



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



MARIA LUISA DE ALENCAR E SILVA LEITE

BIOESTIMULAÇÃO TRANSDENTINÁRIA DE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES
ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE SINVASTATINA PREVIAMENTE AO USO DO
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Araraquara

2017



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



MARIA LUISA DE ALENCAR E SILVA LEITE

BIOESTIMULAÇÃO TRANSDENTINÁRIA DE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES
ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE SINVASTATINA PREVIAMENTE AO USO DO
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Diana Gabriela de Sousa Soares

Araraquara

2017

Leite, Maria Luísa de Alencar e Silva

Bioestimulação transdentinária de células odontoblastóides através da aplicação de sinvastatina previamente ao uso do cimento de ionômero de vidro / Maria Luísa de Alencar e Silva Leite.-- Araraquara: [s.n.], 2017

83 f.; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Diana Gabriela de Sousa Soares

1. Cimento de ionômero de vidro 2. Polpa dentária
3. Sinvastatina I. Título

MARIA LUÍSA DE ALENCAR E SILVA LEITE

**BIOESTIMULAÇÃO TRANSDENTINÁRIA DE CÉLULAS
ODONTOBLASTÓIDES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE
SINVASTATINA PREVIAMENTE AO USO DO CIMENTO DE
IONÔMERO DE VIDRO**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof^o Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2^o Examinador: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

3^o Examinador: Prof^a Dr^a Linda Wang

Araraquara, 23 de Fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES

MARIA LUÍSA DE ALENCAR E SILVA LEITE

NASCIMENTO: 24/12/1991 – João Pessoa – Paraíba

FILIAÇÃO: Antônio Wellington de Alencar Leite
Carmen Lúcia de Lucena e Silva Leite

2010-2015 Graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba

2015-2016 Estágio de Docência em Prótese Parcial Removível pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho inteiramente a Deus, que em todos os momentos esteve olhando por mim e me dando forças para seguir e perseverar continuamente. E de modo especial, agradeço a Ele por tornar essa caminhada mais fácil e prazerosa, colocando pessoas maravilhosas ao meu redor.

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** por confiar e abrir as portas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais desde o período da minha graduação e por aceitar me orientar como aluna de Mestrado. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos e por estar presente nos bons e maus momentos durante essa jornada. Agradeço de coração pelo cuidado que tem por cada uma de nós, suas orientadas.

À **Prof^a. Dr^a. Diana Gabriela de Sousa Soares** por ser mais que uma co-orientadora, uma amiga e, porque não, uma irmã mais “velha”. Obrigada por desde o princípio estar me guiando para a trajetória acadêmica e por se fazer exemplo como pessoa e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos, por permitir meu crescimento acadêmico e por estar caminhando comigo nessa jornada.

À **Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling** pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento do meu projeto de Mestrado, mostrando-se sempre muita solícita e atenciosa durante todas as etapas de execução da pesquisa. Muito obrigada, professora!

À **Prof^a. Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio** pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento da pesquisa, as quais foram essenciais para o pleno desenvolvimento desse projeto.

À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso** por estar presente no meu primeiro ano de Mestrado me ajudando no que fosse preciso para elaboração do projeto e na aprendizagem das metodologias laboratoriais, bem como, mostrando-se sempre muito solícita durante todo esse período.

Aos meus pais, **Antônio Wellington e Carmen Lúcia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas a mim e a meus irmãos, abrindo mão do que fosse preciso para permitir nosso crescimento profissional. Obrigada por serem meus melhores exemplos como seres-humanos, por me mostrar que a vida, em

todos os seus aspectos, requer muita dedicação, perseverança, humildade, amor e sem dúvida, Deus no centro de todas as coisas. Todas as etapas vencidas também são méritos vossos, meus pais! Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Pedro Henrique e Ana Cecília**, pelo cuidado, amor e apoio constante a mim! Obrigada por serem meus melhores amigos! Amo vocês!

Ao meu namorado, **Leonardo**, por todo o apoio durante esses anos juntos, torcendo sempre a cada etapa conquistada e por sonhar junto a mim todas as fases da vida que ainda estão por vir. Obrigada por tornar meus dias mais leves e por me fazer querer ser alguém melhor a cada dia! Te amo!!

Aos meus sogros, **Nicola e Cristina**, por também se tornarem a minha família. Obrigada por tudo que vocês têm feito por mim e pelo carinho imenso transmitido! Agradeço a Deus por tê-los nessa caminhada de vida!! Amo vocês!

Às amigas, **Carla, Ester, Giovana, Suelen, Thaísa e Uxua** por todos os momentos vividos, pelas conversas e pela ajuda em algum momento no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela convivência e por todo aprendizado neste período.

Às alunas de Iniciação Científica **Caroline e Gabriela**, com quem tive a oportunidade de trabalhar junto, auxiliando em seus projetos. Meninas, muito obrigada pela convivência e pelo crescimento proporcionado.

Aos **colegas de Mestrado em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP, por tornarem esse curso de Mestrado mais leve e mais prazeroso diante de uma turma tão boa quanto a nossa! Obrigada pelo apoio e torcida em cada uma de nossas etapas!

Aos **familiares e amigos** pelas torcidas e orações prestadas a mim! Obrigada por fazerem parte da minha vida e todos os momentos compartilhados durante todos esses anos!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)**, representada pela atual Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e o Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos, foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal no período de Pós-Graduação.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr-UNESP**, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde a maior parte desta pesquisa foi realizada.

Ao **Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Infantil da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, onde uma parte deste projeto desenvolvido.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio, onde uma parte esta pesquisa foi realizada.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**. A todos os professores e funcionários, agradeço pela disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo. Muito obrigada por tudo!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**, representado pela Coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina e a Vice-Coordenadora Prof^a. Dr^a. Renata Garcia Fonseca, por toda acessibilidade durante este período.

Aos professores da **Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Fisiologia e Patologia**, por terem aberto as portas dentro do Departamento e pelos

inúmeros ensinamentos que recebi, em especial ao **Prof. Carlos Alberto de Souza Costa**, o qual acompanhei na maior parte das atividades desenvolvidas nos estágios realizados nesta Disciplina e me deu a oportunidade de ministrar uma de suas aulas à graduação, permitindo minha primeira experiência docente numa das maiores instituições do país. Muito obrigada, professor!

Aos professores da **Disciplina de Prótese Parcial Removível do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da FOAr-UNESP**, por terem aberto as portas da Pós-Graduação e me passado inúmeros ensinamentos, em especial ao **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, o qual acompanhei na maior parte das atividades desenvolvidas nos estágios realizados nesta Disciplina.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pela Bolsa de Mestrado concedida no período de março/2015 a setembro/2015 (processo: 131183/2015-0).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela Bolsa de Mestrado concedida no período de outubro/2015 a fevereiro/2017 (processo: 2015/15635-7).

Leite MLAS. Bioestimulação transdentínária de células odontoblastóides através da aplicação de sinvastatina previamente ao uso do cimento de ionômero de vidro [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O objetivo geral da presente pesquisa foi avaliar se o pré-tratamento da dentina com sinvastatina (SV) antes de aplicar o cimento de inômero de vidro (CIV) permitiria a difusão transdentínária desta droga em concentrações capazes de promover aumento da capacidade de células odontoblastóides em depositar e mineralizar matriz de dentina. No Estudo 1, foram determinadas concentrações de sinvastatina que fossem bioativas e citocompatíveis quando em contato com células odontoblastóides MDPC-23. Duas concentrações (0,01 e 0,1 μM) e três tempos de tratamento (24 h, 72 h e contínuo – até 14 dias) foram avaliados. No Estudo 2, diante da confirmação da hipótese da difusão transdentínária da SV por análise em cromatografia líquida em espectro de massa (LC-MS/MS), concentrações de 2,5 e 1,0 mg/mL foram selecionadas para avaliação do efeito bioativo transdentínario sobre células odontoblastóides MDPC-23 após pré-tratamento ou não da superfície dentínaria com EDTA. Também nesse estudo foi avaliada a ação antimicrobiana (teste de disco-difusão) das concentrações de 2,5 e 1,0 mg/ml de SV sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. No Estudo 3, a concentração que apresentou os melhores resultados no estudo anterior foi selecionada para avaliação do efeito bioativo transdentínario sobre células MDPC-23 associado ao protocolo de forramento cavitário com Ketac Molar (3M ESPE). Nos estudos que avaliaram o efeito bioativo da SV foram analisados os seguintes parâmetros celulares: viabilidade celular (MTT), atividade de ALP (timolftaleína monofosfato) e deposição de matriz mineralizada (alizarin red) (n = 6). A concentração de 2,5 mg/ml de SV também foi selecionada para avaliação da resistência de união ao microcisalhamento do CIV Ketac Molar à dentina, aplicando-a sobre a dentina pré-tratada ou não com EDTA. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey (p < 0,05). Os resultados do Estudo 1 demonstraram que baixas concentrações de SV em curto período de tratamento apresentaram efeito bioativo e citocompatível sobre células odontoblastóides MDPC-23. Em sequência, os estudos transdentínarios demonstraram aumento na atividade de ALP e na deposição de

matriz mineralizada quando a dentina foi tratada com SV; no entanto, apenas a SV 2,5 mg/mL, associada ou não ao EDTA, resultou em valores significativamente superiores ao controle negativo, para ambos os parâmetros testados. Desta forma, a concentração de 2,5 mg/mL de SV foi selecionada para realização dos experimentos subsequentes, onde foi possível observar que o forramento da dentina com CIV, realizado após tratamento do substrato com EDTA e SV apresentou a melhor resposta quanto a expressão dos marcadores fenotípicos testados. De modo complementar, observou-se ação antimicrobiana da SV nas concentrações testadas contra as linhagens avaliadas e que o pré-tratamento da dentina com EDTA previamente a aplicação da SV resultou em valores de resistência de união significativamente superiores comparado ao tratamento isolado com SV. Assim, conclui-se que o tratamento da dentina com SV previamente ao forramento do substrato com CIV é capaz de aumentar a capacidade de células odontoblastóides em depositar matriz mineralizada rica em cálcio.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro. Polpa dentária. Sinvastatina.

Leite MLAS. Transdental biostimulation of odontoblast-like cells after applying simvastatin followed by glass-ionomer cement [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine whether the treatment of dentin with simvastatin (SV) before application of glass-ionomer cement (GIC), allows transdental diffusion of this drug at bioactive concentration capable of increasing the potential of odontoblast-like cells to deposit and mineralize dentin matrix. In the 1st study, the dose-response and time-course of SV were determined for the odontoblast-like MDPC-23 cells. Two concentrations (0.01 and 0.1 μ M) of SV and three treatment times (24 h, 72 h and continuous – up to 14 days) were evaluated. In the 2nd study, the SV transdental diffusion hypothesis was confirmed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS / MS). Then, concentrations of 2.5 and 1.0 mg/ml were selected to evaluate the transdental bioactivity of this drug with MDPC-23 cells, when dentin was treated or not with EDTA. Also in this study the antimicrobial activity (disc diffusion assay) of 2.5 and 1.0 mg/ml SV against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* was evaluated. In the 3rd study, the 2.5 mg/mL SV was selected to analyze the bioactivity of dentin treatment with SV followed by lining with Ketac Molar (3M ESPE). In all the studies, the following cell parameters were analyzed: cell viability (MTT), ALP activity (thymolphthalein monophosphate) and mineralized matrix deposition (alizarin red) (n=6). The concentration of 2.5 mg/ml SV was selected to evaluate dentin microshear-bond strength of GIC Ketac Molar when applied on dentin conditioned or not with EDTA. Data were submitted to ANOVA and Tukey test's ($p < 0.05$). The results of the 1st study demonstrated that exposing MDPC-23 to low concentrations of SV during short periods of time resulted in a bioactive effect associated with no toxicity to cultured cells. In the transdental study, it was detected an increase on ALP activity and mineralized matrix deposition when dentin was treated with SV; however, only SV 2.5 mg/ml, associated or not to EDTA, resulted in values significantly higher than negative control for both cell parameters. Finally, it was observed that lining dentin with GIC associated with pre-treatment with EDTA and SV 2.5 mg/ml resulted in the best cell responses regarding the expression of odontoblastic phenotypic markers. In

addition, SV featured antimicrobial activity at both tested concentrations against the bacterial strains evaluated. Finally, pre-treatment of dentin with EDTA + SV resulted in significantly higher bond strength values compared to SV treatment. Therefore, based upon the methodology employed in the present in vitro, it was possible to conclude that the treatment of dentin substrate with a specific concentration of simvastatin before application of glass-ionomer cement enhances the capability of odontoblast-like cells to deposit calcium-rich mineralized matrix.

Key-words: Glass-ionomer cement. Dental pulp. Simvastatin.

Lista de abreviaturas e siglas

ALP – Fosfatase alcalina

Al - Alumínio

ATM – Pressão atmosférica

BHI – Brain Heart Infusion

BMP-2 – Bone morphogenetic protein-2

Ca - Cálcio

CBF α 1 – Core binding factor alpha 1

CHX – Clorexidina

CIV – Cimento de ionômero de vidro

CN – Controle negativo

CO - Monóxido de carbono

Cont – Contínuo

CP – Controle positivo

CPA - Câmara pulpar artificial

CPI – Capeamento pulpar indireto

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMP1 – Dentin matrix protein 1

DSP - Dentin sialoprotein

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERD - Espessura do remanescente dentinário

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

F - Flúor

HDPCs – Human dental pulp cells

hDSPCs - Human dental stem pulp cells

HMG-CoA - Hidroximetilglutaril-coenzima A redutase

HO-1 - Hemi oxigenase-1

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas

MDPC-23 – Mouse derived pulp cells

MTA - Agregado trióxido mineral

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

OCN – Osteocalcin

OPN - Osteopontin
OPG – Osteoprotegerin
Osx - Osterix
PBS - Tampão fosfato-salino
PVC – Policloreto de polivinila
RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Runx2 - Runt-related transcription factor 2
SFB - Soro fetal bovino
SV – Sinvastatina
TGF β - Transforming growth factor β
UFC – Unidades formadoras de colônia
Zn - Zinco
gf – Grama-força
h – Hora
L - Litro
 μ L- Microlitro
 μ M – Micromolar
mM – Milimolar
ml – Mililitro
mg – Miligrama
mm – Milímetro
mmol - Milimol
MPa – Megapascal
nm – Nanômetro
N – Normal
rpm – Rotações por minuto
% - Porcentagem
°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	24
3.1 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODO	25
4.1 Estudo 1: Determinação da concentração e tempo de tratamento bioativos e citocompatíveis de sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23	25
4.2 Estudo 2: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina.....	28
4.3 Estudo 3: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro	39
4.4 Análise estatística	45
5 RESULTADO	46
5.1 Estudo 1: Determinação da concentração e tempo de tratamento bioativos e citocompatíveis de sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23	46
5.2 Estudo 2: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina.....	51
5.3 Estudo 3: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro	59
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia Restauradora Contemporânea tem como objetivo básico o re-estabelecimento da função e estética ao elemento dental, associado à manutenção da saúde e homeostasia do complexo dentino-pulpar (Cooper et al.¹², 2010). Nesta situação específica, a restauração de cavidades muito profundas ainda representa um desafio, sendo o uso de materiais dentários forradores biocompatíveis considerado primordial para manutenção da vitalidade do elemento dental (de Souza Costa et al.^{18,20}, 2002, 2007). No entanto, o material dentário ideal para proceder o forramento de cavidades profundas deve apresentar, além de biocompatibilidade, um conjunto de propriedades capazes de garantir o sucesso clínico a longo prazo, tais como atividade antimicrobiana, adequada resistência mecânica, baixa solubilidade, ser isolante térmico e elétrico, promover o selamento da dentina, apresentar adesão às estruturas dentária e co-polimerização com o material restaurador (de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Hebling et al.³¹, 2010; Hilton³², 2002).

Na atualidade, os conhecimentos de biologia pulpar associados aos conceitos modernos e notável evolução nos campos da engenharia tecidual e biotecnologia, tornaram-se imprescindíveis para que o material a ser aplicado sobre dentina de cavidades profundas também apresente potencial bioativo, estimulando o processo de regeneração/reparação do tecido pulpar (Wataha⁷⁸, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de biomateriais forradores capazes de interagir com a dentina e atuar positivamente na manutenção da vitalidade da polpa, através da modulação de suas células específicas, tem sido a proposta de inúmeras pesquisas nos últimos anos (Ferracane et al.²⁶, 2010).

Os materiais dentários empregados atualmente para forramento de cavidades profundas não apresentam todas as propriedades ideais requeridas para tal procedimento, particularmente quanto a bioatividade em relação às células pulpares (Ferracane et al.²⁶, 2010). Os cimentos de hidróxido de cálcio têm sido descritos por alguns pesquisadores como indutores do processo de esclerose dentinária e deposição de dentina reacional pelos odontoblastos, sendo este efeito atribuído à sua alcalinidade, a qual promove a dissolução de proteínas bioativas da dentina, com conseqüente bioestimulação dos odontoblastos (Sangwan et al.⁶⁰, 2013; Simon et al.⁶⁵, 2011). Entretanto, estudos histopatológicos realizados em dentes humanos

demonstram que a aplicação de cimento de hidróxido de cálcio em cavidades com espessura de remanescente dentinário inferior a 0,5 mm não estimulou a deposição de dentina terciária após 30 e 85 dias da sua aplicação (Costa et al.^{14,15}, 2003, 2011; de Souza Costa et al.^{18,20}, 2002, 2007). Além disso, os cimentos de hidróxido de cálcio não aderem às estruturas dentárias, apresentam baixa resistência mecânica e elevada solubilidade, o que faz com que estes materiais sejam dissolvidos ao longo do tempo, tornando o substrato dentinário propenso à re-colonização bacteriana e consequente recidiva de cárie (Schuurs et al.⁶³, 2000).

Diante das características negativas dos cimentos de hidróxido de cálcio, os cimentos de ionômero de vidro, modificados ou não por resina, têm sido recomendados como materiais forradores/bases cavitárias, principalmente devido às melhores propriedades mecânicas e menores índices de solubilidade. Ainda, os CIVs apresentam módulo de elasticidade semelhante à dentina, atividade antimicrobiana, liberação de flúor, adesão ao substrato dentinário (Hilton³³, 2009; Mitra et al.⁴⁸, 2009; Xie et al.⁸⁰, 2010) e biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar (Costa et al.¹³⁻¹⁵, 2003; 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Six et al.⁶⁶, 2000). No entanto, estes cimentos ionoméricos não apresentaram bioatividade mesmo após longos períodos em contato com dentina profunda (Costa et al.¹³⁻¹⁵, 2003; 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Six et al.⁶⁶, 2000). Dentro deste contexto, o desenvolvimento de novos biomateriais ou o aprimoramento dos materiais dentários atualmente disponíveis no mercado, visando conferir bioatividade com o complexo dentino-pulpar, seria de grande interesse, particularmente para situações clínicas onde há exposição de dentina muito próxima ao tecido pulpar (Ferracane et al.²⁶, 2010; de Souza Costa et al.²¹, 2014).

