

SYLVIA BICALHO RABELO

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO
GÊNICA EM CÉLULAS DA POLPA DENTAL HUMANA
SENSIBILIZADAS POR CIMENTOS ENDODÔNTICOS**



2012

SYLVIA BICALHO RABELO

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM
CÉLULAS DA POLPA DENTAL HUMANA SENSIBILIZADAS POR
CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos, SP

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

R112c Rabelo, Sylvia Bicalho

Citotoxicidade, genotoxicidade e expressão gênica em células da polpa dental humana sensibilizadas por cimentos endodônticos / Sylvia Bicalho Rabelo. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
110.f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo.

1. Cimentos endodônticos. 2. Mineralização óssea. 3. RT-PCR em tempo real. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 17 de Outubro de 2012 .

Assinatura :

E-mail: sylvia.rabelo@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Marcia Sampaio Campos

Faculdade de Odontologia de Taubaté

UNITAU – Universidade de Taubaté

Prof. Dr. Cácio de Moura Netto

Faculdade de Odontologia de São Paulo

UNIP – Universidade Paulista

São José dos Campos, 14 de setembro de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, porque no momento em que conheci vocês, entendi o amor. A estrelinha que brilha em vocês ilumina meu coração. Que Deus abençoe vocês.

Ao meu marido, **Renato Cunha Rabelo**, companheiro e amigo de todos os momentos; meu grande amor. Que a paciência de espera exercitada nos momentos de minha ausência possa ser recompensada em vivermos juntos o hoje e o amanhã. Te amo.

Aos meus pais, **Neiva Lemos Bicalho** e **Adezílio Bicalho Filho**. A presença de vocês ao meu lado a cada passo que dou, com carinho e suporte, me traz a certeza na vida. Obrigada por terem me doado o que existe de mais precioso na vida, o tempo. Amo vocês.

À Deus, por trazer vida ao meu ser, confortar meu coração e engrandecer a minha alma.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por terem estado comigo em todos os momentos. A certeza do amor de vocês me ajuda a seguir cada passo. Amo vocês.

Aos amigos que me acompanham, obrigada pelo incentivo de seguir em frente diante das dificuldades.

Aos colegas da pós-graduação, em cada degrau agradeço a ajuda de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, obrigada por me acompanhar e guiar durante os últimos anos. Agradeço a orientação do caminho a seguir.

À Prof. Tit. Márcia Carneiro Valera, obrigada pelos pequenos comentários que se tornaram grandes conselhos. Agradeço à Sra. por ter me guiado e facilitado o caminho para que eu pudesse avançar mais um passo.

Ao Prof. Dr. Bruno Cavalcanti, obrigada pelas trocas de informação e discussões técnicas que me ajudaram a responder muitos questionamentos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da UNESP.

À Profa. Dra. Samira Esteves Camargo, agradeço o auxílio na realização de diversas etapas deste trabalho.

À Renata Falchete, obrigada por ter sido grande companheira de laboratório durante os experimentos de PCR e Imuno.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Bolsa de Doutorado e reserva técnica, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da UNESP e aos seus funcionários.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite em participar e dispendido seu tempo na análise deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE QUADROS E TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Cultura de Células primárias	34
4.1.1 Subcultivo das células primárias	36
4.1.2 Morfologia das células primárias	37
4.1.3 Detecção de proteínas das células primárias	38
4.1.3.1 Caracterização por imunohistoquímica das células primárias.....	38
4.1.3.2 Caracterização por imunofluorescência das células primárias.	40
4.1.3.3 Detecção da fosfatase alcalina das células primárias.....	41
4.1.4 Curva padrão de crescimento celular	42
4.2 Preparo do meio condicionado com os cimentos endodônticos	43
4.3 Avaliação da citotoxicidade	45
4.4 Ensaio de Micronúcleo	47
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Retro-Transcrição (RT-PCR em Tempo Real)	49
4.5.1 Obtenção das Amostras	49
4.5.2 Delineamento dos oligonucleotídeos	52
4.5.3 Eficiência das reações	54

4.5.4 Quantificação Relativa	57
5 RESULTADOS	60
5.1 Cultura de células primárias	60
5.1.1 Subcultivo das células primárias	60
5.1.2 Morfologia das células primárias	62
5.1.3 Detecção de proteínas das células primárias	63
5.1.3.1 Caracterização por imunohistoquímica das células primárias ...	64
5.1.3.2 Caracterização por imunofluorescência das células primárias.....	65
5.1.3.3 Detecção da fosfatase alcalina das células primárias.....	67
5.1.4 Curva padrão de crescimento celular	68
5.2 Avaliação da Citotoxicidade	69
5.3 Ensaio de Micronúcleo	74
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Retro-Transcrição (RT-PCR em Tempo Real)	77
5.4.1 Obtenção das Amostras	77
5.4.2 Eficiência das Reações	78
5.4.3 Quantificação Relativa	85
6 DISCUSSÃO	91
6.1 Cultura de células primárias	91
6.2 Preparo dos extratos	92
6.3 Citotoxicidade dos cimentos	93
6.4 Ensaio de Micronúcleo	96
6.5 Quantificação Relativa	97
7 CONCLUSÃO	102
8 REFERÊNCIAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen) utilizado para cultura de células primárias da polpa dental humana	35
Figura 2 - Frasco com área de crescimento de 75 cm ² contendo 10ml de meio de cultura celular	36
Figura 3 - Cimento endodôntico acondicionado sobre a área total do fundo dos poços da placa, sendo recoberto por meio de cultura DMEM-F12	43
Figura 4 - Placa de cultura celular de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), contendo 8x10 ³ células em 200µl de meio de cultura por poço, para verificação da citotoxicidade dos cimentos pelo ensaio de MTT(<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> , Sigma-Aldrich Brasil LTDA)	45
Figura 5 - Placas em triplicata contendo amostras após deposição de 100µl de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) por poço durante o ensaio de MTT. Cada placa contém 4 espécimes por diluição, sendo n _{total} =12 em cada diluição, para cada cimento endodôntico	47
Figura 6 – Cultura celular sobre lâminas de vidro, para teste de micronúcleo	48
Figura 7 – Células da cultura primária da polpa dental; Cultivo em placa de 6 poços, material de extração de RNA e NanoDrop 2000	

(Thermo Fisher Scientific Inc.,Wilmington, USA) para quantificação do RNA das células de cultura primária da polpa dental	51
Figura 8 – Tratamento das amostras com Dnase I e EDTA, seguido de retrotranscrição com a utilização do kit SuperScript III, First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, USA)	52
Figura 9 - Sistema de detecção de Real Time PCR Line Gene K (Bioer Technology Hi-tech, Binjiang)	55
Figura 10 – Disposição das triplicatas durante a realização das Curvas de Eficiência	56
Figura 11 – Ilustração do esquema de comparação das triplicatas das amostras tratadas, utilizado nas reações de Quantificação Relativa	58
Figura 12 - Sequência de fases proliferativas das culturas (P1 a P4) ..	61
Figura 13 - Células do tipo fibroblastos provenientes de quinta passagem de cultura primária da polpa. Microscopia de fase (40X) ...	62
Figura 14 - Células do tipo fibroblastos provenientes de décima passagem de cultura primária. Microscopia de fase (40X)	63
Figura 15 – Detecção da Osteocalcina presente nos fibroblastos de cultura primária da polpa (Microscopia óptica, 20X e 40X)	64
Figura 16 – Ausência da citoqueratina nos fibroblastos de cultura primária da polpa dental (Microscopia óptica, 20X e 40X)	65

Figura 17 – Imunofluorescência de anticorpo para osteocalcina conjugado ao FITC nas células de quinta passagem de cultura primária da polpa dental. As imagens A1 e B1 mostram manchamento do citoplasma por FITC; as A2 e B2 mostram manchamento do núcleo por DAPI; A3 e B3 mostram imagens sobrepostas. C mostra Controle Negativo onde apenas o núcleo das células aparecem manchados por DAPI	66
Figura 18 - Presença da fosfatase alcalina nas células da quinta passagem da cultura primária da polpa dental humana revelada pelo método cromogênico utilizando o SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich Brasil LTDA). Microscopia de luz invertida (40X)	67
Figura 19 – Gráfico ilustrando proliferação das células de quinta passagem de cultura primária da polpa dental	68
Figura 20 – Comparação da citotoxicidade dos cimentos endodônticos nas diversas diluições. Os valores indicados são medianas com interquartis (25% e 75%)	71
Figura 21 – Comparação da citotoxicidade de cada cimento endodôntico em suas diluições seriadas. Os valores aparecem em medianas com interquartis (25% e 75%)	72
Figura 22 – Micronúcleos encontrados nas células de cultura primária da polpa após contato com extratos de cimentos endodônticos	75
Figura 23 – Curva padrão de eficiência do RUNX-2; série de diluições de 1:10 a 1:10000	78

Figura 24 – Curva padrão de eficiência da OC; série de diluições de 1:1 a 1:1000	79
Figura 25 – Curva padrão de eficiência do BMP-2; série de diluições de 1:10 a 1:1000	79
Figura 26 – Curva padrão de eficiência do OPN; série de diluições de 1:1 a 1:1000	80
Figura 27 – Curva padrão de eficiência da ALP; série de diluições de 1:1 a 1:100	80
Figura 28 – Curva padrão de eficiência do GAPDH; série de diluições de 1:10 a 1:10000	81
Figura 29 - Curva de <i>Melting</i> do RUNX-2	82
Figura 30 - Curva de <i>Melting</i> do BGLAP (OC)	82
Figura 31 - Curva de <i>Melting</i> do BMP-2	83
Figura 32 - Curva de <i>Melting</i> da OPN	83
Figura 33 - Curva de <i>Melting</i> da ALP.....	84
Figura 34 - Curva de <i>Melting</i> do GAPDH	84
Figura 35 - Comparação da quantificação relativa de expressão das amostras. Os valores indicam o número de vezes de expressão em relação ao controle não tratado normalizado em 1	87

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Composição dos cimentos endodônticos utilizados	44
Quadro 2 – Genes de interesse e descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em Tempo Real	54
Tabela 1 - Efeito dos extratos dos cimentos endodônticos na viabilidade de células de cultura primária da polpa dental, expressos em porcentagem relativa ao controle não tratado. Os valores indicados são médias, medianas e desvio padrões encontrados em cada diluição dos cimentos	73
Tabela 2 – Teste de Dunn 5% para as diluições dos extratos	73
Tabela 3 - Formação de micronúcleos pelo contato das células da quinta passagem de cultura primária da polpa dental humana com extratos dos cimentos endodônticos. Valores expressos em micronúcleos por 1000 células, indicando os valores das médias	76
Tabela 4 - Número de vezes que cada gene foi expresso em relação ao Controle (Calibrador normalizado em 1)	86

Rabelo SB. Citotoxicidade, genotoxicidade e expressão gênica em células da polpa dental humana sensibilizadas por cimentos endodônticos[tese] São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

O sucesso dos tratamentos endodônticos está relacionado ao correto diagnóstico das alterações pulpares, à qualidade do preparo biomecânico e da obturação dos canais radiculares, bem como à compatibilidade entre os cimentos obturadores com os tecidos adjacentes ao canal. Atualmente a busca de bom comportamento biológico destes cimentos se faz de extrema importância. O presente estudo teve como objetivo analisar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos extratos de três cimentos endodônticos e seus efeitos sobre a expressão dos genes BMP2, ALP, RUNX2, BGLAP, OPN e DMP1 em células da polpa dental humana. Foram utilizadas células primárias de tecidos pulpares de terceiro molar com rizogênese incompleta. Cimentos endodônticos foram depositados em placas de 24 poços e armazenados a 37°C por 6 h; cada espécime foi colocado em contato com 2,7 ml de meio de cultura (DMEM-F12) e as amostras foram incubadas por 24 h, a 37°C. Extratos originais (1:1) de cada material foram diluídos em série até 1:32 e analisados quanto a citotoxicidade pelo ensaio de MTT. Após a obtenção de uma diluição que não fosse extremamente tóxica e não interferisse demasiadamente na replicação celular (subdose), foi realizado o teste de micronúcleo para avaliação da genotoxicidade dos materiais. A expressão dos genes foi verificada por RT-PCR em tempo real, em 6, 12 e 24 h. O RNA total foi isolado e retrotranscrito. Os testes de citotoxicidade indicaram que a sobrevivência celular foi afetada pelos extratos na seguinte ordem: EndoREZ > AH Plus > RoekoSeal ≥ MTA. O EndoREZ propiciou o maior número de micronúcleos no ensaio de genotoxicidade. A quantificação relativa indicou que em 24 h, o AH Plus e o EndoREZ agiram de modo similar, aumentando a expressão da OPN e reduzindo a ALP; o RoekoSeal gerou expressão da OPN decrescente com o tempo de contato, reduziu a expressão ALP e do gene RUNX2. O MTA foi o material que menos interferiu, de maneira geral, na expressão dos genes de interesse.

Palavras-chave: Cimentos endodônticos. Mineralização óssea. RT-PCR em tempo real.

Rabelo SB. Citotoxicity, genotoxicity and gene expression in human dental pulp cells sensitized by endodontic sealers extracts [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

The success of endodontic therapy is related to the correct pulp and periapical alterations diagnosis; to the good biomechanical instrumentation and to the root canal sealing quality; to the compatibility between the endodontic sealers and the root canal surrounding tissues as well. Nowadays, the seeking for a sealer with good biological behavior is extremely important. The aim of this study was to analyze the cytotoxicity and the genotoxicity of three endodontic sealers and their effects on the expression of the genes BMP-2, ALP, RUNX2, BGLAP, SPP1 and DMP1 in human dental pulp cells. Primary cells from the 5th passage obtained from pulp tissue of third molar with incomplete rizogenesis were used in this study. Endodontic sealers were placed in 24 well plates and stored at 37°C for 6 hours. After that, each specimen was covered with 2.7 ml of cell culture media (DMEM-F12) and incubated afterwards at 37°C for 24 h. Original extracts (1:1) of each material were serially diluted up to 1:32 and the citotoxicity was analyzed by MTT assay. After obtaining extracts subdose, non very toxic or non interfering on cell replication, genotoxicity was evaluated by micronucleus test. The gene expression was accessed by Real Time RT-PCR, after extracts exposure of 6, 12 and 24 h. Total RNA was isolate and retrotranscribed. The citotoxicity test has showed that cell survival was affected in the following order: EndoREZ > AH Plus > Roeko Seal ≥ MTA. EndoREZ has caused the highest score in micronucleus assay. Relative quantification indicated that at 24 h, AH Plus and EndoREZ increased OPN and reduced ALP; RoekoSeal has caused decreasing OPN expression over time, and has also reduced ALP and RUNX2 expressions. In general, MTA has less interfered at genes expressions.

Key-words: *Endodontic sealers. Bone mineralization. Real time PCR.*

1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes nas diversas especialidades da Odontologia estão sendo direcionados para a busca de materiais que sejam bem tolerados pelo tecidos apicais, capazes de favorecer o prognóstico após um tratamento e que apresentem efeito antimicrobiano.

O sucesso dos tratamentos endodônticos aparece como consequência de diversos fatores: o diagnóstico correto pelo conhecimento da origem das alterações pulpares e periapicais; o grau de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares; a qualidade do preparo biomecânico e da obturação a ele subsequentes.

Entretanto, nada adiantaria seguir corretamente todas as etapas do tratamento e por fim concluir a obturação com um cimento endodôntico de baixa tolerância tecidual, que ocasionalmente propiciasse inflamação crônica persistente aos tecidos periapicais.

Um cimento endodôntico além de não citotóxico (ao menos a médio e longo prazos), deve ser bicompatível, permitindo o processo de reparação dos tecidos apicais circunvizinhos ao órgão dentário, favorecendo a eliminação bacteriana local ou até mesmo estimulando a reparação tecidual (Eldeniz et al., 2006; Eldeniz et al., 2007; Geurtsen, Leyhausen, 1997)

Existe hoje no mercado uma grande variedade de cimentos endodônticos disponibilizados para uso clínico. Estudos mostram divergências de opiniões com relação ao comportamento biológico dos diferentes cimentos endodônticos. Tais divergências talvez ocorram devido à própria particularidade de cada material empregado ou talvez pelas diferenças nas metodologias empregadas nos experimentos, sejam estes *in vitro*, *in vivo*, ou simulando situações clínicas (Hanks et al., 1996).

Dentre os cimentos citados em estudos previamente realizados, encontram-se o AH Plus (Dentsply De Trey, Germany), o RSA (RoekoSeal Automix, Colthene/Whaledent, Germany) e o EndoREZ (UltradentProductsInc,USA). O AH Plus contém como componente principal de sua formulação uma resina diepóxica, além de aminas que aceleram a reação de polimerização. O EndoREZ, por sua vez, é um cimento a base de resina dimetacrilato (UDMA) e o RoekoSeal, a base de óleo de silicone (Leonardo et al., 2008; Schweikl, Schmalz, 2000; Zmener et al., 2005).

Os níveis da expressão dos genes relacionados a mineralização tecidual como RUNX2 ("runt-related transcription factor 2"), osteocalcina (OC), proteína morfogenética óssea (BMP2), fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (SPP1) e proteína da matriz dentinária (DMP1), tem sido verificados em estudos anteriores onde concentrações subtóxicas de diversos agentes irritantes são colocados em contato com culturas celulares causando alterações na viabilidade e a proliferação celular, sem causar a apoptose ou morte de 100% das células (Galler et al., 2011; Rashid et al., 2003; Yasuda et al., 2008).

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos causados pelo contato da subdoses de alguns cimentos endodônticos (AH Plus, RoekoSeal e EndoREZ), com células provenientes das culturas da polpa de terceiro molar com rizogênese incompleta, através da análise da citotoxicidade, da genotoxicidade e da expressão de alguns genes envolvidos nos processos de diferenciação de osteoblastos, mineralização óssea e osteogênese: BMP2, ALP, RUNX2, BGLAP (OC), SPP1 (OPN) e DMP1 por RT-PCR em tempo real.

A hipótese deste estudo é que os materiais que contém componentes resinosos (AH Plus e EndoREZ) interfiram de forma negativa na expressão dos genes relacionados à mineralização, diferindo do cimento não resinoso RoekoSeal e do MTA Branco (Angelus, Paraná, Brasil).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Experimentos *in vitro* apontam a citotoxicidade de alguns cimentos atualmente utilizados na odontologia clínica. Dentre estes encontram-se o AH Plus (Dentsply De Trey, Germany), o RoekoSeal (RoekoSeal Automix, Colthene/Whaledent, Germany) e o EndoREZ (UltradentProductsInc,USA). Tal citotoxicidade parece variar com o decorrer do tempo de endurecimento e de contato entre a cultura celular, e o material em questão.

Schweikl e Schmalz (2000), verificaram o efeito citotóxico e genotóxico do AH Plus dependente da concentração do cimento, das pastas que o compoem, e também dependente da substância eluente (DMSO ou solução salina 0,9%). A ação mutagênica do AH Plus com formação de micronúcleos em células V79, fibroblastos de pulmão de *hamster* chinês, utilizando-se o DMSO como eluente foi observada imediatamente após a mistura e não mais após 24 h. Quando a solução salina 0,9% foi utilizada como eluente ao invés do DMSO, o efeito citotóxico observado imediatamente após a manipulação foi 100 vezes menor; tal toxicidade não esteve presente no tempo de 24 h após a mistura. Quando apenas a pasta B foi testada, no grupo onde o DMSO foi utilizado como eluente, o efeito citotóxico observado foi similar ao do AH Plus recém manipulado; no entanto, quando a solução salina foi utilizada, este efeito tóxico diminuiu em 10 vezes. O estudo menciona que foi preciso utilizar maior quantidade da pasta A para que se observasse o mesmo efeito causado pela pasta B no grupo do DMSO; ainda no caso da pasta A, nenhum efeito tóxico foi observado no grupo da solução salina.

Em 2002, Schwarze et al. investigaram a biocompatibilidade de diversos cimentos endodônticos a longo prazo; o

estudo foi desenvolvido *in vitro* por um período superior a 1 ano, com a utilização de raízes dentárias humanas preenchidas com N2, Apexit, Roeko Seal, AH Plus, Ketac Endo e *Endomethasone* associados a um cone de gutta-percha. Extratos foram obtidos imediatamente após a obturação, quando as raízes foram imersas por 24 h em 1,5 ml de água destilada suplementada com Gentamicina a 2%. A citotoxicidade foi verificada pelo teste de XTT em fibroblastos 3T3 imortalizados de ratos e em células da cultura primária do ligamento periodontal, expostas aos extratos por 52 semanas. O estudo indicou que apenas o N2 foi significativamente mais citotóxico do que os demais cimentos testados. Nenhum material apresentou toxicidade severa, mesmo logo após a manipulação, com exceção da *Endomethasone*, que gerou maior efeito citotóxico na décima semana do experimento. Tal fato ocorreu devido à presença de degradação do cimento no período mencionado.

Oztan et al. (2003) compararam a citotoxicidade relativa do AH Plus e do RSA (RoekoSeal Automix, cimento a base de silicone) através de MTT com observação da atividade enzimática mitocondrial e da viabilidade celular após a exposição de células L929 aos materiais por um período de 24, 48 e 72 h. O experimento sugere que o AH Plus e o RSA possuem níveis similares de citotoxicidade em fibroblastos de ratos, sendo que ambos os cimentos apresentaram baixa influência tóxica nas células durante o período experimental. O AH Plus permitiu que a viabilidade celular permanecesse em 108.83%, 72.75% e 66.92% após 24, 48 e 72 h, respectivamente, enquanto o RoekoSeal proporcionou níveis de sobrevivência celular de 101.58%, 86.95% e 89.42% nos mesmos períodos, tendo como referência o grupo controle não tratado.

Miletic et al. (2005) verificaram que o cimento AH Plus apresentou maior efeito tóxico sobre células do tipo HeLa (células de carcinoma cervical humano) e L929 (fibroblastos de ratos) uma hora após a mistura, bem como nas primeiras 24 a 48 h. Num período de 7 dias e 30 dias posterior à mistura, a exposição das células ao cimento não causou

maior destruição celular do que aquela previamente observada. Estes efeitos foram verificados nas duas linhagens celulares, sendo que o estudo não indicou diferenças significantes nas células viáveis do tipo HeLa e L929 com relação ao material utilizado e aos tempos observados. Por outro lado, o RoekoSeal (RSA) não mostrou citotoxicidade em nenhum destes períodos observados para os tipos celulares estudados, apresentando portanto melhor biocompatibilidade que o AH Plus.

Xu et al. (2010) compararam a citotoxicidade do Real Seal, da guta-percha, do núcleo de Real Seal e do AH Plus em células MG63 (*human osteoblast-like MG63 cells*) através de ensaios MTT e concluíram que o Real Seal foi mais tóxico para estas células do que o AH Plus. A Guta-percha mostrou boa biocompatibilidade, seguida do núcleo de Real Seal, que também exibiu nível aceitável de sobrevivência celular para que não fosse indicado como citotóxico. Amostras do AH Plus e o Real Seal foram confeccionadas com a utilização de tubos de teflon, onde os cimentos foram manipulados e armazenados em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 72 h. A guta-percha foi aquecida a 80°C, depositada nos tubos de teflon e depois mantida a 37°C. Após esterilização dos espécimes com ultravioleta, 5ml de meio de cultura foi colocado sobre eles, seguido de um período de incubação de 3 dias. Os extratos foram preparados com diluições de 100%, 50%, 25% e 12,5%. O estudo sugere que a maior citotoxicidade e a menor biocompatibilidade do Real Seal estiveram associadas a porcentagem relativamente alta de resinas contidas em sua formulação, bem como à falta de uma condição anaeróbia no decorrer do experimento, a qual seria necessária para a completa polimerização do cimento em questão.

Al-Hiyasat et al. (2010) compararam o efeito citotóxico de 4 cimentos endodônticos resinosos: AH Plus, a base de resina epóxica; EndoREZ, a base de metacrilato; Epiphany, um multimetacrilato; e o MetaSEAL, que é um cimento também a base de metacrilato. Os cimentos foram incubados em solução de PBS por uma semana a 37°C.

Os extratos foram então colocados em contato com fibroblastos C 3T3 e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de MTT em 48 h. O AH Plus foi o cimento que exibiu menor citotoxicidade, seguido do EndoREZ, o qual apresentou toxicidade moderada, do Epiphany que gerou uma citotoxicidade severa e do MetaSEAL, que foi o mais citotóxico dos cimentos testados.

Estudos relacionam a intensa citotoxicidade logo após a mistura de alguns cimentos, como o AH Plus por exemplo, com a presença de determinadas substâncias em sua formulação, utilizadas como aceleradores da polimerização dos mesmos (Schweikl, Schmalz, 2000; Schweikl et al., 1998).

Alguns estudos *in vivo* indicam uma destruição celular mais moderada, seguida da reparação tecidual quando tecidos vivos entram em contato com materiais obturadores de canal (Farhad et al., 2011; Leonardo et al., 2008; Scarparo et al., 2009; Zmener et al., 2005). Autores sugerem que a própria reação inflamatória local, associada aos mecanismos de processos de reparação tecidual natural após uma agressão, poderiam eliminar a toxicidade inicial do material. Assim, aquele material causador de danos teciduais *in vitro* não seria necessariamente tóxico *in vivo*.

