



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

CLAUDIA VILLELA BIN

**EFEITO DE BIOMATERIAIS NO CRESCIMENTO E
FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS PROGENITORAS DA POLPA
DENTÁRIA**

2014

CLAUDIA VILLELA BIN

**EFEITO DE BIOMATERIAIS NO CRESCIMENTO E FUNCIONALIDADE DE
CÉLULAS PROGENITORAS DA POLPA DENTÁRIA**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus São José dos Campos, 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

2014

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Cimentos capeadores diretos da polpa	13
2.1.1 Biodentine	13
2.1.2 MTA e Ca(OH) ₂	18
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cultura celular	28
4.1.1 Descongelamento.....	28
4.1.2 Troca de meio.....	30
4.1.3 Subcultivo.....	30
4.1.4 Contagem celular	32
4.1.5 Curva padrão de viabilidade e crescimento celular	33
4.1.6 Plaqueamento	33
4.2 Materiais Bioativos	33
4.2.1 Divisão dos grupos experimentais.....	34
4.2.2 Preparo dos meios condicionados.....	35
4.3 Ensaio de XTT	36
4.4 Ensaio de SRB	37
4.5 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)	39
4.6 Análise de formação de nódulos minerais (Ensaio de Alizarin Vermelho)	40

4.7 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Curva padrão de viabilidade e crescimento celular	43
5.2 Citotoxicidade	43
5.3 Fosfatase Alcalina	49
5.4 Alizarin Vermelho	51
6 DISCUSSÃO	54
6.1 Ensaio de citotoxicidade	54
6.2 Fosfatase Alcalina	58
6.3 Alizarin Vermelho	59
7 CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIAS	64
ANEXO	74

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Assist. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Marcia Carneiro Valera

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Vivien Thiemy Sakai

Faculdade de Odontologia
UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

São José dos Campos, 18 de junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Cláudio e Arlene: a realização deste trabalho somente foi possível devido aos anos de sacrifício de vocês, para que pudéssemos, sempre, ter a melhor educação.

Vocês sempre serão exemplos de amor, carinho, dedicação e família...

Aos meus queridos irmãos Rafael e Mariana: agradeço pelo carinho, pelas risadas, pela ajuda, conselhos, companhia e pela nossa união em todos os momentos.

Ao meu amado João: obrigada pelo eterno incentivo na minha profissão, pelo crescimento conjunto... Por toda ajuda na execução deste trabalho e pela imensa compreensão. Obrigada por sempre ser tão prestativo e companheiro.

Ao meu orientador Carlos Henrique: agradeço por me aceitar como sua aluna de Doutorado, pela confiança em meu trabalho, pela paciência, pelos conselhos, pela ajuda que obtive, pela sua disponibilidade e pelo carinho e educação com que sempre me tratou. Obrigada por tudo professor “Ique”...

À querida professora Márcia: Obrigada pelo aprendizado nesses cinco anos de pós-graduação, por acreditar em mim, pela atenção extrema com que sempre me recebeu tanto na faculdade quanto em sua casa. Pelos conselhos sempre tão construtivos e animadores... E obrigada por sempre respeitar as minhas decisões e opiniões. A senhora é um exemplo para todos.

Ao Professor Bruno Cavalcanti: obrigada pela ideia do projeto, pela sua dedicação, pelas oportunidades que tive em aprender novas metodologias, pela sua disponibilidade “quase que diária”, pela sua educação e paciência de sempre. Jamais me esquecerei da ajuda e aprendizado que o senhor e a “Marcinha” me proporcionaram...

À professora Ana Paula: sempre tão querida, carinhosa, companheira, animada e meiga... Aprendi muito com a senhora durante os anos juntos de Clínica Integrada. Seus conselhos são para muito além da faculdade, são para sempre...

As queridas amigas Nádia, Adriana Chung, Camila, Sylvia, Maria Teresa, Rafaela e Ivany: “que saudades eu já sinto de vocês...” Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos sempre tão alegres, pelas risadas e ajudas infinitas!!! O caminho foi muito mais fácil tendo vocês ao meu lado...

Ao professor Ivan Balducci pela realização da estatística deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, à secretaria e todos os funcionários que contribuíram com este trabalho.

