biológicas bem definidas e são obtidas comercialmente a partir de coleções de cultura celulares (Galler *et al.* 2006). A resposta semelhante entre as linhagens primárias e imortalizadas nos ensaios de citotoxicidade sugere que as linhagens celulares estudadas são viáveis para avaliação de novos materiais odontológicos (Yalvac *et al.* 2010).

A ALP é uma enzima presente na membrana plasmática que está associada ao processo de mineralização (Weiss *et al.*, 1986), sendo observada no tecido ósseo, hepático e também em anexos do órgão dentário, como polpa e folículo dentários (Goseki-Sone *et al.* 1999). A ALP é um dos principais marcadores da atividade osteoblástica celular (Magnusson

et al. 1999), sendo indicada para avaliação da bioatividade de materiais que visam reparo por tecido mineralizado.

Os resultados do presente estudo demonstram maior atividade da enzima ALP na linhagem óssea (Saos-2), e aumento da atividade durante o período avaliado, destacando-se os materiais CP e Nb₂O₅μ. A elevada atividade desta enzima na linhagem Saos-2 já foi descrita por diversos autores (Marcus *et al.* 2001), destacando que a mesma é dependente da concentração de células semeadas (Rodan *et al.* 1987), o que justifica a maior atividade desta enzima no período final de avaliação (7 dias).

Nas demais linhagens avaliadas, não houve diferença estatística entre os períodos avaliados. A atividade desta enzima nas culturas primárias foi ligeiramente maior que na linhagem de fibroblastos mPDL. O aumento da atividade desta enzima em culturas primárias pode estar relacionado à sua capacidade de diferenciação osteoblástica (Higuita-Castro *et al.* 2011). Fibroblastos do ligamento periodontal são células que possuem diferentes características morfogenéticas (Giannopoulou & Cimasoni 1996), bem como capacidade de diferenciação em células que secretam matriz mineralizada (Murakami *et al.* 2003) justificando a atividade de ALP nesta linhagem.

Ensaio *in vivo* devem ser realizados após a obtenção de uma resposta favorável nos ensaios *in vitro*, uma vez que estes não podem ser diretamente comparados com ensaios *in vivo*, nos quais ocorre uma resposta conjunta de todo o organismo envolvido (Spångberg 1978). Entretanto, a avaliação da citotoxicidade de materiais *in vitro* pode nos dar uma visão geral dos efeitos biológicos dos mesmos, sugerindo respostas para condições *in vivo* (Azar *et al.* 2000).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a avaliação da citotoxicidade de materiais endodônticos é similar nas diferentes linhagens celulares primárias (polpa e folículo dentário humanos) e linhagens celulares imortalizadas (mPDL e Saos-2). Entretanto, para a avaliação da bioatividade o uso de uma linhagem celular específica é indicado destacando a linhagem osteoblástica. Materiais à base de óxido de nióbio micro e nanoparticulados mostram potencial para uso alternativo como radiopacificadores na composição do MTA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (processo: 2012/08961-7), que financiou o desenvolvimento deste trabalho e aos Professores Doutores Carlos Rossa Júnior e Joni Augusto Cirelli por sua colaboração com o trabalho.

REFERÊNCIAS

- AlAnezi AZ, Zhu Q, Wang YH, Safavi KE, Jiang J (2011) Effect of selected accelerants on setting time and biocompatibility of mineral trioxide aggregate (MTA). *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **111**, 122-7.
- Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F (2000) In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *Journal of Endodontics* **26**, 462-5.
- Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B* **95**, 380-6.
- Challa VS, Mali S, Misra RD (2013) Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **101**, 2083-9.
- Cheng L, Weir MD, Xu HH *et al.* (2012) Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dental Materials* **28**, 573-83.
- Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radioopacifier cement on the material properties of an endodontic Portland cement – based (MTA like) system. *Journal of Endodontics* **33**, 295-8.
- Correa GT, Veranio GA, Silva LE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MF (2009) Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *Journal of Applied Oral Science* **17**, 457-61.
- Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *European Journal of Oral Science* **114**, 138-46.