Alguns pesquisadores têm sugerido o uso de substâncias bioativas como potenciais coadjuvantes para o procedimento clínico de forramento de cavidades profundas (Min et al.⁴⁷, 2010; Okamoto et al.⁵⁴, 2009). Dentre as substâncias estudadas, a sinvastatina, droga vastamente empregada no tratamento de hipercolesterolemia, tem emergido como um potente bioestimulador do processo de deposição e mineralização de matriz rica em colágeno (Karaxha et al.³⁸, 2013; Min et al.⁴⁷, 2010; Okamoto et al.⁵⁴, 2009; Tanigo et al.⁷², 2010; Wadagaki et al.⁷⁷, 2011). Desta forma, o objetivo geral do presente estudo foi associar o protocolo de forramento cavitário com CIV ao pré-tratamento da superfície dentinária com sinvastatina, visando a difusão transdentinária desta droga em concentrações

capazes de promover aumento da capacidade de células pulpares em depositar e mineralizar matriz dentinária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A sinvastatina pertence ao grupo das estatinas, as quais são conhecidas como inibidores da hidroximetilglutaril-coenzima A redutase, possui a capacidade de inibir a transformação da HMG-CoA redutase em ácido mevalônico, precursor do colesterol. Assim, apresentam-se como a primeira linha de drogas para o tratamento de hiperlidemia. Por se tratar de uma droga segura e de custo relativamente baixo, esta tem sido amplamente usada para tais fins (Liao, Laufs⁴⁴, 2005; Maeda et al.⁴⁶, 2001). Concomitante a isso, diversos efeitos pleiotrópicos têm sido observados com o uso dessa substância, incluindo ação anti-inflamatória (Kwak et al.⁴², 2000; Sakoda et al.⁵⁹, 2006), indução de angiogênese e melhoria da função celular do endotélio vascular (Min et al.⁴⁷, 2010; Nishimoto-Hazuku et al.⁵², 2008; Van Nieuw Amerongen et al.⁷⁴, 2000; Xu et al.⁸¹, 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que o contato direto da sinvastatina com células ósseas e suas precursoras, promove aumento significativo na expressão de marcadores fenotípicos de osteoblastos, bem como aumento na deposição de matriz mineralizada (Tanigo et al.⁷², 2010; Wadagaki et al.⁷⁷, 2011). O mecanismo de ação está envolvido com a melhora das características fenotípicas dos osteoblastos pelo aumento na expressão de BMP-2 e CBF α 1; e antagonicamente, pela diminuição da proliferação e diferenciação de osteoclastos ao suprimir a expressão de RANKL (Ayukawa et al.², 2009; Dai et al.¹⁷, 2014).

Alguns pesquisadores relataram que células tronco pulparem tratadas com sinvastatina apresentaram aumento significativo na diferenciação odontogênica e na deposição de matriz mineralizada (Karaxha et al.³⁸, 2013; Min et al.⁴⁷, 2010; Okamoto et al.⁵⁴, 2009). O mecanismo de ação da sinvastatina na diferenciação odontoblástica não é completamente conhecido; porém, já foi demonstrado que este fenômeno está relacionado com a ativação da via de sinalização MAPK/ERK, mecanismo similar ao observado para diferenciação odontoblástica via fatores de crescimento como TGF- β e BMP-2 (Karaxha et al.³⁸, 2013). A via ERK é um mediador essencial na proliferação e diferenciação celular, em células ósseas (Chen et al.¹¹, 2010), células do ligamento periodontal (Kin et al.³⁹, 2011) e células pulparem (Karaxha et al.³⁸, 2013).

Okamoto et al.⁵⁴ (2009) demonstraram que a sinvastatina acelerou (in vitro) a diferenciação odontogênica de células-tronco da polpa dental humana levando a formação de tecido mineralizado in vivo. Min et al.⁴⁷ (2010) sugeriram que o aumento da formação de matriz mineralizada in vitro associada à sinvastatina esteve relacionado aos seus efeitos sobre a diferenciação odontogênica de células pulpares humanas, sendo que esta substância atuou na indução da angiogênese através de um mecanismo que envolve a ação da HO-1 e seu produto CO. Foi observado também que quando associada ao MTA contendo óxido de bismuto, a sinvastatina aumentou a proliferação e a diferenciação de células HDPCs, bem como a deposição de nódulos de mineralização, sendo sugerido como um interessante material para uso no capeamento pulpar direto (Lee et al.⁴³, 2012). No estudo realizado por Varalakshmi et al.⁷⁵. (2013), a adição de sinvastatina em cimento de α -tricálcio fosfato promoveu, em células pulpares em cultura, aumento da atividade de ALP e da expressão gênica de marcadores da diferenciação odontoblástica. Hidrogéis biodegradáveis associado à sinvastatina quando mantidos em contato com células hDSPCs in vitro também resultaram em aumento na atividade de ALP, deposição de cálcio e a expressão de BMP-2. Ainda, quando implantados em região subcutânea de ratos, estes biomateriais aumentaram a expressão de sialoproteína dentinária e a deposição de matriz mineralizada (Miyazawa et al.⁴⁹, 2015).

O efeito do contato direto da sinvastatina com o tecido pulpar foi avaliado em estudo histopatológico (Asl Aminabadi et al.¹, 2013). Três concentrações de sinvastatina (1, 5 e 10 μ M) misturadas em um pó de carboximetilcelulose de sódio (material inerte), foram aplicadas sobre o tecido pulpar de dentes decíduos humanos, sendo a reação inflamatória e a deposição de tecido mineralizado comparados com aqueles observados em dentes submetidos ao capeamento pulpar com pó de hidróxido de cálcio. As menores concentrações de sinvastatina induziram maior deposição de matriz dentinária e causaram menor inflamação ao tecido pulpar. Todavia, reparação com limitada inflamação e notável formação de tecido dentinário ocorreu em uma taxa mais baixa quando a sinvastatina foi usada, comparado ao hidróxido de cálcio (Asl Aminabadi et al.¹, 2013). Jia et al.³⁷. (2016) também demonstraram aumento da mineralização in vivo quando a sinvastatina (1 μ M) foi aplicada em dentes de cães submetidos à pulpotomia, atuando de modo positivo no reparo pulpar. Entretanto, esta concentração suprimiu a proliferação de células hDSPCs in vitro. Desta forma, foi possível observar que a sinvastatina tem

sido capaz de estimular a deposição de dentina terciária in vivo; no entanto, este efeito foi associado à reação inflamatória no tecido pulpar e à redução da proliferação celular, que podem estar relacionadas a uma liberação rápida de elevadas concentrações desta substância.

Assim, a liberação gradual de baixas concentrações de sinvastatina parece ser desejável. Estudos recentes avaliaram a inclusão desta substância bioativa em materiais para regeneração óssea, com o objetivo promover a liberação gradual da mesma e acelerar o reparo ósseo. Quando a sinvastatina foi adicionada em scaffolds compostos por polímeros sintéticos ou hidrogéis de gelatina, ocorreu liberação lenta e gradual de SV associado ao aumento na diferenciação de osteoblastos e mineralização extracelular in vitro, sendo observado ainda formação de tecido ósseo em sítios ectópicos in vivo (Pullisaar et al.^{56,57}, 2013, 2014; Tanigo et al.⁷², 2010; Wadagaki et al.⁷⁷, 2011). A adição da sinvastatina em materiais a base de sulfato de cálcio também foi capaz de promover a diferenciação osteogênica de células mesenquimais provenientes da medula óssea, bem como de estimular a regeneração em defeitos ósseos criados em calvária de ratos (Huang et al.³⁴, 2014; Mundy et al.⁵⁰, 1999; Nyan et al.⁵³, 2007). Estudos in vitro também demonstraram que a diferenciação odontogênica é mais pronunciada quando baixas concentrações de sinvastatina (0,01 a 0,1 μM) são empregadas, enquanto que elevadas concentrações (1 a 10 μM) causam efeitos citotóxicos (Karannya et al.³⁸, 2013; Min et al.⁴⁷, 2010; Okamoto et al.⁵⁴, 2009; Saewong et al.⁵⁸, 2013).

Apesar de existir na literatura estudos demonstrando a ação bioestimuladora da sinvastatina como coadjuvante no processo de reparo do tecido pulpar, não há estudos abordando a sua aplicação no capeamento pulpar indireto. Esse interesse é dado em virtude dos materiais dentários empregados atualmente para forramento de cavidades profundas não apresentarem todas as propriedades ideais requeridas para tal procedimento, particularmente quanto a bioatividade sobre células pulpares (Ferracane et al.²⁶, 2010). Em casos de cavidades muito profundas, o procedimento de capeamento pulpar indireto (CPI) tem como objetivo induzir a deposição, de forma rápida e efetiva, de dentina reacional na base da parede pulpar da cavidade, reduzindo assim o risco de agentes tóxicos provenientes de materiais restauradores e/ou microrganismos alcançarem a polpa via transdentinária (Ferracane et al.²⁶, 2010; de Souza Costa et al.²¹, 2014). Dessa forma, a utilização da sinvastatina como coadjuvante à técnica de forramento cavitário poderia permitir o retorno da polpa à

sua condição de homeostasia e conseqüentemente manter a preservação da vitalidade pulpar.

Dentre os materiais dentários atualmente disponíveis no mercado odontológico, os CIVs parecem ser os mais vantajosos como forradores cavitários por já apresentarem diversas propriedades ideais requeridas para tal procedimento. Biocompatibilidade com o tecido pulpar de dentes humanos foi demonstrada em estudos histopatológicos quando CIV modificado por resina foi aplicado em cavidades com espessura do remanescente dentinário (ERD) entre 0,2 e 0,5 mm. (Costa et al.¹³⁻¹⁵, 2003, 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007). Com relação ao CIV convencional, foi demonstrada biocompatibilidade em polpa de ratos quando o mesmo foi aplicado em cavidades com similar ERD (Six et al.⁶⁶, 2000). Somado a isso, a adesão química à estrutura dental, formada através de ligações iônicas entre os grupos carboxílicos presentes no CIV e os íons Ca^{2+} presentes no substrato dentário (Sidhu, Nicholson⁶⁴, 2016; Tyas⁷³, 2006), tem demonstrando melhorar a longevidade das restaurações quando comparado a outros agentes forradores (Foley et al.²⁷, 2004; Taifour et al.⁷¹, 2002). Ainda, a liberação de flúor e a inibição de microrganismos acidogênicos pelos CIVs parecem favorecer a remineralização dental e diminuir a ocorrência de cárie secundária (Foley et al.²⁷, 2004; Sidhu, Nicholson⁶⁴, 2016).

Dessa forma, surge a hipótese de que o tratamento da dentina profunda com sinvastatina previamente a aplicação do CIV poderia bioestimular os odontoblastos a depositar dentina reacional na base da parede pulpar, protegendo a polpa de agressões futuras e preservando a homeostasia do complexo dentino-pulpar. Entretanto, para que se estabeleça uma formulação adequada da sinvastatina para uso no CPI como agente indutor da dentinogênese reacional, é necessário que esta droga se difunda via transdentinária em uma concentração com adequada bioatividade. Assim, o estabelecimento dessa nova terapia trará grandes benefícios para a Odontologia Conservadora Contemporânea, especialmente em situações de cavidades muito profundas.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo geral avaliar o possível efeito bioativo transdentinário da sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura.

3.1 Objetivos específicos

Estudo 1 - Determinação da concentração de sinvastatina e do tempo de tratamento capaz de tornar esta substância não tóxica e ao mesmo tempo bioativa para as células odontoblastóides MDPC-23

1. Determinar a concentração de sinvastatina que apresente bioatividade para as células odontoblastóides MDPC-23, bem como o tempo de contato desta substância que não cause toxicidade para esta mesma linhagem celular.

Estudo 2 - Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina

1. Avaliar a difusão transdentinária da sinvastatina;
2. Determinar o efeito bioativo transdentinário da sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura;
3. Analisar a ação antimicrobiana da sinvastatina sobre microrganismos envolvidos no desenvolvimento e evolução da doença cárie.

Estudo 3 - Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro

1. Determinar o efeito bioativo transdentinário da sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23 quando da aplicação desta substância sobre a dentina, previamente ao uso do cimento de ionômero de vidro;
2. Avaliar a resistência de união do cimento de ionômero de vidro à dentina quando do pré-tratamento do substrato dentinário com sinvastatina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo 1: Determinação da concentração de sinvastatina e do tempo de tratamento capaz de tornar esta substância não tóxica e ao mesmo tempo bioativa para as células odontoblastóides MDPC-23

4.1.1 Cultura celular

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram subcultivadas a cada três dias na densidade de 3 x 10⁴ células/cm².

4.1.2 Procedimento experimental

Células MDPC-23 foram semeadas em placas de 96 compartimentos (T0) em DMEM com 10% de SFB, na densidade de 2.500 células/compartimento durante 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após este período, as células foram submetidas a diferentes tratamentos (T1), de acordo com os grupos experimentais demonstrados na Tabela 1. Dessa maneira, as células foram incubadas em meio de cultura DMEM com 10% de SFB, suplementado ou não com sinvastatina, por períodos de até 14 dias.

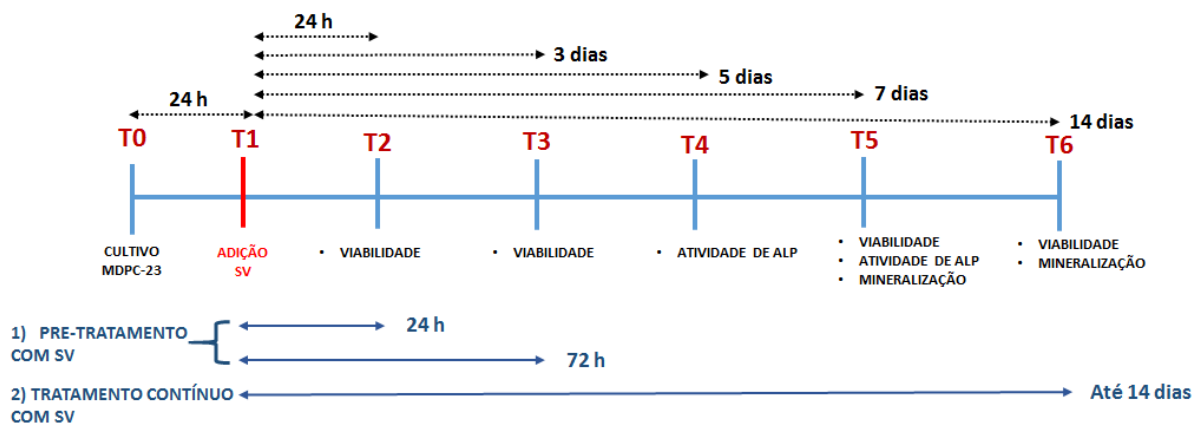
Tabela 1 - Grupos experimentais de acordo com a concentração de sinvastatina (SV) e período de tratamento.

Grupos	Concentração de SV	Período de tratamento
Controle negativo (CN)	-	Contínuo
SV 0,01 – 24h	0,01 µM	24 horas
SV 0,01 – 72h	0,01 µM	72 horas
SV 0,01 - Cont	0,01 µM	Contínuo
SV 0,1 – 24h	0,10 µM	24 horas
SV 0,1 – 72h	0,10 µM	72 horas
SV 0,1 - Cont	0,10 µM	Contínuo

Fonte: Elaboração própria.

Nos grupos com tratamento de sinvastatina por 24 horas e 72 horas, decorrido este período de contato, as células foram cultivadas em meio de cultura sem adição da droga até completar os períodos de análise. Nos grupos com tratamento contínuo de sinvastatina, as células foram cultivadas em meio de cultura com adição da droga durante todo o período experimental. O grupo controle negativo foi mantido em meio de cultura DMEM completo. O delineamento experimental está demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental.



Fonte: Elaboração própria.

4.1.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT (n=6) após 1, 3, 7 e 14 dias (T2, T3, T5, T6). Em cada período de análise, as células foram incubadas por 4

horas em DMEM suplementado com 10% da solução de MTT (5 mg/ml; Sigma Chemical Co). Após este período, o meio foi sugado e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em 200 µL de solução de isopropanol acidificado, sendo a absorbância mensurada a 570 nm. O valor médio de absorbância do grupo controle negativo no período de 1 dia foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo os valores em porcentagem dos demais grupos calculados a partir deste parâmetro.

4.1.4 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada pelo teste de timolftaleína monofosfato (n = 6) nos períodos de 5 e 7 dias (T4, T5), por meio do protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A cada período de análise, uma solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) foi aplicada sobre as células a fim de promover a lise celular. Para a quantificação da dosagem de ALP, uma alíquota da reação de lise foi transferida para tubos contendo timolftaleína monofosfato (22 mmol/L) a 37°C. Em seguida, um reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L) foi adicionado, sendo a absorbância mensurada a 590 nm. Para a normalização da ALP, foi realizada a quantificação da dosagem de proteína total. Assim, outra alíquota da reação de lise foi transferida para tubos contendo Solução de Reagente de Lowry (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA), a qual ficou em contato por 20 minutos a 25 °C. Em seguida, solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) foi adicionada, permanecendo em contato por 30 minutos, sendo então, a absorbância mensurada a 655 nm. A dosagem de ALP e proteína total foram obtidas a partir de uma curva padrão, e o valor da atividade de ALP foi calculada a partir da divisão dos valores da dosagem da ALP pelo da proteína total. Estes valores foram transformados em porcentagem, considerando-se o grupo CN no período de 5 dias como 100% de atividade de ALP.

4.1.5 Avaliação da deposição de matriz mineralizada

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada pelo teste de Alizarin Red (n = 6) aos 7 e 14 dias (T5, T6). A cada período de análise, as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C por 1 hora, seguido de lavagem com água deionizada, e incubação com solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4,2; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) por 15 minutos sob agitação. Após este período, as células foram lavadas com água deionizada, e a formação dos nódulos foi avaliada por microscópio de luz (Olympus BX51TF, Tóquio, Japão). Imagens da formação de nódulos de mineralização foram obtidas em um aumento de 4x. Em seguida, foi aplicada a solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) por 15 minutos para dissolução dos nódulos, sendo a absorvância da solução resultante avaliada a 560 nm. Para esta análise, o grupo CN aos 7 dias foi considerado como 100% de marcação.

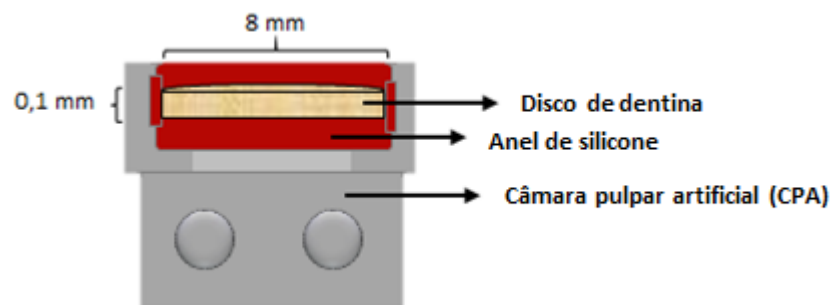
4.2 Estudo 2: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina

4.2.1 Obtenção dos discos de dentina

Após o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (ANEXO A; Nº do Processo: 51908415.3.0000.5416), molares humanos extraídos foram obtidos, os quais foram imersos em Timol 0,1% e submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal. Da coroa de cada dente, foi obtido um disco de dentina da região mais profunda, utilizando-se para isto uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA) acoplado a um disco de diamante (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda.). As superfícies dos discos de dentina foram lixadas e regularizadas com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF-Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) até a obtenção de uma espessura de 0,1 mm, avaliada por meio de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil). Os discos de dentina sofreram redução da sua área total com ponta diamantada cilíndrica (número 1095 - KG Sorensen) em alta rotação, com acabamento em baixa rotação, de tal forma que o diâmetro final dos discos fosse de 8 mm.