Bin CV. Efeito de biomateriais no crescimento e funcionalidade de células progenitoras da polpa dentária [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Na Endodontia, estudos têm demonstrado avanços nas terapias reparativas e regenerativas que visam à recuperação da vitalidade e função do tecido pulpar. Para isso são realizadas técnicas conservadoras como o capeamento pulpar e pulpotomia. Os materiais bioativos comumente empregados durante o capeamento pulpar são o MTA e o Ca(OH)_2 PA. Porém, um novo material denominado Biodentine, a base silicato de tricálcio, está sendo comercializado com o mesmo propósito. Contudo, os efeitos biológicos deste cimento ainda não são claros, principalmente em se tratando da polpa a ser regenerada. Desta forma, este trabalho avaliou os efeitos destes materiais sobre células progenitoras. A biocompatibilidade da Biodentine, MTA e Ca(OH)_2 foi analisada por ensaios de citotoxicidade (XTT e SRB), após 1, 3 e 5 dias do contato das células com os materiais. Os processos funcionais de mineralização foram verificados pela quantificação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) envolvida no processo de mineralização, bem como pela observação da formação de nódulos mineralizados pelo ensaio de alizarin vermelho. Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos (ANOVA e Tukey 5%) e demonstraram uma significativa biocompatibilidade da Biodentine nos ensaios de citotoxicidade. Contudo, o cimento de Ca(OH)_2 foi o material que estimulou a maior atividade de ALP. Além disso, todos os cimentos propiciaram a formação de nódulos mineralizados a partir do sétimo dia, no teste do alizarin vermelho. Pôde-se concluir que a Biodentine pode ser uma importante alternativa como material capeador nos procedimentos regenerativos.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Biodentine. Reparo pulpar. Células-tronco.

Bin CV. Effect of biomaterials on dental pulp stem cell growth and functionality [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

With the use of principles of regenerative therapies in Endodontics, new tissue engineering strategies have showed success in the de novo formation of pulp tissue in animal models. The commonly used materials on the original dental pulp tissue are the MTA and calcium hydroxide. In addition, a new material known as Biodentine, based on tricalcium silicate, is new to the market, with the same purpose of the others. However, the biological effects and mechanisms of this bioactive material are not elucidated. This project evaluated the effects of these biomaterials on dental pulp stem cells. The biocompatibility of them was assessed by XTT and SRB assays, at 1, 3 and 5 days. The alkaline phosphatase activity assay and alizarin red staining of mineralized nodules was assessed by functional mineralization. The results were subjected to statistical analysis (ANOVA and Tukey 5%) and demonstrated a significant Biodentine's biocompatibility in cytotoxicity assays. However, Ca(OH)₂ cement was the material that was most stimulated ALP activity. In addition, all cements enabled the formation of mineralized nodules from the seventh day, in alizarin red test.

Keywords: Cytotoxicity. Biodentine. Pulp healing. Stem Cell.

1 INTRODUÇÃO

Cicatrização tecidual pode ser definida como a resposta programada de um determinado tecido ou órgão frente a uma injúria, como necrose, doença ou traumatismo. O processo de cicatrização pode resultar em reparo ou em regeneração do órgão lesionado. O reparo tecidual ocorre pela substituição de um tecido necrosado por um tecido distinto do original, geralmente fibrose, e sem o reestabelecimento de função do tecido injuriado. Enquanto regeneração tecidual pode ser definida como a reposição das funções biológicas de um tecido depois de danificado, sendo o tecido neoformado semelhante ao anterior (Gerstenfeld et al., 2003).

Atualmente a regeneração tecidual tem sido alcançada com o emprego de células-tronco, fatores bioquímicos e engenharia genética. Os princípios das terapias regenerativas também podem ser aplicados na Endodontia. Para isso, estudos têm sido realizados envolvendo células-tronco pulpare, fatores de crescimento, engenharia genética, cultura de células e tecidos (Murray et al., 2007).

Hasegawa et al. (2006), demonstraram que células-tronco da medula óssea, que são rotineiramente utilizadas na medicina, podem também se diferenciar em odontoblastos e formar tecidos duros. Da mesma forma, células-tronco dentárias, incluindo as células-tronco da polpa, células-tronco do folículo dental e células-tronco do ligamento periodontal, quando isoladas e caracterizadas também podem ser utilizadas na formação de um novo tecido dentário (Lindroos et al., 2008).

As células tronco da polpa dentária (DPSCs) são capazes de se diferenciar em células odontoblásticas na presença de moléculas

sinalizadoras (Nakashima et al., 1994; Kim YB et al., 2010; Tamaoki et al., 2010). Desta forma, esse tipo celular assume um importante papel na endodontia regenerativa. Essas células podem ser obtidas a partir de terceiros molares (DPSCs) (Gronthos et al., 2000) ou por meio de dentes decíduos esfoliados (SHED) (Miura et al., 2003). Pesquisas recentes indicam que a formação de um novo tecido pulpar com o uso destas células-tronco é viável (Murray et al., 2007; Galler et al., 2011; Ishizaka et al., 2011).

Exposições traumáticas durante o preparo de cavidades são as principais indicações para a realização do capeamento pulpar (Zander, Glass, 1949). Este tratamento é frequentemente realizado em dentes vitais jovens, por ser um tratamento conservador e considerado menos agressivo para os tecidos pulpares. Pesquisas que avaliaram as interações entre o material de capeamento e a polpa a ser tratada demonstraram que materiais biocompatíveis são capazes de estimular a diferenciação de células-tronco pulpares em osteoblastos e conseqüentemente a mineralização (Smith et al., 1995; Graham et al., 2006).