Em 2005, Zmener et al. avaliaram histológica e histometricamente a reação do tecido ósseo ao EndoREZ contido em tubos implantados em tíbias de ratos Wistar machos e compararam os resultados com os obtidos em um grupo controle de ratos que tiveram tubos de silicone como implante. Após um período de 10 dias, verificou-se uma diferença significativa entre os grupos, sendo maior o número de células do infiltrado inflamatório e menor a quantidade de tecido ósseo reacional formado no grupo teste. Ao fim de 60 dias, o processo inflamatório inicial do grupo tratado foi resolvido, e não houve diferença significativa da quantidade de células contadas e do tecido ósseo reacional formado no grupo tratado comparado ao controle.

Souza et al. (2006) compararam a biocompatibilidade dos cimentos AH Plus, EndoREZ (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, USA) e Epiphany. Participaram do estudo 30 porcos Guinea, os quais receberam implantes intra-ósseos dos materiais em cada lado da região inferior da mandíbula e foram avaliados por 4 a 12 semanas. Os resultados da avaliação microscópica dos tecidos ósseos da região sugerem que a reação inflamatória causada pelo EndoREZ era severa, a reação causada pela AH Plus era moderada e o Epiphany foi o único dos três cimentos que apresentou biocompatibilidade intraóssea.

Um estudo de biocompatibilidade com os tecidos periapicais feito em cães por Leonardo et al. (2008) indicou que a deposição de tecido com completa mineralização na região apical num período de 90 dias foi maior no grupo que teve o elemento dentário obturado com o RoekoSeal do que no grupo onde foi utilizado o AH Plus para obturação. Nenhuma diferença entre os grupos com relação ao infiltrado inflamatório, espessamento do ligamento periodontal, reabsorção dentinária, cementária e óssea foi observada.

Scarparo et al. (2009) investigaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos aos cimentos EndoREZ (Ultradent Products Inc, USA), AH Plus e EndoFill (cimento este a base de óxido de zinco e eugenol), através do implante de tubos de polietileno contendo o material observado em animais. O estudo indicou que após 7, 30 e 60 dias, com relação ao infiltrado inflamatório celular, condensação fibrosa e formação de abscesso, o EndoREZ e o EndoFill provocaram inflamação mais intensa e duradoura do que o AH Plus; este último, por outro lado, mostrou uma diminuição da reação inflamatória com o passar do tempo. Somente o grupo controle mostrou redução significativa da inflamação no período de 60 dias. Em relação a formação de abscesso, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos nos diferentes tempos do estudo, embora esta tenha se mostrado reduzida com os cimentos EndoREZ e EndoFill. Todos os grupos apresentaram aumento na

espessura da camada fibrosa durante o estudo. Assim sendo, o experimento concluiu que nenhum dos materiais possuem características ideais de biocompatibilidade tecidual.

Gencoglu et al. (2009) compararam a toxicidade causada aos órgãos distantes por dois cimentos endodônticos: Guta Flow (Roeko, Coltene Whaledent, Langenau, Germany), o qual contém o RoekoSeal, e o EndoREZ (Ultradent Products Inc, South Jordan, USA). Estes autores avaliaram também a reação do tecido conjuntivo. Através de parâmetros histopatológicos, o estudo comparou o efeito dos dois cimentos com um cimento a base de Óxido de Zinco e Eugenol. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados e o estudo sugere que ambos os novos cimentos, Guta Flow e EndoREZ possuem níveis aceitáveis de toxicidade tecidual e biocompatibilidade.

Farhad et al. (2011) realizaram um estudo histopatológico em ratos *Wistar*, a fim de comparar a severidade da resposta inflamatória tecidual subcutânea causada por três cimentos endodônticos: o Epiphany, o AH Plus e o cimento Grossman nos períodos de 15, 30 e 60 dias. O estudo indicou que o cimento Grossman causou a resposta inflamatória mais severa para todos os grupos estudados, seguido pelo AH Plus, Epiphany e Grupo Controle. De modo geral, todos os grupos mostraram regressão da resposta inflamatória. O AH Plus bem como o Epiphany apresentaram compatibilidade tecidual similares, pois ambos causaram inflamação moderada em 15 dias e leve em 30 e 60 dias.

Oliveira et al. (2010) observaram melhora na biocompatibilidade do AH Plus com a adição de 5% de Hidróxido de Cálcio a este cimento. Uma análise histopatológica 14 dias após realização de implante subcutâneo de tubos de silicone preenchidos por AH Plus, em ratos, permitiu que os autores verificassem a presença de resposta inflamatória menos intensa quando o Hidróxido de Cálcio (5%) foi adicionado ao AH Plus.

Novas pesquisas tem surgido no intuito de buscar entendimento aos diversos resultados obtidos em testes de citotoxicidade. Tais investigações envolvem testes complementares com a verificação dos possíveis efeitos genotóxicos causados pelos cimentos endodônticos e avaliação de propriedades físicas dos mesmos (Camargo et al., 2009; Vasconcelos et al., 2011;). Estudos recentes estão sendo direcionados também para a busca de um material que seja antimicrobiano, capaz de favorecer o prognóstico no caso do tratamento com a utilização do material desenvolvido.

Silva (2011) comparou o efeito citotóxico de um cimento experimental da copaíba, do RoekoSeal, do AH Plus e do EndoREZ em diversas diluições. Através do ensaio de MTT, o estudo verificou que, após um período de endurecimento dos cimentos de 12 h seguidos de exposição da cultura aos extratos por 24 h, tanto o AH Plus como o EndoREZ apresentaram efeitos citotóxicos altos em fibroblastos de hamster chinês (V79). O RoekoSeal, no entanto, apresentou-se biocompatível pois os resultados mostraram valores semelhantes ao controle não tratado. O AH Plus e o cimento experimental da Copaíba apresentaram-se tóxicos somente no extrato original 1:1 e na diluição 1:2. O EndoREZ, por sua vez, induziu citotoxicidade em todas as diluições testadas, sendo considerado significativamente mais citotóxico que os demais cimentos. A genotoxicidade foi verificada neste estudo pela formação de micronúcleos; os resultados indicaram que, dentre os cimentos testados, apenas o EndoREZ foi capaz de induzir formação de micronúcleo, gerando um número de micronúcleos quase 1,5x maior que o controle positivo EMS, apresentando-se altamente genotóxico.

Um experimento recente realizado em 2011 por Willershausen et al. comparou além da citotoxicidade, o efeito antimicrobiano de 4 cimentos endodônticos: GuttaFlow, EndoSequence BC, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus Jet. Após um período de 72 h e de 96 h, o GuttaFlow e o EndoSequence BC não foram citotóxicos, tendo

sido considerados biocompatíveis, mas não apresentaram efeito antimicrobiano em *E. faecalis*, enquanto o Pulp Canal Sealer EWT e o AH Plus Jet causaram significativa diminuição na proliferação celular, embora estes últimos tenham exercido forte efeito antimicrobiano em *P. micra*.

Oliveira et al. (2011) verificaram a presença de infiltrado microbiano após a obturação com diversos cimentos endodônticos; dentre eles, estavam o AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Active GP, Endofill, além de dois cimentos a base de MTA: o Endo CPM Sealer e o MTA Sealer. Após instrumentação endodôntica, dentes humanos previamente esterelizados foram obturados com guta percha associada a um dos cimentos testados ou com o sistema Epiphany/Resilon. O grupo controle não recebeu material obturador. A proliferação microbiana foi observada por 24 horas durante 16 semanas. Embora todos os cimentos tenham permitido o infiltrado microbiano, o AH Plus e o Sealapex apresentaram o melhor selamento, enquanto que os cimentos a base de MTA permitiram os maiores infiltrados.

Além dos efeitos causados pelos materiais empregados, autores têm procurado verificar a resposta promovida por diferentes linhagens celulares. Brackett et al. (2010) compararam 5 cimentos endodônticos (AH Plus Jet, EndoREZ, EndoREZ X, e Pulp Canal Sealer) em 3 diferentes linhagens de células: L 929, ROS e MC3T3-E1. Após o teste de MTT, verificou-se que inicialmente, todos os cimentos testados haviam causado diminuição da sobrevivência celular. Em 12 semanas, o AH Plus apresentou porcentagem de células viáveis maior que o grupo controle, seguido pelo EndoREZ X, EndoREZ, Pulp Canal Sealer e Epiphany.

Sabe-se que o cimento MTA (Mineral Trioxide Aggregate), tem sido utilizado na Endodontia em diversos procedimentos como pulpotomias, como material preenchedor do ápice radicular, em terapias para apicificação e também em perfurações radiculares. Acredita-se que o MTA estimule a deposição de cimento dentário, facilite a regeneração do

ligamento periodontal e a formação óssea (Oviir et al., 2006; Schwartz et al., 1999).

Lessa et al. (2010) verificaram o efeito em dois tempos diferentes (24 h e 7 dias) do contato do extrato do *White* MTA e de um novo cimento a base de MTA, o Bio-MTA, sobre odontoblastos MDPC-23. Os autores buscavam investigar a compatibilidade destes cimentos por ensaio de citotoxicidade e ainda por verificação de alteração de morfologia celular por análise em microscopia de varredura eletrônica (SEM). Embora o Bio-MTA tenha originado superfície com maior porosidade do que o *White* MTA após contato com meio aquoso, nenhum dos cimentos foi citotóxico e o tempo do extrato não afetou os resultados.

Bin et al. (2011), compararam o efeito citotóxico e genotóxico do MTA *Fillapex*, *White* MTA e AH Plus em células V79 (fibroblastos de *Hamster* chinês). Este estudo observa que o *White* MTA é biocompatível, tendo apresentado baixa citotoxicidade nos ensaios de MTT e ausência de genotoxicidade no ensaio de micronúcleo. O AH Plus, no entanto, mostrou efeito citotóxico e genotóxico, quando extratos em concentrações mais altas foram utilizados para sensibilização das culturas.

Um experimento *in vitro* realizado por Guven et al. (2007) mostrou que o MTA é capaz de exercer efeito estimulante da produção de proteína morfogenética BMP-2 em fibroblastos de gengiva humana.

Outros autores também sugerem que o MTA favorece não só a expressão do BMP-2 e o aumento de secreção da proteína morfogenética BMP-2, mas também exerce importante papel no processo de mineralização (Maeda et al., 2010; Yasuda et al., 2008).

Yasuda et al. (2008) verificaram o efeito do MTA sobre a viabilidade celular e a capacidade de mineralização de células da polpa dental. Os autores verificaram que o MTA não apresentou citotoxicidade para este modelo celular, estimulou significativamente a mineralização, aumentou o nível de expressão do mRNA da proteína BMP-2 e aumentou

a produção da própria proteína BMP-2 em 40%; o estudo concluiu que o BMP-2 exerce desta forma papel importante no processo de mineralização induzida pelo MTA.

Em 2010, Maeda et al. observaram o efeito da dissolução do cálcio (presente no MTA) no meio em que ele estivesse presente, sobre a diferenciação odontoblástica e cementoblástica de células de cultura primária do ligamento periodontal. As células foram cultivadas na presença ou ausência de discos de MTA e também de CaCl_2 , a fim de verificar a liberação de cálcio, sua atividade e expressão gênica, e também verificar a expressão e atividade do BMP-2. Observou-se neste estudo a indução de calcificação devido ao CaCl_2 presente no meio e um acúmulo de cálcio nos primeiros 14 dias de cultivo devido à ação do MTA, bem como um aumento na síntese da proteína BMP-2. Os autores também notaram um aumento da expressão do gene *Bmp-2* acima do nível de expressão basal devido à ação tanto do MTA quanto CaCl_2 .

Um estudo realizado por Muthukuru (2012), verificou que a secreção da fosfatase alcalina em células do ligamento periodontal (PDL cells) e osteoblastos foi aumentada dose-dependente após estímulo com a proteína BMP-2 até a concentração de 10ng/ml de BMP-2. A partir desta concentração, a secreção da fosfatase e a mineralização *in vitro* começaram a diminuir.

A fosfatase alcalina é uma proteína presente tanto em células da camada sub-odontoblástica da polpa dentária quanto em células de outros tecidos, como o renal e o ósseo. Existem 3 tipos de fosfatase alcalina: uma universal, também conhecida como a dos rins/fígado/osso, a fosfatase intestinal e a placentária. Na polpa dentária, a maior atividade da fosfatase alcalina está presente nos odontoblastos e camadas sub-odontoblásticas. Acredita-se que a fosfatase alcalina desempenhe importante papel no transporte de íons e esteja relacionada ao processo de biomineralização. (Goseki et al., 1990; Rachid et al., 2003).

A biomineralização é um processo onde existe a deposição de minerais no meio intra ou extracelular. No organismo humano, ocorre a deposição de hidroxiapatita e cálcio na matriz extracelular. A mineralização fisiológica ocorre em tecidos duros, enquanto a patológica ocorre em tecidos moles. Na formação de dentina, odontoblastos presentes na periferia da polpa dental são responsáveis pela formação de hidroxiapatita. A mineralização ocorre em duas etapas; a primeira, com a formação de cristais de hidroxiapatita em vesículas extracelulares, com posterior propagação através da matriz extracelular; nesta etapa, ocorre o acúmulo de cálcio em vesículas da matriz, favorecido por proteínas como a sialoproteína óssea. Este acúmulo, associado ao acúmulo de fosfato inorgânico (Pi), leva à deposição de hidroxiapatita. Na segunda etapa de mineralização, os cristais de hidroxiapatita penetram na matriz da membrana e se difundem no meio extracelular através da ação da fosfatase alcalina tecidual não-específica (TNALP) e são assim depositados entre as fibrilas colágenas. O pirofosfato (PPi), que por sua vez é inibidor da formação da hidroxiapatita, é hidrolisado pela fosfatase alcalina tecidual não-específica (TNALP), a qual é expressa em diversos tipos de células e tecidos, entre eles os odontoblastos e o fígado, em pH=8 a 10. Devido à ação da fosfatase alcalina, ocorre um acúmulo de fosfato inorgânico (Pi). O processo normal de mineralização ocorre devido ao equilíbrio entre os níveis de PPi e Pi extracelulares. Assim, a fosfatase alcalina não-específica tem importante papel na mineralização, pois além promover a hidrólise do inibidor da hidroxiapatita, ela fornece Pi para o processo de formação da mesma hidroxiapatita. A fosfatase alcalina não-específica é codificada em humanos pelo gene ALPL, localizado no cromossomo 1 (Harmey et al., 2004; Orimo, 2010).

Três moléculas são reconhecidas como reguladoras dos níveis de PPi e Pi extracelulares: TNAP (*tissue-nonspecific alkaline phosphatase* ou Fosfatase Alcalina não-específica tecidual, gene *Akp2*),

NPP1 (*nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*, gene *Enpp1*) que atua na formação de PPI a partir de nucleosídeo trifosfatos e ANK (*Ankilosis Protein*, gene *Ank*), mediadora do transporte intra/extracelular de PPI. Mutações em qualquer um destes três genes causam acúmulo de PPI. Harmey et al. (2004) identificaram as alterações decorrentes de mutações no gene que codifica a osteopontina (OPN) e seus efeitos na expressão de PPI mediada por TNAP, NPP1 e ANK. Em osteoblastos de camundongos que apresentavam mutação no gene *Enpp1*, foi observado uma diminuição da expressão da OPN que por sua vez atua como inibidor da mineralização, havendo neste caso uma hipermineralização. O mesmo estudo indicou que expressão da OPN esteve muito aumentada durante o período de diferenciação óssea em osteoblastos de calvaria, que eram mutantes no gene *Akp2*, codificante da fosfatase alcalina. Este aumento se deve ao aumento da transcrição do gene OPN induzida por elevadas concentrações de PPI extracelular. Tal alteração causou a hipomineralização.

A Osteopontina (OPN) recebe este nome por promover uma “ponte” entre a hidroxiapatita e as células. A OPN adere à hidroxiapatita com grande afinidade e está envolvida no encaixe de osteoclastos, à matriz óssea mineralizada. A OPN é uma sialoproteína fosforilada, componente da matriz extracelular mineralizada de ossos e dentes, caracterizada pela presença de uma sequência de ácido poliaspártico e sítios de fosforilação de serinas, mediadores da adesão à hidroxiapatita. A OPN tem diversas funções e é expressa em diversas situações em diversos tecidos e tipos celulares, entre eles osteoblastos, odontoblastos e fibroblastos. A expressão da OPN pode ser afetada por hormônios, citocinas, fatores de crescimento, etc. Em geral, a OPN tem como função primordial a reparação e sua expressão é normalmente aumentada após injúria ou agressão (Sodek et al., 2000).

Em 2003, Rashid et al. investigaram o efeito do cálcio extracelular sobre as proteínas relacionadas à mineralização óssea,

dentre elas a ALP, a BMP-2 e a OPN em células de cultura primária da polpa humana. Os autores observaram que a elevação da concentração de cálcio promoveu um aumento na expressão do mRNA tanto da BMP-2 quanto da OPN. Entretanto, uma diminuição da expressão da fosfatase (ALP) foi observada quando houve o aumento da concentração de cálcio. O estudo menciona que, sendo a OPN presente em células da polpa devem estar relacionada à formação de dentina reparadora e nódulos de calcificação pulpar. Deste modo, sendo que o cálcio extracelular aumentou a expressão da OPN nas células da polpa nesse estudo, os autores acreditam que a calcificação pulpar promovida pelo hidróxido de cálcio seja através da ação da OPN.

Rodrigues et al. (2012) verificaram a atividade da fosfatase alcalina, a mineralização e a expressão de marcadores de odontoblastos associados ao PPI em células de cultura primária da polpa dental de indivíduos portadores de hipofosfatasia hereditária (HPP), causada por deficiência de fosfatase alcalina devido a mutação no gene TNAP. A expressão dos genes foi comparada à expressão dos mesmos em células de controles saudáveis. Foi observada a redução de 50% da fosfatase expressa quando o grupo da hipofosfatasia foi comparado ao controle. A expressão dos genes que regulam a síntese de PPI também foi alterada no grupo HPP. Estas alterações compreendem a redução da expressão do gene da anquilose ANKH e aumento da expressão do gene *increased ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1* (ENPP1). Os marcadores odontoblásticos (OPN, DMP1, DSPP) tiveram suas expressões danificadas nas células de portador de HPP.

A DMP1 (*Dentin matrix acidic phosphoprotein* ou proteína da matriz dentinária) é uma proteína da matriz extracelular, não-colágena, pertencente à classe das SIBLINGS (*Small integrin binding ligand N-Linked glycoprotein*), com papel crítico na biomineralização.

Deshpande et al. (2011) verificaram que mesmo as proteínas SIBLING tendo características semelhantes, cada uma exerce

seu papel na mineralização. Os resultados deste estudo revelam que a mineralização da matriz colágena pode ocorrer de diferentes modos.

Além da DMP1, a família das SIBLINGs incluem a osteopontina (OPN), a sialoproteína dentinária (DSP) e a sialoproteína óssea (BSP). As SIBLINGs são proteínas pequenas, distintas das proteínas maiores da matriz celular, que possuem características genéticas e bioquímicas semelhantes, como elevado número de domínios acídicos (ácido aspártico e glutâmico) e muitas serinas (90%), as quais podem ser fosforiladas. Esta composição monomérica faz com que as SIBLINGs adotem uma conformação aberta e desestruturada facilitando sua interação com outras moléculas. Na presença de cálcio, a DMP1 é capaz de formar filamentos por si só (Bellahcène et al., 2008).

A DMP1 tem papel importante na mineralização de osso e dentina, e está presente em diversos tecidos dos ossos e dentes. Outra função correlacionada à DMP-1 é a indução de diferenciação de células da polpa dental em células do tipo odontoblastos. Mutações no gene DMP1 estão associadas à hipomineralização generalizada e também dentinárias, com a formação de ampla cavidade pulpar e pré-dentina defeituosa. Um estudo realizado por Abd-Elmeguid et al. (2012) verificou que a proteína DMP1 pode estar relacionada ao desenvolvimento de alterações inflamatórias na polpa dental pelo fato desta proteína ter estimulado a produção das Interleucinas 6 e 8 em culturas de fibroblastos de polpa humana. Os autores mencionaram não terem encontrado a proteína DMP-1 em tecido pulpar ausente de inflamação, em dentes impactados com rizogênese completa; entretanto, a proteína foi identificada em células provenientes de dentes com polpa imatura e também em células de dentes com inflamação pulpar.

Em 2009, Martinez et al. observaram que a expressão da proteína DMP1 em germes dentários variou nos diversos períodos da odontogênese. O estudo compreendeu fetos humanos em diversos estágios gestacionais (14, 16, 19, 20, 21, 23 e 24 semanas), comparados

a dentes com rizogênese completa. Foi observado pelos autores a marcação positiva da DMP1 em algumas células da lâmina dentária e do órgão do esmalte e a marcação negativa em outras, dentre estas algumas células da papila dental. O estudo sugere que neste caso, as células da papila positivamente marcadas irão se diferenciar em células odontoblásticas, e as com marcação negativa representam células mesenquimais ou células tronco. Nos dentes que apresentavam rizogênese completa, a marcação para a DMP1 foi observada apenas nos túbulos dentinários. O estudo concluiu que a DMP1 aparece presente em todas as fases da odontogênese, na lâmina dentária, órgão do esmalte, e na papila dentária, com pequenas variações de expressão. Entretanto, dentina e esmalte mineralizados não apresentam DMP1.

O RUNX2 é um fator de transcrição que controla o processo de diferenciação e maturação óssea através da expressão de diversos genes, como OPN (SPP1, fosfoproteína 1 secretada), Ibsp (Sialoproteína óssea 2) e OC (BGLAP, proteína óssea gama-carboxyglutamato [gla] / osteocalcina). Osteoblastos imaturos expressam os genes OPN (SPP1) e depois Ibsp, enquanto que osteoblastos maduros expressam OC (BGLAP). Durante o processo de diferenciação de osteoblastos, a expressão de mRNA do RUNX2 bem como da proteína RUNX2 é alterada como um processo dinâmico. O processo de maturação pode ser evidenciado através da expressão dos genes OPN e OC. Assim, num osteoblasto maduro, espera-se que a expressão do BGLAP (osteocalcina) seja aumentada enquanto a expressão do RUNX2 seja inibida. Durante a diferenciação dos osteoblastos, RUNX2 favorece a expressão dos genes que codificam proteínas da matriz óssea, como o OPN e OC. No entanto, quando a expressão do RUNX2 é aumentada, ocorre a inibição da maturação dos osteoblastos e a redução da expressão da OC. Após o processo de maturação, acredita-se que o RUNX2 não tenha ação significativa na manutenção e modulação do nível de OC (BGLAP), pois a diminuição do RUNX2 em osteoblastos maduros

não pareceu reduzir a expressão do OC em ratos (Komori, 2009; Maruyama et al., 2007).

Galler et al. (2011) verificaram, através da monitoração por RT-PCR em tempo real da expressão de genes relacionados à mineralização, uma redução de marcadores da mineralização óssea em células da polpa humana que foram expostas ao triethylene-glycol-dimethacrylate (TEGDMA). Esta resposta foi dependente do tempo e da concentração do TEGDMA. O TEGDMA é um composto comumente usado em adesivos dentinários. O estudo revelou que, em uma concentração subtóxica onde a viabilidade e a proliferação celular não eram afetadas, os níveis da expressão dos genes relacionados a mineralização (RUNX2, osteocalcina, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, sialofosfoprotein dentinária) reduziram de 5% a 20% em 4 hora: 50% em 12 horas. A fosfatase alcalina e a deposição de cálcio também foram baixas nas células tratadas, indicando que o TEGDMA inibiu de certa forma neste caso a mineralização induzida por células da polpa humana, prejudicando desta forma a formação de dentina reparadora após capeamento pulpar.

A polpa dental é heterogênea e apresenta uma camada de células odontoblásticas adjacente a dentina e a outras células pulpares. Os odontoblastos se desenvolvem a partir de células mesenquimais. Acredita-se que as células da polpa tenham a capacidade de se diferenciarem em odontoblastos.

De uma maneira geral, independentemente do modo como o canal endodôntico foi instrumentado, os cimentos endodônticos tem papel vital no sucesso e longevidade do tratamento endodôntico e mesmo que este cimento não seja capaz de ativar a mineralização óssea nas regiões periapicais, ele não deve prejudicar o processo de mineralização que ocorreria naturalmente, muito menos causar uma irritação contínua nos tecidos periapicais.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos causados pelo contato da subdoses de alguns cimentos endodônticos (AH Plus, RoekoSeal e EndoREZ), em células da polpa dental humana, através da análise da citotoxicidade, da genotoxicidade e da expressão de alguns genes envolvidos nos processos de diferenciação de osteoblastos, mineralização óssea e osteogênese: BMP2, ALP, RUNX2, BGLAP (OC), SPP1 (OPN) e DMP1 por RT-PCR em Tempo Real.