Para a correta interpretação dos resultados, foi realizada a medição dos índices iniciais de filtração para todos os discos de dentina previamente ao início dos ensaios transdentinários. Este cuidado permite padronizar os testes, já que diminui a interferência da estrutura da dentina, proveniente de variações anatômicas dos diferentes discos. Previamente a medição da condutância hidráulica, foi aplicada a solução de EDTA 0,5 N em cada superfície dos discos por 30 segundos para remoção da smear-layer, seguido de lavagem com água deionizada pelo mesmo período. Os discos foram adaptados em câmara de filtração e foi deixado passar água pelo período de 5 minutos, para limpeza dos discos. Após análise da condutância hidráulica, os discos foram distribuídos nos grupos experimentais, de modo que não houvesse diferença estatisticamente significativa entre os valores numéricos médios obtidos. O valor médio de permeabilidade de 12 mm/min foi empregado para todos os experimentos subsequentes. A seguir, cada disco foi adaptado à câmara pulpar artificial (CPA), estando interposto por dois anéis de silicone e vedado perifericamente com cera (Figura 2). Cada conjunto disco-CPA foi embalado individualmente e submetido à esterilização em óxido de etileno para a realização dos testes transdentinários.

Figura 2 - Esquema representativo do disco de dentina adaptado à câmara pulpar artificial (CPA).



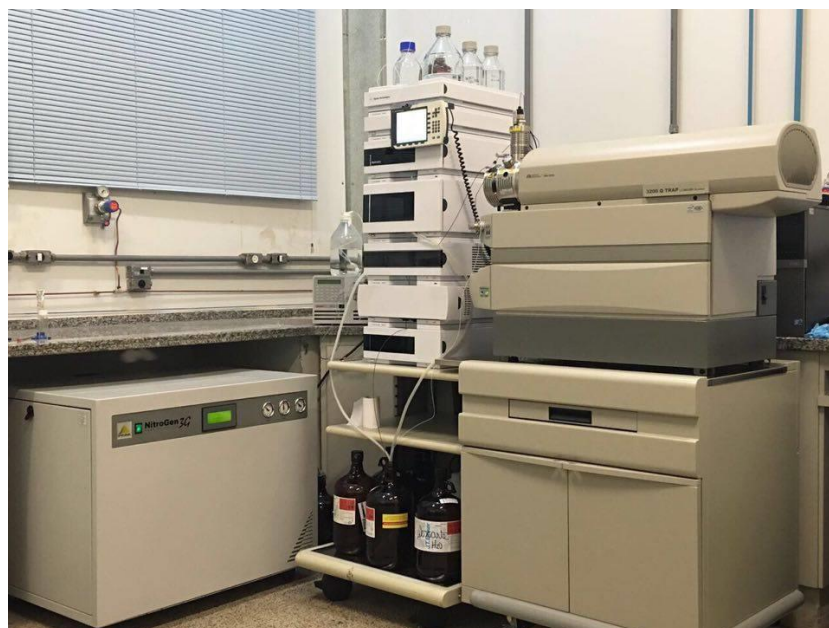
Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Quantificação da difusão transdentinária da sinvastatina

Com o objetivo de confirmar a hipótese da difusão transdentinária de sinvastatina, selecionou-se uma concentração de 1 mg/ml (2400 μ M em metanol) desta substância para o teste de quantificação. Assim, conjuntos disco/CPA com

diferentes permeabilidades ($n=3$) foram posicionados em placas de 24 compartimentos de forma invertida, sendo 2 mL de PBS (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) adicionados. Em seguida, as CPAs foram giradas dentro do compartimento das placas, sendo um total de 1 mL removido para promover exposição da superfície de dentina, sobre a qual foi realizada a aplicação de 20 μ L da solução 1 mg/ml de SV. Desta forma, o PBS permaneceu em íntimo contato com a dentina, e assim, os componentes capazes de se difundir via transdentinária se acumularam nessa solução, denominada, neste momento, de extrato. Após 24 horas de incubação a 37°C, o extrato foi transferido para um vial de vidro para análise em cromatógrafo líquido (Agilent Technologies 1200 Series - Englewood, CO, USA) acoplado ao espectrômetro de massa (3200QTRAP - AB SCIEX, Ontário, CA), tendo-se como parâmetro o peso molecular da sinvastatina (418,566 g/mol). A concentração de SV nos extratos foi calculada por meio de uma curva padrão. Após esta análise (Figura 3), foi realizado cálculo para determinação da massa de SV e do percentual médio de sinvastatina capaz de se difundir através da estrutura de dentina, para determinação das concentrações a serem aplicadas no pré-tratamento do substrato dentinário realizado nos estudos subsequentes.

Figura 3 - Equipamento utilizado para quantificação da sinvastatina em espectro de massa. Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series e espectrômetro de massas 3200QTRAP - AB SCIEX.



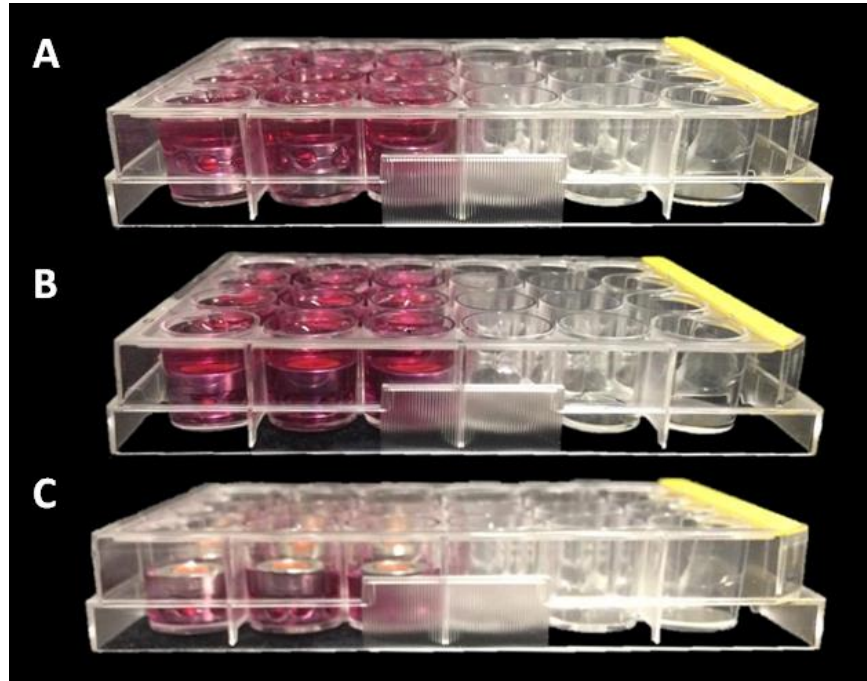
Fonte: Elaboração própria.

4.2.3 Estudo piloto para determinação da concentração de SV

4.2.3.1 Procedimento experimental

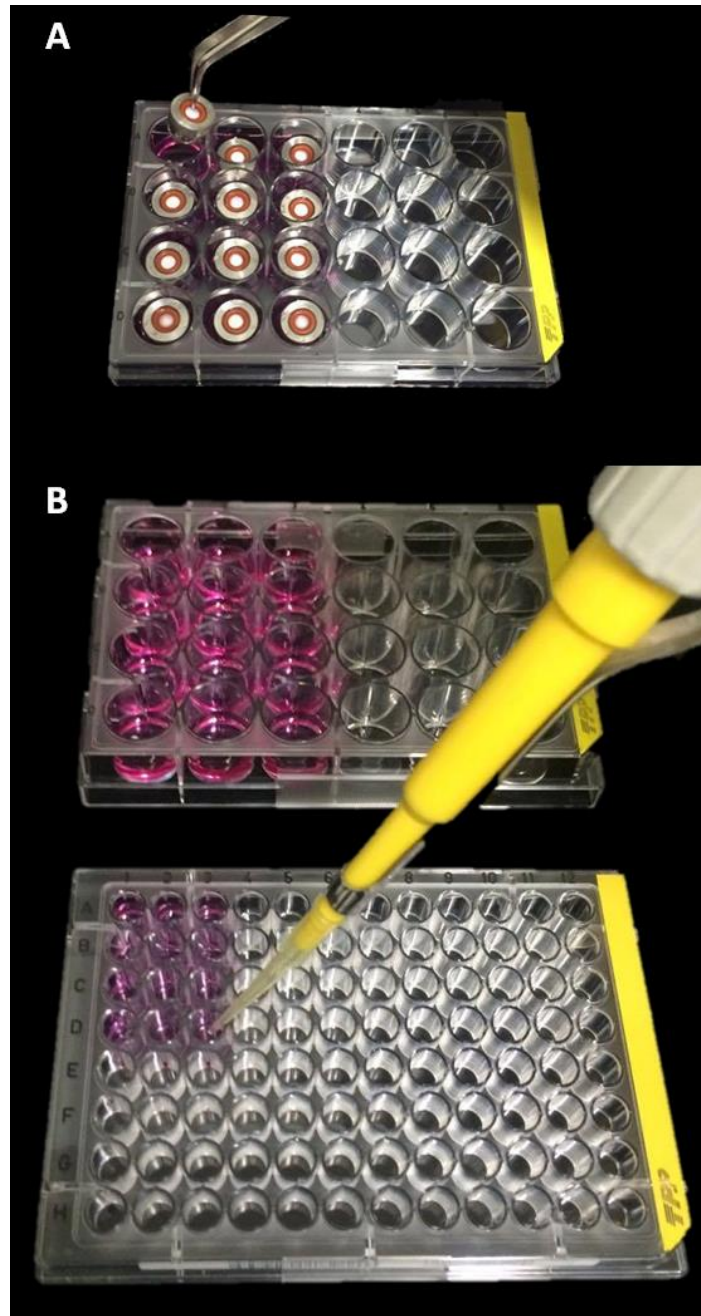
De acordo com o experimento prévio de quantificação da difusão transdentinária de sinvastatina, quatro concentrações dessa droga foram selecionadas para o estudo piloto com a finalidade de avaliar o efeito bioativo transdentinário sobre células MDPC-23. Assim, essas células foram semeadas em placas de 96 compartimentos em DMEM com 10% de SFB, na densidade de 2.500 células/compartimento durante 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Os conjuntos disco/CPA foram posicionados em placas de 24 compartimentos de forma invertida, sendo 2 mL de DMEM com 10% de SFB adicionados. Em seguida, as CPAs foram giradas dentro do compartimento das placas de cultura, sendo um total de 1 mL removido para promover exposição da superfície de dentina (Figura 4), sobre a qual foram realizados os protocolos de pré-tratamento descritos na Tabela 2. Este procedimento foi realizado com o objetivo de evitar a formação de bolhas na superfície inferior do disco de dentina. Desta forma, o meio de cultura permaneceu em íntimo contato com a dentina, e, assim, os componentes do pré-tratamento capazes de se difundir pela dentina se acumularam no meio de cultura, denominado neste momento de extrato. Após 24 horas do término dos protocolos de pré-tratamento, os conjuntos disco/CPA foram removidos, sendo todo extrato provenientes de 6 conjuntos disco/CPA coletado e distribuído em alíquotas de 100 µL, as quais foram aplicadas por um período de 24 horas (37°C e 5% de CO₂) sobre as células previamente semeadas em placas de 96 compartimentos (Figura 5). Após o tempo de contato com o extrato, este foi aspirado, sendo as células mantidas em DMEM com 10% SFB (37°C e 5% de CO₂) até a realização de cada protocolo experimental, sendo o meio trocado a cada 24 horas.

Figura 4 - A - Conjuntos disco/CPA posicionados em placa de 24 compartimentos de forma invertida, sendo 2 mL de DMEM com 10% de SFB adicionados. B - CPAs foram giradas dentro do compartimento das placas de cultura. C – Remoção de 1 ml de DMEM com 10% de SFB de cada compartimento para promover exposição da superfície de dentina, sobre a qual foram realizados os protocolos de pré-tratamento.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - A - Conjuntos disco/CPA removidos após 24 horas do término dos protocolos de pré-tratamento. B - Extrato coletado da placa de 24 compartimentos e distribuído em alíquotas, as quais foram aplicadas por um período de 24 horas sobre as células MDPC-23 previamente semeadas em placas de 96 compartimentos.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 - Grupos pilotos de acordo com pré-tratamento sobre a superfície dentinária (n=3).

Grupos	Pré-tratamento
Controle negativo	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
EDTA + Etanol	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de etanol ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 2,5 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 1,0 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 1,0 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 0,5 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 0,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 0,1 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 0,1 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.3.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT (n=6) após 24 horas. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.3.

4.2.3.3 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada pelo teste de timolftaleína monofosfato (n=6) após 5 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.4.

4.2.3.4 Avaliação da deposição de matriz mineralizada

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada pelo teste de alizarin red (n=6) após 14 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.5.

4.2.4 Efeito bioativo transdentinário da sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura

Diante dos resultados do estudo piloto, duas concentrações de sinvastatina foram selecionadas para avaliação do efeito bioativo sobre células odontoblastóides MDPC-23 via transdentinária, diante da realização ou não do pré-tratamento da dentina com EDTA, conforme os protocolos descritos na Tabela 3. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.2.3.

Tabela 3 - Grupos experimentais de acordo com pré-tratamento sobre a superfície dentinária (n=6).

Grupos	Pré-tratamento
Controle negativo	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
Etanol	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de etanol ativamente com ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos para evaporar o solvente.
EDTA	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
EDTA + Etanol	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de etanol ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
SV 2,5 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
SV 1,0 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 1,0 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 2,5 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 1,0 mg/ml	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 1,0 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.4.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT (n=6) após 1, 5 e 14 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.3.

4.2.4.2 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada pelo teste de timolftaleína monofosfato (n=6) após 5 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.4.

4.2.4.3 Avaliação da deposição de matriz mineralizada

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada pelo teste de alizarin red (n=6) após 14 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.5.

4.2.5 Avaliação da ação antimicrobiana da sinvastatina

4.2.4.1 Linhagens Bacterianas

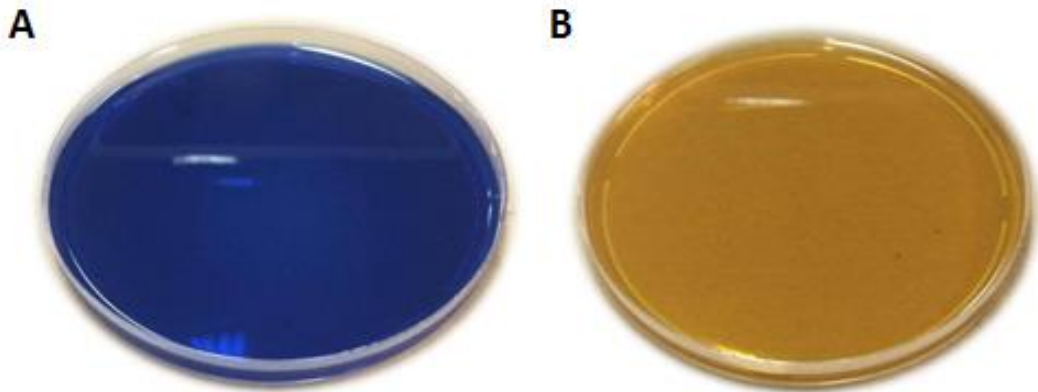
Neste estudo, foram utilizadas linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*; ATCC 25175) e *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*; ATCC 4356), as quais foram reativadas em meio de cultura BHI (Acumedia, Lansing, MI, EUA) suplementado com 1% de extrato de levedura (Himedia, Vadhani, MB, IND).

4.2.4.2 Preparo do Meio de Cultura

Para a realização do teste de disco-difusão foram utilizados os meios de cultura Mitis Salivaris Agar (Himedia, Vadhani, MB, IND) para a linhagem de *S. mutans*; e Lactobacillus MRS Agar (Himedia, Vadhani, MB, IND) para a linhagem de *L. acidophilus*. Inicialmente, o meio foi pesado de acordo com as recomendações do fabricante, seguido de diluição em água destilada e posterior homogeneização, sendo então submetido à esterilização em autoclave, por 15 minutos a 01 ATM, na

temperatura de 120°C. Decorrido esse tempo, foi procedida a distribuição do meio em placas de Petri descartáveis e estéreis (140x15 mm), junto à chama de segurança do bico de Bunsen (Figura 6).

Figura 6 - Meios de cultura distribuídos nas placas de Petri. A - Mitis Salivaris Agar. B - Lactobacillus MRS Agar.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.4.3 Teste de disco-difusão

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio de cultura BHI suplementado com 1% de extrato de levedura e incubadas a 37°C por 18 horas em ambiente de microaerofilia. Decorrido esse período, foi verificada a presença do crescimento bacteriano pela aparência turva do meio de cultura e deposição de colônias de crescimento na parte inferior do tubo falcon. Após homogeneização, foi transferido 400 µl do inóculo de cada linhagem bacteriana para a uma cubeta e realizada a quantificação das unidades formadoras de colônia em espectrofotômetro (Biophotometer® D30, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a uma absorvância de 600 nm. A densidade ótica dos microrganismos foi ajustada para uma concentração correspondente a 1×10^7 UFC/ml. Em seguida, para cada placa de Petri foi utilizado 300 µL de inóculo de *S. mutans* e 1000 µL de inóculo de *L. acidophilus*, os quais foram distribuídos de maneira uniforme em toda a superfície do ágar, com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. As placas de Petri foram mantidas então em ambiente microaerófilo por 30 minutos a 37°C para devida secagem.

Decorrido esse tempo, foram distribuídos 5 discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro em cada placa de Petri. A distância entre os discos foi de 3 cm para não

haver interferências entre os halos produzidos pelos grupos experimentais. Em seguida, foi aplicado 20 µL de cada solução avaliada sobre o disco de papel de acordo com a Tabela 4. As placas foram incubadas em ambiente de microaerofilia a 37°C, por períodos de 24 e 48 horas, quando foram realizadas as mensurações dos halos de inibição do crescimento bacteriano com auxílio de um paquímetro digital. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada linhagem bacteriana selecionada para o estudo (n=9).

Tabela 4 - Grupos experimentais para avaliação da ação antimicrobiana sobre *S. mutans* e *L. acidophilus*

Grupos experimentais	Solução
Controle negativo (CN)	Água deionizada
Controle positivo (CP)	Clorexidina 2%
Etanol	Etanol 100%
SV 2,5	2,5 mg/ml de SV
SV 1,0	1,0 mg/ml de SV

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Estudo 3: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro

4.3.1 Determinar o efeito bioativo transdentinário da sinvastatina sobre células odontoblastóides MDPC-23 quando da aplicação desta substância sobre a dentina, previamente ao uso do cimento de ionômero de vidro

4.3.1.1 Obtenção dos discos de dentina

Os discos de dentina foram obtidos de acordo com o item 4.2.1. A seguir, cada disco foi adaptado à CPA, estando interposto por dois anéis de silicone e vedado perifericamente com cera. Cada conjunto disco-CPA foi embalado individualmente e submetido à esterilização em óxido de etileno para a realização dos testes transdentinários.

4.3.1.2 Procedimento experimental

Células MDPC-23 foram semeadas em placas de 96 compartimentos em DMEM com 10% de SFB, na densidade de 2.500 células/compartimento durante 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Os conjuntos disco/CPA foram posicionados em placas de 24 compartimentos de forma invertida, sendo 2 mL de DMEM com 10% de SFB adicionados. Em seguida, as CPAs foram giradas dentro do compartimento das placas de cultura, sendo um total de 1 mL removido para promover exposição da superfície de dentina, sobre a qual foram realizados os protocolos de forramento da superfície dentinária descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Grupos experimentais de acordo com o protocolo de forramento da superfície dentinária (n=6).