Quando ocorre a destruição da camada odontoblástica e o capeamento pulpar é realizado, o complexo dentino-pulpar se regenera através do recrutamento, diferenciação e proliferação de células progenitoras e pela formação de dentina reparativa (Smith et al., 1995). Desta forma, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar qual o melhor material a ser utilizado para recobrir o tecido pulpar exposto (Zander, Glass, 1949). Uma vez que, a diferenciação e proliferação das células pulpares podem ser afetadas drasticamente pela interação das células tronco da polpa dentária (DPSCs) com os materiais empregados durante o capeamento pulpar. Os materiais bioativos mais utilizados com sucesso no capeamento são: o mineral trióxido agregado (MTA) e o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). (Yasuda et al., 2008b).

O hidróxido de cálcio possui propriedades biológicas e terapêuticas. Seu mecanismo de ação está relacionado com seu pH alcalino. Este material estimula a formação de uma zona de necrose superficial no tecido pulpar, induzindo a uma ligeira inflamação tecidual (Ford et al., 1995; Cox, Cohen, 1996; Yoshida et al., 1996; Olsson et al., 2006; Yasuda et al., 2008a). O pH mais elevado produz uma neutralização do meio ácido gerado pela inflamação local no tecido pulpar, além de proporcionar ao material um efeito antibacteriano. Além disso, auxilia na formação de tecido mineralizado, como a ponte de dentina e formação de dentina reacional. (Tamburic et al., 1993; Murray et al., 2000; Gencay et al., 2004; Subramaniam et al., 2006; Yasuda et al., 2008a).

O MTA é um cimento bioativo a base de cimento Portland (Torabinejad et al., 1995), que possui inúmeras aplicações na endodontia, tais como retrobturação, reparo de reabsorções e perfurações radiculares, apicificação, capeamento pulpar e pulpotomia (Roberts et al., 2008).

A ampla utilização do MTA é inerente a suas propriedades, incluindo ação antimicrobiana (Torabinejad et al., 1995), insolubilidade nos fluídos orais, radiopacidade (Danesh et al., 2006), bom selamento (Torabinejad et al., 1993) e biocompatibilidade (Moghaddame-Jafari et al., 2005; Camargo et al., 2009; Bin et al., 2012).

Vários estudos *in vitro* demonstraram essa biocompatibilidade, relacionando-a a baixa de citotoxicidade (Moghaddame-Jafari et al., 2005; Camargo et al., 2009; Bin et al., 2012) e genotoxicidade (Camargo et al., 2009; Bin et al., 2012), ausência de produção de espécies reativas de oxigênio (Camargo et al., 2009), adesão em células ósseas (Zhu et al., 2000; Al-Rabeah et al., 2006) e aumento na proliferação celular (Moghaddame-Jafari et al., 2005; Oviir et al., 2006; Takita et al., 2006). Recentemente, o MTA foi relacionado com a liberação de prostaglandina E₂, evidenciando uma importante relação com o processo de formação da ponte de dentina (Minamikawa et al., 2009)

(Torabinejad et al., 1997; Regan et al., 2002; Main et al., 2004; Chong et al., 2009).

Um novo material denominado Biodentine (Septodont, Saint Maur des Faussés, França), a base silicato de tricálcio, é atualmente comercializado, com o mesmo propósito. Os principais benefícios desse material em detrimento dos outros, são o tempo reduzido de presa e melhores propriedades mecânicas (Tran et al., 2012b; Zanini et al., 2012).

As aplicações clínicas e as características físicas desses materiais são amplamente descritas na literatura, porém, a bioatividade e efeitos biológicos sobre o tecido pulpar durante a regeneração e reparo ainda não são totalmente claros (Zanini et al., 2012). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos dos materiais bioativos (MTA, Ca(OH)_2 e Biodentine) sobre células progenitoras da polpa dentária, em relação à citotoxicidade, expressão de fosfatase alcalina e atividade de mineralização. Como hipótese experimental, supomos que os cimentos Biodentine e MTA seriam mais biocompatíveis e superiores ao induzir o processo de mineralização em relação ao pó hidróxido de cálcio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cimentos capeadores diretos da polpa

2.1.1 Biodentine

Laurent et al. (2008), analisaram um novo cimento a base de Ca_3SiO_5 desenvolvido para tentar contornar as deficiências dos tradicionais cimentos existentes no mercado. A proposta do estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade e os principais efeitos desses materiais sobre as funções das células alvos. O teste Ames foi aplicado em quatro cepas de *Salmonella typhimurium*. O teste de micronúcleos foi realizado em linfócitos humanos. A citotoxicidade através do ensaio de MTT, o teste Cometa e os efeitos sobre funções celulares específicas por meio de imunohistoquímica foram realizados em fibroblastos da polpa humana. Os resultados mostraram que o teste Ames não comprovou nenhuma evidência de mutagenicidade. A incidência de micronúcleos e a porcentagem de cauda de DNA formada após o teste Cometa foram similares ao controle negativo. A porcentagem de morte celular induzida pelo novo cimento foi similar ao MTA e menor do que a provocada pelo cimento Dycal. O novo cimento não afetou as funções específicas das células alvo tais como, mineralização, expressão de colágeno tipo 1 e sialoproteína. Os autores concluíram que o novo cimento foi

biocompatível, podendo ser utilizado com segurança em procedimentos clínicos.