A hipótese deste estudo é que os materiais que contém componentes resinosos (AH Plus e EndoREZ) interfiram de forma negativa na expressão dos genes relacionados à mineralização, diferindo do cimento não resinoso RoekoSeal e do MTA Branco (Angelus, Paraná, Brasil).

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo A).

4.1 Cultura de células primárias

As células primárias foram provenientes de terceiro molar com rizogênese incompleta. O procedimento de exodontia foi realizado no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia Oral da Faculdade de Odontologia (Declaração em Anexo B).

Após a exodontia, o elemento dentário foi colocado imediatamente em PBS (Solução Salina Tamponada Dulbecco, Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Em laboratório, foi realizada a odontosseção e o tecido pulpar foi retirado, irrigado com PBS por 1 min e cortado em pequenos fragmentos; em seguida, foi realizada a incubação em solução de Tripsina-Edta 0.25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) por 15 min, a 37°C, com posterior incubação em meio mínimo essencial de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM-F12 GIBCO/Invitrogen) (Figura 1), suplementado com 15% soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e com 1% de solução antibiótica de penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). O explante foi mantido em estufa atmosférica a 37°C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) até que ocorresse a migração das células. Durante esse período, o meio foi renovado três vezes por semana.

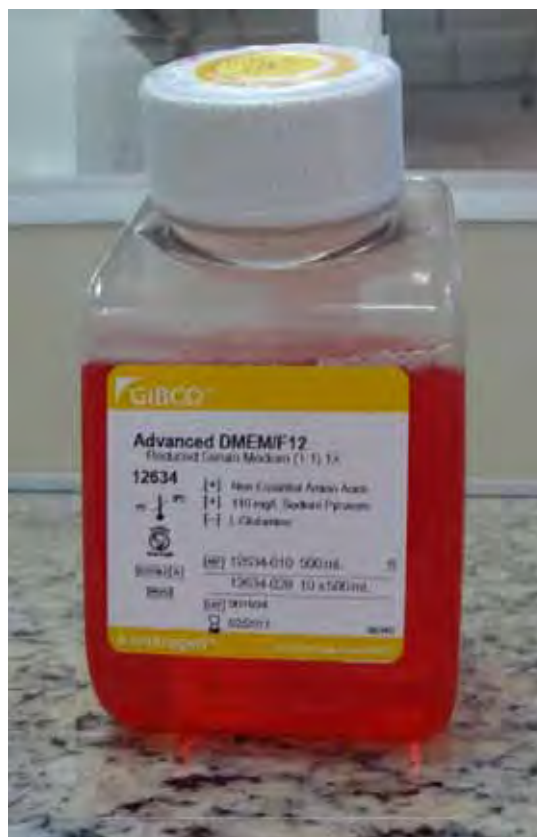


Figura 1 – Meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen) utilizado para cultura de células primárias da polpa dental humana.

As células foram posteriormente transferidas para um frasco de cultura celular com filtro, capacidade para volume de 60 ml e área de crescimento de 25 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), contendo 3 ml de meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen), até que ocorresse a sub-confluência, ou seja, até que aproximadamente 80% da superfície interna da parte inferior da garrafa fosse recoberta pelas células. Após atingirem a sub-confluência, as células foram transferidas para uma garrafa média, com área de crescimento de 75 cm², em 10ml de meio de cultura (Figura 2) e posteriormente subcultivadas.

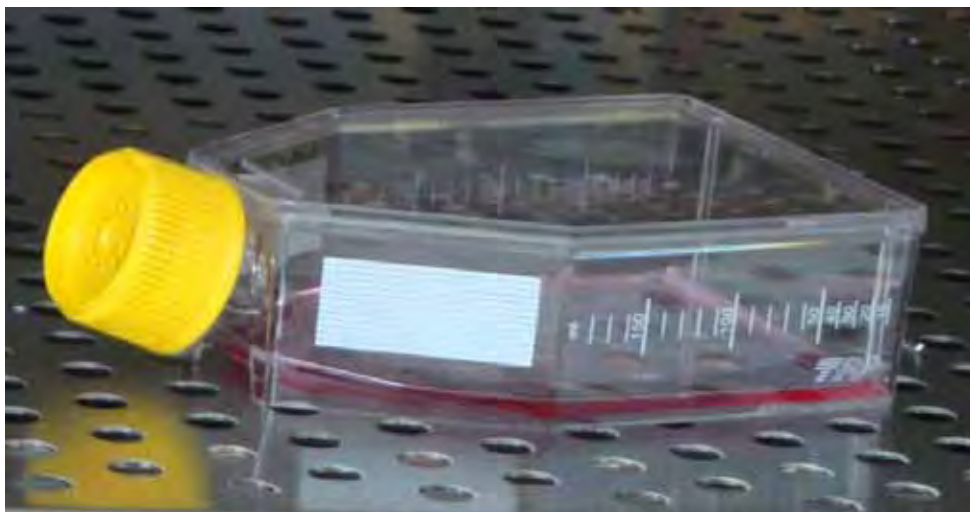


Figura 2 – Frasco com área de crescimento de 75 cm² contendo 10ml de meio de cultura celular.

4.1.1 Subcultivo das células primárias

Todas as vezes em que subcultivos se fizeram necessários, o seguinte protocolo foi seguido: o meio antigo do frasco de cultivo foi removido e as células foram irrigadas com 5 ml de PBS (Solução Salina Tamponada Dulbecco, Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Após remoção do PBS, foi adicionado ao frasco 3 ml de solução Tripsina-EDTA 0.25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Seguidos 4 minutos de incubação a 37°C em estufa atmosférica com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States), leves batidas foram dadas no fundo da garrafa de cultura, para auxiliar no descolamento das células. Em seguida, foi adicionado 6ml de meio de cultura DMEM-F12 sobre as células, neutralizando a tripsina. Todo este conteúdo foi transferido para um tubo tipo *Falcon* (TPP, Trasadingen, Suíça) e levado à centrifuga por 4 min, a 1000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* ressuspensionado em 1ml de meio fresco. Após homogeneização, a suspensão foi dividida em duas garrafas de cultura já contendo 10 ml de meio DMEM-F12

(GIBCO Invitrogen) fresco. As garrafas foram levadas à estufa, onde permaneceram até que as células atingissem a sub-confluência (ocupando aproximadamente 80% da superfície do fundo da garrafa de cultivo).

Neste estudo foram utilizadas células da 5ª passagem, as quais foram caracterizadas quanto a morfologia, quanto a presença de algumas proteínas, e quanto à ausência de alterações cromossômicas pelo ensaio de micronúcleo. A viabilidade e proliferação destas células também foram verificadas.

4.1.2 Morfologia das células primárias

A morfologia das células primárias foi analisada por microscopia de fase. As culturas celulares foram iniciadas e subcultivadas até a quinta e décima passagens. A contagem de células foi realizada e 3×10^5 células em 4 ml de meio foram plaqueados por poço, sobre lâmina de vidro de microscopia, em placas de 4 poços.

Para o plaqueamento, foram realizados os mesmos passos do subcultivo até a resuspensão do *pellet* em 10 ml de meio fresco. Um volume de 10 µl foi retirado desta cultura e depositado sobre uma câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany). O número de células viáveis por ml foi estimado através da média dos valores contados nos quatro quadriláteros periféricos da câmara, multiplicado por 10^4 .

Após o plaqueamento, as placas de cultura foram incubadas em estufa a 37°C, 100% humidade e 5% CO₂ por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as lâminas foram irrigadas com PBS 1X e em seguida desidratadas em etanol 100% por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram removidas do etanol e reservadas em temperatura ambiente por período superior a 24 h, para secagem.

Decorrido o período de secagem, as lâminas foram submetidas à análise por microscopia de fase (Leica, Leitz, Germany).

4.1.3 Detecção de proteínas das células primárias

A caracterização das células primárias de quinta passagem provenientes da polpa dental foi também realizada através da detecção de duas proteínas: a osteocalcina e a fosfatase alcalina. A detecção da osteocalcina foi realizada pelo método imunohistoquímico e também por imunofluorescência. A fosfatase alcalina, por sua vez, foi detectada por método cromogênico utilizando o *NitroBlue tetrazolium* (NBT) e o *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (BCIP).

As células foram plaqueadas sobre lâminas de vidro, em placas de 4 poços, sendo 2×10^4 células em 4 ml de meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen). As placas foram cultivadas durante 7 dias e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após uma semana, o meio de cultura foi removido e as lâminas foram fixadas em solução de acetona 20%, em PBS. Após a remoção da acetona, as lâminas foram deixadas por 4 horas em temperatura ambiente para secagem, e posteriormente armazenadas em *freezer*.

4.1.3.1 Caracterização por imunohistoquímica das células primárias

As lâminas foram retiradas do *freezer*, rehidratadas com 100 µl de PBS 1X por 5 min e imersas em solução de 0.5% Triton-X/PBS (Sigma-Aldrich Brasil LTDA) por 15 min. Após duas lavagens em água destilada, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em

solução de ácido cítrico monohidrato, pH 6.0 (Merck, Darmstadt, Germany).

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram lavadas com água destilada por cinco minutos, duas vezes. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com a utilização de solução de álcool metílico 50% e Peróxido de Hidrogênio 20 vol., durante 10 min. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada e submersas duas vezes em solução de TRIS (Hidroximetil Amino Metano P.A., Vetec Química Fina LTDA, Brasil), pH 7.4, por 5 min. Em seguida, foi realizado o bloqueio das proteínas inespecíficas através de incubação com BSA (10 ml de TRIS pH 7.4 + 100 mg do pó de Soroalbumina Bovina, Sigma-Aldrich Brasil LTDA) durante 1 hora. As lâminas foram na sequência incubadas com o anticorpo primário.

Para a detecção da osteocalcina, foi utilizado o anticorpo primário policlonal, IgG de coelho FL-100 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), na diluição 1:400 em solução de uso. A solução de uso era composta por 59ml de Solução de Tris, pH 7.4, e por duas outras soluções, denominadas "A" e "B", nas proporções 1,25 ml e 2,5 ml, respectivamente. A solução "A" continha 500 mg de BSA, em 10 ml de água; já a solução "B" continha 500 mg de Azida Sódica em 10 ml de água. A incubação foi realizada *overnight*. As lâminas foram na sequência desincubadas, lavadas duas vezes em solução de TRIS por 5 min, secas e incubadas com o anticorpo secundário do LSAB Kit Universal (Biotinylated Link Universal, DAKO North America Inc.) por 30 min; depois de lavadas novamente duas vezes em solução de TRIS por 5 min, foi feita a incubação com o anticorpo terciário do LSAB Kit Universal (Streptavidin-HRP) por outros 30 min, seguido de nova irrigação com TRIS. As culturas foram coradas com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution, DAKO, Denmark A/S) por 2 min, passadas em solução de TRIS e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer DAKO North America Inc) durante 1 min; na sequência foi realizada a

desidratação das lâminas em soluções de concentração progressiva de álcool, seguida de diafanização em xylol e montagem com Permount® Fisher Scientific e uma lamínula de vidro, para posterior análise microscópica. O controle positivo foi realizado em lâmina contendo tecido ósseo. O controle negativo foi realizado pela substituição do anticorpo primário por solução de uso.

Para a confirmação da origem mesenquimal da cultura primária, o filamento do citoesqueleto epitelial Citoqueratina foi submetido também à detecção por imunohistoquímica. Neste caso, por se tratarem de culturas de células primárias da polpa dentária, a constatação da ausência de tal filamento era o resultado esperado no teste. Nesta reação foi utilizado o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-citoqueratina AE1/AE3 (DAKO North America Inc.) na diluição 1:100 em solução de uso, com período de incubação de 1 hora. O controle positivo desta reação foi feito por uma lâmina de epitélio de mucosa oral e o negativo pela substituição do anticorpo primário por solução de uso.

4.1.3.2 Caracterização por imunofluorescência das células primárias

Para a detecção da osteocalcina por imunofluorescência, as lâminas foram retiradas do *freezer*, rehidratadas com 100 µl de PBS 1X por 5 min e em seguida submetidas ao mesmo procedimento acima descrito para a técnica de imunohistoquímica até a incubação com o anticorpo primário.

Após lavagem com 2 trocas de PBS foi realizada incubação por 45 min do anticorpo secundário Anti-mouse IgG (whole molecule)-FITC produzido em coelhos (F9137 - Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), na diluição 1:200. Após lavagem, foi realizada a coloração das amostras com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride,

Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e montagem utilizando-se o Fluoroshield com DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e lamínula. Os espécimes foram examinados em microscópio de fluorescência Leica (Leica Microsystems LTD, Germany), sob epifluorescência com a utilização dos filtros apropriados para visualização do DAPI ($\lambda_{\text{excitação}}=358\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=461\text{nm}$) e para visualização do FITC ($\lambda_{\text{excitação}}=495\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=521\text{nm}$).

4.1.3.3 Detecção da fosfatase alcalina nas células primárias

A fim de visualizar a presença de fosfatase alcalina nas células da quinta passagem, foi realizado o método cromogênico utilizando *NitroBlue tetrazolium* e *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT, Sigma-Aldrich Brasil LTDA).

O procedimento de preparação das lâminas para a detecção da fosfatase alcalina nas células primárias ocorreu do mesmo modo como o dos ensaios de imunohistoquímica. As células foram plaqueadas em placas de 4 poços (ThermoFisherScientific, Rochester, NY), sendo 2×10^4 células em 4 ml de meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen). As placas foram cultivadas durante 7 dias e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após uma semana, o meio de cultura foi removido e as lâminas foram fixadas em solução de acetona 20%, em PBS. Após a remoção da acetona, as lâminas foram deixadas por 4 horas em temperatura ambiente para secagem, e posteriormente armazenadas em freezer.

As culturas celulares foram então lavadas duas vezes com Dulbecco PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e incubadas *overnight* em uma solução de *NitroBlue Tetrazolium* (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT, Sigma-Aldrich Brasil LTDA). Após incubação, as lâminas de

vidro foram novamente lavadas com PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), cobertas com lamínulas de vidro e visualizadas em microscópio de luz invertida (Leica Leitz, Germany).

4.1.4 Curva padrão de crescimento celular

Para observação da proliferação e a viabilidade celular, foi realizado um levantamento do padrão de crescimento das células da cultura primária antes que qualquer cimento fosse colocado em contato com as culturas. O método utilizado foi o ensaio colorimétrico do 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ou MTT (Sigma-Aldrich Brasil LTDA), cuja quantificação da reação de redução é o indicador da atividade celular. Este ensaio está baseado na atividade das desidrogenases no metabolismo celular de glicídeos, fornecendo uma estimativa de sobrevivência celular através da mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH).

Foram plaqueadas 2×10^3 , 5×10^3 e 8×10^3 células primárias da 5^a passagem em 200 μ l de meio DMEM-F12 (GIBCO/Invitrogen), por poço, em placas de cultura celular contendo 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). Foram realizados dois experimentos independentes, totalizando 8 espécimes para cada grupo padronizado, por período.

O ensaio do MTT foi realizado nas culturas em 24 h, em 2, 4, 6 e 8 dias. A inibição enzimática foi detectada com o auxílio de um espectrofotômetro e filtro de 570 nm (Asys Hitech GmbH, Austria), permitindo a obtenção dos valores relativos a concentração das substâncias que inibem 50% da atividade enzimática (IC_{50}).

4.2 Preparo do meio condicionado com os cimentos endodônticos

Amostras contendo cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply De Trey, Germany), EndoREZ (Ultradent Products Inc,USA), RoekoSeal Automix (Colthene/Whaledent, Germany) e MTA Branco (Mineral Trioxide Aggregate, Angelus, Paraná, Brasil) foram preparadas sobre placas de cultura de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar. Os cimentos foram acondicionados de modo que ocupassem a área total do fundo dos poços da placa; cada amostra foi padronizada em diâmetro de 16,2 mm e espessura aproximada de 2 mm (Figura 3). Para esta padronização, foram colocados 0,22 ml de cimento em cada poço com o auxílio de uma seringa de 1ml (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA).

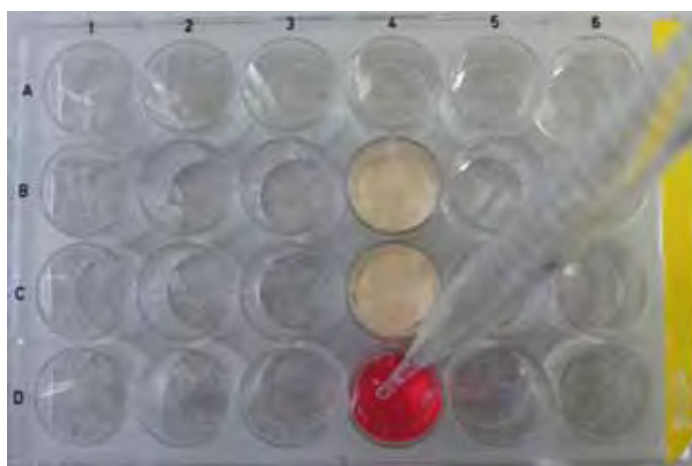


Figura 3 – Cimento endodôntico acondicionado sobre a área total do fundo dos poços da placa, sendo recoberto por meio de cultura DMEM-F12.

Os espécimes do cimento EndoREZ (Ultradent Products Inc,USA) foram recobertos com Parafilm®M e fotopolimerizados em $780\text{mW}/\text{cm}^2$ por 40s.

Após descansarem por 6 horas em estufa atmosférica a 37°C, com tensão de 5% CO₂ (Thermo Fisher Scientific Inc, United States), espécimes de cada tipo de cimento endodôntico foram cobertos com 2,7 ml de meio de cultura celular DMEM-F12 e novamente incubados por 24 horas a 37°C. Após este período, o meio foi removido do contato com os espécimes, formando os extratos originais (1:1) de cada material. Os extratos originais foram preparados segundo as recomendações da ISO 10993-5 (1992), mantendo-se uma proporção de 84,06 mm² da área da superfície do espécime por ml de meio de cultura. Estes extratos sofreram diluição seriada até 1:32 em meio de cultura celular antes de serem analisados por ensaio de MTT.

A composição de cada cimento utilizado nos testes de citotoxicidade, de micronúcleo e de RT-PCR em Tempo Real está descrita a seguir no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição dos cimentos endodônticos utilizados.

Cimentos Endodônticos	Composição
AH Plus (Dentsply DeTrey, Alemanha)	Pasta A: Bisphenol-A, Bisphenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos. Pasta B: dibenzylidiamina, aminoadamantane, diamina tricyclodecane, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone.
EndoREZ (Ultradent, USA)	30% UDMA, óxido de zinco, sulfato de bário, resinas, pigmentos.
RoekoSeal (Coltene/Whaledent, Alemanha)	Polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óleo a base de parafina, catalisador de platina, dióxido de zircônio.

4.3 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade das células primárias de quinta passagem, através do ensaio de MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA). As células da polpa dentária foram subcultivadas em meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen) suplementado com 15% soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e com solução antibiótica de penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde 8×10^3 células em 200 µl de meio de cultura foram plaqueadas em cada poço, e incubadas por um período de 24 horas em estufa a 37°C, CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States), para que as células se aderissem à superfície interna do fundo dos poços (Figura 4).



Figura 4 - Placa de cultura celular de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), contendo 8×10^3 células em 200 µl de meio de cultura por poço, para verificação da citotoxicidade dos cimentos pelo ensaio de MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA).

Após este período, o meio antigo foi removido e os poços foram preenchidos por 200 µl de extratos originais dos cimentos endodônticos, bem como por suas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). As placas foram novamente incubadas em estufa atmosférica a 37°C, por outras 24 h. Após a incubação, as placas sensibilizadas tiveram os meios condicionados com os cimentos endodônticos removidos de seus poços; cada poço foi então preenchido por 100 µl de solução de 0.5% de MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA) em PBS. O conjunto foi incubado a 37°C, envolto por folha de papel alumínio, durante 1h. Na sequência, a solução de MTT foi removida das placas e cada poço foi preenchido por 100 µl de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA). O conjunto foi novamente envolto em papel alumínio e incubado a 37°C, por 10 min.

Além dos poços preenchidos pelo extrato original e suas diluições, cada placa de 96 poços continha também um controle negativo, constituído por 200 µl de meio DMEM-F12 puro, e um controle não tratado, composto pela própria cultura celular. Para cada diluição e para cada controle foram plaqueados quatro poços em três experimentos independentes, totalizando 12 espécimes em cada grupo experimental (Figura 5). A sobrevivência celular foi quantificada pela dissolução do MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA) em DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA) e a densidade óptica resultante da solução foi detectada com o auxílio de um espectrofotômetro e filtro de 570 nm (Asdys Hitech, Austria).

A citotoxicidade foi expressa como porcentagem do grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional GRAPHPAD PRISM (Graphpad software Inc, version 5.00).

O resultado do ensaio do MTT permitiu a escolha de uma diluição, identificada como subdose (dose de baixa toxicidade que permite a replicação celular), que foi posteriormente utilizada para a sensibilização

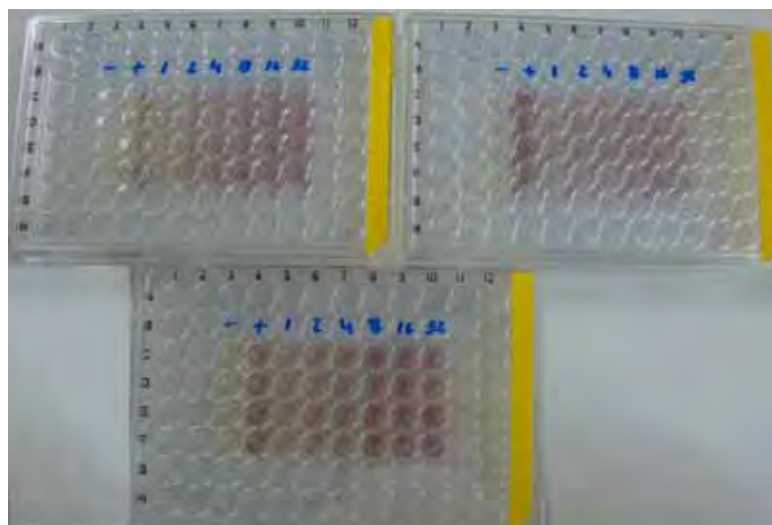


Figura 5 – Placas em triplicata contendo amostras após deposição de 100 μ l de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) por poço durante o ensaio de MTT. Cada placa contém 4 espécimes por diluição, sendo $n_{total}=12$ em cada diluição, para cada cimento endodôntico.

das culturas celulares durante a análise da formação de micronúcleo e da expressão dos genes por RT-PCR em Tempo Real.

4.4 Ensaio de Micronúcleo

Micronúcleos são pequenos corpos extranucleares que surgem de fragmentos de cromátides, de cromossomos acêntricos, ou mesmo de cromossomos que não foram incluídos nas células filhas após a telófase, na divisão celular (Kirsh-Volders et al., 2011).

O ensaio de micronúcleo foi realizado em duas etapas distintas do estudo. A primeira se deu antes que as culturas fossem submetidas a qualquer teste de biocompatibilidade, com o intuito de verificar a presença de alterações na segregação de cromossomos durante as divisões celulares. Numa segunda fase, o ensaio de micronúcleo foi realizado após sensibilização das culturas pelos extratos

condicionados, a fim de que fossem detectadas alterações inerentes às divisões celulares.

Para o ensaio de micronúcleo, 3×10^5 células da quinta passagem de cultura primária da polpa dental em 4 ml de meio DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen) foram plaqueadas sobre lâmina de vidro localizadas em placa de 4 poços (ThermoFisherScientific, Rochester, NY) (Figura 6).

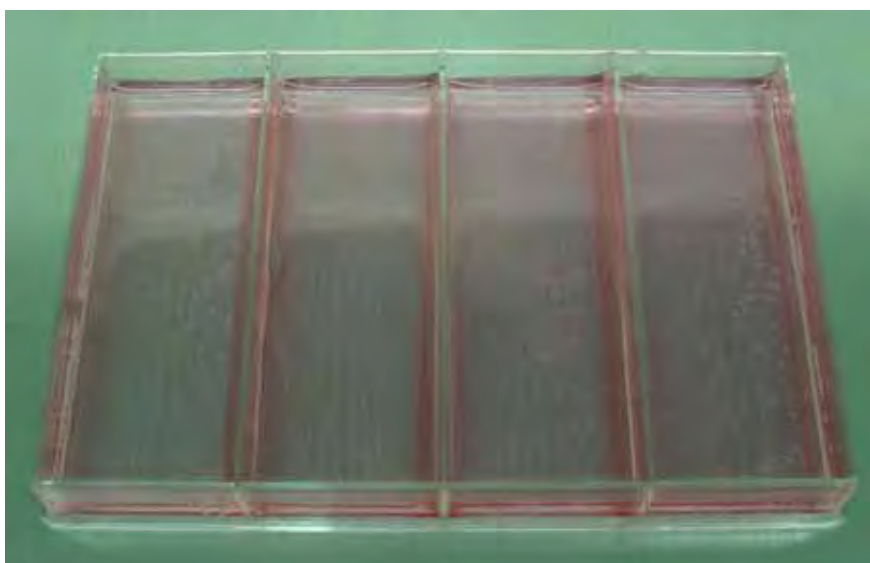


Figura 6 – Cultura celular plaqueada sobre lâminas de vidro de 26 cm X 76 cm, em placa de 4 poços (ThermoFisherScientific, Rochester, NY) para teste de micronúcleo.