- Giannopoulou C, Cimasoni G (1996) Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Dental Research* **75**, 895-902.
- Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of Endodontics* **37**, 203-10.
- Goseki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Oida S (1999) Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcified Tissue International* **64**, 160-2.
- Güven EP, Yalvaç ME, Şahin F, Yazici MM, Rizvanov AA, Bayirli G (2011) Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. *Journal of Endodontics* **37**, 650-6.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P (2004) Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology In Vitro* **18**, 703-10.
- Higueta-Castro N, Gallego-Perez D, Pelaez-Vargas A et al. (2011) Reinforced Portland cement porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B* [Epub ahead of print].
- Kudo Y, Hiraoka M, Kitagawa S et al. (2002) Establishment of human cementifying fibroma cell lines by transfection with temperature-sensitive Simian Virus-40 T-antigen Gene and hTERT Gene. *Bone* **30**, 712-7.
- Magnusson P, Larsen I, Magnusson M, Davie MWJ, Sharp CA (1999) Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *Journal of Bone and Mineral Research* **14**, 1926-33.
- Marcus R, Feldman D, Klesey J. (2001). *Osteoporosis*, 2nd edn San Diego, CA, USA: Academic Press.

Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I (2013) Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clinical Oral Investigations* **17**, 1969-83.

Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H, Ishikawa I (2003) Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontology* **74**, 780-6.

Oliveira MG, Xavier CB De marco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH (2007) Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Brazilian Dental Journal* **18**, 3-7.

Opačić-Galić V, Petrović V, Zivković S et al. (2013) New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *International Endodontic Journal* **46**, 506-16.

Rodan SB, Imai Y, Thiede MA et al. (1987) Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Research* **47**, 4961-6.

Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC et al. (2012) Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *Journal of Endodontics* **38**, 971-6.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG (2012) A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal* **45**, 12-18.

Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH (2013) The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Journal of Endodontics* **39**, 242-8.

Spångberg LS (1978) Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *Journal of Endodontics* **4**, 296-9.

- Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru JM (2008) Radiopacity evaluation of rootend filling materials by digitization of images. *Journal of Applied Oral Science* **16**, 376–9.
- Torabinejad M, Parirokh M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of Endodontics* **36**, 190-202.
- Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2013) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal* [Epub ahead of print].
- Weiss MJ, Cole DEC, Ray K et al. (1986) Isolation and characterization of a cDNA encoding human liver/bone/ kidney-type ALP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 7182-6.
- Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R (2000) Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *Journal of Endodontics* **26**, 703-7.
- Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, Weyer V, Willershausen B, Marroquin BB (2013) Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Archives of Oral Biology* **58**, 1232-7.
- Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA et al. (2010) Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The Pharmacogenomics Journal* **10**, 105-13.
- Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A (2012) Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dental Materials* **31**, 1028-32.

Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR (2013) In vitro cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Brazilian Dental Journal* **24**, 111-6.

TABELAS

Tabela 1) Materiais experimentais avaliados.

GRUPO	MATERIAL	PROPORÇÃO	FABRICANTE
CP	Cimento Portland branco	1 g : 320 μ L	Votoran, Votorantin cimentos, Rio Branco do Sul, PR, Brasil
MTA	Mineral Trióxido Agregado Branco	1 g : 320 μ L	Angelus, Londrina, PR, Brasil
Nb ₂ O ₅ μ	CP (70%) + 30% óxido de nióbio microparticulado	1 g : 400 μ L	FOAr – UNESP, Araraquara, SP, Brasil
Nb ₂ O ₅ n	CP (70%) + 30% óxido de nióbio nanoparticulado	1 g : 400 μ L	FOAr – UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Figura 2) Resultados da viabilidade celular (%) pelo ensaio Azul de Trypan nas diferentes linhagens avaliadas. Letras iguais representam semelhança estatística ($p > 0,05$).