Laurent et al. (2012), avaliaram a habilidade da Biodentine em produzir dentina reparativa e sua modulação na secreção de TGF- β 1 por células pulpares. Após a aplicação do cimento diretamente sobre cultura de células da polpa humana por 24 horas, a interação do material com as mesmas foi analisada em secções do tecido. Também foi analisado o cimento de hidróxido de cálcio e o adesivo resinoso Xeno III. A secreção de TGF- β 1 foi quantificada por ELISA. Os resultados mostraram que a Biodentine induziu a formação de uma mineralização primitiva, sob a forma de osteodentina, logo após sua aplicação, e esta foi expressa por marcadores de odontoblastos. Este cimento também aumentou a secreção de TGF- β 1 por células da polpa. O mesmo ocorreu com o hidróxido de cálcio e o MTA, porém, não houve aumento dessa secreção com o adesivo Xeno III.

Leierendecker et al. (2012), avaliaram cimentos recentemente lançados no mercado à base de silicato de cálcio (CMSs). O estudo analisou se o contato prolongado desses cimentos com a dentina promove efeitos adversos sobre a integridade da matriz de colágeno. Corpos de prova de dentina foram extraídos e confeccionados a partir de terceiros molares humanos (7 X 3 X 0.3 mm) e divididos em três grupos de acordo com o material que a dentina seria exposta (MTA Plus, Biodentine e controle não tratado). O período de exposição foi de 24 horas, 1, 2 e 3 meses. O ensaio de hydroxyprolina foi realizado para quantificar coleções de colágeno extraídas em cada grupo e período. A desmineralização no grupo de três meses foi determinada por microscopia por transmissão eletrônica pela detecção de alterações ultraestruturais na matriz de colágeno. Os resultados mostraram que o contato prolongado da dentina com os CMSs afetou a integridade da matriz de colágeno. Entretanto, a quantidade de colágeno extraído foi limitada à superfície de contato. Isto, porém, deve ser levado em

consideração quando da aplicação desses materiais em delgados remanescentes de dentina.

Shayegan et al. (2012), avaliaram em dentes decíduos de suínos, a resposta do tecido pulpar após procedimento de pulpotomia e de capeamento pulpar direto, utilizando como materiais a Biodentine, MTA branco e o formocresol. Foram utilizados 180 dentes que foram divididos em 3 grupos experimentais de acordo com os períodos avaliados (7, 28 e 90 dias). Após esses tempos, os animais foram sacrificados e os espécimes foram preparados para análise histológica. Nos grupos onde foi realizado a pulpotomia houve diferença significativa entre a Biodentine e MTA branco quando comparado ao Formocresol, em relação à resposta inflamatória e formação de tecido duro. Nos grupos em que foi realizado o capeamento pulpar houve apenas uma diferença entre a Biodentine e o Ca(OH)_2 em relação a formação de tecido duro no período de 7 dias. Os autores concluíram que tanto a Biodentine como o MTA branco são materiais adequados e biocompatíveis para o capeamento pulpar.

Tran et al. (2012a), avaliaram a capacidade da Biodentine de induzir o reparo do tecido pulpar em ratos. Primeiramente, foram realizadas cavidades artificiais em primeiros molares superiores de 27 ratos com seis semanas de vida, a fim de expor a polpa. As áreas expostas foram capeadas com Biodentine, MTA e Ca(OH)_2 , e as cavidades foram seladas com cimento de ionômero de vidro. Após 7, 14 e 30 dias, os dentes foram extraídos e posteriormente preparados para imunohistoquímica. Tanto o MTA como a Biodentine induziram a proliferação celular e produziram barreira de tecido mineralizado positiva para osteopontina. Depois de 30 dias, houve a formação de uma ponte de dentina homogênea secretada por células com fenótipo de odontoblastos. Porém, a barreira formada pelo Ca(OH)_2 continha poros, sugerindo uma organização de reparo diferente das induzidas pelo MTA e Biodentine. Esses resultados indicam que a Biodentine fornece um ambiente

favorável para o processo de reparo pulpar semelhante ao MTA, e que mesmo com as limitações de um estudo realizado em animais, a Biodentine é um material biocompatível que pode ser utilizada para o capeamento pulpar direto.

Zanini et al. (2012), avaliaram os efeitos biológicos da Biodentine em células murino imortalizadas da polpa (OD-21). Primeiramente a cultura celular foi exposta à Biodentine para determinar a proliferação celular pelo ensaio de citotoxicidade pelo corante MTS (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium), após 2, 3 e 5 dias da exposição ao material. A expressão de genes marcadores celulares foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. A expressão de proteínas foi quantificada pela atividade da fosfatase alcalina. A coloração pelo alizarin vermelho foi utilizada para avaliar e quantificar a biomineralização. A expressão de vários genes confirmou a diferenciação das células OD-21 em odontoblastos durante o período da cultura celular. Concluíram que a Biodentine é um material bioativo porque promoveu essa diferenciação e biomineralização, e, por isso, seu uso clínico é indicado para o processo de regeneração do complexo dentino-pulpar, como capeamento pulpar direto.