O conjunto foi incubado por 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Finalizado o período de incubação, as culturas foram sensibilizadas com as subdoses dos extratos de cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply De Trey, Germany) nas diluições 1:4 e 1:8; EndoREZ (UltradentProductsInc,USA) nas diluições 1:8 e 1:16; Roeko Seal (RoekoSeal Automix, Colthene/Whaledent, Germany) nas diluições 1:2 e 1:4; e MTA (Mineral Trioxide Aggregate) na diluição 1:2. As placas contendo as culturas celulares condicionadas foram incubadas por 24 h.

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e fixadas em álcool absoluto (100%). Após 30 min de

exposição ao álcool, as lâminas foram retiradas dos poços e deixadas na temperatura ambiente durante 24 h para secagem.

A seguir, foi realizado um processo de coloração que se iniciou com a imersão destas lâminas em uma solução de HCl a 5N por 40 min; na sequência, elas foram lavadas em água destilada e imersas em corante SCHIFF (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) por 30 min. Após este período, as amostras foram lavadas em água sulfurada (208 ml de água destilada, 10 ml de 10% $K_2S_2O_5$ e 2 ml de 5N HCl) durante 6 min e por fim lavadas em água corrente durante 10 min. A partir daí, foram expostas durante 5 min a cada uma das diluições seriadas de álcoois: 70%, 80%, 90%, 96%, 100%. As amostras foram diafanizadas em em xylol por 10 min e por fim montadas em lamínula com ERV-Mount (EasyPath, Brasil).

Os micronúcleos foram identificados como estruturas de material genético contidas no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, incluindo uma área 1/3 menor do que a área do núcleo principal. Tais estruturas foram contadas a cada 1000 células observadas em microscópio de luz invertida, com objetiva de imersão (100X - Leica Leitz, Germany).

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Retro-Transcrição (RT-PCR em tempo real)

4.5.1 Obtenção das Amostras

Após os testes de citotoxicidade, foram estabelecidas as subdoses dos extratos dos cimentos testados. As células da polpa dental foram subcultivadas em 4 ml de meio de cultura DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen) em placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) e, após

período de incubação da cultura por 24 h, as células da quinta passagem foram expostas às concentrações subtóxicas dos extratos dos cimentos endodônticos por 6, 12 e 24 h. O extrato do AH Plus (Dentsply DeTrey, Germany) foi utilizado na diluição 1:16; o do EndoREZ (UltradentProductsInc,USA) na diluição 1:32; o do RoekoSeal (RoekoSeal Automix, Colthene/Whaledent, Germany) e do MTA (Mineral Trioxide Aggregate) foram utilizados na diluição 1:4.

A expressão dos genes RUNX2, BMP-2, ALP, BGLAP (OC), SSP1 (OPN) e DMP1 foi verificada nessas células pela reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real por Retro-Transcrição (RT-PCR *real time*).

Após a sensibilização das células, o RNA total foi isolado utilizando-se o Trizol® Reagent (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) para a lise celular, conforme as instruções do fabricante, e o PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) para a purificação do RNA. As concentrações e o grau de pureza das amostras de RNA foram determinados por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE 19810, USA) (Figura 7).

Buscou-se nesta fase a obtenção de amostras que apresentassem valores de $A_{260/280} \sim 2.0$, de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes fosse atingido; além disso, outro requisito foi quantidade de RNA suficiente para posterior utilização nas reações de retro-transcrição e PCR em Tempo Real. Acredita-se desta forma que o RNA que seria em seguida retrotranscrito, estaria livre de contaminações por proteínas e materiais degradados. O RNA total purificado foi armazenado a - 80°C.

Todas as amostras foram submetidas ao tratamento com Deoxyribonuclease I, a Dnase I, para que eventuais contaminações residuais de DNA genômico fossem eliminadas previamente à retrotranscrição. Este tratamento foi realizado imediatamente antes das

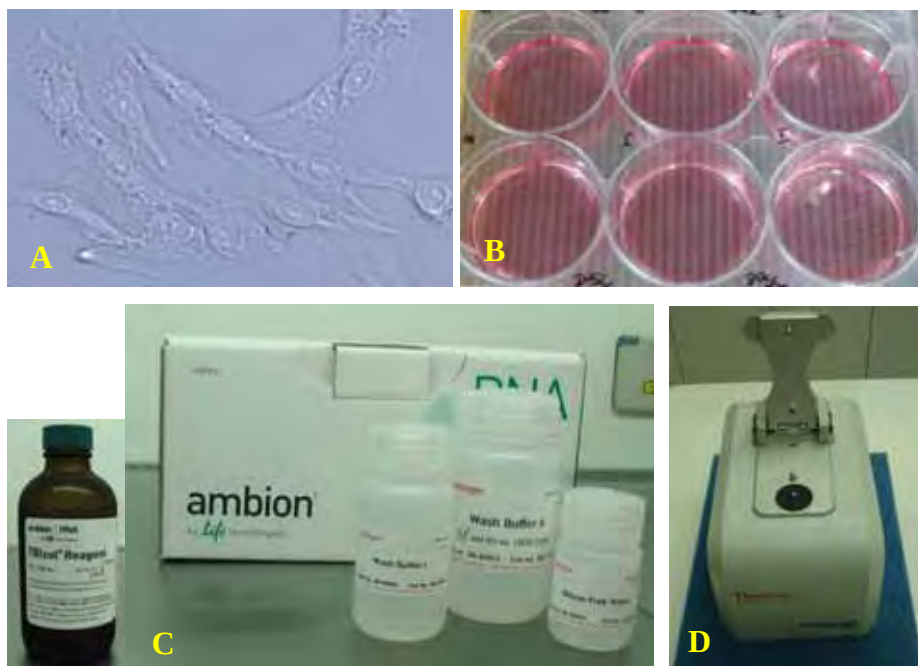


Figura 7 – A – Células da cultura primária da polpa dental; B - Cultivo em placa de 6 poços. C - Material de extração/purificação de RNA; D - NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA), para quantificação do RNA das células de cultura primária da polpa dental.

reações de retrotranscrição, com a utilização do kit comercial Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen® Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). O protocolo foi seguido conforme instruções do fabricante, onde 1 µg de RNA foi incubado por 15 min à temperatura ambiente, juntamente com 1 µl de 10X DNase I Reaction Buffer; 1 µl DNase I, Amp Grade, 1 U/µl; e água DEPC em volume final de reação de 10 µl. Ao final deste período, a Dnase I foi inativada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM à reação, com subsequente aquecimento das amostras por 10 min à 65°C. Neste ponto, as amostras encontravam-se prontas para a retrotranscrição propriamente dita.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada em reação de transcrição reversa seguindo instruções do fabricante do Kit SuperScript III, First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). Em cada reação foram adicionados: 500 ng de RNA total, 1 µl de 50 ng/µl

random hexamers, 1 μ l de annealing buffer e água DPEC para completar o volume final de 8 μ l. As amostras foram incubadas em termociclador à 65°C, por 5 min e imediatamente submetidas à incubação em gelo por 1 min. Na sequência, foram adicionados 10 μ l de 2X First-Strand Reaction Mix e 2 μ l de SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix, homogeneizados em *vortex*, rapidamente centrifugados e incubados por 7 min à 25°C seguidos de 50 min à 50°C. A reação foi terminada com incubação das amostras à 85°C por 5 min e armazenamento do cDNA a -20°C em *freezer* (Figura 8).

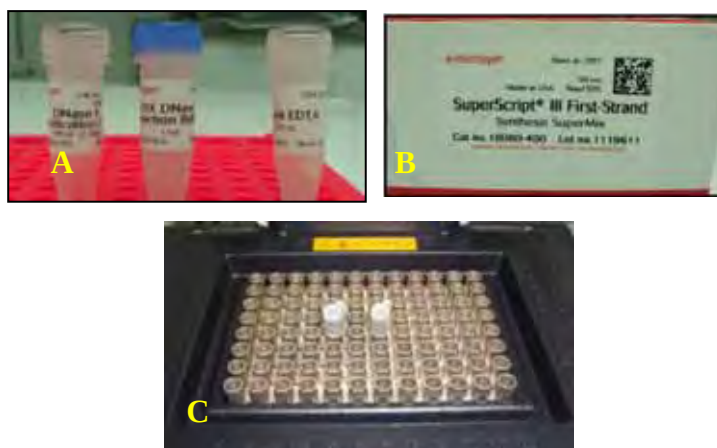


Figura 8 – Tratamento das amostras com Dnase I e EDTA (A), seguido de retrotranscrição com a utilização do kit SuperScript III, First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, USA) (B). C - Amostras no termociclador.

4.5.2 Delineamento dos oligonucleotídeos

O delineamento dos oligonucleotídeos, ou *Primers*, foi o passo seguinte à escolha dos genes de interesse bem como dos genes de controle endógeno (*housekeeping genes*) que seriam utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

Visando a otimização dos resultados, alguns pontos (como comprimento da sequência, conteúdo de “GC”, região de provável anelamento, temperatura de *melting* (T_m), entre outros) foram considerados no momento da escolha do par de oligonucleotídeos.

Para a identificação da sequência correspondente a cada um dos genes de interesse, os mesmos foram acessados segundo a base de dados de genes do *Pubmed/Entrez* no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Foram identificadas desta maneira: a identidade correta dos genes, a sequência de referência (“REFSEQ”) e o formato “FASTA” do cDNA. A partir desta sequência, foi realizado um “BLAT” para obtenção das sequências do DNA genômico e do cDNA. Esta sequência permitiu a aquisição dos dados necessários para posterior utilização do programa de delineamento de *primers*. Neste caso, foi escolhido o Primer3, disponível no endereço eletrônico <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi.

Após seleção dos oligonucleotídeos, ou *primers*, os produtos que possivelmente seriam obtidos com o par escolhido foram reversamente verificados pelo endereço eletrônico do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os *primers* correspondentes aos genes de interesse e aos genes de controle endógeno (*housekeeping genes*) foram sintetizados segundo as sequências descritas a seguir no quadro 2.

Quadro 2 – Genes de interesse e descrição dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em Tempo Real.

GENE	SEQUÊNCIA	TEMPERATURA de MELTING (°C)	TAMANHO DO PRODUTO	REFERÊNCIA FASTA PUBMED
HPRT1 ID 3251	F 5' TGCTCGAGATGTGATGAAGG 3' R 5' TCCCCTGTTGACTGGTCATT 3'	54,5 56,1	192	NM_000194.2
GAPDH ID 2597	F 5'GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3' R 5'TGGGATTTCATTGATGACA 3'	55,1 51,7	201	NM_002046.4
ACTB ID 60	F 5'AAACTGGAACGGTGAAGGTG 3' R 5'GTGGACTTGGGAGAGGACTG 3'	55,4 57,1	206	NM_001101.3
* ALP ID 249	F 5'CCACGTCTTCACATTTGGTG 3' R 5'AGACTGCGCCTGGTAGTTGT 3'	54,2 58,8	196	NM_000478.4
OC/ BGLAP ID 632	F 5' GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG 3' R 5' AGCAGAGCGACACCCTAGAC 3'	57,5 58,8	194	NM_199173.4
OPN/ SPP1 ID 6696	F 5'TTGCAGTGATTGCTTTTGC 3' R 5'GTCATGGCTTTCGTTGGACT 3'	52,7 55,5	200	NM_000582.2
RUNX 2 ID 860	F 5'GAACTGGGCCCTTTTTCAGA 3' R 5'CACTCTGGCTTTGGGAAGAG 3'	55,3 55,6	208	NM_004348.3
BMP2 ID 650	F 5'TCAAGCCAAACACAAACAGC 3' R 5'ACGTCTGAACAATGGCATGA 3'	54,4 54,7	197	NM_001200.2
* DMP1 ID 1758	F 5'CAGGAGCACAGGAAAAGGAG 3' R 5'CTGGTGGTATCTTGGGCACT 3'	55,6 56,9	213	NM_004407.3

* Referência: Galler et al., 2006

4.5.3 Eficiência das reações

As amostras de cDNA provenientes das células sensibilizadas pelos extratos condicionados pelos cimentos endodônticos foram utilizadas em reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *real time*). Foi utilizado o fluoróforo SYBR Green I como agente intercalante da dupla fita de DNA, do kit Platinum®SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen® Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). A reação de amplificação foi feita através do sistema de detecção de *Real Time* PCR Line Gene K (Bioer Technology Hi-tech, Binjiang – Figura 9).



Figura 9 - Sistema de detecção de Real Time PCR Line Gene K (Bioer Technology Hi-tech, Binjiang).

Uma quantificação relativa permitiu a comparação da variação na expressão dos genes de interesse (alvo) entre a amostra do controle não tratado e as amostras sensibilizadas pelos extratos dos cimentos endodônticos e do MTA.

A validação por meio de “Curvas de Eficiência” das reações de amplificação foi feita antes que qualquer comparação relativa pudesse ser realizada. Uma curva padrão foi desenvolvida para cada um dos *primers* escolhidos, pois nesta fase foi testada a eficiência de amplificação dos *primers* correspondentes aos genes de interesse (alvo) e aos genes endógenos (que seriam posteriormente utilizados como referência ativa); esta eficiência foi verificada através da “curva de *melting*”, onde se procurou observar a formação de um pico único e evidente, com T_m acima de 80°C , indicando a ausência de anelamento do primer com ele mesmo, ou seja, *primer dimer* ou outros produtos inespecíficos.

As curvas-padrão permitiram também a verificação da eficiência da pipetagem e a precisão do ensaio. Procurou-se observar em

todas as curvas, eficiência ~100% ($Slope \simeq -3,32$) e coeficiente de correlação $\geq 0,99$.

A determinação da concentração ideal de amostra inicial de cDNA, que seria utilizada para que os resultados fossem produzidos dentro da faixa linear dinâmica do ensaio, foi atingida também através da realização de curva padrão. Foram utilizadas para a curva padrão triplicata de amostras em 4 diluições seriadas de base 10, sendo que pelo menos três pontos de diluição foram considerados na confecção da curva de eficiência. As reações continham também controles negativos com a finalidade de detecção de contaminações das reações. A Figura 10 apresenta um esquema padrão do bloco utilizado para as Curvas de Eficiência.

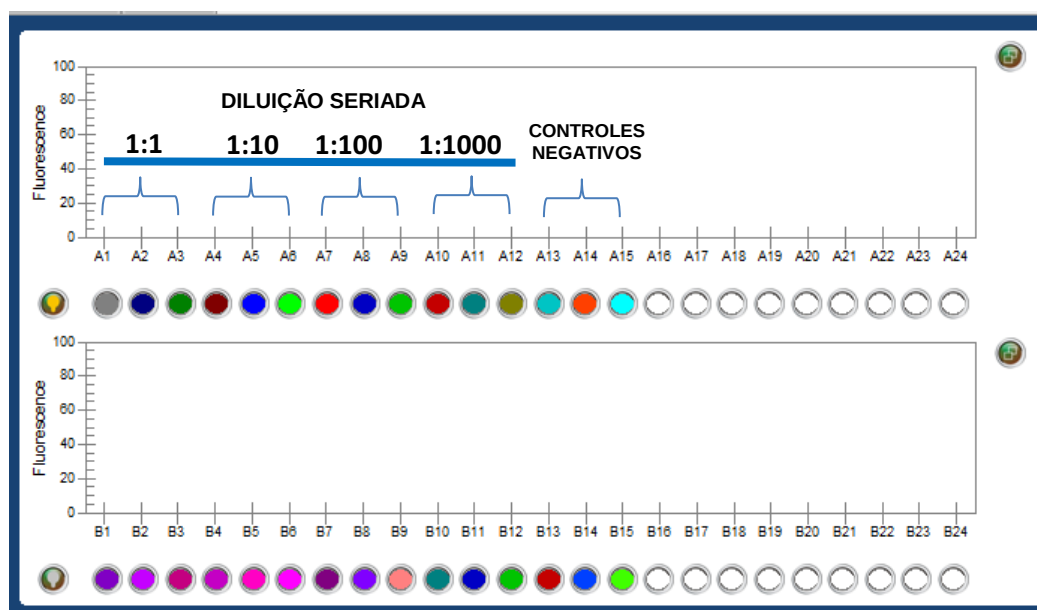


Figura 10 – Disposição das triplicatas durante a realização das Curvas de Eficiência.

A busca de resultados capazes de representar da maneira mais consistente possível a variação de expressão entre as amostras sensibilizadas, levou ao experimento de três genes endógenos antes que um deles fosse escolhido como normalizador. Testou-se desta

forma a eficiência da ACTB (Beta Actin, ID 60), do GAPDH (desidrogenase 3-fosfato gliceraldeído, ID 2597) e também do HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase1*, ID 3251). O GAPDH foi o gene selecionado como controle endógeno de referência ativa nas reações de PCR em Tempo Real pelo fato deste ter apresentado pequena variação entre as amostras e por ter originado reações de eficiência ~100%.

A PCR em Tempo Real foi feita num volume total de 25 µl. O ROX foi o fluoróforo utilizado como referência passiva nas reações. Cada reação continha 2 µl (50 ng) de cDNA, e 23,5 µl de master mix. O master mix era composto de 12,5 µl de Platinum®SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen® Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA); 0,5 µl do *forward* e *reverse primers* (10µM); 0,5 µl de ROX e 9,5 µl de água tratada com dietil pirocarbonato DEPC.

As reações de amplificação seguiram o programa padrão sugerido pelo fabricante Platinum®SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen® Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). O programa teve início com a incubação UDG por 2min a 50°C; seguido de desnaturação a 95°C por 2 min; foram a seguir realizados 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s.

4.5.4 Quantificação Relativa

A quantificação relativa fornece informação sobre alterações nos níveis de expressão das diversas amostras testadas e relaciona estes valores aos do controle não tratado (calibrador da reação). O resultado da quantificação relativa apresenta, desta maneira, a variação de expressão dos genes de interesse (BMP-2, RUNX-2, BGLAP, ALP, DMP1 e SPP1) em relação ao calibrador (normalizado em 1). A PCR em

Tempo Real iniciou-se com uma mesma concentração de cDNA, obtido pela retrotranscrição do RNA purificado de células tratadas em cada um dos grupos experimentais. Acredita-se desta forma, que os resultados obtidos apontem variações na expressão dos genes de interesse, detectadas desde a fase inicial de variação, onde ainda existia o aumento exponencial da amplificação (Pfaffl, 2004).

As reações foram realizadas para cada um dos genes de interesse, nas amostras de 6, 12 e 24 h. Em cada reação, o bloco de PCR foi preenchido por: triplicata das amostras sensibilizadas pelos diversos cimentos endodônticos contendo um par de *primers* correspondentes ao gene de interesse; triplicata das amostras sensibilizadas pelos diversos cimentos endodônticos contendo um par de *primers* correspondentes ao gene endógeno GAPDH, normalizador da reação; Controle não tratado (UC), o qual serviu de “calibrador”; controle negativo (NEG). A Figura 11 ilustra o esquema utilizado nas reações de Quantificação Relativa.

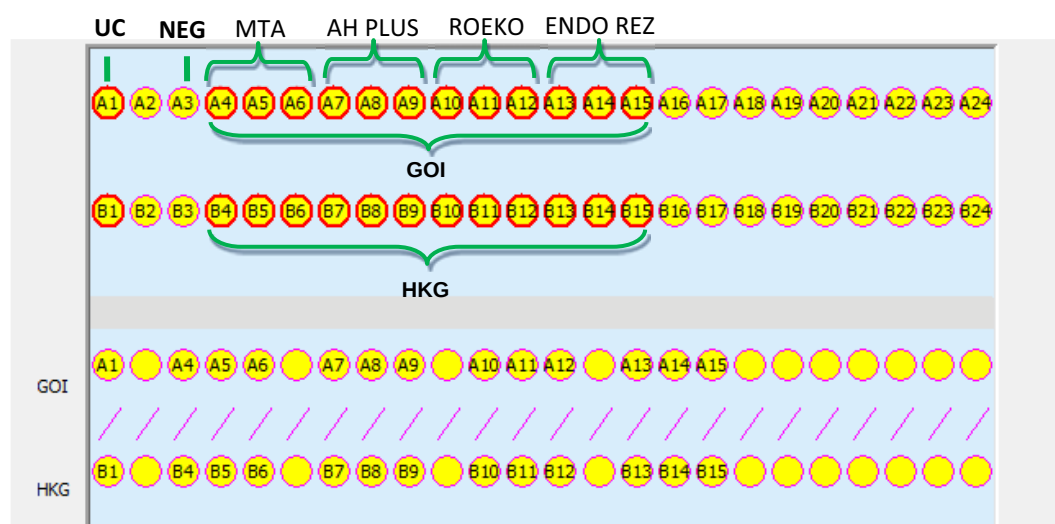


Figura 11 – Ilustração do esquema de comparação das triplicatas das amostras tratadas, utilizado nas reações de Quantificação Relativa. GOI = *Gene of Interest* ou Gene de Interesse; HKG = *Housekeeping Gene* ou Gene Endógeno, referência ativa da reação; UC = *Untreated Controle* ou Controle não tratado, calibrador da reação; NEG = controle negativo.

Os resultados foram obtidos pela comparação do Ct dos genes de interesse nas amostras tratadas e controle. As variações entre as amostras foram estatisticamente verificadas pelo teste ANOVA (2 FATORES), com significância de 5%. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional GRAPHPAD PRISM (Graphpad software Inc, version 5.00).

5 RESULTADOS

5.1 Cultura de células primárias

5.1.1 Subcultivo das células primárias

As células do tipo fibroblastos provenientes de cultura primária da polpa dental foram subcultivadas até a quinta passagem para a realização dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade. A sequência de fases proliferativas bem como a adequada proliferação das culturas em cada fase podem ser observadas na figura 12. Nota-se o aumento do número de células nas passagens 1 e 2 das culturas (de P1A para P1B e de P2A para P2B). Nas passagens 3 (P3) e 4 (P4), já se observa a formação de células bem alongadas, com prolongamentos citoplasmáticos característicos de fibroblastos.

Após o subcultivo até a passagem 5, as células da quinta passagem foram caracterizadas quanto a morfologia, quanto a presença de algumas proteínas, e quanto à ausência de alterações cromossômicas pelo ensaio de micronúcleo. A viabilidade e proliferação destas células também foram verificadas. As células viáveis foram utilizadas nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade.

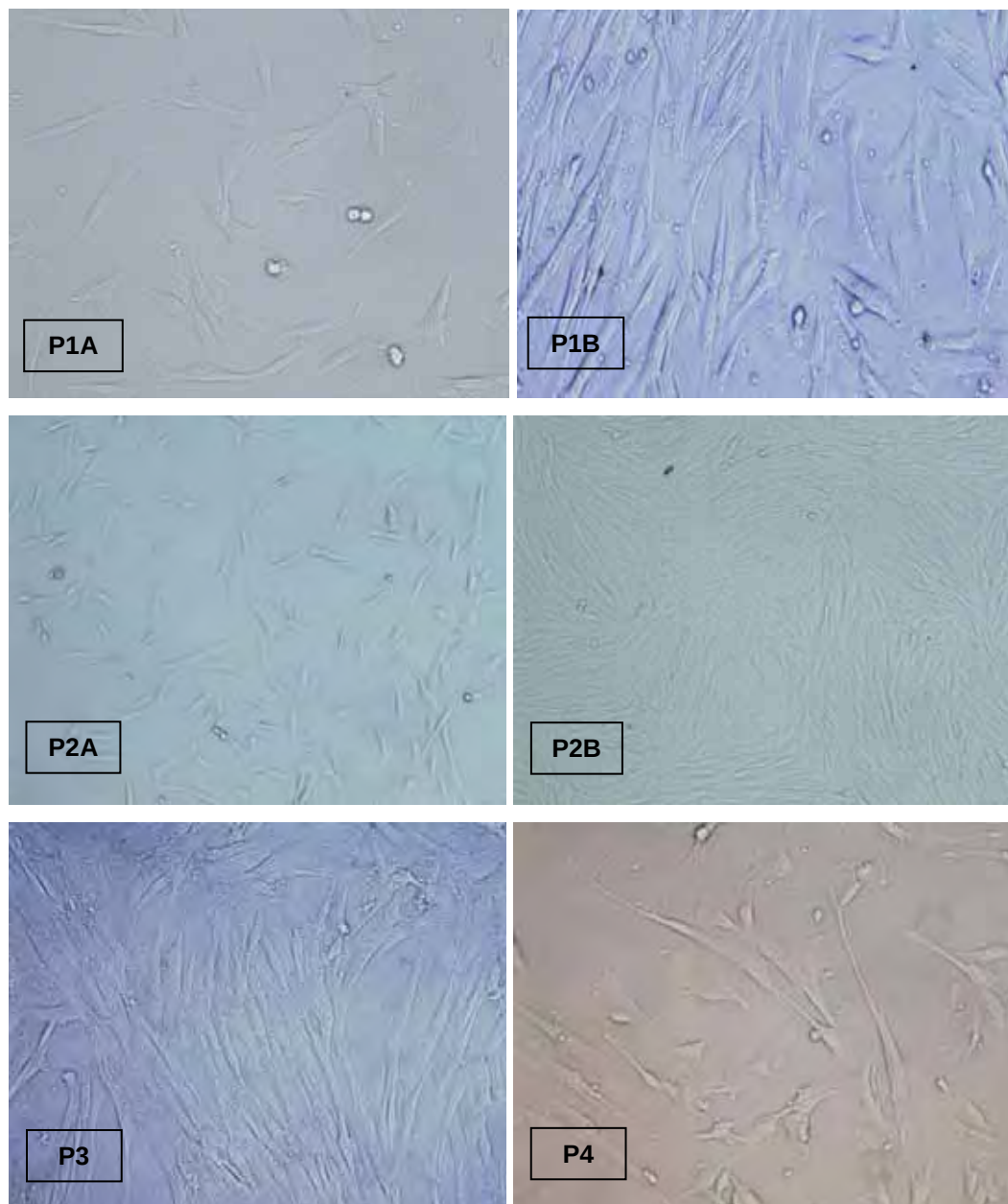


Figura 12 - Sequência de fases proliferativas das culturas (P1 a P4). Observou-se aumento considerável do número de células de P1A para P1B e de P2A para P2B. Morfologia alongada e formação de prolongamentos citoplasmáticos das células em P4.