Grupos	Protocolo
Controle negativo	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
EDTA	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
Ketac Molar	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Misturar o pó e o líquido do CIV por 30 segundos. Aplicar com auxílio da seringa centrix o CIV na superfície oclusal.
EDTA / Ketac Molar	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Misturar o pó e o líquido do CIV por 30 segundos. Aplicar com auxílio da seringa centrix o CIV na superfície oclusal.
SV 2,5 mg/ml / Ketac Molar	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente. Misturar o pó e o líquido do CIV por 30 segundos. Aplicar com auxílio da seringa centrix o CIV na superfície oclusal.
EDTA + SV 2,5 mg/ml / Ketac Molar	Lavar a superfície oclusal com 1 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 seg, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente. Misturar o pó e o líquido do CIV por 30 segundos. Aplicar com auxílio da seringa centrix o CIV na superfície oclusal.

Fonte: Elaboração própria.

Utilizou-se como agente forrador cavitário o cimento de ionômero de vidro convencional Ketac Molar na proporção pó/líquido de 1:1 (Figura 7; 3M, ESPE Dental Products Division, St. Paul, MN, EUA). Desta forma, o meio de cultura permaneceu em íntimo contato com a dentina, e, assim, os componentes do pré-tratamento e/ou do material forrador capazes de se difundir pela dentina se acumularam no meio de cultura, denominado neste momento de extrato. Após 24 horas do término dos protocolos de forramento da superfície dentinária, os conjuntos disco/CPA foram removidos, sendo todo extrato coletado e distribuído em alíquotas, as quais foram aplicadas por um período de 24 horas (37°C e 5% de CO₂) sobre as células previamente semeadas. Após o tempo de contato com o extrato, este foi aspirado, sendo as células mantidas em DMEM com 10% SFB (37°C e 5% de CO₂) durante os períodos pré-determinados para realização dos protocolos experimentais específicos, sendo o meio trocado a cada 24 horas.

Figura 7 - Imagem representativa do CIV Ketac Molar. Forma de apresentação em dois frascos: pó (vidro de fluórsilicato de alumínio, lantânio e cálcio) e líquido (ácido poliacrílico, ácido tartárico, ácido sorbico, ácido benzoico).



Fonte: Elaboração própria.

4.3.1.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT (n=6) após 1, 5 e 14 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.3.

4.3.1.4 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada pelo teste de timolftaleína monofosfato (n=6) após 5 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.4.

4.3.1.5 Avaliação da deposição de matriz mineralizada

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada pelo teste de alizarin red (n=6) após 14 dias. O protocolo experimental empregado foi de acordo o item 4.1.5.

4.3.2 Avaliação da resistência de união ao microcisalhamento do cimento de ionômero de vidro frente ao pré-tratamento da dentina com sinvastatina

4.3.2.1 Seleção e distribuição dos dentes

Trinta terceiros molares humanos hígidos extraídos foram obtidos após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP. Estes foram armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4°C) até o momento da sua utilização. Os dentes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (n=6) de acordo com os grupos experimentais.

4.3.2.2 Obtenção da superfície de dentina

Os dentes foram cortados transversalmente no terço oclusal da coroa, com a finalidade de produzir uma superfície plana em dentina. O corte foi realizado com o auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltd. Lake Bluf IL, EUA), com velocidade de 250 rpm e força de 200 gf, sob refrigeração constante. As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com aproximadamente 40 vezes de aumento para comprovar a ausência de remanescentes de esmalte sobre a superfície dentinária.

4.3.2.3 Confeção dos espécimes

Os dentes previamente cortados foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável, usando como matriz um tubo cilíndrico de PVC com 20 mm de diâmetro externo por 18 mm de altura, de forma que a superfície de dentina estivesse centralizada e paralela à base do tubo. Em seguida, a superfície dentinária

foi lixada com lixa de carbetto de silício granulação 600 (Carborundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil), em politriz, sob refrigeração com água (Politriz ERIOS – 27000, São Paulo, SP, Brasil) por 60 segundos, para proporcionar uma camada homogênea de smear layer. Então, na superfície dentinária de cada dente foram confeccionados três espécimes. Inicialmente, foi realizada a delimitação das áreas adesivas, utilizando-se fita adesiva dupla face ácido resistente (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil) com três perfurações (diâmetro de 1,2 mm), confeccionadas com o auxílio de um perfurador de lençol de borracha adaptado (modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, as áreas delimitadas em dentina foram tratadas de acordo com os grupos experimentais demonstrados na Tabela 6. Matrizes cilíndricas transparentes de silicone com 2,0 mm de altura e orifício de 1,0 mm de diâmetro foram obtidas pelo corte de sonda uretral descartável (Embramed, São Paulo, SP, Brasil). Estas foram posicionadas sobre as áreas de dentina exposta e utilizadas como matriz para a confecção dos espécimes.

Tabela 6 - Grupos experimentais de acordo com o pré-tratamento da dentina

Grupos	Protocolo
Controle negativo (CN)	Lavar a superfície oclusal com água destilada. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
Controle positivo (CP)	Aplicar 10 µL de ácido poliacrílico 25% (fase líquida do CIV) por 10 seg. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 10 segundos. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
EDTA	Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 segundos. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida.
SV 2,5 mg/ml	Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.
EDTA + SV 2,5 mg/ml	Aplicar 10 µL de EDTA 0,5 N por 30 segundos. Lavar a superfície oclusal com água destilada por 30 segundos. Secar a superfície oclusal com disco de papel, deixando-a levemente úmida. Aplicar 20 µL de 2,5 mg/ml de SV ativamente com a ponta da ponteira durante 20 segundos. Aplicar jato de ar por 10 segundos de modo a evaporar o solvente.

Fonte: Elaboração própria.

O material foi manipulado em temperatura ambiente controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), conforme as recomendações do fabricante do CIV Ketac Molar (3M – ESPE Dental

Products, St. Paul, MN, EUA) e inserido nas matrizes com o auxílio de uma seringa Centrix (DFL, Indústria e Comércio S.A, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A superfície do material foi protegida com vaselina e o conjunto (troquel + matriz plástica + espécime) foi armazenado em estufa a 37°C com 100% de umidade durante 24 horas. Em seguida, as matrizes dos espécimes de cada dente foram cortadas com auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Embramed, Jurubatuba, SP, Brasil) e removidas. Estes espécimes foram tracionados imediatamente após a remoção das matrizes.

4.3.2.4 Determinação da resistência de união por meio de teste de microcisalhamento

O ensaio de microcisalhamento foi realizado em máquina para testes mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil), previamente ajustada para forças de tração. Para a execução do teste, foi usado um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro laçando simultaneamente o corpo-de-prova o mais próximo possível da união material/dentina e o prolongamento da célula de carga (Figura 8). Os movimentos de tração foram realizados utilizando célula de carga de 100 N a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os testes foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e prosseguiu até que ocorresse a fratura. Os resultados de resistência de união foram dados pelos valores de tensão máxima suportada pela união dentina/material, em MPa.

Figura 8 - Amostra posicionada na máquina de ensaio para realização de testes mecânicos. Para execução do teste de microcisalhamento foi utilizado um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro laçando simultaneamente o corpo-de-prova e o prolongamento da célula de carga.



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Análise estatística

Para verificar a reprodutibilidade dos dados, dois experimentos independentes foram realizados para todos os protocolos neste estudo. Em seguida, os dados compilados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade. Diante da normalidade dos dados, estes foram avaliados pelo teste ANOVA a dois critérios. Para identificação das diferenças entre os grupos experimentais em cada período de análise foi empregado o teste Tukey. Este mesmo teste foi também empregado para identificação das diferenças entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Todos os testes foram fixados a um nível de significância de 5%.

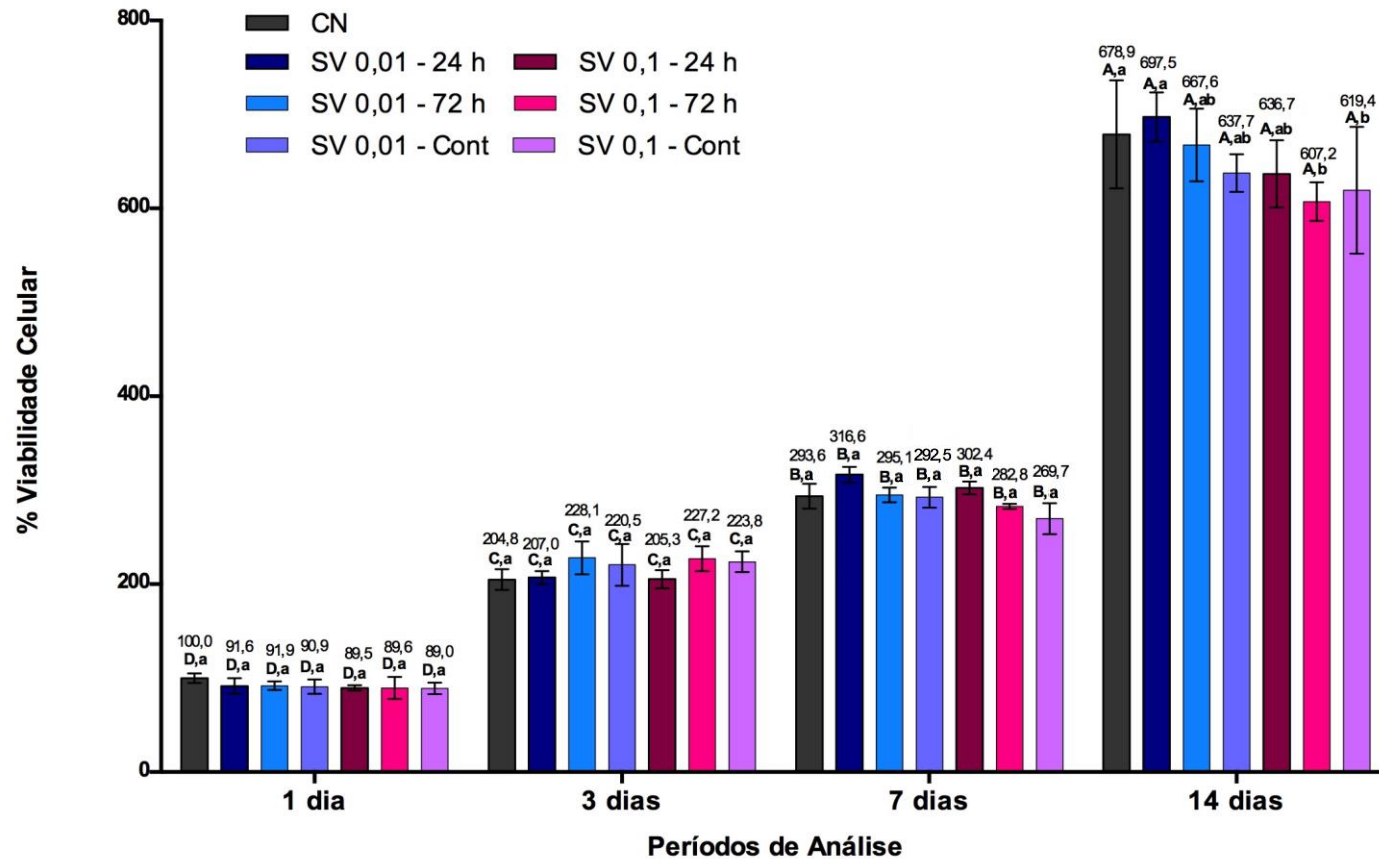
5 RESULTADO

5.1 Estudo 1: Determinação da concentração de sinvastatina e do tempo de tratamento capaz de tornar esta substância não tóxica e ao mesmo tempo bioativa para as células odontoblastóides MDPC-23

Viabilidade celular

Tal como observado na Figura 9, aumento significativo da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de análise. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais expostos a SV, comparado ao controle negativo (CN) nos períodos de 1 e 3 e 7 dias, independente da concentração e tempo de tratamento das células com esta droga ($p > 0,05$). No entanto, no período de 14 dias, o tratamento com $0,1 \mu\text{M}$ SV por 72 horas ou de forma contínua, promoveu redução significativa, em torno de 71,6% e 59,5% na viabilidade celular, respectivamente, em relação a CN.

Figura 9 - Média e desvio padrão dos valores da viabilidade celular (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; p < 0,05). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise.

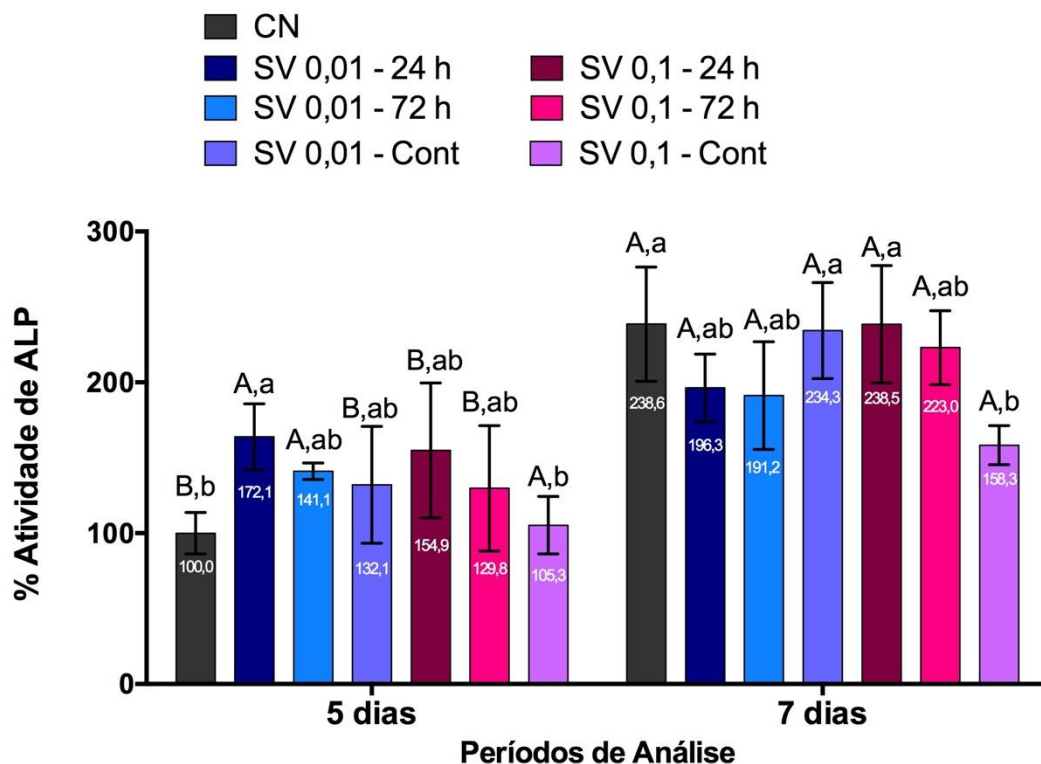


Fonte: Elaboração própria.

Atividade de ALP

Aumento na atividade de ALP foi observado para todos os grupos expostos a SV em relação ao CN no período de 5 dias (Figura 10); no entanto, esse aumento foi significativo apenas para as células tratadas com SV 0,01 μ M por 24 horas. Aos 7 dias, redução significativa da atividade de ALP em relação ao CN (80,3%) foi observada apenas para as células expostas a SV 0,1 μ M de forma contínua. Todavia, os demais grupos não diferiram estatisticamente quando comparados ao CN ($p > 0,05$).

Figura 10 - Média e desvio padrão dos valores da atividade de ALP (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise ($n=6$; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise.



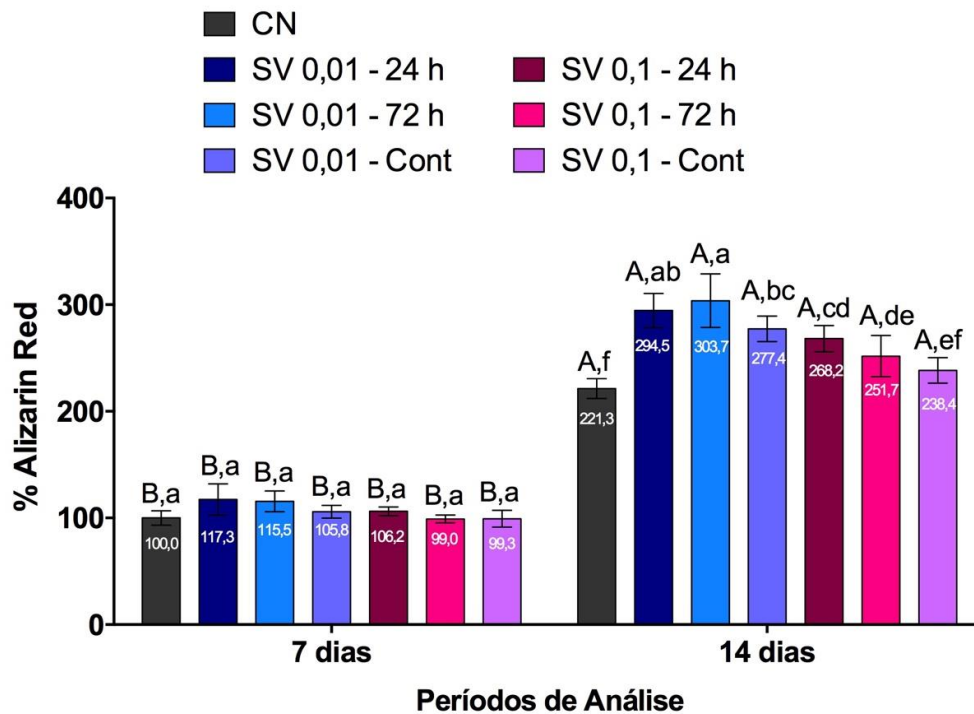
Fonte: Elaboração própria.

Deposição de matriz mineralizada

Aumento de 73,2%; 82,4%; 56,1%; 46,9% e 30,4% na deposição de matriz mineralizada foi observado para os grupos SV 0,01 – 24h; SV 0,01 – 72h; SV 0,01 –

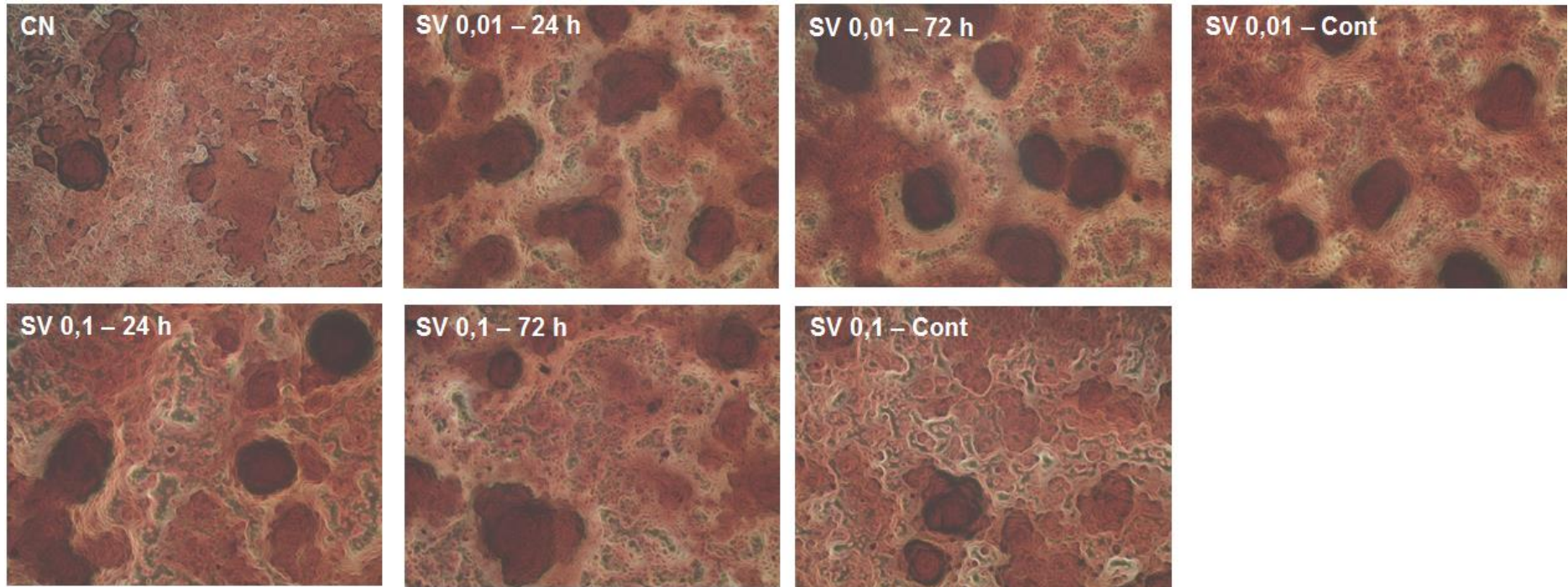
Cont; SV 0,1 – 24h e SV 0,1 – 72h, respectivamente, após 14 dias em relação ao CN (Figura 11). Ausência de diferença significativa com CN foi observada apenas quando as células MDPC-23 foram tratadas com SV 0,1 μ M de forma contínua ($p > 0,05$). Imagens representativas da deposição dos nódulos de mineralização no período de análise de 14 dias estão demonstradas na Figura 12.