Perard et al. (2012) avaliaram os efeitos biológicos da Biodentine sobre células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) e em células da polpa (OD-21). Além disso, avaliaram os efeitos da Biodentine e do MTA quanto à expressão gênica em cultura celular para os genes envolvidos na diferenciação odontogênica Runx2, secreção de matriz (Col1a1, Spp1) e mineralização (ALP). Os autores utilizaram o ensaio da fosfatase ácida para comparar a biocompatibilidade dos materiais. A diferenciação celular foi determinada por PCR em tempo real. As células MDPC-23 na presença de MTA tiveram os maiores níveis de viabilidade em relação às mesmas células expostas a Biodentine e ao controle no período de 7 dias. Para as células OD-21, a taxa de proliferação no

mesmo período foi significativamente menor quando da presença de MTA e Biodentine em relação ao grupo controle. A expressão de Col1a1 foi ligeiramente menor nas culturas quando expostas ao MTA em relação à Biodentine e controle. Concluíram que a Biodentine e MTA podem modificar a proliferação de células pulpares, e que seus efeitos podem variar ao longo do tempo, dependendo da linhagem celular considerada. Observaram similaridade entre a Biodentina e MTA reforçando a indicação destes para o capeamento pulpar direto.

Zhou et al. (2013), estudaram o efeito da Biodentine, MTA branco e do cimento de ionômero de vidro (CIV) sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos. As células foram incubadas durante 1, 3 e 7 dias em contato com os extratos dos materiais testados, e também durante os mesmos períodos houve o contato direto da superfície dos materiais com as células imersos no meio de cultura. A citotoxicidade foi avaliada pelo citometro de fluxo e a adesão celular à superfície dos materiais por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que as células expostas ao extrato da Biodentine e ao MTA obtiveram as maiores taxas de viabilidade celular para todas as concentrações testadas. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses materiais em todo o experimento. Contudo as células expostas ao extrato do CIV mostraram os menores índices de viabilidade. As células em contato tanto com a Biodentine ou com o MTA se aderiram e se espalharam pela superfície do material após um dia de incubação, e, esse processo manteve-se crescente pelos períodos de 3 e 7 dias de cultura. Os autores concluíram que a Biodentine e o MTA causaram reações similares para este tipo celular, sendo menos citotóxicos que o cimento de ionômero de vidro.

2.1.2 MTA e Ca(OH)_2

Accorinte et al. (2008), avaliaram a resposta histomorfológica de células humanas da polpa humana após capeamento pulpar direto com MTA e com cimento a base de Ca(OH)_2 . A exposição pulpar foi realizada na superfície oclusal de 40 premolares humanos. Após 30 e 60 dias do capeamento, os dentes foram extraídos e processados para exames histopatológicos. Os resultados mostraram que os dois cimentos propiciaram formação de ponte de dentina e induziram resposta inflamatória. Entretanto, para o grupo do Ca(OH)_2 30 dias, foi observada menor formação de ponte de dentina quando comparada aos grupos do MTA 30 e 60 dias. Os autores concluíram que, apesar, do reparo induzido pelo cimento de Ca(OH)_2 seja mais lento, ambos os cimentos promoveram com sucesso o reparo pulpar em dentes humanos.

Min et al. (2008), analisaram a resposta de células pulpares ao capeamento pulpar realizado com MTA e com cimento de hidróxido de cálcio, frente ao processo de formação de ponte de dentina e expressão de sialoproteína dentinária (DSP). O capeamento pulpar direto foi realizado em 20 terceiros molares que não apresentavam cárie. Após dois meses, os dentes foram extraídos e os espécimes foram preparados para análise histológica e imunohistoquímica. Os resultados mostraram que 100% dos dentes tratados com MTA formaram ponte de dentina e o mesmo ocorreu com 60% dos dentes tratados com hidróxido de cálcio. Entretanto, a espessura da ponte formada pelo MTA foi significativamente maior do que a observada pelo hidróxido de cálcio. Além disso, maior quantidade de DSP foi expressa em células odontoblásticas e fibroblastos de polpa sob a ponte de dentina para o MTA. Esses dados indicaram que o MTA foi superior ao cimento de hidróxido de cálcio ao induzir o processo dentinogênico em células humanas da polpa após capeamento.

Camargo et al. (2009), avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade do MTA cinza e branco, e do cimento de hidróxido de cálcio (Hydro C), em células da polpa humana (tHPCs). Estas foram expostas às diluições dos cimentos testados durante 1 hora, e, em seguida, foi determinada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de citometria de fluxo (FACS). A taxa de sobrevivência celular foi determinada pelo ensaio do cristal violeta após 24 horas da exposição aos cimentos. A genotoxicidade foi quantificada pela formação de micronúcleos em células V79, e a modificação do ciclo celular induzida pelos extratos foi avaliada por FACS. Os resultados mostraram que o Hydro C foi o cimento mais citotóxico do estudo, e que aumentou em duas vezes a produção de ROS. Os dois tipos de MTA praticamente não reduziram o número de células e não induziram a formação de ROS. Não foi constatado um aumento significativo do número de micronúcleos para nenhum material. O Hydro C aumentou ligeiramente o número de células em G1 e G2.