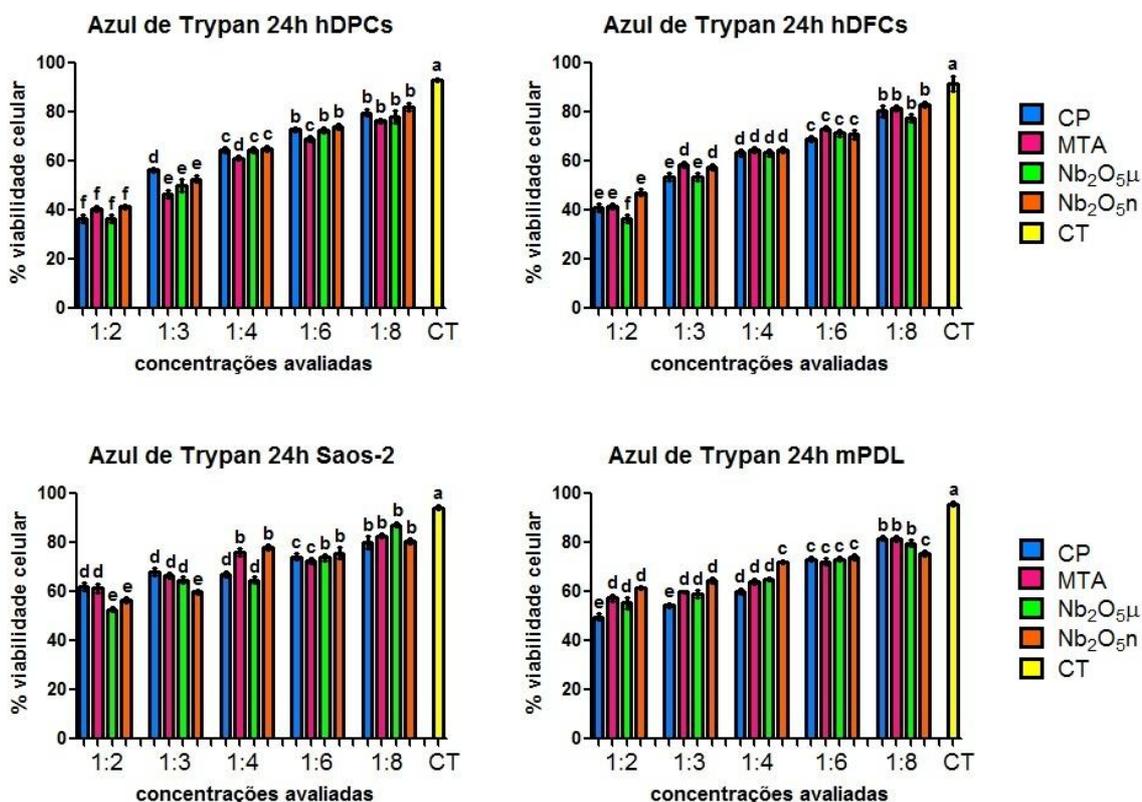
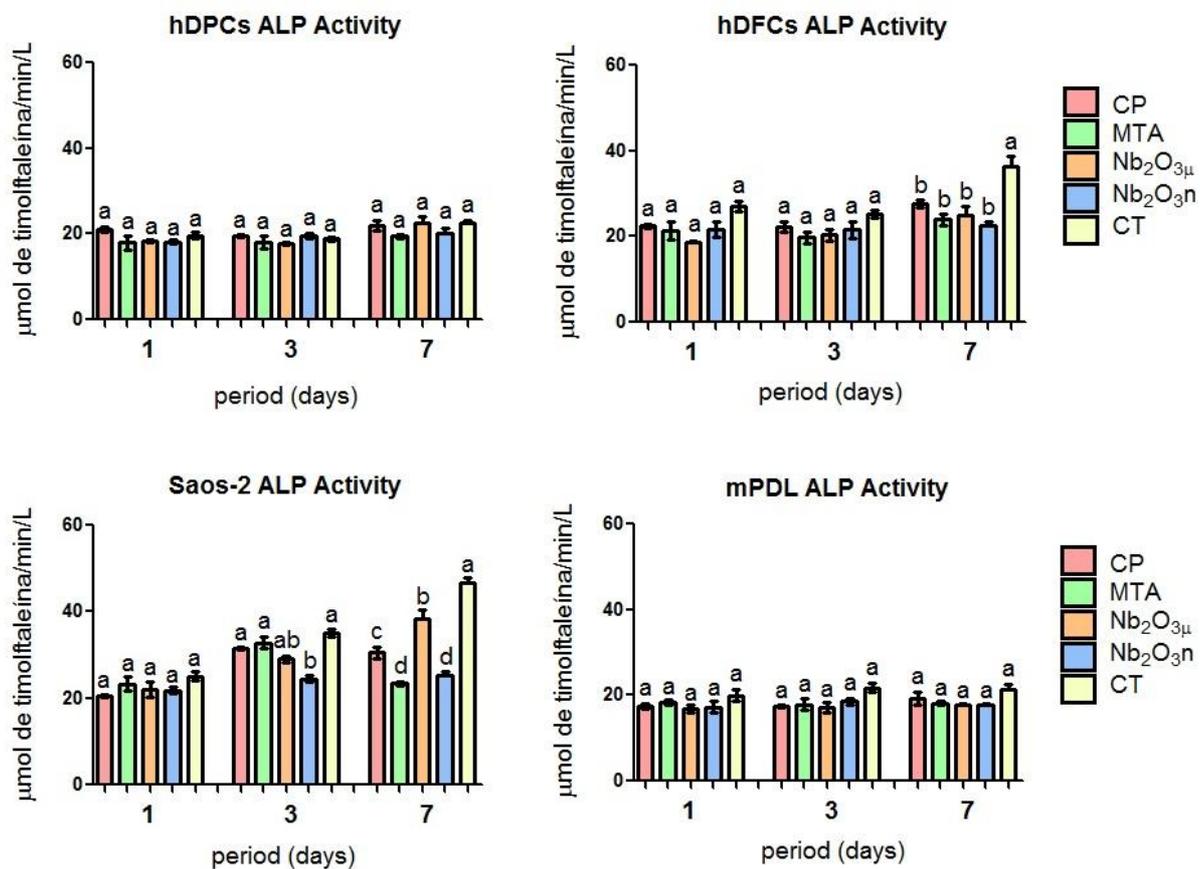