Figura 11 - Média e desvio padrão dos valores da deposição de matriz mineralizada (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise ($n=6$; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Imagens obtidas em microscopia de luz invertida (4x). Figura composta por imagens representativas do ensaio de alizarin red, indicando que o efeito bioativo da sinvastatina sobre as células MDPC-23 foi tempo-concentração dependente na formação de nódulos de mineralização. Note a menor formação de nódulos nos grupos **SV 0,1 – Cont** e **CN**, comparado aos demais grupos experimentais.



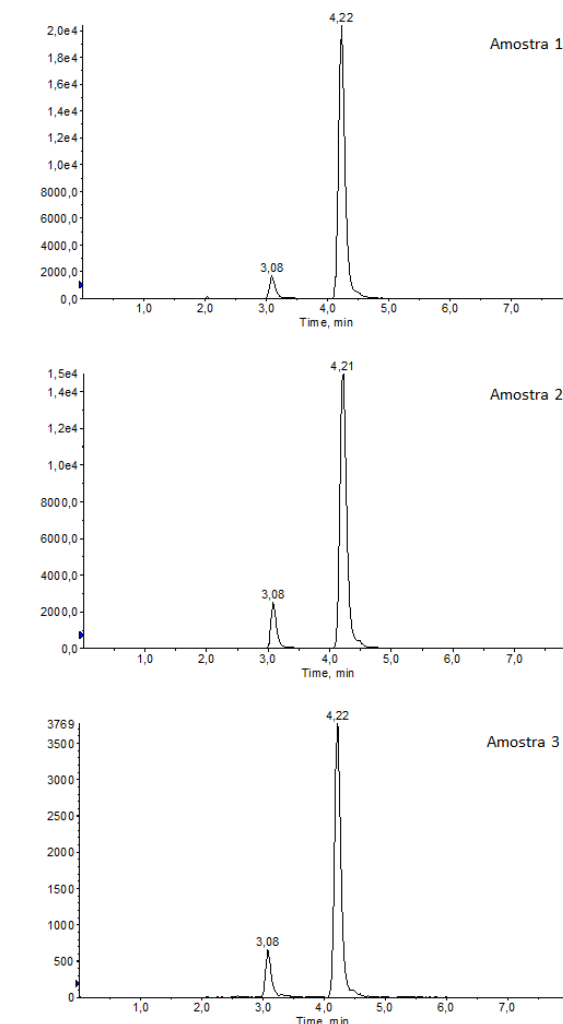
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Estudo 2: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina

5.2.1 Quantificação da difusão transdentinária da sinvastatina

A hipótese da difusão da SV via transdentinária quando aplicada sob a forma de uma solução (1 mg/ml = 2400 µM) sobre a superfície da dentina foi confirmada. Um volume de 20 µL de SV foi dispensado sobre a dentina, correspondendo em massa a um total de 20 µg de SV. Através da análise em LC-MS/MS (Figura 13), observou-se que a liberação da substância foi permeabilidade-dependente, sendo calculado a percentagem de SV capaz de se difundir pelos discos, conforme demonstrado na Tabela 7.

Figura 13 - Difusão transdentinária da sinvastatina (LC-MS/MS). A sinvastatina foi detectada no período entre 4 e 5 minutos de análise de cada amostra experimental.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Difusão transdentinária da sinvastatina de acordo com a permeabilidade dentinária.

Amostra	Permeabilidade (mm/min)	Concentração (μM) em 1 mL de PBS	Proporção em % do total de SV em 1 mL de PBS
1	72,0	2,0	4,2%
2	48,0	1,6	3,3%
3	12,0	0,5	1,0%
MÉDIA	43,7	1,4	2,83%

Fonte: Elaboração própria.

A partir destes dados, discos com permeabilidade média de 12 mm/min foram selecionados para os experimentos subsequentes, visto que esta foi a permeabilidade mais prevalente entre os discos de dentina com 0,1 mm de espessura obtidos para este estudo. Desta forma, considerando-se uma média de 1% de difusão do total de SV aplicada em massa no volume de 20 μL de solução, foram estabelecidas quatro concentrações de SV a serem empregadas no experimento piloto para análise via transdentinária, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações de SV selecionadas para os ensaios transdentinários.

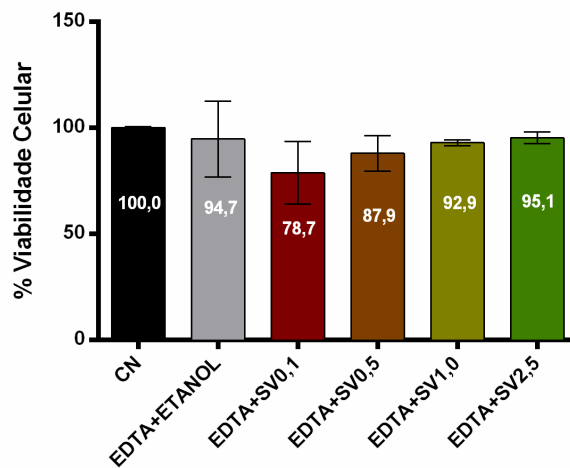
Concentração	Total de SV em massa em 20 μL	Proporção do total de SV em 1 mL de PBS (1% de difusão)
0,1 mg/mL (240 μM)	2 μg	0,02 μg = 0,05 μM
0,5 mg/mL (1200 μM)	10 μg	0,1 μg = 0,2 μM
1,0 mg/mL (2400 μM)	20 μg	0,2 μg = 0,5 μM
2,5 mg/mL (6000 μM)	50 μg	0,5 μg = 1,2 μM

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Ensaio piloto para determinação da concentração de SV

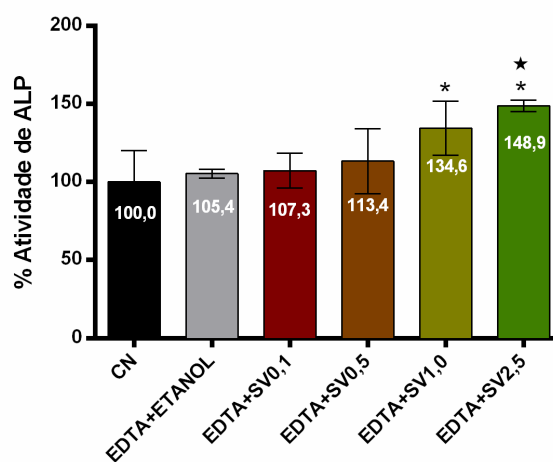
De acordo com os resultados do ensaio piloto (Figura 14, 15 e 16), foi observado que as concentrações de 2,5 e 1 mg/ml de SV aplicadas sobre a dentina previamente tratada com EDTA foram citocompatíveis e apresentaram melhores valores de atividade de ALP e de deposição de matriz mineralizada em relação ao CN. Assim, essas concentrações foram selecionadas para os testes subsequentes.

Figura 14 - Média e desvio padrão dos valores da viabilidade celular (%) dos grupos pilotos no período de análise de 24 h (n=3; ANOVA; $p < 0,05$). Constatou-se ausência de diferença estatística entre os grupos.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Média e desvio padrão dos valores da atividade de ALP (%) dos grupos pilotos no período de análise de 5 dias (n=3; testes ANOVA e Dunnet's; $p < 0,05$).

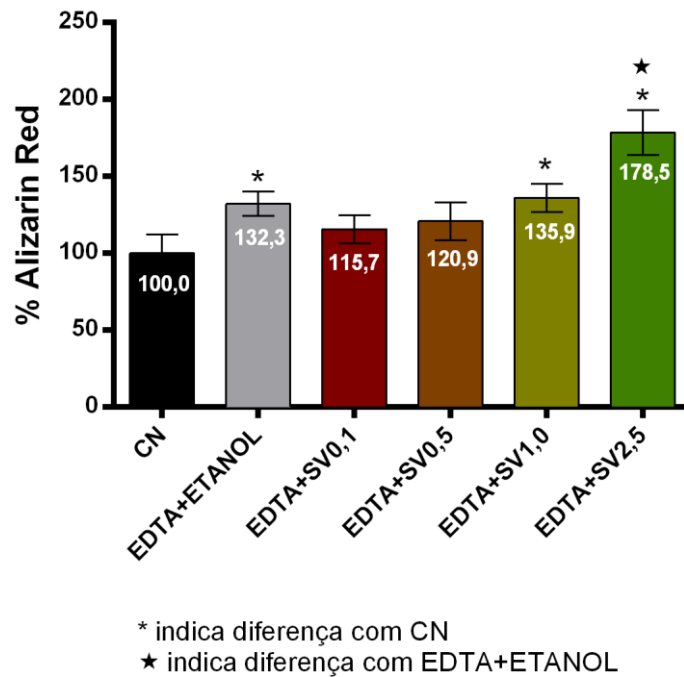


* indica diferença com CN

★ indica diferença com EDTA+ETANOL

Fonte: Elaboração própria.

Figura 16 - Média e desvio padrão dos valores da deposição de matriz mineralizada (%) dos grupos pilotos no período de análise de 14 dias (n=3; testes ANOVA e Dunnet's; $p < 0,05$).



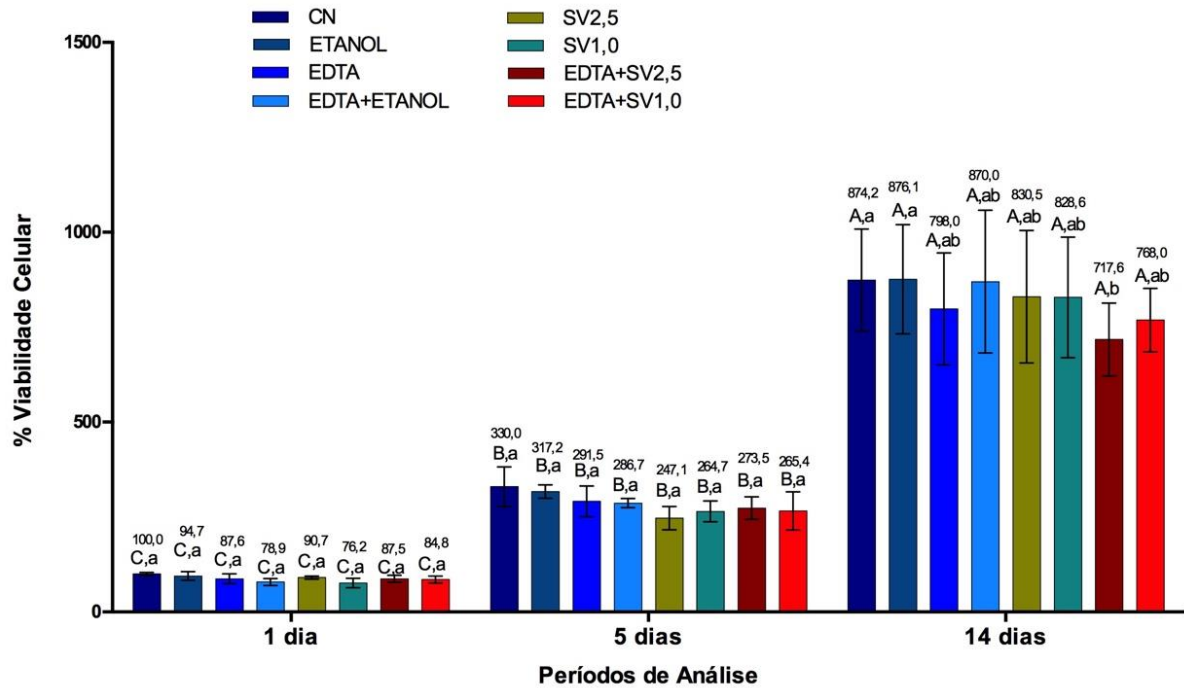
Fonte: Elaboração própria.

5.2.3 Bioestimulação de células odontoblastóides MDPC-23 via transdentinária frente ao pré-tratamento com sinvastatina

Viabilidade celular

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 17, aumento significativo da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de análise. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais nos períodos de 1 e 5 dias ($p > 0,05$); no entanto, no período de 14 dias, o tratamento prévio da dentina com EDTA seguido da aplicação de 2,5 mg/ml de SV promoveu uma redução significativa na viabilidade celular em relação ao CN.

Figura 17 - Média e desvio padrão dos valores da viabilidade celular (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise.

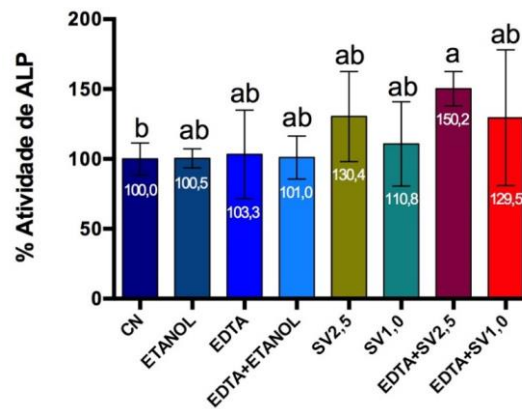


Fonte: Elaboração própria.

Atividade de ALP

Aumento significativo da atividade de ALP foi observado para o grupo no qual a dentina foi tratada previamente com EDTA seguida da aplicação de 2,5 mg/ml de SV em relação ao CN no período de 5 dias (Figura 18). Em contrapartida, os demais grupos não diferiram estatisticamente quando comparados ao CN ($p > 0,05$).

Figura 18 - Média e desvio padrão dos valores da atividade de ALP (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro do período de análise.

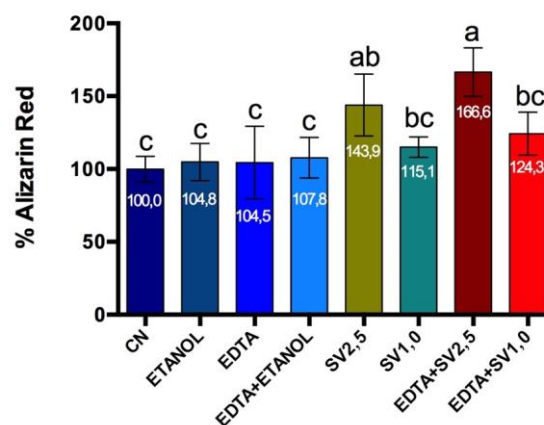


Fonte: Elaboração própria.

Deposição de matriz mineralizada

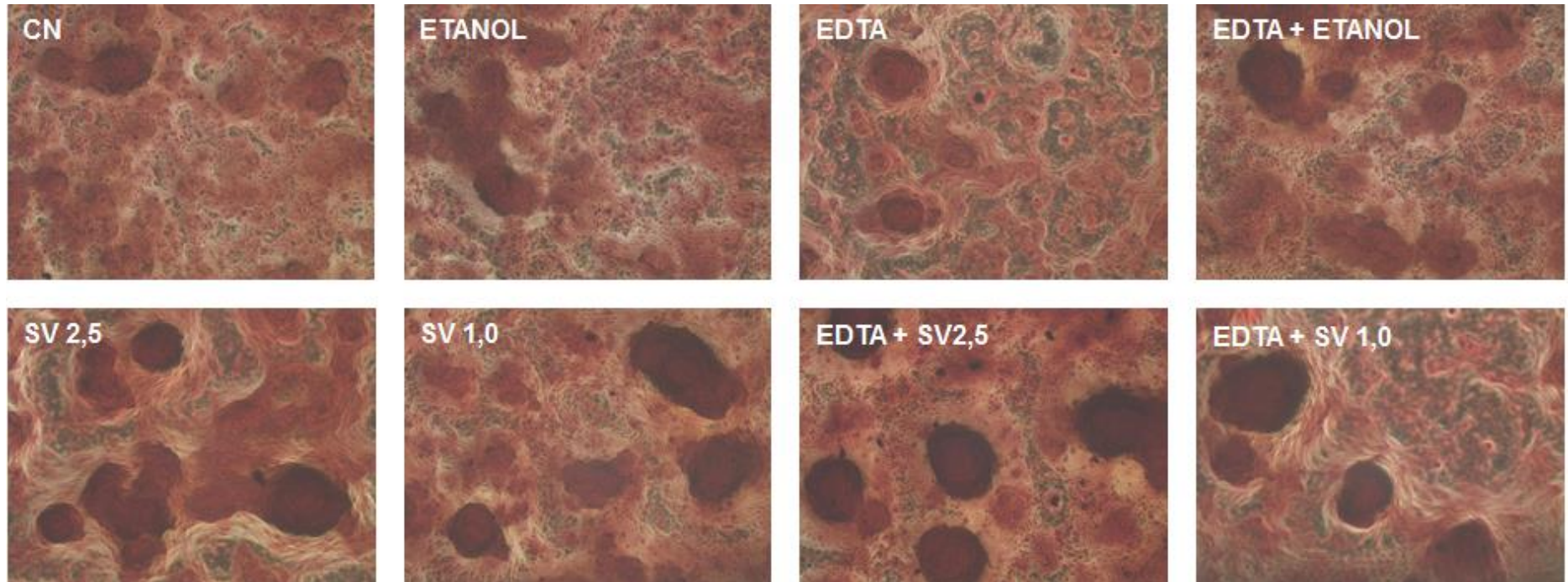
Os resultados na Figura 19 mostram aumento significativo de 66,6% e 43,9% na deposição de matriz mineralizada para os grupos nos quais foi aplicado 2,5 mg/ml de SV na dentina tratada ou não com EDTA, respectivamente, comparados ao controle negativo no período de 14 dias. Todavia, os demais grupos experimentais não diferiram do controle negativo ($p > 0,05$). Imagens representativas da deposição dos nódulos de mineralização pelas células MDPC-23 no período de análise de 14 dias estão demonstradas na Figura 20.

Figura 19 - Média e desvio padrão dos valores da deposição de matriz mineralizada (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro do período de análise.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Imagens obtidas em microscopia de luz invertida (4x). Figura composta por imagens representativas do ensaio de alizarin red, indicando que o efeito bioativo sobre as células MDPC-23 na formação de nódulos de mineralização foi dependente da concentração de sinvastatina. Note a maior formação de nódulos no grupo **EDTA + SV 2,5** seguido pelo grupo **SV 2,5** comparado ao **CN**.