Masuda-Murakami et al. (2009), avaliaram os efeitos do MTA e do cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) na diferenciação odontoblástica em células da polpa por meio de “*heat-shock protein 25*” (hsp25) como um marcador para a diferenciação odontoblástica. Os efeitos da exposição celular aos cimentos foram analisados por microscopia de varredura. As células foram preparadas para imunohistoquímica para anticorpos policlonais anti-hsp25 e actina. A expressão de RNAm de hsp25 e DSPP nas células durante 2 dias foram quantificadas por PCR em tempo real. A maioria das células expostas ao MTA mostraram uma intensa imunomarcagem para hsp25, e a expressão de RNAm para hsp25 e DSPP, no mesmo período, foi maior em relação ao grupo exposto ao Dycal. Esses resultados mostraram que o MTA induziu a uma diferenciação odontoblástica e formação de dentina reparativa com mínima taxa de morte celular.

Ji et al. (2010), avaliaram a relação existente entre o hidróxido de cálcio no recrutamento, proliferação e mineralização de células-tronco (DPSCs) obtidas a partir de premolares imaturos de cães. O ensaio de PCR foi utilizado para identificar marcadores celulares de células tronco. Análise por *Imunoblot*, ensaio de migração celular e coloração por alizarin vermelho foram usados para avaliar a capacidade de proliferação, migração e mineralização de células tratadas com hidróxido de cálcio. O material foi aplicado em defeitos intencionais criados nos dentes de cães para a observação do processo de regeneração da dentina. Os resultados evidenciaram que o hidróxido de cálcio aumentou o recrutamento, migração, proliferação e mineralização das DPSCs. Esses dados reforçaram o uso dessas células, pois funcionaram como verdadeiros depósitos de células-tronco para o processo de regeneração pulpar além de elucidarem o efeito benéfico do hidróxido de cálcio.

Kim YB et al. (2010), estudaram alterações na expressão gênica relacionada ao processo de mineralização quando o MTA foi exposto às células da polpa humana (HDPCs). A exposição ocorreu por meio de tubos de Teflon (diâmetro 10 mm, altura 2 mm) aplicados sobre a cultura celular. Tubos vazios expostos às células foram usados como controle negativo. A extração de RNA foi realizada após 6, 24 e 72 horas. Os resultados foram confirmados por meio de PCR para os genes quando expressos em dobro ou inferior à metade. De 24.546 genes, 109 genes foram “*upregulated*” mais que duas vezes (THBS1, VCAN, BHLHB2, FN1, COL10A1, TUFT1 e HMOX1), e 69 genes foram “*down-regulated*” abaixo de 50% (DCN, SOCS2 e IL8). Esses resultados sugeriram que em vez de ser um material “bioinerte”, o MTA estimulou as células da polpa de várias formas, induzindo a mineralização e a uma ligeira inflamação, além de ter um papel protetor contra essa inflamação.

Paranjpe et al. (2010), avaliaram a exposição de cultura de células da polpa humana (DPSCs) ao MTA cinza, e estudaram os

níveis de expressão gênica, secreção de fator de crescimento endotelial e análise da superfície morfológica. Os dados obtidos indicaram que o MTA promoveu sobrevivência e proliferação celular significativamente maior que o grupo controle, além disso, estimulou a expressão dos genes Runx2, osteocalcina, fosfatase alcalina e da sialoproteína dentinária. O MTA também induziu o aumento da secreção de fatores de crescimento endotelial, que são importantes no processo de cicatrização e regeneração. Desse modo, esses resultados indicaram a capacidade deste material em promover diferenciação das células pulparem em linhagem odontoblástica, que são responsáveis pela formação de ponte de dentina, contribuindo com o sucesso do tratamento.

D'Anto et al. (2010), avaliaram a ação do MTA durante o processo de adesão, proliferação e migração de células-tronco humanas derivadas da medula óssea mesenquimal (hMSCs). Os cimentos ProRoot MTA branco e Portland branco foram manipulados e deixados sob presa por 24 horas. A proliferação e diferenciação celular, após a exposição aos cimentos, foram avaliadas pelo método do azul de alamar, a fim de verificar a presença ou ausência de diferenciação celular durante 28 dias. Para avaliar o efeito na capacidade migratória das hMSCs, foi realizado um ensaio de migração durante 18 horas. Os cimentos foram colocados em placas de 6 poços e as células em "inserts" com poros de 8 mm. Após análise de microscopia de varredura, pôde-se observar adesão e distribuição celular por toda a superfície do MTA. Porém a proliferação celular foi significativamente maior sobre o MTA em relação ao cimento Portland. Desse modo, os autores concluíram que o cimento de MTA auxilia no processo de adesão, crescimento e migração das células-tronco mesenquimais.