5.1.2 Morfologia das células primárias

A morfologia das células primárias de quinta e décima passagens foram observadas por microscopia de fase e estão apresentadas nas figuras 13 e 14. Pode ser visualizado o aspecto alongado do citoplasma, com prolongamentos evidentes e núcleo arredondado elíptico bem delimitado, característico das células tipo fibroblastos. O espaço ocupado por organelas citoplasmáticas e núcleo apresentando um ou dois nucléolos também ficaram evidenciados. Foi possível observar ainda a interação celular, com formação de malha por células bem entremeadas.

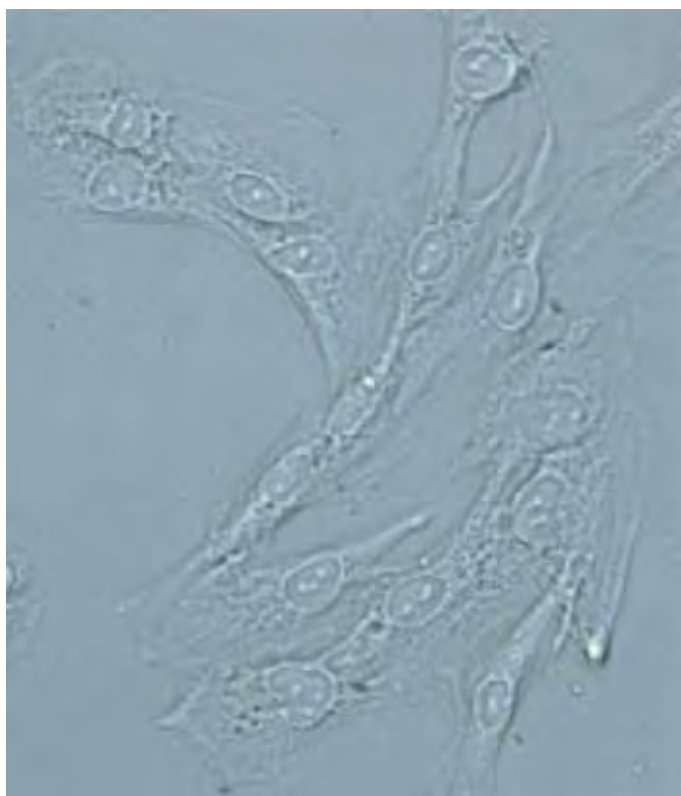


Figura 13 – Microscopia de fase (40X). Células do tipo fibroblastos provenientes de quinta passagem de cultura primária da polpa.

A figura 14 mostra o aparecimento de algumas células na passagem 10 com perda de formato alongado, embora muitas células ainda apresentem este aspecto alongado. Estas células apresentam-se com morfologia mais alargada do que longa, quando comparadas às células de passagens anteriores.

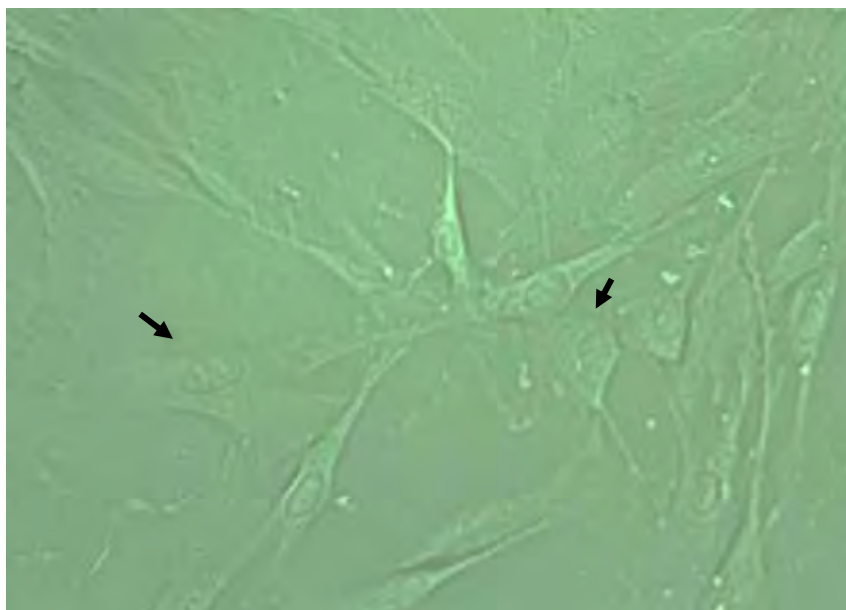


Figura 14 – Microscopia de fase (40X). Células do tipo fibroblastos provenientes de décima passagem de cultura primária. Verificou-se a presença de algumas células com formato menos alongado (setas).

5.1.3 Detecção de proteínas das células primárias

A detecção da osteocalcina e da fosfatase alcalina compuseram as formas de caracterização das células primárias de quinta passagem provenientes da polpa dental. A detecção da osteocalcina foi realizada por dois métodos: imunohistoquímico e imunofluorescência. A fosfatase alcalina foi detectada por método cromogénico utilizando o *nitro blue tetrazolium*/NBT e o *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*/BCIP (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT, Sigma-Aldrich Brasil LTDA).

5.1.3.1 Caracterização por imunohistoquímica das células primárias

Após fixação das lâminas, contendo células da polpa dental de quinta passagem, em solução de 20% de acetona/PBS e posterior armazenamento das amostras em *freezer* a -20°C , foi realizada a detecção da osteocalcina. A figura 15 apresenta amostra contendo pigmentação amarronzada distribuída em seu citoplasma, indicando a presença de osteocalcina nessas células. As culturas foram coradas com DAB (3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution, DAKO, Denmark A/S), contra-coradas com Hematoxilina de Mayer (DAKO North America Inc) e sequencialmente submetidas à análise por microscopia óptica.

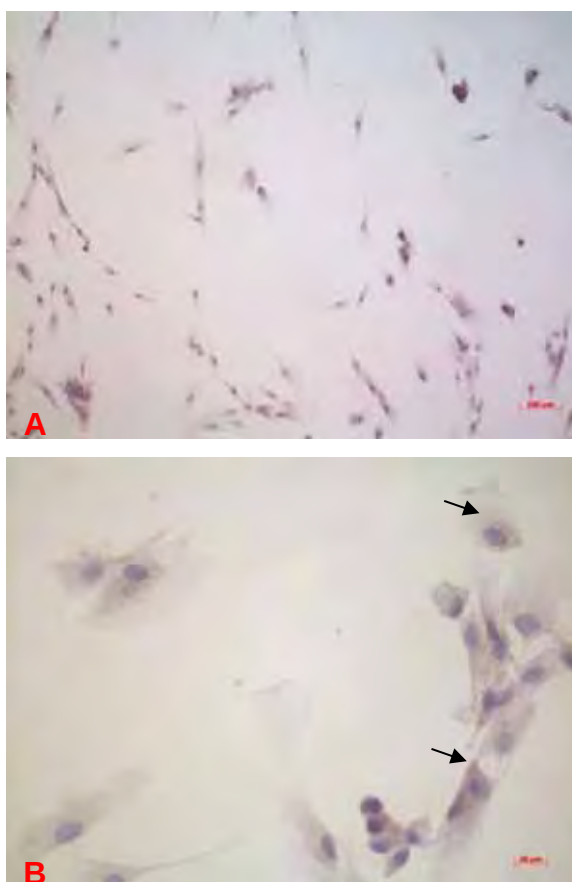


Figura 15 –Osteocalcina presente nas células da cultura primária da polpa (pigmento amarronzado-seta); A -Microscopia óptica, 20X; e B - Microscopia óptica 40X.

A figura 16 apresenta amostra com marcação negativa no teste de imunohistoquímica, indicando ausência do filamento de citoesqueleto citoqueratina, confirmando desta forma a origem mesenquimal da cultura primária.

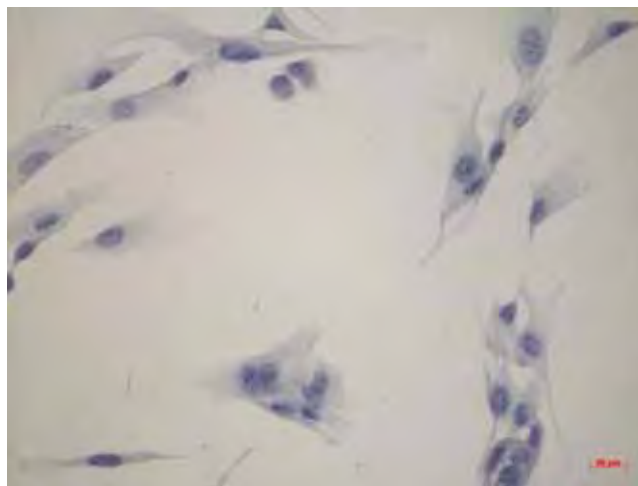


Figura 16 – Ausência da citoqueratina nos fibroblastos de cultura primária da polpa dental (Microscopia óptica, 20X e 40X).

5.1.3.2 Caracterização por imunofluorescência das células primárias

A figura 17 indica presença de osteocalcina nas células de quinta passagem de cultura primária da polpa dental através de marcação por imunofluorescência. Após incubação *overnight* com anticorpo primário para osteocalcina policlonal, IgG de coelho FL-100 (Santa Cruz Biotechnology Inc.,USA), na diluição 1:400 em solução de uso, e incubação por 45 min. com anticorpo secundário Anti-mouse IgG (whole molecule)-FITC produzido em coelhos (F9137 - Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), na diluição 1:200, as células da polpa apresentaram fluorescência do núcleo (devido à ligação de suas estruturas ao DAPI) e do citoplasma, indicando marcação positiva do FITC conjugado à osteocalcina; o controle negativo (onde o anticorpo primário foi substituído

por solução de uso) apresentou a marcação positiva apenas no núcleo, por DAPI; a marcação no citoplasma foi negativa.

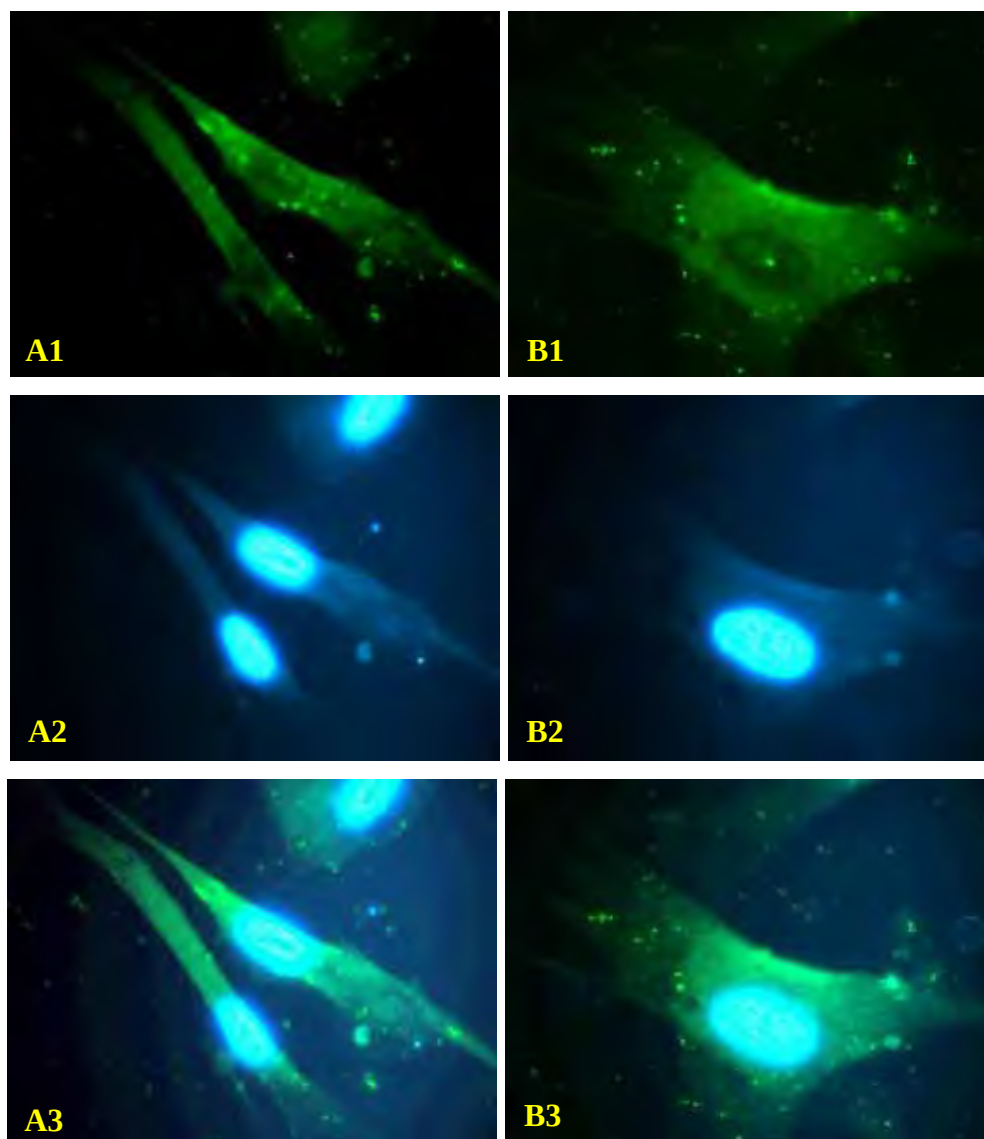


Figura 17 – Imunofluorescência de anticorpo para osteocalcina conjugado ao FITC nas células de quinta passagem de cultura primária da polpa dental. As imagens A1 e B1 mostram manchamento do citoplasma por FITC; as A2 e B2 mostram manchamento do núcleo por DAPI; A3 e B3 mostram imagens sobrepostas.

5.1.3.3 Detecção da fosfatase alcalina nas células primárias

A presença da fosfatase alcalina nas células da quinta passagem da cultura primária da polpa dental humana foi detectada pelo método cromogênico utilizando o *nitro blue tetrazolium* e o *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT, Sigma-Aldrich Brasil LTDA). Neste método, a hidrólise do BCIP pela fosfatase resulta na formação do leucoindigo, que por sua vez é oxidado pelo NBT em 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro indigo (BCI), azul insolúvel. Na reação, o NBT é reduzido no diformazan (DF). Desta forma, a reação produz um precipitado roxo insolúvel que é uma mistura de NBT-DF e BCI. A figura 18 mostra presença de precipitações arroxeadas distribuídas por todo o citoplasma celular, compatível com marcação positiva para fosfatase alcalina. A região ocupada pelo núcleo celular apresenta-se mais clara e bem delimitada, com ausência de coloração arroxeada.

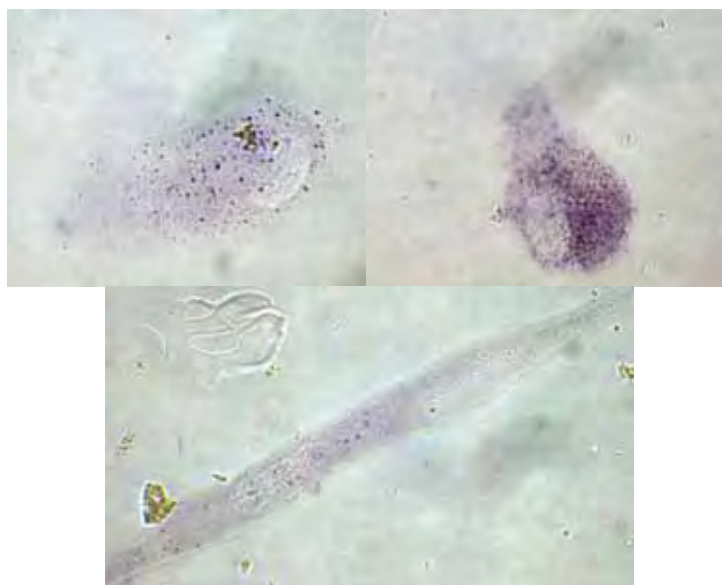


Figura 18 - Presença da fosfatase alcalina (pigmentação arroxeada) nas células da quinta passagem da cultura primária da polpa dental humana revelada pelo método cromogênico utilizando o SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich Brasil LTDA). Microscopia de luz invertida (40X).

5.1.4 Curva padrão de crescimento celular

Para observação da proliferação e a viabilidade celular, foi realizado um levantamento do padrão pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma-Aldrich Brasil LTDA). Foram plaqueadas 2×10^3 , 5×10^3 e 8×10^3 células primárias da 5ª passagem em 200 μ l de meio DMEM-F12 (GIBCO/Invitrogen), por poço, em placas de cultura celular contendo 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). O ensaio do MTT foi realizado nas culturas em 24 h, em 2, 4, 6 e 8 dias. Os resultados estão apresentados a seguir na figura 19.

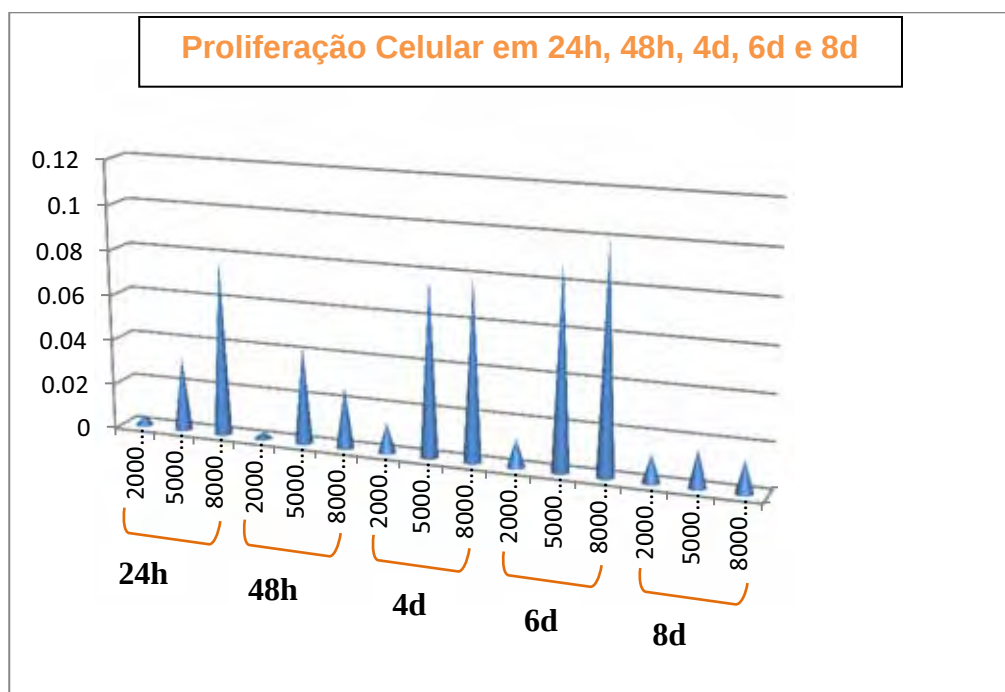


Figura 19 – Gráfico ilustrando proliferação das células de quinta passagem de cultura primária da polpa dental.

As células proliferaram bem nas primeiras 24 horas. Ao microscópio óptico, as células apresentaram-se bem aderidas ao fundo dos poços das placas de 96 poços nesse período, sem formação de sobre-camadas.

Houve pequena diferença nos valores indicativos de absorvância ($\lambda=570$ nm) quando 8000 células foram plaqueadas por poço, se comparados os períodos de 24 h e 4 dias. Em 24 h, as 8000 células viáveis produziram $A_{570nm} = 0.078$ e em 4 dias de cultura $A_{570nm} = 0.08$. Ainda no período de 4 dias, foi observada a $A_{570nm} = 0.078$ no plaqueamento de 5000 células. Com base nestes valores, observou-se pouca variação na viabilidade celular de 8000 células/poço em 24 h para 5000 e 8000 células/poço em 4 dias.

Também foram similares os valores obtidos no plaqueamento de 5000 células/poço ($A_{570nm} = 0.09$) e 8000 células/poço ($A_{570nm} = 0.1$) no período de 6 dias.

No período de 8 dias, observou-se viabilidade celular limitada quando houve o plaqueamento de 2000, de 5000 e de 8000 células/poço ($A_{570nm} = 0.01$ para os três períodos).

Valores de absorvância igualmente baixos também foram observados quando 2000 células foram plaqueadas por poço, em todos os períodos.

Em 48h, observou-se viabilidade celular diminuída quando ocorreu o plaqueamento de 8000 células ($A_{570nm} = 0.024$), se os valores da absorvância forem comparados aos valores correspondentes às 5000 células no mesmo período ($A_{570nm} = 0.043$) e às 8000 células no período anterior (24 h).

5.2 Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pela sobrevivência estimada de células primárias de quinta passagem, através do ensaio de MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA)

em período de 24 h de exposição às diluições dos extratos condicionados com cimentos endodônticos.

Os valores de viabilidade celular apresentados como resultado do ensaio de MTT representam porcentagem relativa ao grupo controle não tratado. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional GRAPH PAD PRISM (Graphpad software Inc, version 5.00).

De modo geral, os cimentos testados geraram valores de sobrevivência celular acima de 80% nas diluições 1:16 e 1:32, valores estes indicativos de baixa citotoxicidade quando estes materiais foram diluídos. Os extratos originais do AH Plus e do EndoREZ produziram alta toxicidade para as culturas celulares. Os valores médios de sobrevivência celular observados após exposição a estes extratos originais foram de 11,1% para o AH Plus e 10,4% para o EndoREZ, se comparados ao controle não tratado. A alta citotoxicidade também foi observada na diluição 1:2 destes cimentos, onde o AH Plus permitiu viabilidade celular de 16,6% e o Endo Rez de 27,9%. Ao contrário do AH Plus e do EndoREZ, os extratos não diluídos do MTA e do RoekoSeal originaram baixa citotoxicidade nas culturas, com diferenças significantes ($P < 0.05$) nas diluições 1:1 e 1:2. As células expostas ao extrato original do MTA apresentaram proliferação semelhante às células do grupo controle não tratado (viabilidade celular de ~100%) e as células expostas ao extrato não diluído do RoekoSeal apresentaram viabilidade celular média de 85,9%; a diluição 1:2 do mesmo cimento proporcionou a sobrevivência celular média de 83,6%. A figura 20 mostra a variação da citotoxicidade dos cimentos no extrato original e nas suas diluições.

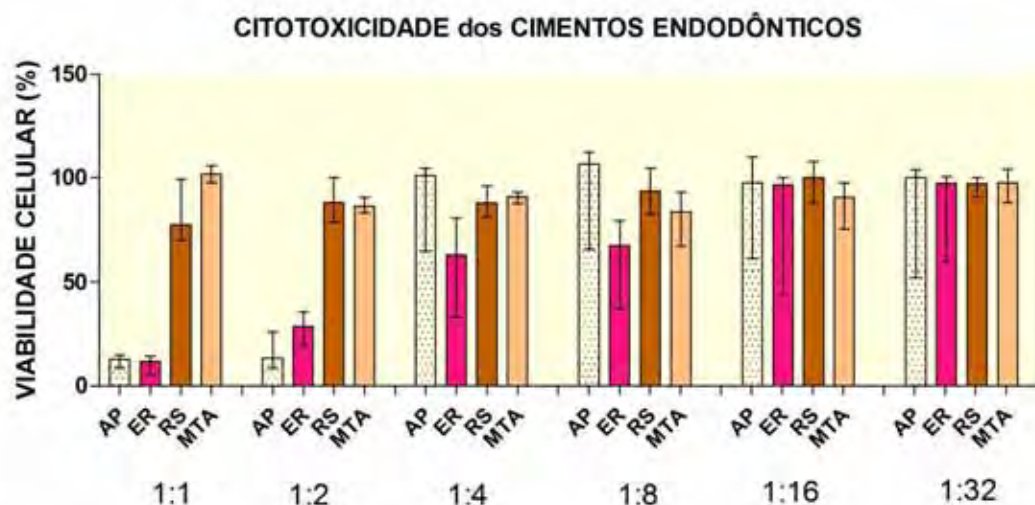


Figura 20 – Comparação da citotoxicidade dos cimentos endodônticos nas diversas diluições. Os valores indicados são medianas com interquartis (25% e 75%).