Fonte: Elaboração própria.

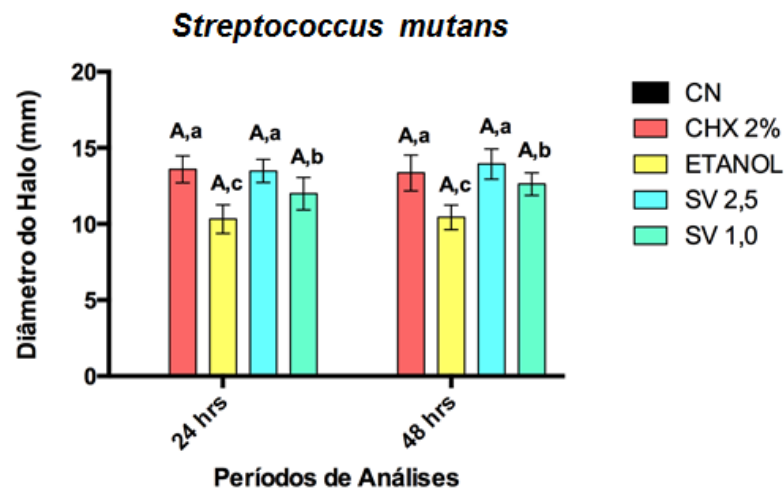
5.2.4 Avaliação da ação antimicrobiana da sinvastatina

De acordo com as Figuras 21 e 22, os grupos experimentais mantiveram os halos de inibição crescimento bacteriano formados ao longo do tempo, sendo constatado ausência de diferença significativa entre os períodos de análise para ambos os grupos experimentais e ambas as linhagens bacterianas avaliadas ($p > 0,05$). Os grupos Clorexidina 2%, Etanol 100%, SV 2,5 mg/ml e SV 1,0 mg/ml demonstraram a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano significativamente superior em relação ao CN sob ambas as linhagens avaliadas.

A ação antibacteriana dos grupos Clorexidina 2% e SV 2,5 mg/ml apresentou os melhores resultados contra *S. Mutans* em relação aos demais grupos experimentais. O grupo SV 1,0 mg/ml, por sua vez, apresentou melhores valores comparado ao grupo Etanol 100%.

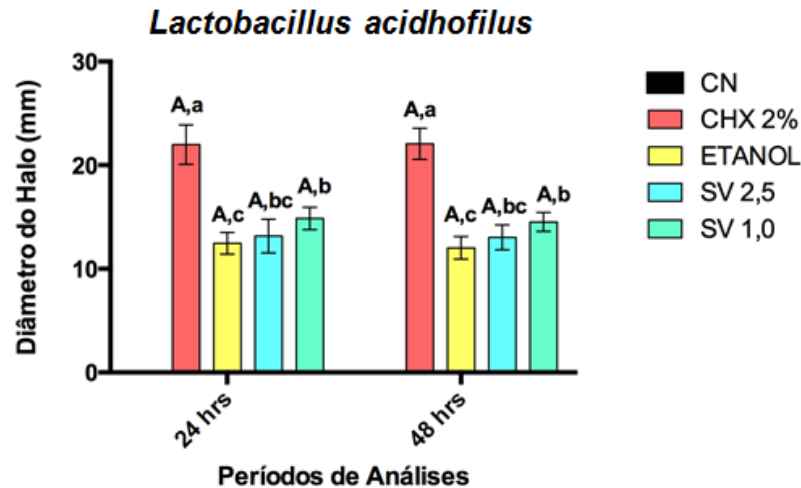
Em contrapartida, a ação antibacteriana contra *L. acidophilus* demonstrou melhores achados para o grupo Clorexidina 2% em relação aos demais grupos experimentais. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos SV 2,5 mg/ml e SV 1,0 mg/ml ($p > 0,05$), este último diferiu estatisticamente do grupo Etanol 100%.

Figura 21 - Média e desvio padrão dos valores do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano (mm) dos grupos experimentais respectivos à linhagem *S. mutans*. (n=9; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise. Constatou-se ausência de diferença significativa entre os períodos de análise para ambos os grupos experimentais ($p > 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 - Média e desvio padrão dos valores do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano (mm) dos grupos experimentais respectivos à linhagem *L. acidophilus*. (n=9; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise. Constatou-se ausência de diferença significativa entre os períodos de análise para ambos os grupos experimentais ($p > 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

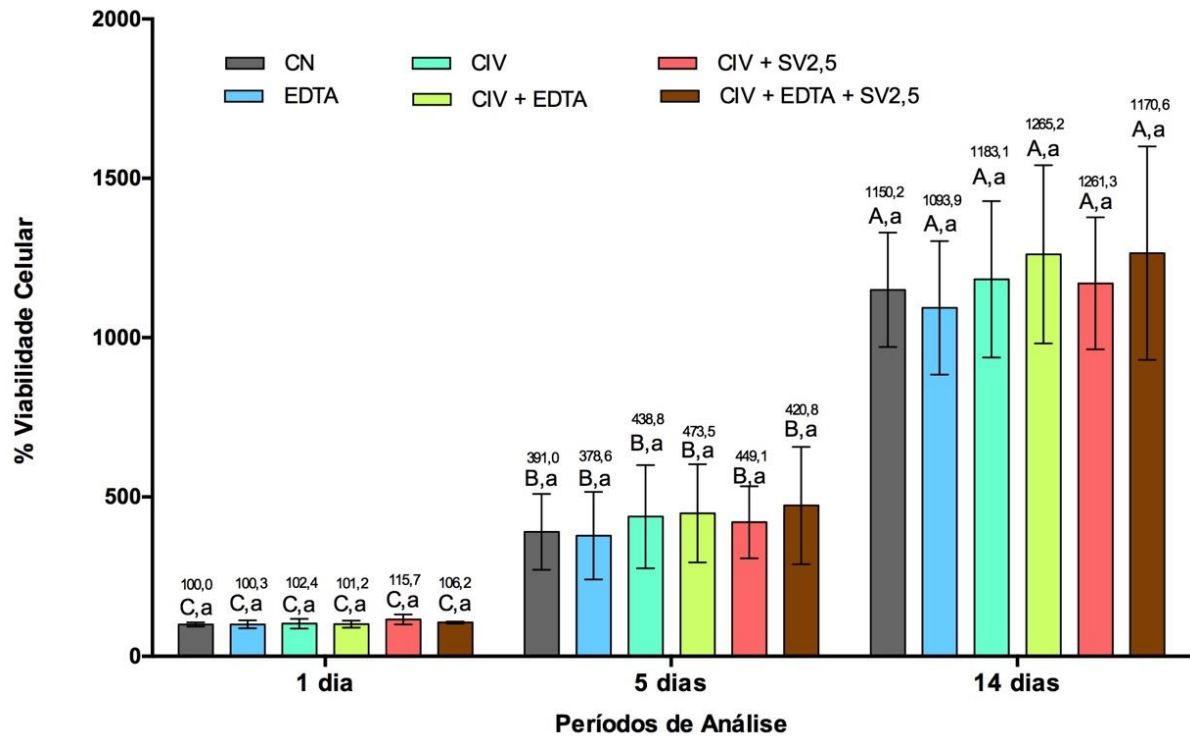
5.3 Estudo 3: Avaliação do pré-tratamento da dentina com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro

5.3.1 Bioestimulação de células odontoblastóides MDPC-23 via transdentinária frente ao pré-tratamento com sinvastatina como coadjuvante ao protocolo de forramento cavitário com cimento de ionômero de vidro

Viabilidade celular

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 23, aumento significativo da viabilidade celular ocorreu em todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de análise. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais nos períodos de 1, 5 e 14 dias ($p > 0,05$).

Figura 23 - Média e desvio padrão dos valores da viabilidade celular (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise.

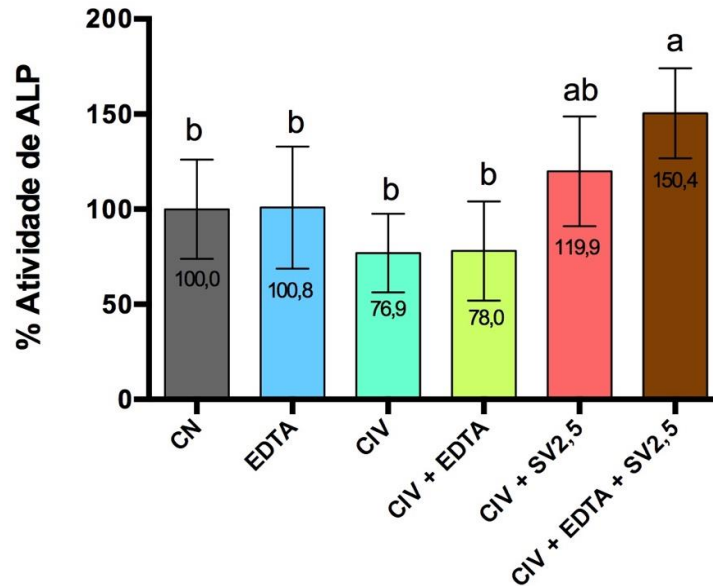


Fonte: Elaboração própria.

Atividade de ALP

Após 5 dias, aumento significativo da atividade de ALP foi observado para o grupo no qual a dentina foi tratada previamente com EDTA seguida da aplicação de 2,5 mg/ml de SV e do forramento cavitário com CIV em relação ao controle negativo (Figura 24). Em contrapartida, os demais grupos experimentais não diferiram estatisticamente quando comparados ao CN ($p > 0,05$).

Figura 24 - Média e desvio padrão dos valores da atividade de ALP (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro do período de análise.

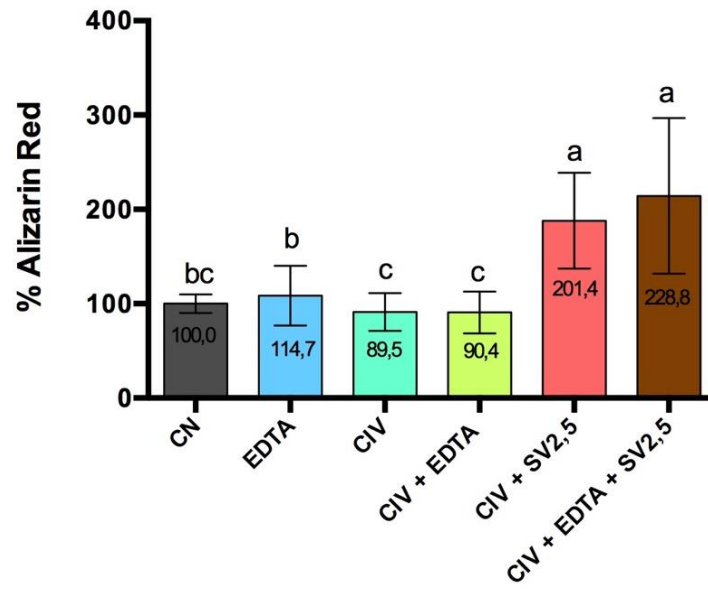


Fonte: Elaboração própria.

Deposição de matriz mineralizada

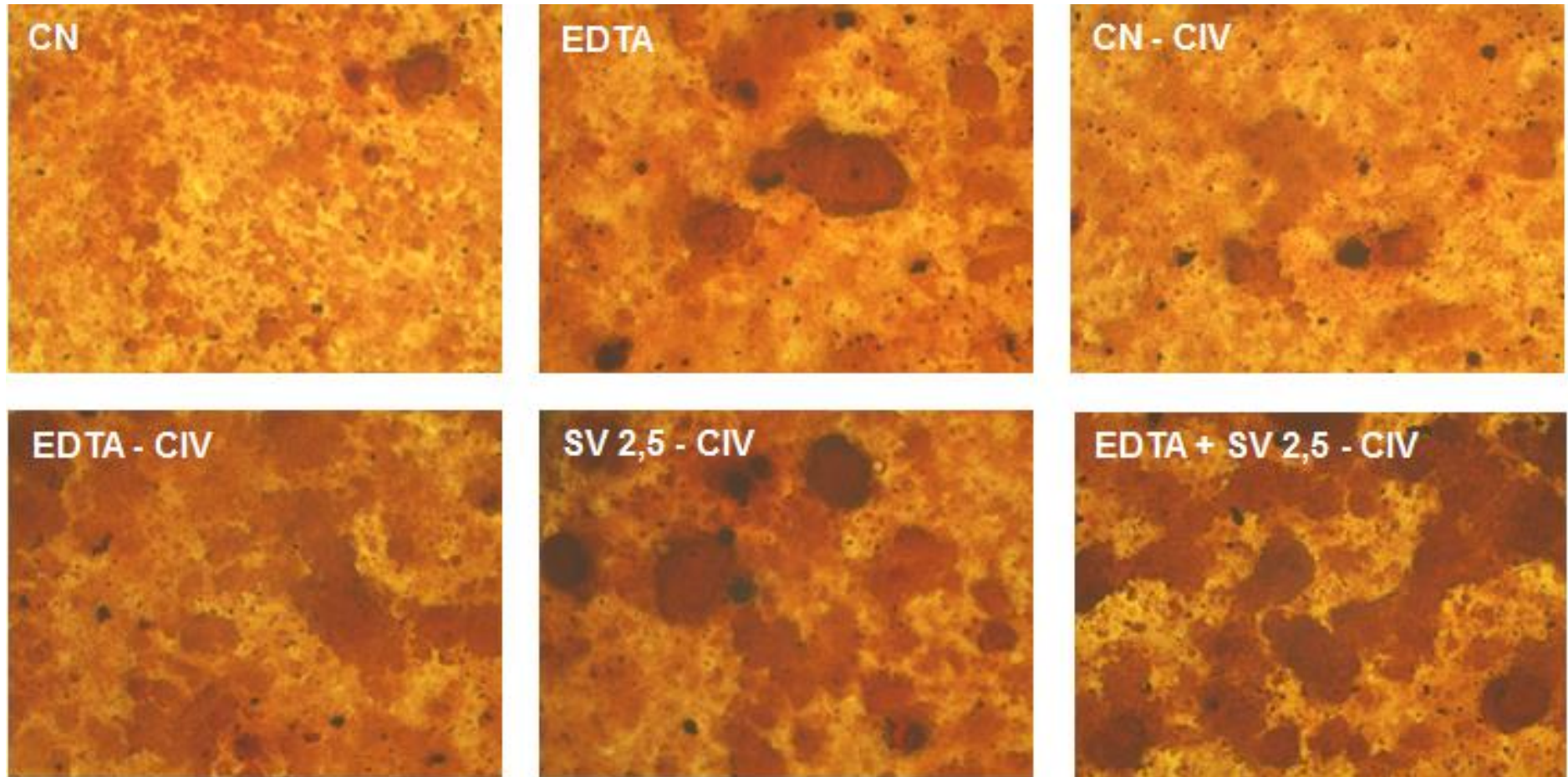
Os resultados na Figura 25 mostram aumento significativo de 128,8% e 101,4% na deposição de matriz mineralizada, respectivamente, para os grupos nos quais foram tratados previamente ou não com EDTA seguido de aplicação de 2,5 mg/ml de SV e da realização do forramento cavitário com CIV sobre a superfície dentinária em relação ao CN no período de 14 dias. Todavia, os demais grupos experimentais não diferiram do CN ($p > 0,05$). Imagens representativas da deposição dos nódulos de mineralização no período de análise de 14 dias estão demonstradas na Figura 26.

Figura 25 - Média e desvio padrão dos valores da deposição de matriz mineralizada (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro do período de análise.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 26 - Imagens obtidas em microscopia de luz invertida (4x). Figura composta por imagens representativas do ensaio de alizarin red, indicando que o efeito bioativo sobre as células MDPC-23 na formação de nódulos de mineralização foi dependente do tratamento da dentina com sinvastatina. Note a maior formação de nódulos no grupo **EDTA + SV 2,5 - CIV** seguido pelo grupo **SV 2,5 - CIV** comparado aos demais grupos experimentais.

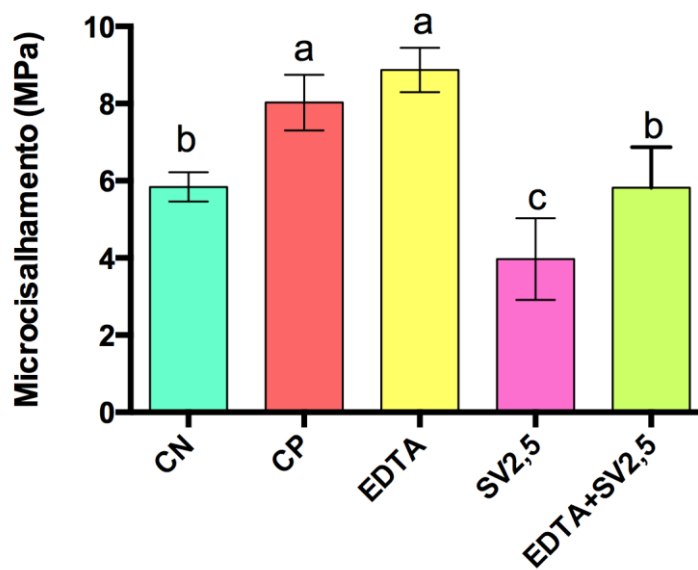


Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Avaliação da resistência de união ao microcissalhamento do cimento de ionômero de vidro frente ao pré-tratamento da dentina com sinvastatina

De acordo com a Figura 27, os melhores resultados de resistência de união ao microcissalhamento foram proporcionados pelo pré-tratamento da dentina com EDTA 0,5 N ou ácido poliacrílico 25% (CP). Em contrapartida, redução da resistência de união foi observada para os demais grupos experimentais, sendo os menores valores observado para o grupo submetido apenas a aplicação de 2,5 mg/ml de SV sobre a superfície dentinária.

Figura 27 - Média e desvio padrão dos valores da resistência de união ao microcissalhamento do CIV à dentina (MPa) dos grupos experimentais no período de análise (n=6; testes ANOVA e Tukey; $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A ação da sinvastatina como potente indutor da diferenciação odontogênica, seguido da síntese e mineralização de matriz dentinária por células mesenquimais indiferenciadas da polpa, tem sido demonstrada na literatura (Jia et al.³⁷, 2016; Karanxha et al.³⁸, 2013; Lee et al.⁴³, 2012; Min et al.⁴⁷, 2015; Okamoto et al.⁵⁴, 2009; Varalakshmi et al.⁷⁵, 2013). Os dados obtidos na presente pesquisa parecem corroborar, pelo menos em parte, com estes achados anteriores, pois de maneira geral conseguimos demonstrar que em determinadas condições a SV apresenta potencial para bioestimular células com fenótipo de odontoblasto em cultura.

Quando as células MDPC-23 foram cultivadas em contato direto com SV, foi possível concluir que, em curtos períodos esta droga foi citocompatível, desde que não houve diferença significativa na viabilidade celular em relação ao controle negativo para ambas as concentrações da droga testada. Na presença de SV, a atividade de ALP apresentou-se aumentada em relação ao controle negativo no período de 5 dias, demonstrando uma aceleração no processo de maturação celular, já que as células do grupo controle apresentaram pico de atividade aos 7 dias. Os maiores valores foram observados para os grupos tratados com SV por 24 horas, sendo em torno de 172,1% e 154,9% para SV 0,01 e 0,1 μM , respectivamente. Aumento na deposição de matriz mineralizada foi observado aos 14 dias para ambas as concentrações de SV testadas, sendo detectado acréscimo de 82,4% a 30,4% em relação ao controle, com exceção para o grupo no qual as células foram tratadas de maneira contínua com 0,1 μM de SV. Resultados obtidos em estudos laboratoriais prévios demonstraram que baixas concentrações de SV (0,01 a 0,1 μM) foram compatíveis com células pulpares humanas em cultura, mesmo quando estas foram submetidas ao tratamento contínuo por até 5 dias (Jia et al.³⁷, 2016; Karanxha et al.³⁸, 2013; Saewong et al.⁵⁸, 2013). Em contrapartida, Okamoto et al.⁵⁴ (2009) relataram que concentrações de SV superiores a 1 μM , quando aplicadas sobre células tronco mesenquimais provenientes do tecido pulpar de dentes humanos, inibiram a formação de fibras de actina, bem como interferiram na progressão do ciclo celular regulado pela ativação de Rho mediada pela via do mevalonato.