Figura 3) Resultados da avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina nas diferentes linhagens avaliadas. Letras iguais dentro de um mesmo período representam semelhança estatística ($p > 0,05$).



4 DISCUSSÃO

A utilização de células mesenquimais indiferenciadas pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias regenerativas para tratar não somente danos aos tecidos dentais e periodontais, mas também problemas sistêmicos como injúrias neurais e doenças neurodegenerativas⁴⁸. Estas células, presentes na polpa e do folículo dentário humanos despertam grande interesse científico diante do seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares, como células ósseas, cartilaginosas, adiposas, neurais, dentre outros²⁸.

Inúmeros tipos de linhagens celulares estão sendo estudadas, porém estudos que avaliam citotoxicidade e respostas biológicas envolvendo células humanas, como fibroblastos do ligamento periodontal ou osteoblastos humanos, entre outros, permitem aproximar os resultados da realidade clínica, uma vez que estas células estão diretamente envolvidas no processo de reparo¹⁴. Estudos com células mesenquimais provenientes da polpa e folículo dentário são realizados para avaliação de novos biomateriais para uso odontológico³³.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade descritos no Capítulo 2 demonstraram que as linhagens primárias podem ser utilizadas como modelo para ensaios de citotoxicidade, assim como as culturas imortalizadas utilizadas tradicionalmente⁶¹. Além disso, conforme demonstrado no Capítulo 1, as hDPCs apresentam maior capacidade de diferenciação em células com potencial de mineralização, quando comparadas com hDFCs, podendo ser indicadas em ensaios de bioatividade que estimulem a diferenciação óssea³. Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem para avaliação da bioatividade por meio da atividade da ALP, o uso de uma linhagem celular osteoblástica (Saos-2) está mais indicada.

O MTA tem sido considerado o material de escolha para tratamento de perfurações, obturação retrógrada, capeamento direto, além de outras indicações por apresentar excelentes propriedades biológicas e boas propriedades físicas e químicas⁵². A partir da observação de

que o principal componente do MTA é o CP, vários estudos têm demonstrado que as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas destes cimentos são semelhantes^{11,19,36}.

O radiopacificador presente no MTA é o óxido de bismuto, porém estudos recentes têm demonstrado que a associação entre este radiopacificador e o CP interfere de maneira negativa nas boas propriedades do cimento⁸. Visto isso, novos radiopacificadores têm sido avaliados visando formular um novo cimento a base de CP, como o óxido de nióbio, que tem sido bastante utilizado na confecção de implantes endósseos devido às suas boas propriedades mecânicas e biológicas²³.

O nióbio tem sido avaliado na Implantodontia buscando melhorar a liga de titânio convencional utilizadas na fabricação de implantes endósseos. Diversos autores verificaram que além da citocompatibilidade^{26,30}, o nióbio apresenta resistência à corrosão³¹ e propriedade hipoalergênica, sendo utilizado em dispositivos médicos, como o marcapasso²⁷. A sua associação ao CP demonstra potencial para uso alternativo em substituição ao MTA.