*AP = AH Plus; ER = EndoREZ; RS = RoekoSeal.

Embora o AH Plus tenha sido bastante citotóxico quando pouco diluído, pode-se observar uma diminuição significativa nessa toxicidade a partir da diluição 1:4 ($P < 0.05$) em comparação aos extratos mais concentrados (1:1 e 1:2). No caso do EndoREZ, entretanto, valores indicativos de baixa citotoxicidade só foram observados a partir da diluição 1:16. Houve diferença significativa ($P < 0.05$) entre as diluições 1:1 e 1:4 em diante, bem como as diluições 1:2 e 1:16/1:32. Pequena variação na viabilidade celular após exposição das culturas aos extratos do MTA e do RoekoSeal foram notadas. Em todas as diluições estes dois materiais proporcionaram viabilidade celular média acima de 80% (Figura 21).

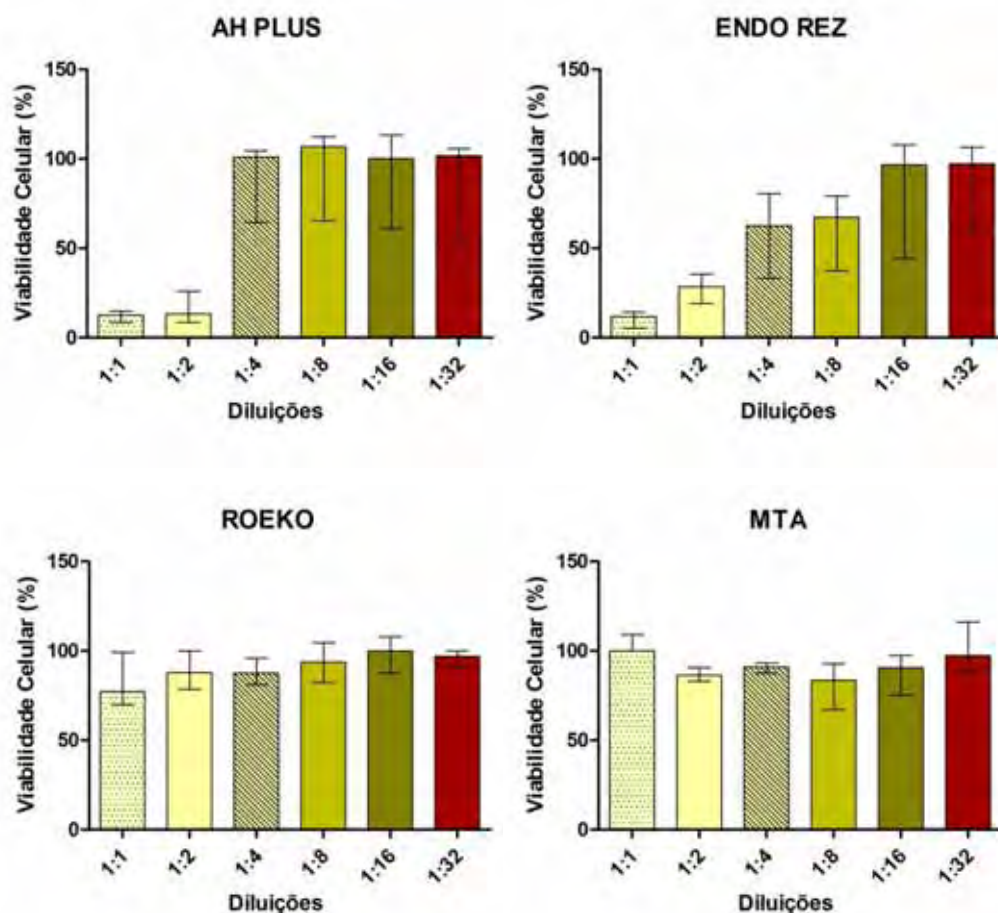


Figura 21 – Comparação da citotoxicidade de cada cimento endodôntico em suas diluições seriadas. Os valores aparecem em medianas com interquartis (25% e 75%).

De modo geral, os materiais testados apresentaram diminuição da citotoxicidade proporcional à diluição dos mesmos, onde extratos mais diluídos favoreceram a proliferação celular quando comparados às células expostas aos extratos mais concentrados.

A Tabela1 apresenta valores percentuais da sobrevivência celular dos grupos tratados relativos ao grupo controle não tratado. Os valores indicados são médias, medianas e desvio padrões encontrados em cada diluição dos cimentos.

Tabela 1 – Efeito dos extratos dos cimentos endodônticos na viabilidade de células de cultura primária da polpa dental, expressos em porcentagem relativa ao controle não tratado. Os valores indicados são médias, medianas e desvio padrões encontrados em cada diluição dos cimentos.

DILUIÇÕES	AH PLUS			ENDO REZ		
	median	med	sd	median	med	sd
CONTROLE	100	100	-	100	100	-
1:1	12.7	11.1	5.4	11.63	10.4	5.8
1:2	13.3	16.6	12.7	28.5	27.9	9.4
1:4	101	87.9	24.2	62.7	59.0	22.0
1:8	106	95.1	25.3	67.3	63.6	26.1
1:16	100	92.4	25.0	96.5	85.3	32.7
1:32	105	82.5	38.1	97.2	85.7	26.8
DILUIÇÕES	ROEKO SEAL			MTA		
	median	med	sd	median	med	sd
CONTROLE	100	100	-	100	100	-
1:1	77.2	85.9	21.9	100	100	20.3
1:2	88.0	83.6	26.1	86.3	87.8	8.4
1:4	87.7	88.1	9.6	90.8	92.8	9.4
1:8	93.5	93.2	11.7	83.5	81.7	14.2
1:16	101.6	100	14.9	90.5	86.6	14.6
1:32	97.0	100	17.0	97.4	98.2	20.9

Porcentagem de sobrevivência celular: Mediana, Média e Desvio Padrão.

A Tabela 2 apresenta as diferenças estatísticas entre os grupos nas diversas diluições dos extratos de cimentos endodônticos. A sobrevivência celular foi afetada na seguinte ordem devido à exposição aos cimentos endodônticos: EndoREZ > AH Plus > RoekoSeal ≥ MTA.

Tabela 2 – Teste de Dunn 5% para as diluições dos extratos.

CIMENTOS ENDODÔNTICOS	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AH Plus	B	B	A	A	A	A
EndoREZ	B	B	B	B	A	A
RoekoSeal	A	A	A B	A	A	A
MTA	A	A	A	A B	A	A

* Letras iguais significam ausência de diferença estatisticamente significativa, letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

O EndoREZ propiciou a maior toxicidade às células de cultura primária da polpa humana e o MTA e RoekoSeal, as menores.

Os cimentos AH Plus e EndoREZ apresentaram maior citotoxicidade que o RoekoSeal e o MTA com significância estatística das diferenças ($P < 0.05$) no extrato original e na diluição 1:2. Nas diluições 1:4 e 1:8, o EndoREZ apresentou a menor viabilidade celular se comparado aos outros cimentos, diferindo significativamente do AH Plus nestas duas diluições ($P < 0.05$). Desta forma, a partir da diluição 1:4, o AH Plus, o RoekoSeal e o MTA propiciaram baixa toxicidade celular. Nas concentrações mais baixas (1:16 e 1:32) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sendo que todos os extratos foram pouco citotóxicos às células.

5.3 Ensaio de Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo foi realizado nas culturas para identificação de genotoxicidade dos materiais estudados.

Os micronúcleos foram identificados como estruturas de material genético contidas no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, incluindo uma área 1/3 menor do que a área do núcleo principal (Figura 22).

Apenas células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose e aquelas exibindo fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

Tais estruturas foram contadas a cada 1000 células observadas em microscópio de luz invertida, com objetiva de imersão (100X - Leica Leitz, Germany).

A escolha das concentrações dos extratos para o ensaio de micronúcleo foi realizada com base nos resultados obtidos no teste de

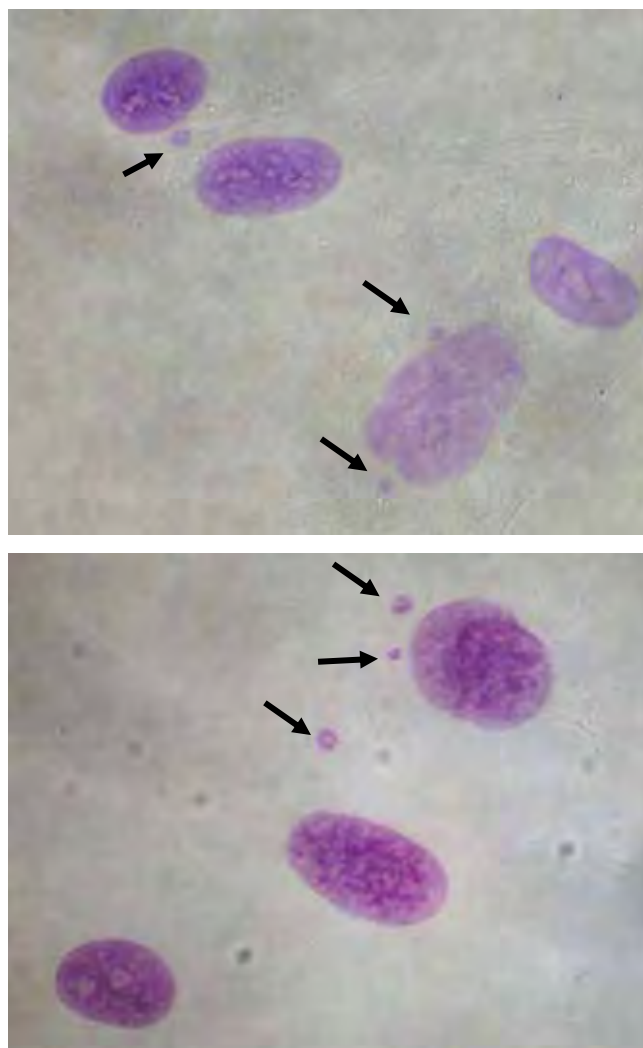


Figura 22 – Micronúcleos (setas) encontrados nas células de cultura primária da polpa dental após contato com extratos de cimentos endodônticos (Microscopia de luz invertida, Leica Leitz, Germany, 100X).

citotoxicidade. Diluições muito citotóxicas foram eliminadas, pois buscava-se a observação de células capazes de se proliferarem, que não estivessem em apoptose.

O RoekoSeal e o MTA foram utilizados nas diluições 1:2, sendo o RoekoSeal utilizado também na diluição 1:4. O EndoREZ foi utilizado nas diluições 1:8 e 1:16; o AH Plus foi utilizado na diluição 1:8. Como controle positivo, foi utilizada solução de 5mM EMS

(EtilMetanoSulfonato). A comparação dos micronúcleos contados foi também realizada com a cultura controle não tratada.

Os resultados indicaram que o EndoREZ na diluição 1:8 favoreceu o aparecimento de micronúcleos ($mn=28,5$) com valores próximos dos valores gerados pelo controle positivo ($mn=33$). O RoekoSeal na diluição 1:2 gerou 17,7 micronúcleos nas culturas primárias. O mesmo material, entretanto, não foi genotóxico na diluição 1:4 ($mn=7,2$), valor este comparável ao encontrado no controle não tratado ($mn=7,5$). Embora ainda apresente genotoxicidade alta em relação ao controle não tratado, o EndoREZ também permitiu que valores médios mais baixos fossem encontrados quando a diluição 1:16 foi comparada à 1:8. O número de micronúcleos caiu de 28,5 para 20, o que representou uma diminuição da genotoxicidade relativa ao controle não tratado de aproximadamente 4 vezes para 2,5 vezes. O AH Plus apresentou genotoxicidade baixa na diluição 1:8, com valores 3 vezes menores que o controle positivo e sem diferença significativa do controle não tratado (1,4 vezes). O MTA, mesmo pouco diluído, também apresentou baixa toxicidade neste ensaio (2,4 vezes menor que o controle positivo).

A tabela 3 mostra valores médios de micronúcleos contados a cada 1000 células.

Tabela 3 - Formação de micronúcleos pelo contato das células da quinta passagem de cultura primária da polpa dental humana com extratos dos cimentos endodônticos. Valores expressos em micronúcleos por 1000 células, indicando os valores das médias.

Diluições dos Extratos	Média
AH Plus (1:8)	11
EndoREZ (1:8)	28.5
EndoREZ (1:16)	20
RoekoSeal (1:2)	17.7
RoekoSeal (1:4)	7.2
MTA (1:2)	13.5
Controle não tratado	7.5
EMS (5 mM)	33

De maneira geral, considerando a forma diluída utilizada de cada material, o extrato do EndoREZ (na diluição 1:8) proporcionou a maior genotoxicidade observada nas células de cultura primária da polpa dental, seguido do RoekoSeal (1:2). O AH Plus e o MTA apresentaram valores médios ligeiramente aumentados em relação ao controle não tratado, mas dentro do esperado (valor aproximado ou inferior a 12 micronúcleos em cada 1000 células contadas).

5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Retro-Transcrição (RT-PCR em Tempo Real)

5.4.1 Obtenção das Amostras

Após os testes de citotoxicidade, foram estabelecidas as subdoses dos extratos dos cimentos testados. Com base nos resultados obtidos no ensaio de MTT e no ensaio de micronúcleo, as seguintes subdoses foram selecionadas para a quantificação relativa da expressão gênica: AH Plus 1:16; EndoREZ 1:32; RoekoSeal 1:4 e MTA 1:4.

Após a sensibilização das células com os extratos condicionados, o RNA total foi isolado, quantificado e armazenado a -80°C até sua utilização nas reações de retrotranscrição. As amostras obtidas apresentaram valores de absorbância $A_{260/280} \sim 2.0$, de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes foi atingido.

As amostras apresentaram quantidade de RNA suficiente para todas as reações seguintes que se fizeram necessárias. Utilizou-se a quantidade de 1 µg de RNA na retro-transcrição.

5.4.2 Eficiência das Reações

A validação por meio de “Curvas de Eficiência” das reações de amplificação foi feita antes que iniciassem as comparações relativas.

Uma curva padrão foi desenvolvida para cada um dos *primers* selecionados, pois nesta fase foi testada a eficiência de amplificação dos *primers* correspondentes aos genes de interesse (alvo) e aos genes endógenos (que seriam posteriormente utilizados como referência ativa). Foram utilizadas para a curva padrão triplicata de amostras em 4 diluições seriadas de base 10, sendo que pelo menos três pontos de diluição foram considerados na confecção da curva de eficiência. Os gráficos correspondentes às curvas-padrão estão ilustrados nas figuras 23 a 28.

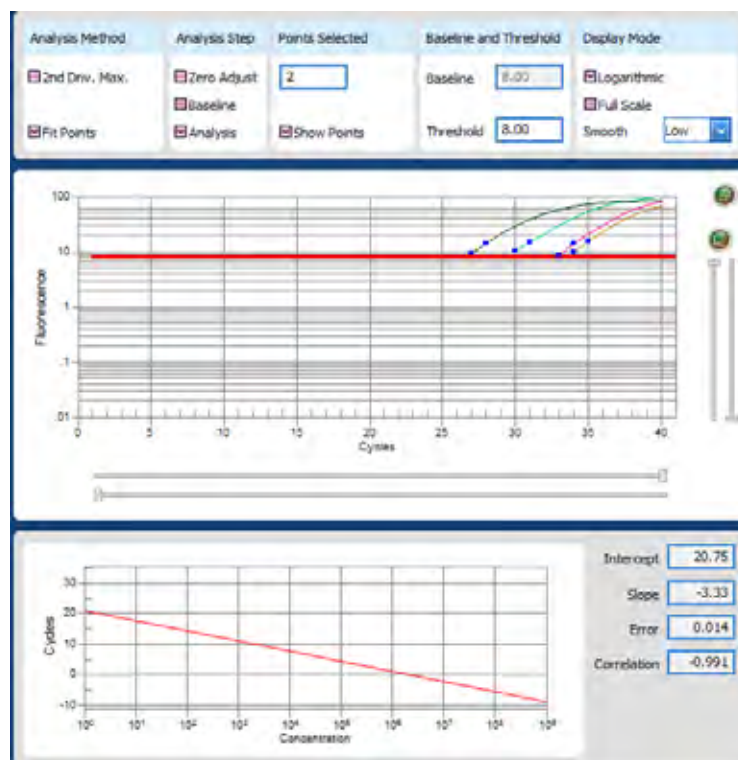


Figura 23 – Curva padrão de eficiência do RUNX-2; série de diluições de 1:10 a 1:10000.



Figura 24 – Curva padrão de eficiência da OC; série de diluições de 1:1 a 1:1000.



Figura 25 – Curva padrão de eficiência do BMP-2; série de diluições de 1:10 a 1:1000.

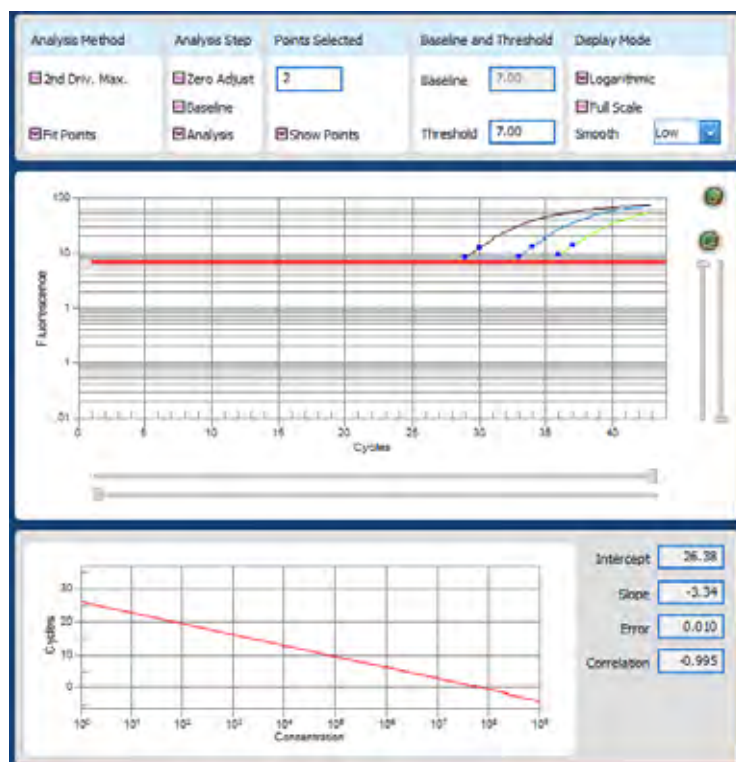


Figura 26 – Curva padrão de eficiência do OPN; série de diluições de 1:1 a 1:1000.

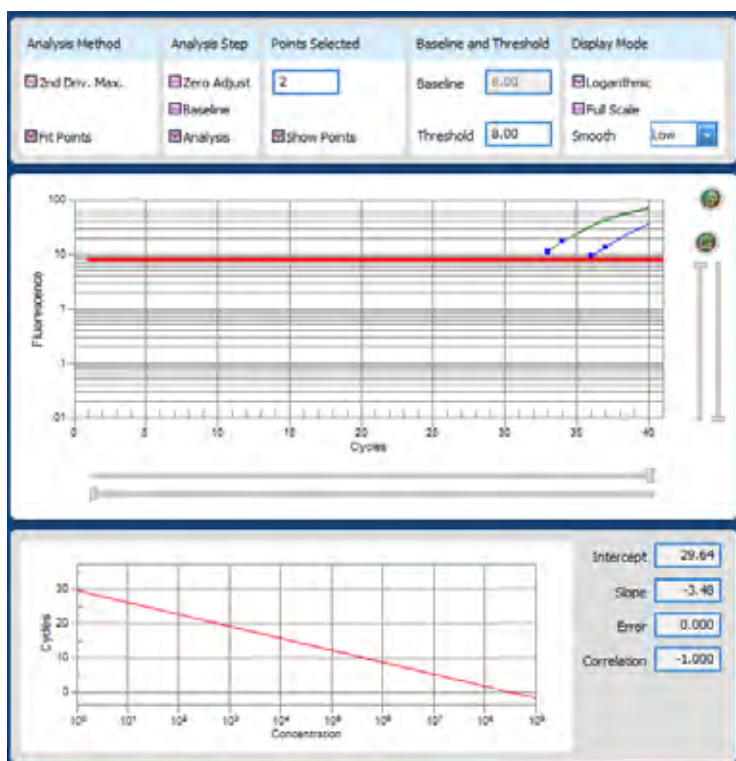


Figura 27 – Curva padrão de eficiência da ALP; série de diluições de 1:1 a 1:100

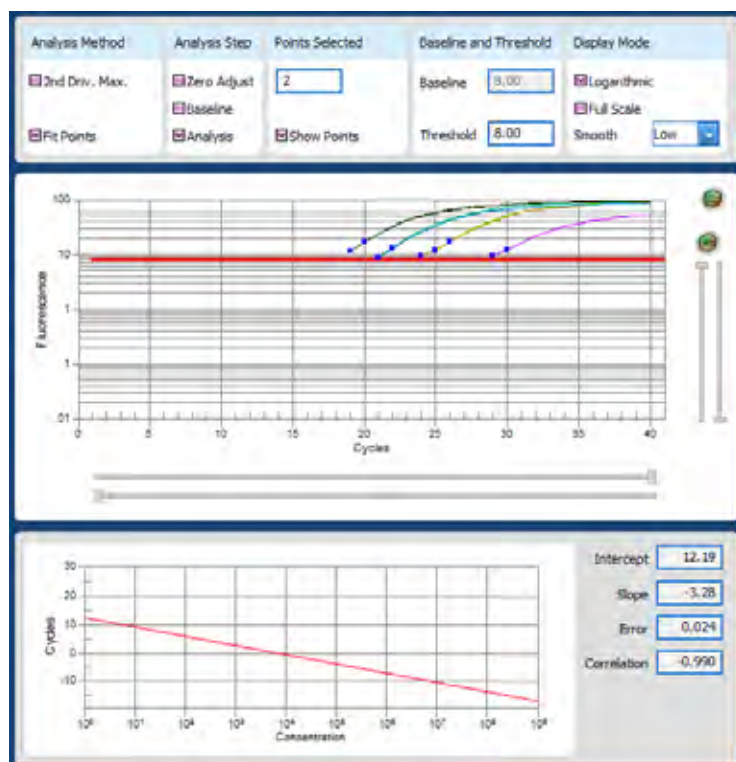


Figura 28 – Curva padrão de eficiência do GAPDH; série de diluições de 1:10 a 1:10000.

Procurou-se observar em todas as curvas, eficiência $\sim 100\%$ ($Slope \approx -3,32$) e coeficiente de correlação $\geq 0,99$.

A eficiência foi verificada também através da “curva de *melting*”, onde houve formação de um pico único e evidente, com temperatura de *melting* (T_m) acima de 80°C , indicando a ausência de anelamento do primer com ele mesmo ou de outros produtos inespecíficos. As figuras 29 a 34 apresentam os gráficos da curva de *melting* dos primers utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

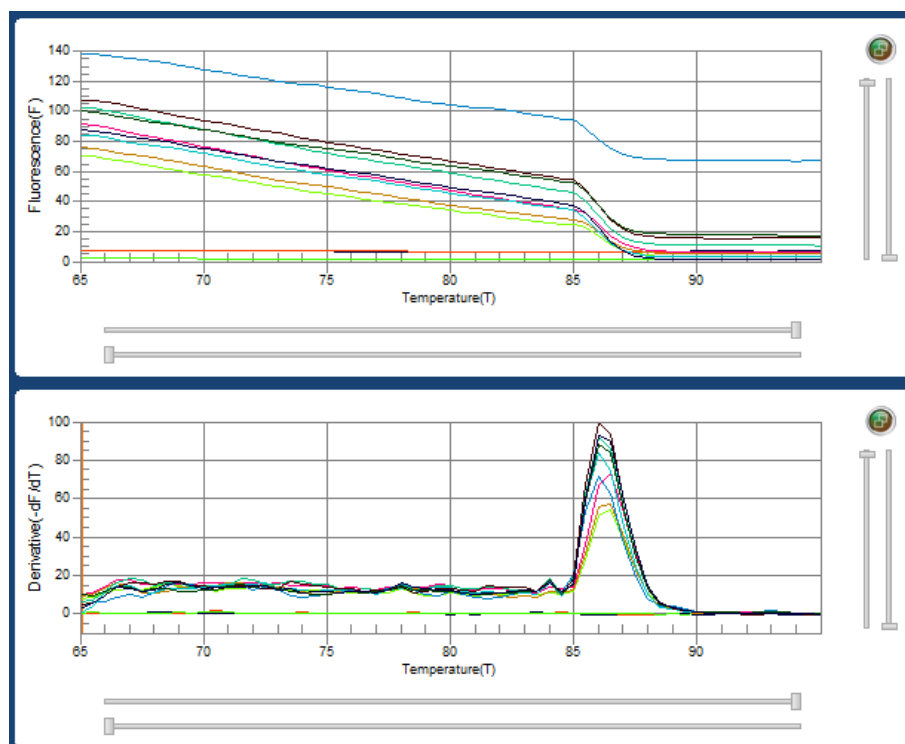


Figura 29 - Curva de *Melting* do RUNX-2.