Sabe-se que para cada célula existe um limiar de citocompatibilidade à exposição de qualquer agente (Min et al.⁴⁷, 2010; Okamoto et al.⁵⁴, 2009; Saewong et al.⁵⁸, 2013), podendo a expressão fenotípica ser reduzida quando a concentração

e/ou tempo de exposição à droga ultrapassa o limiar crítico que mantém a capacidade da célula de se manter viável (Karaxha et al.³⁸, 2013; Saewong et al.⁵⁸, 2013). Já foi demonstrado que a SV em concentrações específicas (0,01 a 1 μM) é capaz de acelerar a expressão de marcadores do processo de síntese de matriz óssea/dentinária em hDPSCs, tais como ALP, OCN, OPN, Runx-2, Osx, DSP e DMP-1 (Karaxha et al.³⁸, 2013; Lee et al.⁴³, 2012; Okamoto et al.⁵⁴, 2009), sendo este processo relacionado com a ativação da via ERK1/2 (Karaxha et al.³⁸, 2013). Jia et al.³⁷ (2016), Lee et al.⁴³ (2012) e Min et al.⁴⁷ (2010) demonstraram aumento na formação de matriz mineralizada quando células pulpares humanas foram tratadas continuamente por 14 dias com 1 μM de SV. Okamoto et al.⁵⁴ (2009) também relataram aumento na formação de tecido mineralizado quando células hDPSCS foram tratadas continuamente com 0,1 μM de SV por 7 dias e então transplantadas para o tecido subcutâneo de ratos imunocomprometidos. Pullissar et al.⁵⁶ (2013), por sua vez, observaram aumento na deposição de cálcio após tratamento contínuo de osteoblastos humanos, pelo tempo de 20 dias, com 10 μM de SV. No presente estudo, dentre os grupos tratados com SV, aqueles submetidos à exposição de 0,01 e 0,1 μM pelos períodos de 24 e 72 horas apresentaram aumento significativo na formação de nódulos de mineralização, determinando que baixas concentrações desta droga, quando aplicadas por curtos períodos de tempo sobre células odontoblastóides MDPC-23, resultam em importante bioestimulação. Yamashita et al.⁸² (2008) demonstraram que o tratamento de células tronco pluripotentes de ratos por 48 horas com 10 μM de SV foi capaz de induzir a diferenciação osteogênica, levando ao aumento na atividade de ALP pelas células. Desta maneira, parece evidente que diferentes concentrações de SV pode bioestimular a formação de matriz mineralizada, dependendo do modo de aplicação e do tipo de célula exposta a esta droga. Assim, baseado nos resultados do presente estudo, bem como de pesquisas anteriores, é possível sugerir que baixas concentrações de SV, além de seguras e citocompatíveis, também são capazes de bioestimular células com fenótipo de odontoblastos no processo de formação de matriz mineralizada.

Diante do potencial bioativo da SV sobre células pulpares *in vitro*, o emprego desta droga como coadjuvante no capeamento pulpar tem sido proposta na literatura. Estudos *in vivo* foram realizados por meio da aplicação direta da SV sobre o tecido pulpar mecanicamente exposto, com o objetivo de promover o processo de dentinogênese reparadora, com consequente deposição de barreira mineralizada

(Asl Aminabadi et al.¹, 2013; Jia et al.³⁷, 2016). Num trabalho relativamente recente, Asl Aminabadi et al.¹ (2013) demonstraram que concentrações de 1 a 5 μM de SV estimularam a formação de barreira mineralizada no tecido pulpar de dentes decíduos. Porém, os autores relataram que menores concentrações de SV induziram maior deposição de matriz dentinária e causaram menor reação inflamatória na região da ferida pulpar. Jia et al.³⁷ (2016) demonstraram que a aplicação de uma esponja de gelatina contendo 1 μM de SV promoveu regeneração da dentina em 85,8% das amostras de polpas de cães submetidas à pulpotomia, enquanto que a esponja de gelatina isoladamente apresentou sucesso em apenas 47,3% das amostras. Por outro lado, Stein et al.⁷⁰ (2005) observaram que apenas uma única aplicação de 0,5 mg de SV incorporada a um gel de metilcelulose sobre a região supraperioosteal da mandíbula de ratos estimulou a formação óssea no local, associada a menor reação inflamatória comparada a doses mais elevadas desta mesma droga. Apesar dos interessantes e promissores resultados observados quando a SV foi aplicada sobre polpas expostas, ainda não havia estudos na literatura que avaliaram o possível potencial bioativo transdentinário desta droga. Assim, na presente pesquisa pudemos demonstrar que a SV diluída em solução alcoólica é capaz de se difundir através da estrutura dentinária com 0,1 mm de espessura; no entanto, a dentina proporcionou retenção de cerca de 95,8% a 99,0% da SV, mesmo quando tratada com EDTA 0,5 N para remoção da smear layer, sendo o porcentual de difusão da SV proporcional à permeabilidade dentinária. Desta forma, quatro concentrações de SV (0,1, 0,5, 1,0 e 2,5 mg/mL) foram inicialmente selecionadas para avaliar o potencial da SV em bioestimular as células MDPC-23 via transdentinária. O etanol 100% foi escolhido como veículo da SV para esta análise, visto que estudos prévios demonstraram que a aplicação deste solvente sobre discos de dentina com 0,4 mm de espessura não causou danos às células MDPC-23 in vitro (Bianchi et al.⁶, 2013). Em estudo in vivo realizado em pré-molares humanos, a aplicação do etanol 100% não resultou em danos ao complexo dentino-pulpar quando o procedimento foi realizado em cavidades com espessura de remanescente dentinário inferior a 0,5 mm (Scheffel et al.⁶², 2015). Ainda, o etanol é amplamente empregado nos primers de sistemas adesivos como solvente de fácil e rápida volatilização (Bianchi et al.⁶, 2013). Assim, no presente estudo, a SV foi diluída em etanol 100% e aplicada ativamente na superfície da dentina, seguido de volatilização do etanol com um leve jato de ar, com o objetivo de incorporar uma

camada de SV na superfície dos discos para promover sua difusão transdentinária. O pré-tratamento do substrato dentinário com EDTA 0,5 N por 30 segundos foi realizado na presente pesquisa devido ao fato deste procedimento promover a remoção da smear layer presente na embocadura dos túbulos dentinários, sem, contudo, ampliar seu diâmetro (Sauro et al.⁶¹, 2010). Desta maneira, constatamos que nenhuma das concentrações de SV testadas causaram danos à viabilidade das células MDPC-23, sendo que as concentrações de 1,0 e 2,5 mg/mL promoveram aumento significativo na atividade de ALP e na deposição de nódulos de mineralização em relação ao controle negativo.

Baseado nos resultados do experimento prévio, as concentrações de 1,0 e 2,5 mg/mL de SV foram selecionadas para os estudos subsequentes, onde avaliou-se o efeito bioestimulador da SV sobre a superfície dentinária condicionada ou não com EDTA 0,5 N. Nesta análise, observamos que o pré-tratamento da dentina com sinvastatina tratada ou não com EDTA não causou efeito citotóxico sobre as células odontoblastoides MDPC-23 comparado ao controle negativo nos períodos de análise de 1 e 5 dias, confirmando estudos prévios sobre células pulpares humanas em cultura (Jia et al.³⁷, 2016; Karanxha et al.³⁸, 2017; Saewong et al.⁵⁸, 2013). Apesar do EDTA e da SV isoladamente não reduzirem de modo significativo a viabilidade celular, os grupos nos quais a dentina foi tratada previamente com EDTA seguido da aplicação de 2,5 mg/ml de SV, redução da proliferação celular comparado ao grupo controle negativo foi observado, visto que valores significativamente inferiores ao CN foram detectados nestes grupos experimentais aos 14 dias. Jia et al.³⁷ (2016) e Okamoto et al.⁵⁴ (2009) observaram redução da viabilidade de células pulpares humanas após 5 dias de tratamento contínuo com 1 μ M SV comparado ao grupo controle negativo; em contrapartida, os autores demonstraram aumento na expressão de marcadores específicos do processo de síntese e deposição de matriz mineralizada sob estas mesmas condições. Resultado similar foi observado no presente estudo, desde que os maiores valores de atividade de ALP e deposição de nódulos de mineralização foram observados para a associação EDTA + SV 2,5 mg/mL. Desse modo, parece que a bioatividade sobre as células pulpares possa estar associada também com uma redução na proliferação celular em períodos tardios. Isto poderia ser confirmado por estudos anteriores, onde pesquisadores observam que células em processo de diferenciação apresentam redução na sua capacidade proliferativa em períodos tardios (Baek et al.³, 2005; Kupcsik et al.⁴⁰,

2009). Com relação ao tratamento prévio da dentina com EDTA, os valores de atividade de ALP e deposição de matriz mineralizada foram maiores quando o EDTA foi empregado, para ambas as concentrações de SV; no entanto, apenas a SV 2,5 mg/mL, associada ou não ao EDTA, resultou em valores significativamente superiores ao controle negativo e ao tratamento com EDTA ou EDTA + etanol, para ambos os parâmetros testados. Desta forma, a concentração de 2,5 mg/mL de SV foi selecionada para realização dos experimentos subsequentes com aplicação de CIV convencional Ketac Molar (3M ESPE), de forma a simular o procedimento de forramento cavitário.

O CIV, também conhecido como cimento polialcenoato de vidro, é formado a partir de uma reação aquosa entre o ácido poliacrílico e o vidro de fluórsilicato de alumínio (Sidhu et al.⁶⁴, 2016). Apesar de apresentar muitas das propriedades de um forrador cavitário ideal, este material isoladamente não estimula a formação de dentina terciária, conforme observado por estudos histopatológicos realizados em dentes humanos, onde cavidades profundas foram forradas com este tipo de material (Costa et al.¹³⁻¹⁵, 2003, 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Six et al.⁶⁶, 2000; Soares et al.⁶⁷, 2016). Assim, a associação de técnicas que possam promover a bioatividade deste procedimento são altamente desejáveis e desta forma tem sido amplamente estudadas (Ferracane et al.²⁶, 2010). O pré-tratamento da dentina com SV sob as diferentes condições experimentais, associado à aplicação do CIV como forrador cavitário, também não causou efeito citotóxico sobre as células MDPC-23 comparado ao controle negativo. Leve redução na atividade de ALP e na deposição de nódulos de mineralização em relação ao controle foi observado quando o CIV foi aplicado sobre os discos com 0,1 mm de espessura. Ao avaliar a citotoxicidade sobre células MDPC-23 de extratos resultantes do contato direto de diferentes CIVs em meio de cultura, de Souza Costa et al.¹⁹ (2003) demonstraram uma redução de 42,5% do metabolismo celular e de 32,5% do número de células aderidas para o grupo Ketac Molar (3M, ESPE) em relação ao controle negativo. Apesar da morfologia das células se mostrarem similar ao visualizado no controle negativo, os resultados desse estudo sugerem que altas concentrações de componentes citotóxicos foram lixiviados do CIV e que estes induziram um efeito citopático sobre as células MDPC-23 em cultura. Além disso, o baixo pH do CIV nas primeiras 24 horas após a manipulação do material também pode estar associado a esse efeito supressor para as células (Ben-Amar et al.⁴, 1999; Camilleri et al.⁹, 2008). Já foi

demonstrado que concentrações de íons Al, Zn e F a cima de 1 mM apresentam efeito citotóxico sobre células pulpres humanas (Stanislawski et al.⁶⁹, 1999). Quando aplicado diretamente sobre polpa expostas, os CIVs promovem inflamação crônica não reversível no tecido pulpar, a qual é atribuída, pelo menos em parte, à incapacidade das células de defesa em fagocitar as partículas de vidro deste material, sendo o mesmo contra-indicado para o capeamento pulpar direto (do Nascimento et al.²², 2000; Costa et al.¹⁴, 2003; Souza et al.⁶⁸, 2006). Em contrapartida, quando a aplicação do CIV é realizada sobre o assoalho de cavidades profundas (remanescente dentinário menor que 0,5 mm), não foi observado efeito tóxico importante no tecido pulpar de dentes humanos (Costa et al.^{14,15}, 2003; 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Soares et al.⁶⁷, 2016). Tem sido demonstrado que o substrato dentinário reduz consideravelmente a citotoxicidade dos materiais testados, sugerindo que este retarde ou mesmo limite a difusão transdentinária de componentes citotóxicos lixiviados do material (Gerzina, Hume,²⁸ 1994; Stanislawski et al.⁶⁹, 1999). Hume³⁵ (1994) demonstrou que essa ação protetora do substrato dentinário também pode estar relacionada à sua umidade, o que faz com que a dentina possa atuar na degradação hidrolítica de componentes tóxicos ou mesmo através da interação química deste tecido dentário tubular com os componentes dos materiais. Assim, é possível sugerir que na presente pesquisa baixas concentrações de íons possam ter sido liberadas da superfície do CIV para se difundir via transdentinaria para causar algum dano celular ou até mesmo alterações na característica fenotípica das células MDPC-23. Por outro lado, observamos neste estudo laboratorial que a aplicação do CIV após condicionamento da dentina com EDTA e uso 2,5 mg/ml de SV, estimulou as células pulpres quanto a expressão dos marcadores de diferenciação testados. Este tratamento da dentina levou ao aumento na atividade de ALP em torno de 50% em relação ao controle negativo, e em torno de 73% em relação à aplicação do CIV associado ou não apenas ao EDTA. Conseqüentemente, aumento expressivo na deposição de matriz mineralizada foi observado, sendo em torno de 129% em relação ao controle, e em torno de 140% em relação aos grupos que receberam CIV em dentina não tratada com SV. Assim, consideramos que este protocolo inovador apresenta-se com uma técnica bastante promissora na indução na formação de dentina reacional em caso de cavidade bastante profunda, com espessura de remanescente dentinário na eminência de exposição pulpar.

Sabe-se que um importante fator que pode contribuir decisivamente para o insucesso do capeamento pulpar indireto é a falha em restabelecer a homeostasia do complexo dentinho-pulpar, seja por componentes citotóxicos lixiviados dos materiais forradores, ou mesmo por patógenos cariogênicos que liberam toxinas passíveis de alcançar a polpa via transdentinária e desencadear um processo inflamatório intenso e persistente (De Souza Costa et al.²¹, 2014). Pode-se ainda somar a isto, o fato destes materiais forradores contemporâneos não apresentarem potencial bioativo capaz de induzir uma resposta positiva das células pulpares presentes abaixo da cavidade (Costa et al.¹³⁻¹⁵, 2003, 2011; de Souza Costa et al.²⁰, 2007; Six et al.⁶⁶, 2000; Soares et al.⁶⁷, 2016). Dessa forma, o emprego de substâncias capazes de induzir rápida formação de matriz mineralizada quando aplicada sobre a superfície dentinária, associado a propriedades antimicrobianas contra patógenos envolvidos com o processo da cárie, seria bastante interessante com o objetivo de aumentar os índices de sucesso clínico do CPI. Estudos na literatura tem demonstrado que a SV, além de apresentar importantes propriedades bioativas sobre o processo de síntese e mineralização da matriz óssea/dentinária (Asl Aminabadi et al.¹, 2013; Jia et al.³⁷, 2016; Stein et al.⁷⁰, 2005), também tem comprovada atividade antimicrobiana (Bergman et al.⁵, 2011; Haeri et al.²⁹, 2015; Macreadie et al.⁴⁵, 2006), porém em concentrações distintas para cada uma dessas finalidades. Haeri et al.²⁹ (2015) demonstraram que 1,0 mg/ml de SV exibiu atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Outro estudo, por sua vez, avaliou o efeito antibacteriano da SV contra patógenos primários do trato respiratório, sendo que os autores observaram que o valor da concentração inibitória mínima desta droga sobre *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* foi de 15 mg/ml (Bergman et al.⁵, 2011). Macreadie et al.⁴⁵ (2006) avaliaram o efeito antifúngico da SV contra *Aspergillus fumigatus* e cinco espécies de *Candida*, observando que uma concentração de 1000 µM foi capaz de inibir o crescimento de todas as espécies selecionadas para o estudo. Corroborando com esses estudos prévios que afirmam o potencial antimicrobiano dessa droga, nossos resultados demonstraram que as concentrações de SV de 1,0 e 2,5 mg/ml inibiram o crescimento de *S. mutans* e *L. acidophilus*, ratificando seu amplo espectro de ação e possível aplicabilidade terapêutica.

Na presente pesquisa, a inibição do crescimento bacteriano também foi avaliada para o etanol 100%, uma vez que a SV foi diluída neste solvente. Tem sido

demonstrado ação antimicrobiana do etanol contra diversas linhagens, como *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Eikenella corrodens* e *Candida albicans* (Vlachojannis et al.⁷⁶, 2015). Welsh et al.⁷⁹ (2009) também observaram ação antibacteriana desse solvente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* sensível e resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* suscetível e resistente à meticilina. Esses resultados confirmam os achados do presente estudo no qual foi possível observar ação antimicrobiana do etanol contra as cepas avaliadas, sugerindo que esse solvente possa estar atuando de modo sinérgico com SV nas suas concentrações testadas neste estudo.

Como esperado, o controle positivo usado neste estudo para avaliar a ação antimicrobiana da SV, representado pela Clorexidina a 2%, apresentou intenso efeito sobre as cepas usadas, o que corrobora com estudos anteriores (Bruschi et al.⁸, 2006, Cardoso et al.¹⁰, 2016, Hajifattahi et al.³⁰, 2016). A Clorexidina demonstrou melhor ação contra *L. acidophilus* em relação aos demais grupos experimentais da presente pesquisa, porém efeito similar foi encontrado contra *S. mutans* quando comparado com o grupo SV 2,5 mg/ml. Assim, a SV na concentração de 2,5 mg/ml, aplicada sobre o substrato dentinário de uma cavidade bastante profunda acometida pela doença cárie, pode surgir como um possível coadjuvante no protocolo de forramento cavitário, atuando em duas vias distintas para o restabelecimento da homeostasia do complexo dentino-pulpar. A primeira via está relacionada com a ação antimicrobiana da SV, a qual, ao ser aplicada sobre uma dentina afetada por cárie, numa concentração tóxica para bactérias cariogênicas, poderia impedir que esses microrganismos e seus subprodutos viessem alcançar e danificar o tecido pulpar via transdentinária. A segunda via se refere à ação bioativa da SV, a qual, ao ser aplicada nessa mesma condição sobre a dentina poderia se difundir via transdentinária para bioestimular os odontoblastos a secretar, de forma rápida e efetiva, uma dentina reacional protetora. No entanto, estudos in vivo são necessários para validar estas hipóteses, visto que no presente estudo apenas estudos laboratoriais foram realizados.

Outra propriedade importante para a longevidade dos protocolos de CPI é a resistência de união entre o forrador cavitário e o remanescente dentário. O CIV, em particular, apresenta como uma de suas qualidades a união química com o substrato dentário, através de fortes ligações iônicas entre o Ca^{2+} do esmalte/dentina e grupos carboxílicos do ácido poliacrílico presente no material (Sidhu, Nicholson,⁶⁴ 2016).