Guyen et al. (2011), avaliaram os efeitos do MTA, do cimento de Ca(OH)_2 (Dycal) e de um material derivado da matriz do esmalte (EMD), quanto a proliferação e diferenciação odontogênica de células-tronco de germes dentários (hTGSCs). A diferenciação

odontogênica das hTGSCs foi avaliada pela expressão da sialofosfoproteína (DSPP) por PCR em tempo real, pela quantificação da atividade da fosfatase alcalina e pela visualização da deposição de cálcio por coloração de Von Kossa. Os resultados demonstraram que o EMD foi o melhor material na diferenciação e proliferação das hTGSCs, e que o Dycal foi citotóxico para essas células. Porém, quando o EMD foi recoberto pelo Dycal mostrou-se menos citotóxico, e, quando recoberto pelo MTA não foi eficiente na proliferação e diferenciação dessas células.

Peng et al. (2011), investigaram os efeitos de um cimento à base de silicato de tricálcio (Ca_3SiO_5) e do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na proliferação e diferenciação odontogênica de células da polpa humana (hDPCs). As células foram expostas aos extratos dos cimentos testados, e a proliferação celular foi analisada pelo ensaio de MTT. A diferenciação odontogênica foi avaliada por PCR em tempo real usando marcadores específicos para sialofosfoproteína (DSPP), proteína de matriz dentinária (DMP1), osteocalcina (OC), fosfatase alcalina (ALP) e para colágeno tipo 1 (Col I). Foram realizados ainda, quantificação da atividade de ALP, ensaio de mineralização pelo alizarin vermelho e imunohistoquímica para DSP. O ensaio de MTT mostrou que as hDPCs proliferaram significativamente para o extrato do cimento de Ca_3SiO_5 quando comparado ao extrato do $\text{Ca}(\text{OH})_2$. A análise por PCR indicou que o cimento de Ca_3SiO_5 estimulou a expressão de todos os genes avaliados. Além disso, estimulou a mineralização e aumentou a produção de ALP e DSP. Concluíram que o cimento de Ca_3SiO_5 induziu a proliferação e a diferenciação odontogênica das células hDPC, e que possivelmente pode ser utilizado como um novo agente para o capeamento pulpar direto.

Zhao et al. (2011), analisaram a ação da proteína kinase ativada por mitose (MAPK) que está envolvida na diferenciação de células-tronco. Os autores investigaram os efeitos do MTA na viabilidade celular, produção de diferentes marcadores, e o envolvimento da MAPK em cultura de células-tronco da polpa dental humana (DPSCs). A

viabilidade e a diferenciação celular foram determinadas pelo ensaio de MTT e PCR em tempo real, respectivamente. A ativação da MAPK foi verificada pelo teste de “*western blotting*”. As concentrações de MTA de 20 e 10 mg/ml foram citotóxicas para as DPSCs. O MTA aumentou significativamente a expressão da fosfatase alcalina (ALP), sialofosfoproteína dentinária (DSPP), colágeno tipo I (COLI), osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP). Além de, induzir a fosforilação de p42 e p44 (p42/44), p38 e c-Jun N-terminal kinases 1 e 2 (JNK1/2) MAPK. Além disso, o inibidor da MAPK p42/44 atenuou a diferenciação odontoblástica induzida pelo MTA. Estes dados indicaram que essa diferenciação induzida pelo MTA em DPSCs foi por meio das vias de MAPK, o que pode desempenhar um papel fundamental nas respostas de reparação do complexo dentino-pulpar.

Hirschman et al. (2012), compararam *in vitro* a citotoxicidade do MTA branco, Brasseler Endosequence Root Repair Putty (ERRM), Dycal, e Ultrablend Plus (UBP) em fibroblastos humanos através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Para isso, as células foram expostas à várias concentrações dos cimentos testados, durante 2, 5 e 8 dias. Os resultados constataram uma taxa de viabilidade celular similares para todas as diluições dos cimentos MTA, ERRM e UBP ao controle negativo para os períodos de 2 e 5 dias de exposição. Somente o Dycal exibiu aumento da citotoxicidade significativo para esses períodos. Após o período de 8 dias a taxa de sobrevivência celular foi de 91% (Brasseler), 88% (MTA), 76% (Ultrablend Plus) e 37% (Dycal). Concluíram que o MTA, ERRM e UBP obtiveram níveis de citotoxicidade semelhantes para estas células e que o cimento Dycal foi o mais citotóxico nos intervalos de tempo avaliados.