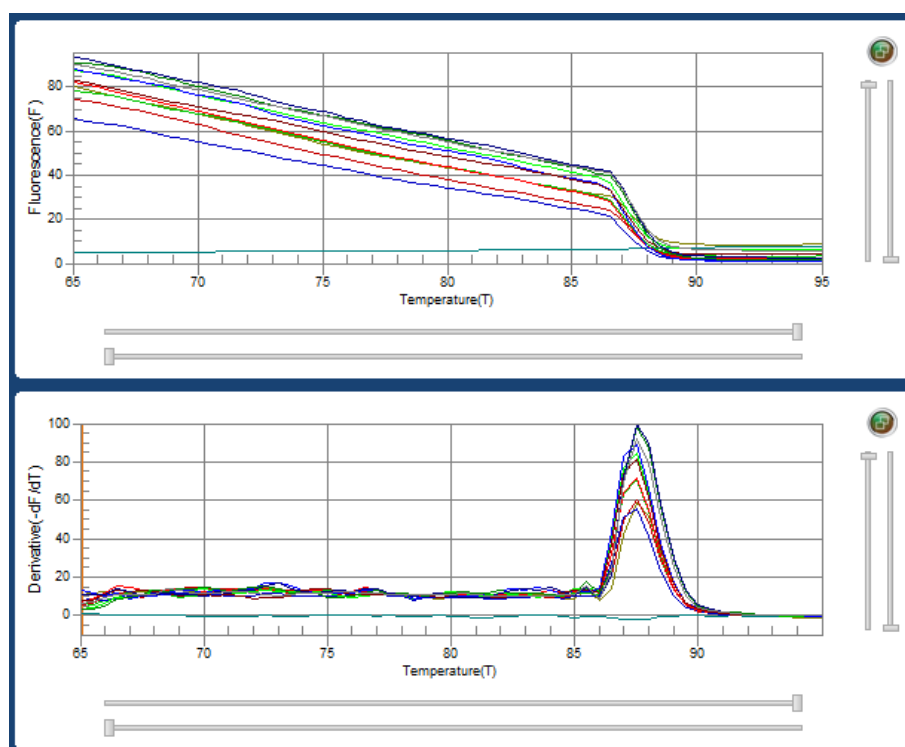


Figura 30 - Curva de *Melting* do BGLAP (OC).

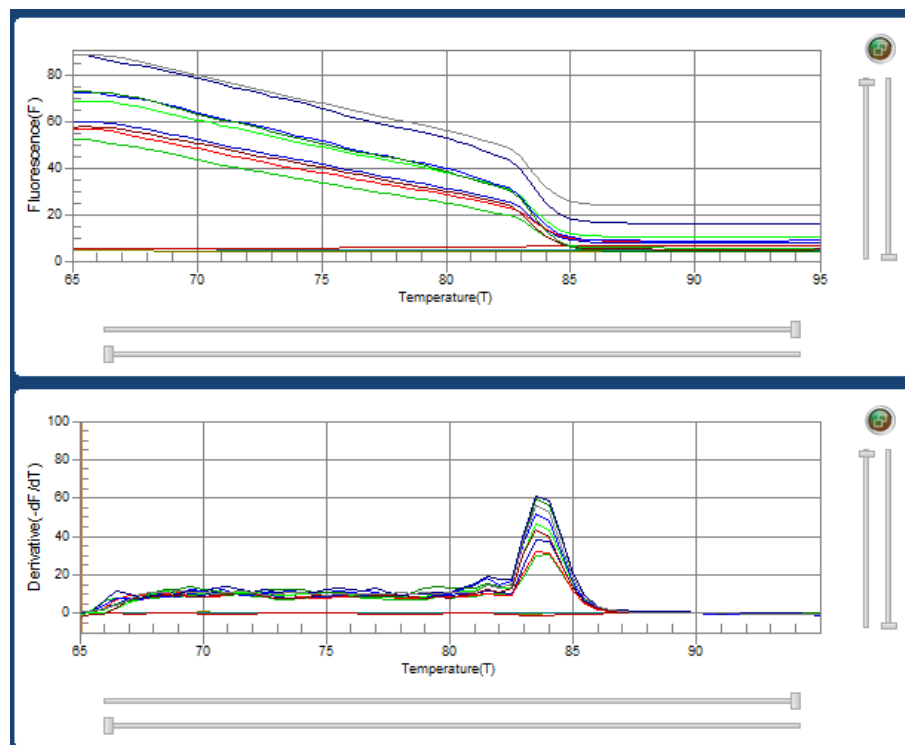


Figura 31 - Curva de *Melting* do BMP-2.

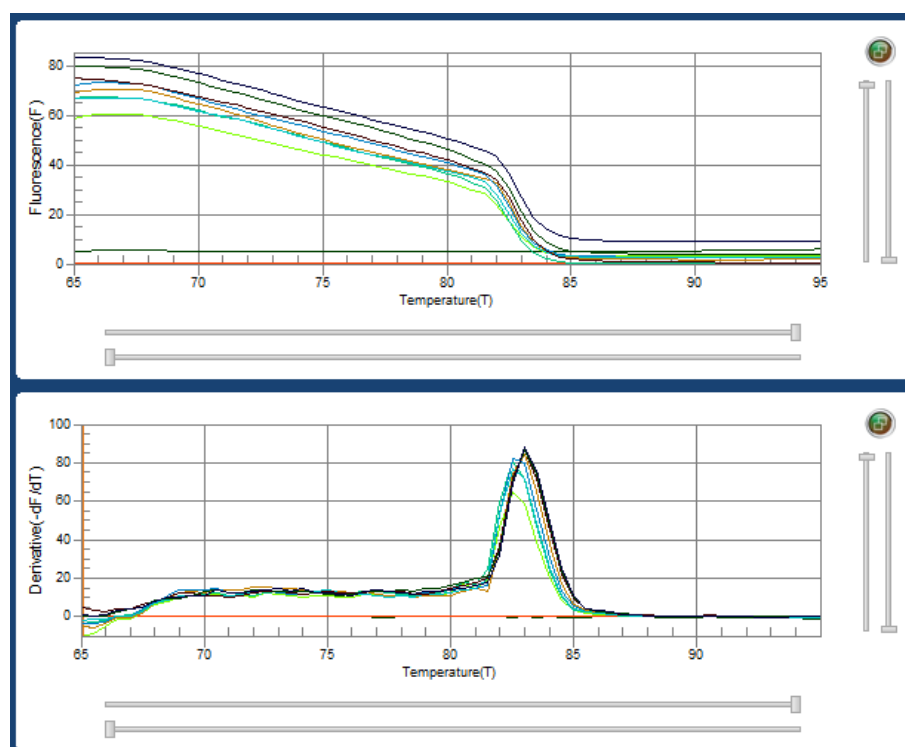


Figura 32 - Curva de *Melting* da OPN.

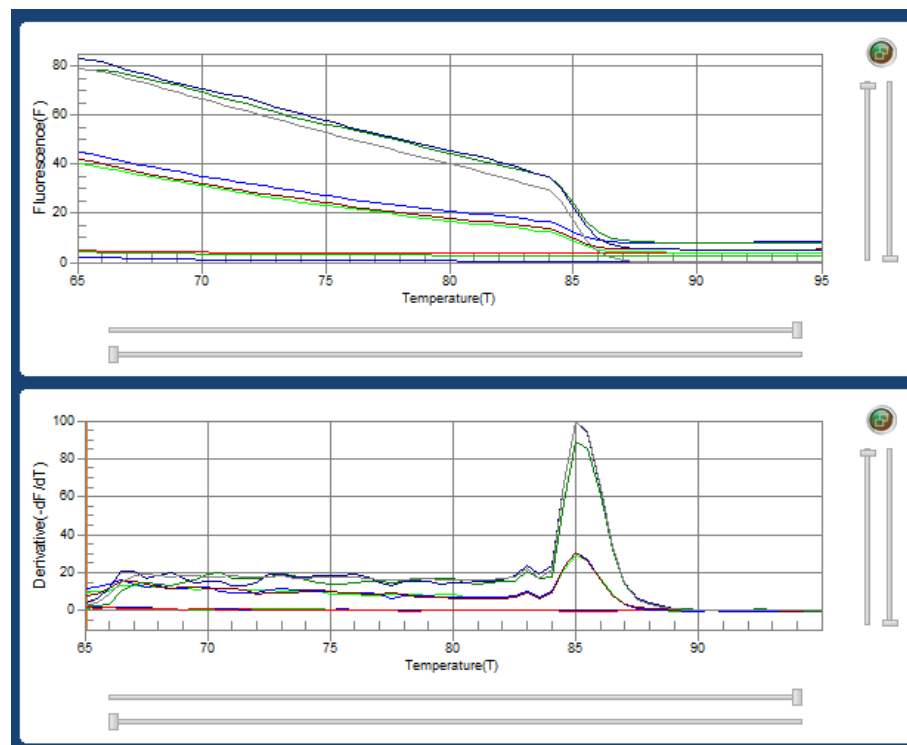


Figura 33 - Curva de *Melting* da ALP.

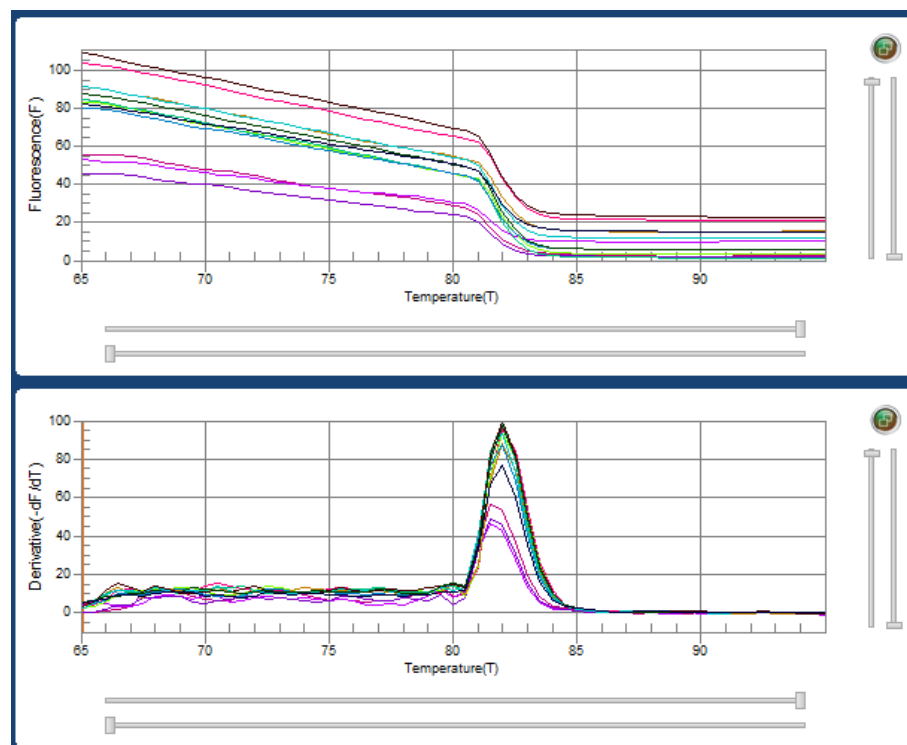


Figura 34 - Curva de *Melting* do GAPDH.

O gene DMP1 foi fracamente expresso nas células da polpa dental, de difícil detecção. Na tentativa de realização da curva padrão do DMP1, foi observada a amplificação correspondente a apenas uma amostra da triplicata, no Ct ~35. Acreditou-se inicialmente em se tratar de produto inespecífico. No entanto, numa nova reação contendo apenas amostras da triplicata do DMP1 com cDNA puro (1:1); amostra controle com o gene endógeno GAPDH e o mesmo cDNA puro (1:1); e um controle negativo, onde o cDNA foi substituído por água DEPC, indicou que a detecção do DMP1 ocorrera aproximadamente no ciclo 35. A detecção da expressão deste gene só foi possível após alteração do programa padrão utilizado para todos os outros genes de interesse. O programa teve início com a incubação UDG por 2min a 50°C; seguido de desnaturação a 95°C por 2 min; foram a seguir realizados 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 40 seg, e não 30 seg, como anteriormente padronizado. Por esse motivo, não foi possível a análise da curva de eficiência deste gene em específico. No intuito de evitar-se uma análise com valores inconsistentes, o DMP1 não participou da comparação relativa.

5.4.3 Quantificação Relativa

O resultado da quantificação relativa representa a variação no nível de expressão dos genes de interesse (BMP-2, RUNX-2, BGLAP, ALP e SPP1) entre as amostras sensibilizadas pelos extratos dos cimentos endodônticos e do MTA e a amostra do controle não tratado (calibrador, normalizado em 1).

Em cada reação, o bloco de PCR em Tempo Real foi preenchido com triplicata de amostras sensibilizadas contendo *primers* específicos para um dos genes-alvo, com triplicatas de amostras

sensibilizadas contendo *primers* do controle endógeno (referência ativa, normalizador), com o controle não tratado (UC), o qual serviu de “calibrador”, e com controle negativo (NEG). Os resultados foram obtidos pelo método de comparação da variação do Ct dos genes de interesse nas amostras sensibilizadas e na amostra controle e estão apresentados a seguir na tabela 4.

Tabela 4 - número de vezes que cada gene foi expresso em relação ao Controle (Calibrador) normalizado em 1.

	CONTROLE	MTA	AHPLUS	ROEKO SEAL	EndoREZ
OC					
6 h	1	2.43	1.96	4.15	3.95
12 h	1	1.20	0.79	0.54	0.56
24 h	1	1.34	0.60	0.99	1.29
ALP					
6 h	1	1.09	0.79	0.63	0.54
12 h	1	0.81	0.47	0.34	0.35
24 h	1	0.61	0.48	0.34	0.28
BMP2					
6 h	1	1.51	0.40	1.79	1.39
12 h	1	3.49	1.92	2.47	2.58
24 h	1	1.76	1.83	3.39	1.79
RUNX2					
6 h	1	1.30	0.81	0.53	1.50
12 h	1	1.28	0.38	0.60	1.49
24 h	1	1.13	1.15	0.55	0.50
OPN					
6 h	1	3.47	2.45	6.29	9.76
12 h	1	1.94	1.84	1.72	3.3
24 h	1	2.14	4.5	1.58	8.21

A figura 35 mostra gráficos que representam a comparação do número de vezes que cada gene foi expresso em relação ao controle não-tratado, normalizado em 1.

Considerando as variações num mesmo período de exposição, observou-se que em 24 h: o EndoREZ apresentou o maior aumento de expressão da OPN, seguido pelo AH Plus. Nesse mesmo período, a expressão da OPN nas amostras do MTA e RoekoSeal foram significativamente menores que as do EndoREZ ($P < 0,05$).

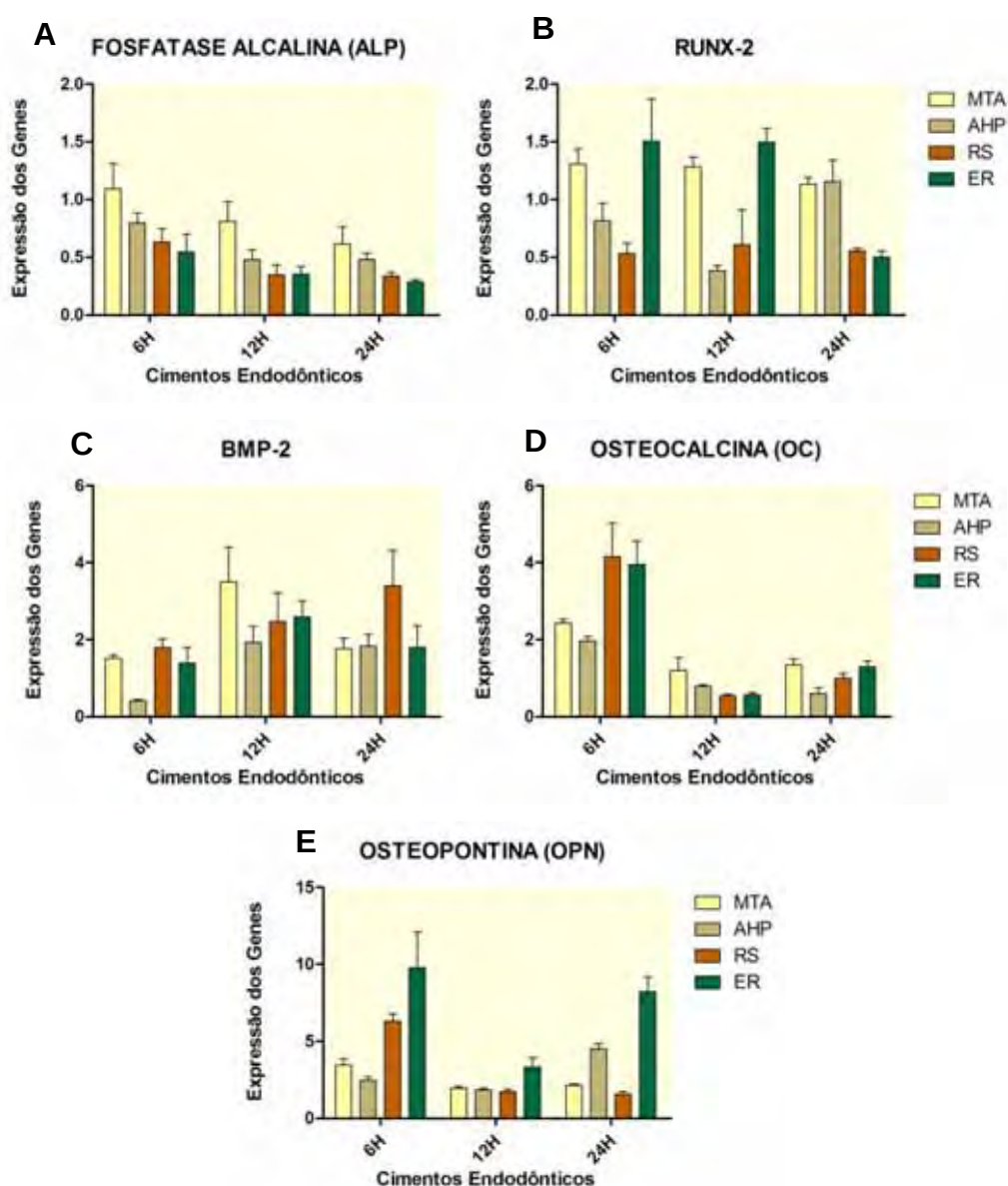


Figura 35 – Comparação da quantificação relativa de expressão das amostras. Os valores indicam o número de vezes de expressão em relação ao controle não tratado normalizado em 1 (A - ALP; B - RUNX-2; C - BMP-2; D - OC; E - OPN).

A redução de expressão da OPN foi de ~4x nas amostras sensibilizadas pelo MTA e de ~5x nas amostras sensibilizadas pelo RoekoSeal quando comparadas à amostra do EndoREZ.

Também em 24 h, observou-se pouca variação na expressão da osteocalcina (OC) em relação ao controle, com exceção do AH Plus, que obteve 60% da expressão do mesmo.

O RoekoSeal foi a amostra que apresentou o maior valor de expressão do BMP-2 (~3x o controle) em 24 h, embora todas as amostras tivessem obtido um aumento de expressão em ~1,7x o controle nesse mesmo tempo experimental. Após 12 h de contato, a expressão do BMP-2 pelas amostras tratadas por MTA foi de ~3x mais que o controle; a do AH Plus mostrou um aumento de expressão de 1,9x o controle; o RoekoSeal e o EndoREZ de ~2,5x.

Ainda no período de 24 h, o EndoREZ e o RoekoSeal mostraram expressão do RUNX2 50% menor que o controle não tratado. Nesse período de contato, o MTA e o AH Plus se comportaram de maneira semelhante ao controle. No caso do AH Plus, a diferença de expressão do gene RUNX2 esteve no período de 12 h, onde observou-se redução de ~2.5x em comparação ao controle.

A expressão da fosfatase alcalina (ALP) apresenta-se diminuída pelo contato com os materiais tanto em 6 h, quanto em 12 h e 24 h. Em 12 h e 24 h, o RoekoSeal e o EndoREZ mostram os menores valores se comparados ao controle. A maior expressão da fosfatase alcalina nestes tempos experimentais foi apresentada pelas amostras sensibilizadas pelo MTA, as quais apresentaram valor de expressão similar ao controle não tratado.

Em 12 h de contato, todas as amostras apresentaram expressões da OPN aumentadas em relação ao controle não tratado. Nesse período a expressão do EndoREZ foi também a maior se comparado aos outros cimentos (~3x a expressão do controle). Os outros materiais promoveram níveis similares de expressão da OPN em 12 h (~1.8x controle).

A expressão da OC em 12 h aparece reduzida em ~50% nas amostras do RoekoSeal e EndoREZ em relação ao controle. O MTA

apresenta expressão similar ao controle, e as amostras do AH Plus expressaram ~80% em relação ao controle não tratado.

Em 6 h de contato, todos os materiais promoveram aumento da expressão da osteocalcina em relação ao controle não tratado. Neste período, os maiores valores aparecem nas amostras do RoekoSeal e do EndoREZ.

Ao observar as variações comparando os 3 tempos experimentais, percebe-se que: a expressão do gene RUNX2 não apresentou variações significantes para o MTA e o RoekoSeal nos diferentes períodos (6 h, 12 h e 24h). No AH Plus, observou-se diminuição da expressão do RUNX2 quando comparados os períodos de 6 h e 12 h, seguida de aumento da mesma no período seguinte. A amostra do EndoREZ apresentou queda significativa de expressão do RUNX2 de 12 h para 24 h de contato.

A expressão da OC aparece elevada no período de 6 h em todas as amostras comparadas ao controle. Pequena variação foi observada na expressão da OC na amostra do MTA e do AH Plus de 12 h para 24 h. Observou-se aumento da expressão deste gene em 24 h para os extratos de EndoREZ e RoekoSeal.

A expressão da fosfatase alcalina apresentou-se quase invariada no período de 12 h para 24 h em todos os grupos. Após 24 h a expressão da fosfatase mostra redução de ~50% em todos os grupos quando comparada ao período de 6 h.

A expressão da OPN também aparece elevada nas primeiras horas de contato com os extratos. Entretanto, se comparados os períodos de 12 e 24 horas, observa-se aumento significativo na expressão da OPN apenas nas amostras do EndoREZ, embora o AH Plus também apresente elevação da expressão deste gene. O MTA e o RoekoSeal apresentam pouca variação neste mesmo período.

Com relação ao gene BMP-2, tanto o MTA quanto o EndoREZ apresentaram seus maiores níveis da expressão em 12 h de

contato. Ao observar os valores expressos em 6 h e 24 h, pequena variação existiu nessas amostras. O RoekoSeal gerou aumento na expressão do BMP-2 com o passar do tempo, sendo que a maior variação ocorreu de 12 para 24 horas. O AH Plus causou um aumento da expressão gênica do BMP-2 em 12 h, entretanto, após este período não houve variação significativa nesses valores.

6 DISCUSSÃO

6.1 Cultura de células primárias

Estudos que avaliam a toxicidade de materiais de uso odontológico tem empregado os mais variados tipos celulares. Alguns estudos *in vitro* foram realizados com a utilização de culturas primárias, como as culturas de fibroblastos imortalizados de ratos - 3T3 (células da cultura primária do ligamento periodontal), as culturas imortalizadas de odontoblastos MDPC-23 e as HDPC, células de cultura primária da polpa (Galler et al., 2011; Lessa et al., 2010). Outros estudos foram feitos com a utilização de linhagens celulares bem estabelecidas, como a L929 ou a V79 (fibroblastos de *hamster* chinês) e as células MG63, ou *human osteoblast-like MG63 cell* (Miletic et al., 2005; Silva, 2011; Xu et al., 2010).

Neste estudo, foram utilizadas células tipo fibroblastos de cultura primária da polpa dental de terceiro molar com rizogênese incompleta, para que alterações relacionadas à mineralização e toxicidade dos materiais, destinados a serem alocados em regiões onde tecidos dentários e estruturas a ele circunvizinhas estariam em contato, pudessem ser notadas.