Porém, alguns CIVs, incluindo o Ketac Molar, devem ser usados apenas após o pré-tratamento da dentina com uma substância passível de remover a smear layer e desmineralizar parcialmente a superfície dentária. Este condicionamento da dentina parece permitir uma união química mais estável, resultante de uma interação direta entre material e o substrato dentinário, bem como, com a finalidade de aumentar a área de superfície, proporcionando também união micro-mecânica na interface dente/ restauração (Sidhu, Nicholson,⁶⁴ 2016). Dentre os condicionadores dentinários mais utilizados estão o ácido poliacrílico e o EDTA (Youm et al.⁸³, 2015). O ácido poliacrílico é um ácido fraco que remove parcialmente a smear layer, liberando íons cálcio e fosfato na superfície da dentina para promover reação química com o material forrador cavitário (Broyles et al.⁷, 2013). Por outro lado, o EDTA é um agente quelante de cálcio, o qual apresenta pH neutro capaz de remover seletivamente a hidroxiapatita do tecido duro e da smear layer (Jacques, Hebling,³⁶ 2005). Observamos no presente estudo que os melhores resultados de resistência de união ocorreram para o grupo tratado previamente com EDTA 0,5 N e para o grupo pré-tratado com ácido poliacrílico 25 % (controle positivo selecionado de acordo com a técnica recomendada pelo fabricante do CIV usado neste estudo). Esses resultados confirmam dados científicos prévios, onde foi demonstrado que o pré-tratamento da dentina com EDTA (El-Askary, Nassif,²³ 2011; Fagundes et al.²⁴, 2009; Fahmy et al.²⁵, 2015; Kusunoki et al.⁴¹, 2010; Munirathinam et al.⁵¹, 2012; Prati et al.⁵⁵, 1992; Youm et al.⁸³, 2015) ou ácido poliacrílico (El-Askary, Nassif,²³ 2011; Prati et al.⁵⁵, 1992; Youm et al.⁸³, 2015) determina uma melhor resistência de união entre a dentina e o CIV, comparado ao grupo onde não se realizou o condicionamento do substrato dentinário. Entretanto, um estudo piloto conduzido ao longo do experimento (dados não incluídos), demonstrou que o pré-tratamento da superfície dentinária (espessura de 0,1 mm) com ácido poliacrílico a 25% quando aplicado conforme as recomendações do fabricante (Tabela 6) causou redução da viabilidade celular em torno de 30,6% sobre células MDPC-23 após 72 horas em contato com o extrato comparado ao grupo CN. Este efeito não foi observado para o EDTA, sendo este, portanto, selecionado, na presente pesquisa, como agente condicionador de dentina. Assim, apesar do ácido poliacrílico ser tão efetivo quanto o EDTA para promover uma melhor adesão do CIV Ketac Molar com a dentina, sua utilização em cavidades muito profundas pode contribuir para possíveis danos às células pulpares (Soares et al.⁶⁷, 2016).

Quando a SV foi associada ao pré-tratamento da superfície dentinária com EDTA 0,5 N, observamos no presente estudo que os valores de resistência de união foram equiparados ao grupo ausente de tratamento de superfície. Por outro lado, ao aplicar a SV sobre a dentina não condicionada, a resistência de união foi reduzida em relação aos demais grupos experimentais. Diante desses resultados, supõem-se que a camada de SV formada sobre a dentina possa se comportar de modo semelhante a smear layer, interferindo, de alguma maneira na união química entre o CIV e substrato dental. Na ausência de qualquer tratamento da superfície dentinária, a manutenção da smear layer juntamente com a presença desta substância hidrofóbica, dificultou ainda mais a interação entre o material forrador e a dentina (Munirathinam et al.⁵¹, 2012), levando a uma menor resistência de união comparado aos demais grupos experimentais.

Apesar da resistência de união à dentina ser uma importante propriedade para os materiais dentários, talvez essa propriedade não tenha tanta relevância em situações clínicas de eminência de exposição pulpar resultante da remoção mecânica da lesão de cárie (Czarnecka et al.¹⁶, 2007). Neste caso, estaremos diante de uma cavidade com um remanescente dentinário muito delgado, altamente permeável e com baixo conteúdo de cálcio (de Souza Costa et al.²¹, 2014), o que dificultaria, por si só, a adesão do CIV com a dentina subjacente. Diante da urgente necessidade em restabelecer as condições de normalidade e homeostasia do complexo dentino-pulpar, evitando dessa forma uma progressão do processo inflamatório que pode levar a necrose do tecido pulpar, as propriedades biológicas proporcionadas pelo uso da SV parece sobrepor as propriedades adesivas do CIV, especialmente em cavidades muito profundas. Além disso, é relevante ressaltar que a SV deve ser aplicada apenas sobre a superfície pulpar/axial da cavidade, uma vez que sua finalidade primordial seria difundir-se via transdentinária para bioestimular as células pulpares subjacentes. Consequentemente, as paredes circundantes da cavidade devem permanecer livres da aplicação dessa substância para permitir a formação da importante interface de união entre o CIV e a dentina.

Diante dos dados científicos já apresentados na literatura e dos relevantes e originais resultados obtidos na presente pesquisa, guardando as limitações desta ter sido realizada in vitro, parece interessante, neste momento, sugerir a inclusão da aplicação da SV no protocolo de forramento de cavidades muito profundas com o CIV Ketac Molar. Possivelmente, esta associação poderá melhorar a propriedade

antimicrobiana e conferir maior bioatividade do procedimento forrador com o complexo dentino-pulpar, particularmente em situações clínicas onde o remanescente dentinário entre a cavidade e a polpa é excessivamente delgado, requerendo o uso de materiais com importantes e definidas propriedades físicas, químicas e biológicas (de Souza Costa et al.²¹, 2014; Ferracane et al.²⁶, 2010). Dentro desta condição clínica, espera-se que ocorra uma lenta e contínua liberação de baixa concentração de SV, capaz de se difundir através dos túbulos dentinários, para então biostimular os odontoblastos. Assim, estas células pulpares que revestem internamente a dentina, poderão depositar dentina reacional na área da polpa relacionada com o assoalho cavitário, afastando este tecido conjuntivo sensível e especializado de possíveis efeitos nocivos futuros, causados por componentes tóxicos de materiais restauradores ou microrganismos e seus sub-produtos. No entanto, futuros estudos in vivo são necessários para que possamos verificar se os mesmos resultados promissores observados neste estudo laboratorial também se repetem nas condições clínicas específicas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo laboratorial é possível concluir que:

- A concentração de 0,01 μ M de sinvastatina, aplicada por 24 horas sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura, pode ser considerada citocompatível e bioestimuladora;
- Sinvastatina, na concentração de 1 mg/mL, é capaz de se difundir através da dentina com 0,1 mm de espessura, sendo a concentração liberada permeabilidade-dependente;
- A concentração de 2,5 mg/mL de sinvastatina, quando aplicada sobre dentina livre de smear layer, seguido do uso do CIV Ketac Molar, é capaz bioestimular, por via transdentinária, células odontoblastóides MDPC-23 em cultura;
- Sinvastatina, na concentração de 1,0 mg/ml e 2,5 mg/ml, apresenta ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*;
- A resistência de união ao microcisalhamento entre CIV Ketac Molar e dentina apresentou melhores valores quando sinvastatina a 2,5 mg/mL foi aplicada sobre a superfície dentinária livre de smear layer.

REFERÊNCIAS*

1. Asl Aminabadi N, Maljaei E, Erfanparast L, Ala Aghbali A, Hamishehkar H, Najafpour E. Simvastatin versus calcium hydroxide direct pulp capping of human primary molars: a randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013; 7 (1): 8-14.
2. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107 (3): 336-42.
3. Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci*. 2005; 20 (3): 438–44.
4. Ben-Amar A, Liberman R, Apatowsky U, Pilo R. pH changes of glass-ionomer lining materials at various time intervals. *J Oral Rehabil*. 1999; 26 (11): 847–52.
5. Bergman P, Linde C, Pütsep K, Pohanka A, Normark S, Henriques-Normark B, et al. Studies on the antibacterial effects of statins--in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e24394.
6. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdentinal cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dent Mater*. 2013; 29 (9): 980-90.
7. Broyles AC, Pavan S, Bedran-Russo AK. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Prosthodont* 2013; 22 (1): 59-62.
8. Bruschi ML, Lara EH, Martins CH, Vinholis AH, Casemiro LA, Panzeri H, et al. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006; 32 (2): 229-38.
9. Camilleri J, Montesin FE, Juszczak AS, Papaioannou S, Curtis RV, Donald FM, et al. The constitution, physical properties and biocompatibility of modified accelerated cement. *Dent Mater*. 2008; 24 (3): 341-50.
10. Cardoso JG, Iorio NL, Rodrigues LF, Couri ML, Farah A, Maia LC, et al. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol*. 2016; 65: 77-81.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>.

11. Chen PY, Sun JS, Tsuang YH, Chen MH, Weng PW, Lin FH. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res.* 2010; 30 (3): 191–9.
12. Cooper PR., Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010; 38 (9): 687-97.
13. Costa CA, Giro EM, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mater.* 2003; 19 (8): 739-46.
14. Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36 (12): 831-9.
Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater.* 2011; 27 (7): e158-70.
15. Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater.* 2011; 27 (7): e158-70.
16. Czarnecka B, Deregowska-Nosowicz P, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Shear bond strengths of glass-ionomer cements to sound and to prepared carious dentine. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18 (5): 845-9.
17. Dai L, Xu M, Wu H, Xue L, Yuan D, Wang Y, et al. The functional mechanism of simvastatin in experimental osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2016; 34 (1): 23-32.
18. de Souza Costa CA, do Nascimento AB, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater.* 2002; 18 (7): 543-51.
19. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003; 24 (21): 3853-8.
20. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 81 (1): 175-84.
21. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30 (7): 769-84.

22. Do Nascimento AB, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CA. Biocompatibility of a resin-modified glass ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent.* 2000; 13 (1): 28-34.
23. El-Askary FS, Nassif MS. The effect of the pre-conditioning step on the shear bond strength of nano-filled resin-modified glass-ionomer to dentin. *Eur J Dent.* 2011; 5 (2): 150-6.
24. Fagundes TC, Toledano M, Navarro MF, Osorio R. Resistance to degradation of resin-modified glass-ionomer cements dentine bonds. *J Dent.* 2009; 37 (5): 342-7.
25. Fahmy SH, El Gendy AA, El Ashry SH. Dentin wettability enhancement for three irrigating solutions and their effect on push out bond strength of gutta percha / AH Plus. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7 (2): e237-42.
26. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology.* 2010; 98 (1): 2-14.
27. Foley J, Evans D, Blackwell A. Partial caries removal and cariostatic materials in carious primary molar teeth: a randomised controlled clinical trial. *Br Dent J.* 2004; 197 (11): 697-701.
28. Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentin on release of TEGMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994; 21 (4): 463–8.
29. Haeri MR, White K, Qharebeglou M, Ansar MM. Cholesterol suppresses antimicrobial effect of statins. *Iran J Basic Med Sci.* 2015; 18 (12): 1253-6.
30. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of *Punica granatum* Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. *Int J Biomater.* 2016; 2016: 8098943.
31. Hebling J, Ribeiro APD, de Souza Costa CA. Relação entre materiais dentários e o complexo dentino-pulpar. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18 (48): 1-9.
32. Hilton TJ. Can modern restorative procedures and materials reliably seal cavities? In vitro investigations. Part 1. *Am J Dent.* 2002; 15 (3): 198-210.
33. Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent.* 2009; 34 (5): 615-25.
34. Huang X, Huang Z, Li W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. *Mol Med Rep.* 2014; 9 (6): 2152-8.
35. Hume WR. Influence of dentine on the pulpward release of eugenol or acids from restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1994; 21(4): 469–73.

36. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater.* 2005; 21 (2): 103-9.
37. Jia W, Zhao Y, Yang J, Wang W, Wang X, Ling L, et al. Simvastatin promotes dental pulp stem cell-induced coronal pulp regeneration in pulpotomized teeth. *J Endod.* 2016; 42 (7): 1049-54.
38. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nör JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39 (1): 76-82.
39. Kim IS, Jeong BC, Kim OS, Kim YJ, Lee SE, Lee KN, et al. Lactone form 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) stimulate the osteoblastic differentiation of mouse periodontal ligament cells via the ERK pathway. *J Periodontal Res.* 2011; 46 (2): 204-13.
40. Kupcsik L, Meurya T, Flury M, Stoddart M, Alini M. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *J Cell Mol Med.* 2009; 13 (11): 4465-73.
41. Kusunoki M, Itoh K, Oikawa M, Hisamitsu H. Measurement of shear bond strength to intact dentin. *Dent Mater J.* 2010; 29 (2): 199-205.
42. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med.* 2000; 6 (12): 1399-402.
43. Lee SY, Min KS, Choi GW, Park JH, Park SH, Lee SI, et al. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2012; 38 (3): 405-10.
44. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 89-118.
45. Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 262 (1): 9-13.
46. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280 (3): 874-7.
47. Min KS, Lee YM, Hong SO, Kim EC. Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36 (3): 447-52.
48. Mitra SB, Lee CY, Bui HT, Tantbirojn D, Rusin RP. Long-term adhesion and mechanism of bonding of a paste-liquid resin-modified glass-ionomer. *Dent Mater.* 2009; 25 (4): 459-66.

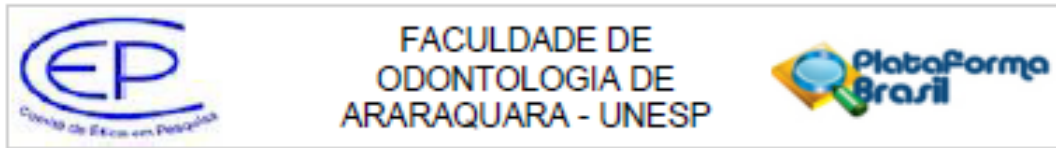
49. Miyazawa A, Matsuno T, Asano K, Tabata Y, Satoh T. Controlled release of simvastatin from biodegradable hydrogels promotes odontoblastic differentiation. *Dent Mater J*. 2015; 34 (4): 466-74.
50. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999; 286 (5446): 1946–9.
51. Munirathinam D, Mohanaj D, Beganam M. Efficacy of various cleansing techniques on dentin wettability and its influence on shear bond strength of a resin luting agent. *J Adv Prosthodont*. 2012; 4 (3): 139-45.
52. Nishimoto-Hazuku A, Hirase T, Ide N, Ikeda Y, Node K. Simvastatin stimulates vascular endothelial growth factor production by hypoxia-inducible factor-1 α upregulation in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51 (3): 267–73.
53. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*. 2007; 104 (4): 384-6.
54. Okamoto Y, Oshima M, Tsuchimoto Y, Matsuka Y, Yasuda T, Shi S, et al. Simvastatin Induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *J Endod*. 2009; 35 (3): 367-72.
55. Prati C, Montanari G, Biagini G, Fava F, Pashley DH. Effects of dentin surface treatments on the shear bond strength of Vitrabond. *Dent Mater*. 1992; 8 (1): 21-6.
56. Pullisaar H, Tiainen H, Landin MA, Lyngstadaas SP, Haugen HJ, Reseland JE, et al. Enhanced in vitro osteoblast differentiation on TiO₂ scaffold coated with alginate hydrogel containing simvastatin. *J Tissue Eng*. 2013; 26 (4): 1-12.
57. Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, Brinchmann JE, Ostrup E. Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 447 (1): 139-44.
58. Saewong S, Thammasitboon K, Wattanaroonwong N. Simvastatin induces apoptosis and disruption of the actin cytoskeleton in human dental pulp cells and periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2013; 58 (8): 964-74.
59. Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao JK, Node K, Izumi Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *J Dent Res*. 2006; 85 (6): 520-3.
60. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J*. 2013; 46 (1): 3-19.

61. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater.* 2010; 26 (4): 368-79.
62. Scheffel DL, Sacono NT, Ribeiro AP, Soares DG, Basso FG, Pashley D, et al. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. *J Dent.* 2015; 43 (5): 537-45.
63. Schuurs AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16 (6): 240-50.
64. Sidhu SK, Nicholson JW. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. *J Funct Biomater.* 2016; 7 (3): 1-15.
65. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res.* 2011; 23 (3): 340-5.
66. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent.* 2000; 28 (6): 413-22.
67. Soares DG, Basso FG, Scheffel DL, Giro EM, de Souza Costa CA, Hebling J. Biocompatibility of a restorative resin-modified glass ionomer cement applied in very deep cavities prepared in human teeth. *Gen Dent.* 2016; 64 (4): 33-40.
68. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22 (9): 838-44.
69. Stanislowski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48 (3): 277-88.
70. Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005; 76 (11): 1861-70.
71. Taifour D, Frencken J E, Beiruti N, Van't Hof MA, Truin G J. Effectiveness of glass-ionomer (ART) and amalgam restorations in the deciduous dentition: results after 3 years. *Caries Res.* 2002; 36 (6): 437-44.
72. Tanigo T, Takaoka R, Tabata Y. Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release.* 2010; 143 (2): 201-6.
73. Tyas MJ. Clinical evaluation of glass-ionomer cement restorations. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14 Suppl: 10-13.
74. Van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, Van Hinsbergh VW. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation.* 2000; 102 (23): 2803-9.

75. Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39 (6): 806-12.
76. Vlachojannis C, Chrubasik-Hausmann S, Hellwig E, Al-Ahmad A. A preliminary investigation on the antimicrobial activity of Listerine®, its components, and of mixtures thereof. *Phytother Res.* 2015; 29 (10): 1590-4.
77. Wadagaki R, Mizuno D, Yamawaki-Ogata A, Satake M, Kaneko H, Hagiwara S, et al. Osteogenic induction of bone marrow-derived stromal cells on simvastatin-releasing, biodegradable, nano- to microscale fiber scaffolds. *Ann Biomed Eng.* 2011; 39 (7): 1872-81.
78. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater.* 2012; 28 (1): 23-40.
79. Welsh AM, Kruger P, Faoagali J. Antimicrobial action of atorvastatin and rosuvastatin. *Pathology.* 2009; 41 (7): 689-91.
80. Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16 (2): 129-38.
81. Xu J, Liu X, Chen J, Zacharek A, Cui X, Savant-Bhonsale S, et al. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296 (3): C535-43.
82. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol.* 2008; 196 (3): 601-13.
83. Youm SH, Jung KH, Son SA, Kwon YH, Park JK. Effect of dentin pretreatment and curing mode on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Adv Prosthodont.* 2015; 7 (4): 317-22.

ANEXO

ANEXO A - Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bioestimulação de células pulpares pela adição de sinvastatina em cimentos de ionômero de vidro

Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa

Área Temática:

Versão: 3

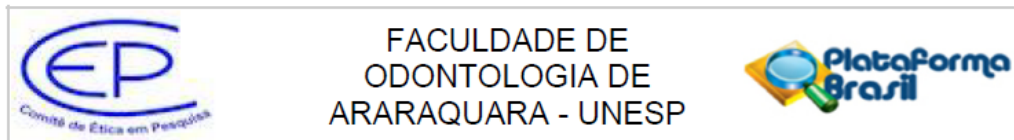
CAAE: 51908415.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.459.469



Continuação do Parecer: 1.459.469

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 21 de Março de 2016

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 23 de Fevereiro, de 2017

MARIA LUÍSA DE ALENCAR E SILVA LEITE