Os resultados do Capítulo 2 mostram citocompatibilidade e bioatividade em ambas às associações utilizadas (óxido de nióbio microparticulado e nanoparticulado), destacando-se a formulação contendo as nanopartículas, que demonstrou resultados superiores em determinadas concentrações avaliadas. Ainda, ambos apresentaram resultados de viabilidade celular similares ou superiores ao MTA, indicando que os cimentos de CP associados ao óxido de nióbio apresentam biocompatibilidade e bioatividade *in vitro*.

As metodologias propostas neste estudo são modelos *in vitro*, que apresentam uma alternativa aos experimentos *in vivo*, além de se constituírem ensaios simples, reproduzíveis e com excelente custo-benefício²², sendo indicados para avaliar, em um primeiro momento, as propriedades biológicas dos possíveis cimentos endodônticos propostos no estudo.

Ensaio *in vivo* devem ser realizados após a obtenção de uma resposta favorável nos ensaios *in vitro*, uma vez que estes não podem ser diretamente comparados com ensaios *in*

vivo, nos quais ocorre uma resposta conjunta de todo o organismo envolvido⁴⁶. Entretanto, a avaliação da citotoxicidade de materiais *in vitro* pode nos dar uma visão geral dos efeitos biológicos dos mesmos, sugerindo respostas para condições *in vivo*⁴.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que células primárias da polpa dentária apresentam maior capacidade de diferenciação em células com potencial para formação de tecido mineralizado, quando comparadas com células do folículo dentário. A comparação da resposta destas linhagens primárias com linhagens imortalizadas (Saos-2 e mPDL) demonstra que a citotoxicidade de materiais endodônticos é similar nas diferentes linhagens. Entretanto, para a avaliação da bioatividade o uso de uma linhagem celular específica é indicada, destacando a linhagem osteoblástica (Saos-2). Além disso, evidencia-se que materiais à base de silicato de cálcio associado ao óxido de nióbio micro e nanoparticulados mostram potencial para uso alternativo como radiopacificadores na composição do MTA.

6 REFERÊNCIAS*

1. Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod.* 2004; 30(7): 527-33.
2. American Dental Association. Specification No. 57 for endodontic filling materials. *J Am Dent Assoc.* 1984; 108: 88.
3. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod.* 2014; 40(3): 387-92.
4. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000; 26(8): 462-5.
5. 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(2): 222-7.
6. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009; 42(3): 227-37.
7. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011; 99(1): 1-7.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopaque cement on the material properties of an endodontic Portland cement – based (MTA like) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295-8.
9. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66(2): 129-38.
10. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD. Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 75(1): 18-24.
11. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11(1): 3-9.
12. Furseth R, Selvig KA, Mjor IA. The periodontium. Human oral embryology and histology. Copenhagen: Munksgaard; 1986.
13. Godley R, Starosvetsky D, Gotman I. Bonelike apatite formation on niobium metal treated in aqueous NaOH. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(10): 1073-7.
14. Gomes-Cornélio AL, 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(2): 203-10.
15. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25): 13625-30.
16. Guo W, Gong K, Shi H, Zhu G, He Y, Ding B, Wen L, Jin Y. Dental follicle cells and treated dentin matrix scaffold for tissue engineering the tooth root. *Biomaterials.* 2012; 33(5): 1291-302.

17. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012; 45(3): 240-8.
18. Harrison JW, Jurosky KA. Wound healing in the tissues of the periodontium following periradicular surgery. III. The osseous excisional wound. *J Endod.* 1992; 18(2): 76-81.
19. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Healing process of dog dental pup after pulpotomy and pulp with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12(2): 109-13.
20. Jirka I, Vandrovcová M, Frank O, Tolde Z, Plšek J, Luxbacher T, et al. On the role of Nb-related sites of an oxidized β -TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33(3): 1636-45.
21. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000; 26(5): 288-91.
22. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008; 50(4): 397-402.
23. Kushwaha M, Pan X, Holloway JA, Denry IL. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dent Mater.* 2012; 28(3): 252-60.
24. Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de Canais Radiculares.* 5^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2008.
25. Leonardo MR, Flores DS, de Paula E Silva FW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod.* 2008; 34(7): 822-5.