Em ensaios de MTT, o fibroblasto tem sido um bom modelo por diversas razões: este tipo celular apresenta características semelhantes às das células encontradas em tecidos que estariam em contato com o material testado quando este fosse utilizado; uma segunda razão para que fibroblastos sejam utilizados em ensaios de citotoxicidade é que este tipo celular apresenta boa proliferação, em tempo de cultivo relativamente curto (24-48h). Quando os resultados a longo prazo são

buscados, os fibroblastos podem facilmente ser cultivados por períodos maiores. Outro bom motivo de uso do fibroblasto é que estas células tem manipulação simples, com baixo risco associados a elas.

O número de células plaqueadas por poço nos ensaios de citotoxicidade e de genotoxicidade foi decidido após realização da curva padrão de crescimento celular. A literatura apresenta diversos estudos onde 2000, 5000 e 8000 células foram utilizadas (Bin et al., 2011; Galler et al., 2011). Observou-se que em 24 h, a proliferação e viabilidade celulares aumentaram linearmente em relação ao tempo de cultivo. Em 48h, talvez por limitação de espaço concomitante à competição por nutrientes disponíveis no meio, observou-se que o crescimento de 8000 células plaqueadas foi baixo, inferior ao de 5000 células. Em 4 dias, a viabilidade celular aproxima-se novamente das plaqueadas inicialmente, sendo que não foram observadas variações entre os grupos de 5000 e 8000 células. Em 8 dias, o crescimento foi bastante limitado em todos os grupos. Optou-se desta forma por plaqueamento de 8000 células por poço, em 24 h de adesão celular. Nos testes de genotoxicidade, os números utilizados são proporcionais aos dos testes de citotoxicidade.

6.2 Preparo dos extratos

Durante o preparo dos extratos, as amostras de espécimes dos cimentos foram preparadas e padronizados de acordo com as normas da ISO 10993-5 (1992) que propõe a padronização dos espécimes na relação área/volume de 50 a 600 mm²/ml onde a superfície do material em contato com o meio de cultura permite a liberação de substâncias pelo material durante o seu tempo de endurecimento. No presente estudo foi utilizada a relação 84,06 mm²/ml, sendo os espécimes preparados e utilizados após 6 h de endurecimento. Procurou-se desta

forma a obtenção de um extrato ainda capaz de indicar o efeito que o material estudado exerceria sobre as culturas celulares, sem que estes efeitos fossem modificados por polimerização incompleta dos materiais.

No teste de micronúcleo, as culturas foram sensibilizadas com as subdoses dos extratos do AH Plus (Dentsply De Trey, Germany) na diluição 1:8; do EndoREZ (UltradentProductsInc,USA) nas diluições 1:8 e 1:16; do RoekoSeal (RoekoSeal Automix, Colthene/Whaledent, Germany) nas diluições 1:2 e 1:4; e do MTA Branco (Angelus, Paraná, Brasil) na diluição 1:2.

Com base nos resultados obtidos no ensaio de MTT e no ensaio de micronúcleo, as seguintes subdoses foram selecionadas para a quantificação relativa da expressão gênica: AH Plus 1:16; EndoREZ 1:32; Roeko Seal 1:4 e MTA 1:4.

As diluições dos extratos de cimentos endodônticos foram selecionadas para os testes de micronúcleo e de PCR em Tempo Real, por terem sido identificadas como tendo permitido viabilidade celular similar dentre os materiais testados, e posteriormente por não terem provocado genotoxicidade muito elevada nas células.

6.3 Citotoxicidade dos cimentos

A citotoxicidade foi avaliada pela sobrevivência estimada de células primárias de quinta passagem, através do ensaio de MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich Brasil LTDA) em período de 24 h de exposição às diluições dos extratos condicionados com cimentos endodônticos.

Os extratos originais (1:1) do AH Plus e do EndoREZ produziram alta toxicidade para as culturas celulares. A alta citotoxicidade também foi observada na diluição 1:2 destes cimentos, onde o AH Plus

permitiu viabilidade celular de 16,6% e o EndoREZ de 27,9%. Ao contrário do AH Plus e do EndoREZ, os extratos não diluídos do MTA e do Roeko Seal originaram baixa citotoxicidade nas culturas: as células expostas ao extrato original do MTA apresentaram proliferação semelhante às células do grupo controle não tratado (viabilidade celular de ~100%) e as células expostas ao extrato não diluído do RoekoSeal apresentaram viabilidade celular média de 85,9%. Estas diferenças de citotoxicidade foram significantes ($P < 0.05$ nas diluições 1:1 e 1:2), onde em concentrações mais altas o AH Plus e o EndoREZ apresentaram alta toxicidade quando comparados ao MTA e RoekoSeal, que não foram citotóxicos para células da polpa.

Embora alguns estudos tenham verificado a alta toxicidade do AH Plus (Bin et al., 2011; Camargo et al., 2009; Miletic et al., 2005; Schweikl, Schmalz, 2000; Silva, 2011; Souza et al., 2006), outros autores mencionaram a baixa citotoxicidade do mesmo em culturas celulares (Al-Hiyasat et al., 2010, Oztan et al., 2003).

Os resultados apresentados no testes de citotoxicidade deste estudo apontam a maior toxicidade do AH Plus e do EndoREZ em relação ao RoekoSeal e MTA. Assim como diversos estudos que indicaram uma alta citotoxicidade inicial do AH Plus mostraram que a reação inflamatória causada pelo contato com o este cimento era transitória, o presente estudo verificou que em concentrações mais elevadas, ou seja, extratos pouco diluídos, a toxicidade do AH Plus foi alta, sendo que a mesma decresceu após cada diluição. Esta situação pode ser comparada à uma dissolução dos componentes mais tóxicos com o passar do tempo de contato, concordando com resultados observados por outros autores (Farhad et al., 2011; Miletic et al., 2005; Scarparo et al., 2009; Schweikl, Schmalz, 2000).

Ao serem consideradas as diversas propriedades dos materiais endodônticos, a ação citotóxica inicial do AH Plus pode ter associado a ela um efeito benéfico de ação anti-microbiana. Segundo

estudo realizado por Willerhausen et al. (2011), o AH Plus promove juntamente com a diminuição da viabilidade celular um forte efeito antimicrobiano sobre *P micra*; além de bom selamento, prevenindo também a recolonização do canal radicular por microrganismos.

Ao comparar 4 cimentos resinosos em 2010, Al-Hiyasat et al., observaram citotoxicidade baixa no AH Plus e moderada no EndoRez; outros dois cimentos testados (Epiphany e MetaSeal) produziram toxicidade severa em cultura de fibroblastos. A metodologia empregada por estes autores, entretanto, utilizou extratos em 7 dias após a manipulação. Este método permitiu àqueles componentes mais tóxicos se dispersarem no decorrer do período testado. Desta forma, a toxicidade do AH Plus foi leve. Mesmo com este período maior no preparo dos extratos, a toxicidade causada pelo EndoREZ ainda foi considerada moderada.

Diversos autores observaram maior ação citotóxica do EndoREZ em relação a outros cimentos (Brackett et al., 2010; Eldeniz et al., 2007; Silva, 2011; Souza et al., 2006). Estudos também indicam que em tecidos de ratos, o EndoREZ pode causar inflamação intensa, possuindo biocompatibilidade tecidual reduzida (Scarpato et al., 2009; Souza et al., 2006; Zmener et al., 2005). Neste estudo, o EndoREZ apresentou alta citotoxicidade às células primárias da polpa dental. Esta toxicidade deve-se a presença do UDMA em sua formulação (Eldeniz et al., 2007) e principalmente pela camada de inibição de oxigênio que mesmo após o endurecimento do material, se mostra plástica.

Assim como o RoekoSeal, o MTA apresentou baixa citotoxicidade neste estudo. Diversos outros autores mencionam que o RoekoSeal tenha efeito invariado com o decorrer do tempo, apresentando-se desta forma como um material de baixa citotoxicidade, mesmo imediatamente após sua manipulação (Gencoglu et al., 2009; Miletic et al., 2005; Oztan et al., 2003; Silva, 2011).

Estudos observaram também a boa tolerância tecidual ao MTA, onde testes realizados com este material indicaram baixa toxicidade

e ainda estimulação de mineralização ou de proteínas a ela relacionadas (Bin et al., 2011; Guven et al., 2007; Lessa et al., 2010; Maeda et al., 2010; Yasuda et al., 2008).

6.4 Ensaio de Micronúcleo

Micronúcleos foram contados como estruturas presentes nos citoplasmas das células, cercados por uma membrana nuclear, incluindo uma área 1/3 menor do que a área do núcleo principal, indicativos de genotoxicidade celular.

No teste de micronúcleo, como controle positivo, foi utilizada solução de 5 mM EMS. A comparação dos micronúcleos contados foi realizada com a cultura controle não tratada e com os extratos dos cimentos endodônticos em diluições específicas.

Os resultados indicaram que o EndoREZ na diluição 1:8 favoreceu o aparecimento de 28,5 micronúcleos, valores estes próximos aos gerados pelo controle positivo (mn=33). Além do efeito citotóxico propiciado às células primárias da polpa dental, o EndoREZ apresentou alta genotoxicidade, provavelmente devido ao UDMA e a camada de inibição de oxigênio presente em sua formulação (Eldeniz et al., 2007). Na diluição 1:16, houve redução do número de micronúcleos contados em comparação a diluição 1:8, de 28,5 para 20 micronúcleos. Entretanto, este valor ainda foi 2,6 vezes maior que o encontrado no controle não tratado.

O RoekoSeal na diluição 1:2 gerou 17,7 micronúcleos nas culturas primárias. Tendo em vista que este valor é quase a metade do número médio de micronúcleos gerados pelo controle positivo, e ainda que o MTA (1:2) e o AH Plus (1:8) também apresentaram valores ligeiramente maiores que o controle (13,5 e 11 micronúcleos, respectivamente), o valor aumentado em relação ao controle não tratado

pode estar simplesmente relacionado à ação irritante de um material estranho, pouco diluído, em contato com as culturas celulares. Na diluição 1:4, o RoekoSeal já apresenta média de 7,2 micronúcleos, sendo este valor comparável ao encontrado no controle não tratado ($mn=7,5$) e indicando, nesta diluição uma baixa genotoxicidade deste cimento.

6.5 Quantificação Relativa

Para o desenvolvimento da PCR em Tempo Real, buscou-se a obtenção de amostras que apresentassem valores de $A_{260/280} \sim 2.0$, de modo que o grau de pureza necessário para o bom desempenho das reações subsequentes fosse atingido.

O RNA foi purificado com a utilização do PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA), associado ao reagente Trizol (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA).

A obtenção de RNA livre de contaminações, com grau de pureza desejável para as reações de PCR em Tempo Real foi facilitada com a utilização do sistema de colunas do kit de purificação.

O RUNX2 é um fator de transcrição que controla o processo de diferenciação e maturação óssea modificando a expressão de diversos genes, como OPN (SPP1), e OC (BGLAP). Durante o processo de diferenciação de osteoblastos, RUNX2 direciona células mesenquimais pluripotentes à linhagem odontoblástica. A expressão do RUNX2 é alterada como um processo dinâmico: RUNX2 aparenta ser fortemente expresso até a formação de osteoblastos imaturos, e durante o processo de maturação sua expressão é diminuída. Em situações onde a expressão do RUNX2 é aumentada, ocorre a inibição da maturação dos

osteoblastos e a redução da expressão da OC e aumento da expressão da OPN (Komori, 2009; Maruyama et al., 2007).

Ao observar as variações comparando os 3 tempos experimentais, percebe-se que: a expressão do gene RUNX2 não apresentou variações significantes para o MTA nos diferentes períodos (6h, 12h e 24h). Esta similaridade ao controle e estabilidade na expressão deste fator de transcrição indica que o MTA não estaria interferindo no processo de diferenciação e maturação celular nestes períodos experimentais.

O RoekoSeal e o AH Plus apresentaram expressão reduzida do fator de transcrição RUNX2 em alguma fase do experimento. Ao considerar que nesta fase as células são imaturas para osteogênese, acredita-se que a diminuição do RUNX2 tenha ocorrido pela ação do contato com um material estranho. O AH Plus apresentou esta redução de expressão mais evidente em 12 h de contato. Em 24 h, a expressão do RUNX2 na amostra do AH Plus já voltou a ser semelhante ao controle e ao MTA. Tal fato pode ter ocorrido devido à alta toxicidade inicial do AH Plus mencionada por diversos autores (Miletic et al., 2005; Schweikl, Schmalz, 2000; Silva, 2011), que talvez tenha causado uma alteração transitória no processo normal de diferenciação celular, da qual a célula tenha rapidamente se recuperado. Com relação ao RoekoSeal, a expressão do RUNX2 é reduzida, mas permanece estável em todos os períodos, o que indica que o tempo de contato com o material não estaria promovendo dano maior que o causado pelo contato inicial.

De um modo geral, ao comparar o quadro de variações nas expressões dos genes que expressam as proteínas relacionadas à mineralização, verificamos que o material que causou a menor variação nas amostras foi o MTA, como era esperado. Nas amostras sensibilizadas pelo MTA, expressão do gene RUNX2 foi similar à do controle nos três períodos observados. O mesmo foi observado na expressão da fosfatase alcalina (ALP) nas amostras deste material e também da osteocalcina

(OC). No caso da OC, a amostra do MTA apresentou elevada expressão apenas no grupo de 6 h, mas este fato foi observado em todos os outros materiais testados. Ainda no caso do MTA, nota-se aumento da expressão do BMP-2 em 6 h, 12 h e 24 h de contato, sendo este incremento de BMP-2 mais evidente após 12 h de contato. O aumento do BMP-2 estimulado pelo contato com MTA concorda com estudos anteriores (Maeda et al., 2010 e Yasuda et al., 2008), onde os autores verificaram que o MTA não só favorece a expressão do BMP-2, como exerce importante papel no processo mineralização como um todo. Dentro da metodologia empregada neste estudo, o MTA atuou como material biocompatível, que favorecendo a expressão do gene BMP-2 na quantificação relativa por PCR em Tempo Real.

Em todos os tempos experimentais, observou-se também um aumento na expressão da OPN pelo contato com o MTA. Observou-se ainda que os valores, mesmo aumentados, mantiveram-se estáveis em 12 e 24 h após o contato, tanto nas amostras do MTA quanto nas amostras do RoekoSeal.

A OPN tem diversas funções e é expressa em diversas situações em diversos tecidos e tipos celulares, entre eles osteoblastos, odontoblastos e fibroblastos. A expressão da OPN pode ser afetada por hormônios, citocinas, fatores de crescimento, etc. Em geral, a OPN tem como função primordial a reparação e sua expressão é normalmente aumentada após injúria ou agressão (Sodek et al., 2000).

Em 2003, Rashid et al. investigaram o efeito do cálcio extracelular sobre as proteínas relacionadas à mineralização óssea, dentre elas a ALP, a BMP-2 e a OPN em células de cultura primária da polpa humana. Os autores observaram que a elevação da concentração de cálcio promoveu um aumento na expressão tanto do BMP-2 quanto da OPN e diminuição da expressão da fosfatase (ALP).

Após contato com os extratos dos cimentos endodônticos, a OPN aparece com expressão elevada de modo geral, o que nos induz a

acreditar que tal aumento de expressão tenha ocorrido pela presença em altas concentrações das substâncias componentes dos próprios materiais, num primeiro momento de contato. O aumento da expressão deste gene foi significativo nas amostras do EndoREZ em 12 h e 24 h; esta expressão elevada foi observada também nas amostras do AH Plus em 24 h de contato.

Com exceção do MTA, as amostras dos outros cimentos também apresentaram redução acima de 50% na expressão da fosfatase alcalina com relação ao controle não tratado, onde o AH Plus apresentou redução de ~50%, seguida do RoekoSeal e EndoREZ, cujos valores foram reduzidos para ~35% e ~30%, respectivamente.

Conforme observado em estudos anteriores, quando ocorre diminuição da fosfatase alcalina não específica durante o processo de diferenciação óssea, além de haver um acúmulo de PPi por falta de hidrólise do mesmo (devido à ausência da fosfatase), ocorre ainda a falta de Pi, originando o desequilíbrio no processo normal de biomineralização. Segundo Harmey et al., 2004, o acúmulo do PPi associado à alta expressão da OPN promoveu hipomineralização em osteoblastos.

Em 12 h, o EndoREZ apresentou concomitantemente redução na expressão da osteocalcina, aumento significativo na expressão da OPN e redução de 65% na fosfatase alcalina, associado ainda à leve elevação na expressão do RUNX2. Tais valores presentes em 12 h e também em 24 h (exceto OC, que permaneceu estável nesse tempo experimental), podem estar associados à inibição do processo de biomineralização (Harmey et al., 2004; Komori, 2009; Maruyama et al., 2007).

O AH Plus apresentou quadro de expressão dos genes OPN e ALP similar ao do EndoREZ após contato de 24 h. No entanto, estes valores apresentaram-se mais discretos, principalmente em contato de 12 h.

O gene DMP1 foi fracamente expresso nas células da polpa dental, com difícil detecção. Por esse motivo, não foi possível a análise da curva de eficiência deste gene em específico. Na tentativa de realização da curva padrão do DMP1, foi observada a amplificação do DMP1 no Ct ~35.

Segundo Abd-Elmaguid et al., 2012, o DMP1 tem como uma de suas funções a indução da diferenciação de células imaturas da polpa dental em odontoblastos, e tal proteína normalmente é ausente em polpas não inflamadas e dentes impactados com rizogênese completa.

Martinez et al., 2009, mencionaram que a marcação positiva ou negativa observada em células imaturas da polpa dental representa o potencial de diferenciação destas células em células odontoblásticas ou representam células mesenquimais, respectivamente.

Acredita-se desta forma, que a detecção fraca da DMP1 em células da polpa dental, tenha ocorrido em função de se tratarem de células imaturas, mas com potencial de diferenciação a elas associado devido aos tecidos de sua origem.

De acordo com os resultados da expressão gênica, futuros estudos devem ser realizados para verificar se as alterações na expressão dos genes serão confirmadas na síntese proteica.

7 CONCLUSÃO

De modo geral, os materiais testados apresentaram diminuição da citotoxicidade proporcional à diluição dos mesmos, onde extratos mais diluídos favoreceram a proliferação celular quando comparados às células expostas aos extratos mais concentrados. Os testes de citotoxicidade indicaram que a sobrevivência celular foi afetada pelos extratos, do mais tóxico para o menos tóxico, na seguinte ordem: EndoREZ > AH Plus > RoekoSeal ≥ MTA.

O EndoREZ (1:8) propiciou o maior número de micronúcleos no ensaio de genotoxicidade, semelhante ao controle positivo, diferindo dos demais materiais.

O AH Plus apresentou quadro de expressão dos genes OPN e ALP similar ao do EndoREZ após contato de 24 h. Os dois cimentos propiciaram concomitantemente aumento na expressão da OPN e redução na expressão da ALP em relação ao controle não tratado, embora os valores tenham sido mais discretos no AH Plus.

As amostras sensibilizadas pelo RoekoSeal apresentaram diminuição da expressão da ALP associada a expressão da OPN decrescente com o tempo de contato. Verificou-se expressão também reduzida, porém estável, do gene RUNX2, em relação ao controle não tratado.

Nas amostras sensibilizadas pelo MTA, expressão do gene RUNX2, da fosfatase alcalina (ALP) e da osteocalcina (OC) apresentou pouca variação em relação ao controle nos períodos observados.

8 REFERÊNCIAS*

Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):75-80.

Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J*. 2010 Feb;43(2):148-53.

Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Mar;8(3):212-26.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):495-500. Epub 2011 Dec 23.

Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):380-6.

Camargo CH, Camargo SE, Valera MC, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Dec; 108(6):952-60.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] Disponível em: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Deshpande AS, Fang PA, Zhang X, Jayaraman T, Sfeir C, Beniash E. Primary structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization. *Biomacromolecules*. 2011 Aug 8;12(8):2933-45.

Eldeniz AU, Erdemir A, Hadimli HH, Belli S, Erganis O. Assessment of antibacterial activity of EndoREZ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):119-26.

Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J*. 2007 May;40(5):329-37.

Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci*. 2011 Mar;53(1):15-21.

Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, et al. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res*. 2011 Feb;90(2):257-62.

Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem*. 2009 Nov;112(6):567-75.

Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials--histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig*. 1997 Feb;1(1):5-11.

Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res*. 1990 Mar;69(3):909-12.

Güven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):447-50.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 1996 May;12(3):186-93.

Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol.* 2004 Apr;164(4):1199-209.

Kirsh-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowic M, Gonzalez L, Looock KV et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 2011 May;85(5):873-99.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan;339(1):189-95.

Leonardo MR, Flores DS, de Paula ESW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod.* 2008 Jul;34(7):822-5.

Lessa FC, Aranha AM, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-Bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz Dent J.* 2010 Jan;21(1):24-31.

Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, et al. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod.* 2010 Apr;36(4):647-52.

Martinez EF, da Silva LA, Furuse C, de Araujo NS, de Araujo VC. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. *Braz Dent J.* 2009;20(5):365-9.

Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn.* 2007 Jul;236(7):1876-90.

Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod*. 2005 Apr;31(4):307-9.

Muthukuru M. Bone morphogenic protein-2 induces apoptosis and citotoxicity in periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2012 Jul 27 [*Epub ahead of print*].

Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J*. 2011 Apr;44(4):370-5.

Oliveira RL, Filho RSO, Gomes HC, Franco MMS e Duarte MAH. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. *Oral Surg, Oral Med, Oral Radiol Endod* 2010 Jan;109(1):e50-e54.

Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch*. 2010 Feb;77(1):4-12.

Oviir T, Pagoria D, Ibarra G, Geurtsen W. Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. *J Endod*. 2006 Mar;32(3):210-3.

Oztan MD, Yilmaz S, Kalayci A, Zaimoglu L. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *J Oral Rehabil*. 2003 Apr;30(4):426-9.

Pfaffl MW. Chapter3. Quantification strategies in real-time PCR. in *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA, USA: SA Bustin; 2004.

Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, et al. The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod*. 2003 Feb;29(2):104-7.

Rodrigues TL, Foster BL, Silverio KG, Martins L, Casati MZ, Sallum EA, et al. Hypophosphatasia-associated deficiencies in mineralization and gene expression in cultured dental pulp cells obtained from human teeth. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):907-12.

Scarpato RK, Grecca FS, Fachin EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):229-32.

Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA, 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*. 1999 Jul;130(7):967-75.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod*. 2002 Nov;28(11):749-53.

Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH plus. *Biomaterials*. 2000 May;21(9):939-44.

Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig*. 1998 Sep;2(3):125-9.

Silva GO. Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos em fibroblastos v79 [dissertação]. São José dos Campos. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2011.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(3):279-303.

Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *J Endod*. 2006 Jul;32(7):656-62.

Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J*. 2006 Jan;39(1):40-7.

Vasconcelos BC, Bernardes RA, Duarte MA, Bramante CM, Moraes IG. Apical sealing of root canal fillings performed with five different endodontic sealers: analysis by fluid filtration. *J Appl Oral Sci.* 2011 Aug;19(4):324-8.

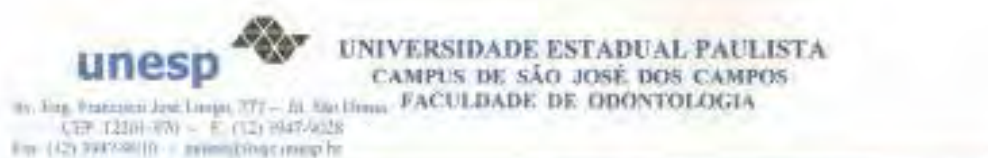
Willershausen I, Callaway A, Briseno B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.* 2011;7:15.

Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):40-4.

Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod.* 2008 Sep;34(9):1057-60.

Zmener O, Banegas G, Pameijer CH. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):457-9.

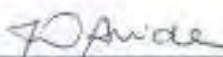
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 064/2010-PH/CEP, sobre “O efeito do extrato de três cimentos endodônticos sobre a expressão dos genes Bmp-2, ALP, Runx2 e Bglap, OPN, DMP1 e Dspp em células da papila dental humana”, sob a responsabilidade de **CARLOS HENRIQUE RIBEIRO CAMARGO**, tendo como orientada Sylvia Bicalho Rabelo, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2010.



 Profa. Adjunta **JANETE DIAS ALMEIDA**
 Coordenadora

ANEXO B – Declaração de doação para pesquisa de dentes extraídos na clínica de cirurgia da UNES



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que os dentes terceiros molares humanos inclusos, recolhidos com a finalidade de pesquisa, pela aluna Doutoranda **SYLVIA BICALHO RABELO**, serão extraídos de pacientes atendidos no ambulatório da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos – UNESP, por motivos ortodônticos, periodontais e/ou protéticos, os quais seriam descartados após a extração, caso não fossem de utilidade para a referida aluna.

Declaro, ainda, que na ocasião será solicitado o consentimento esclarecido do paciente quanto à doação do material para pesquisa científica.

São José dos Campos, 05 de outubro de 2010

Prof. Dr. **FERNANDO VAGNER RALDI**
Responsável pela Disciplina de CTBMF