26. Li Y, Wong C, Xiong J, Hodgson P, Wen C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *J Dent Res.* 2010; 89(5): 493-7.
27. Mallela VS, Ilankumaran V, Rao NS. Trends in cardiac pacemaker batteries. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 2004; 4(4): 201-12.
28. Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrechts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(9): 1969-83.
29. Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endod.* 1989; 15(2): 60-7.
30. McMahon RE, Ma J, Verkhoturov SV, Munoz-Pinto D, Karaman I, Rubitschek F, Maier HJ, Hahn MS. A comparative study of the cytotoxicity and corrosion resistance of nickel-titanium and titanium-niobium shape memory alloys. *Acta Biomater.* 2012; 8(7): 2863-70.
31. Metikos-Huković M, Kwokal A, Piljac J. The influence of niobium and vanadium on passivity of titanium-based implants in physiological solution. *Biomaterials.* 2003; 24(21): 3765-75.
32. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *J Endod.* 2007; 33(2): 163-6.
33. Min KS, Lee SI, Lee Y, Kim EC. Effect of radiopaque Portland cement on mineralization in human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(4): e82-6.
34. Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mfhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24(2): 155-65.

35. Obata A, Takahashi Y, Miyajima T, Ueda K, Narushima T, Kasuga T. Effects of niobium ions released from calcium phosphate invert glasses containing Nb₂O₅ on osteoblast-like cell functions. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012; 4(10): 5684-90.
36. Oliveira MG, Xavier CB De marco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 3-7.
37. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod*. 2011; 37(12): 1691-5.
38. Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(2): 167-73.
39. Provenza DV. Attachment apparatus. *Fundamentals of oral histology and embryology*. Philadelphia: Lea and Febiger; 1988.
40. Schroeder HE. The periodontium. In: Oksche A, Vollrath L. *Handbook of microscopic anatomy*. Berlin: Springer-Verlag; 1986.
41. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am*. 2012; 56(3): 549-61.
42. Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod*. 2013; 39(2): 242-8.
43. Shapira L, Klinger A, Tadir A, Wilensky A, Halabi A. Effect of a niobium-containing titanium alloy on osteoblast behavior in culture. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(6): 578-82.

44. Shilpa PS, Kaul R, Sultana N, Bhat S. Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013; 10(2): 149-54.
45. Sonoyama, W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GTJ. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008; 34(2): 166-71.
46. Spångberg LS. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endod*. 1978; 4(10): 296-9.
47. Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques-Part II: Cell types. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012; 18(4): 258-69.
48. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013; 101(2): 121-32.
49. Tavares CO, Böttcher DE, Assmann E, Kopper PM, de Figueiredo JA, Grecca FS, Scarparo RK. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *J Endod*. 2013; 39(5): 653-7.
50. Telles PD, Machado MA, Sakai VT, Nör JE Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(3): 189-94.
51. Ten Cate AR, Sharpe PT, Roy S, Nanci A. Ten Cate's oral histology. Development, structure, and function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.
52. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010; 36(2): 190-202.
53. Viale-Bouroncle S, Bey B, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C. β -tricalcium-phosphate stimulates the differentiation of dental follicle cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(7): 1719-24.

54. Wise, GE, Lin, F, Fan, W. Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res.* 1992; 267(3): 483-92.
55. Wise, GE, Frazier-Bowers, S, D'Souza, RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(4): 323-34.
56. Woo SM, Hwang YC, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim WJ, Kim SM, Jung JY. Effect of nifedipine on the differentiation of human dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013; 39(6): 801-5.
57. Xiong J, Li Y, Hodgson PD, Wen C. In vitro osteoblast-like cell proliferation on nano-hydroxyapatite coatings with different morphologies on a titanium-niobium shape memory alloy. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95(3): 766-73.
58. Yang B, Chen G, Li J, Zou Q, Xie D, Chen Y, Wang H, et al. Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix - based scaffold. *Biomaterials.* 2012; 33(8): 2449-61.
59. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 111-6.
60. Young F, Sloan A, Song B. Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair. *J Neurosci Res.* 2013; 91(11): 1383-93.
61. Zhan Y, Wang XY, Li SL, Fu X, Yu GY, Cao T, et al. Cytotoxicity of two dental materials on fibroblasts derived from human embryonic stem cells. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2012; 44(1): 1-5.
62. Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(1): 215-20.

63. Zhu Q, Safavi E, Spangberg LS. Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells. *J Endod.* 1999; 25(6): 410-2.
64. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod.* 2000; 26(7): 404-6.
65. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38(9): 1233-8.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 24/03/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

Araraquara, 24 de Março de 2014.