Lee et al. (2012), avaliaram os efeitos citotóxicos e bioativos da Simvastain e Emdogain (Biora AB, Malmö, Suécia), do cimento Portland contendo óxido de bismuto (BPC) e do MTA em células

da polpa humana (HDPCs), por meio do ensaio de MTT. A diferenciação celular foi determinada pela atividade da fosfatase alcalina (ALP), coloração pelo alizarin vermelho e PCR. Os resultados do crescimento celular das HDPCs expostos ao Emdogain e Simvastain adicionados no BPC foram superiores ao crescimento observado para o BPC isolado e similar ao MTA durante 14 dias. Os grupos do Simvastain e Emdogain aumentaram o potencial odontogênico do BPC com relação à atividade da fosfatase alcalina, nódulos de mineralização, expressão de RNA mensageiro de ALP, osteopontina, osteocalcina e Runx2. Esses resultados mostraram que a Simvastain e o Emdogain aumentaram o crescimento celular e a diferenciação das células pulpares para o BPC, e podem ser utilizados na composição do BPC quando utilizado como material capeador.

An et al. (2012), investigaram os efeitos de diferentes concentrações de íons cálcio no crescimento e diferenciação osteogênica de células da polpa humana (hDPCs). Para isso, diversas concentrações de íons cálcio foram adicionadas ao meio de cultura, e um kit de contagem de células (*Cell Counting Kit-8*) foi utilizado para determinar a proliferação celular das hDPCs no meio de cultura. A diferenciação osteogênica e a mineralização foram avaliadas pela atividade da fosfatase alcalina (ALP), coloração pelo alizarin vermelho, Von Kossa, e ensaio quantitativo de íons cálcio. Os marcadores de diferenciação osteogênica selecionados foram quantificados por reação de PCR em tempo real. Dentro da faixa de 1,8 – 16,2 mM, o aumento da concentração de íons cálcio não influenciou na proliferação celular, porém levou a mudanças na diferenciação osteogênica, pois a formação de nódulos de matriz mineralizada foi encontrada para as concentrações mais elevadas de íons cálcio. Contudo, a atividade da ALP e a expressão gênica foram reduzidas. Os resultados por PCR mostraram tendência reduzida na expressão de RNAm do colágeno tipo I e Runx2 nas concentrações elevadas de íons cálcio, enquanto a expressão do RNAm de osteopontina

e osteocalcina foi significativamente maior. O teor de íons cálcio no meio de cultura influenciou significativamente as propriedades osteogênicas das hDPCs, indicando a importância da liberação desses íons pelos materiais capeadores da polpa no alcance de resultados clínicos desejáveis.

Yoshida et al. (2012), realizaram um estudo a fim de identificar células tronco mesenquimais na polpa dental, utilizando dois marcadores específicos *alpha-smooth muscle actin* (a-SMA) e STRO-1. A investigação desses marcadores foi realizada tanto na polpa dental intacta como em áreas de cicatrização do tecido pulpar de adultos. Para isto a polpa exposta foi submetida ao capeamento pulpar direto com os materiais ProRoot White MTA e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para induzir a formação de uma barreira de tecido mineralizado. Depois de 7-42 dias, os dentes foram extraídos e processados para imunohistoquímica utilizando anticorpos para a-SMA, STRO-1. Na polpa normal a-SMA foi detectado em células musculares lisas. Dupla imunofluorescência com STRO-1 e a-SMA mostrou que STRO-1 foi localizado em células musculares lisas vasculares, em células endoteliais e em fibras nervosas. Durante o processo de reparo pulpar, numerosas células positivas para a-SMA emergiram para a margem da ferida em 14 dias, e inicialmente formaram uma barreira de tecido mineralizado forrada com células positivas para a-SMA aparentemente similares a odontoblastos. STRO-1 foi abundantemente encontrado nas fibras nervosas. Após 42 dias, as células da barreira mineralizada foram coradas, e não houve detecção de a-SMA nestas células. Esses dados indicaram que as células positivas para a-SMA aparecem temporariamente na margem do reparo e anteriormente ao processo de formação da barreira mineralizada e STRO-1 permanecem confinados em elementos vasculares e neurais.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação biológica dos biomateriais MTA, Ca(OH)_2 PA e da Biodentine, no processo de reparo pulpar, em células progenitoras da polpa dental humana (SHED).

Para isso:

- a) A biocompatibilidade dos materiais frente às células progenitoras foi determinada por meio de ensaios de citotoxicidade (XTT e SRB), após os períodos de contato com os cimentos de 1, 3 e 5 dias;
- b) A mineralização celular foi quantificada pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP). Foi realizado também o ensaio complementar do alizarin vermelho para observação de nódulos de mineralização formados pelas células a partir do estímulo dos materiais analisados.

A hipótese experimental deste estudo foi de que todos os materiais teriam o potencial de induzir os processos de mineralização, e, que, os cimentos Biodentine e MTA seriam superiores em relação ao hidróxido de cálcio ao estimular este processo. Isso deveria ser confirmado pela maior atividade funcional nos ensaios de alizarin vermelho e fosfatase alcalina destes materiais. Outra suposição foi de que esses cimentos também desempenhariam comportamento superior nos ensaios de citotoxicidade XTT e SRB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o número de protocolo 46420-PH/CEP, e está de acordo com os princípios éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa com seres humanos, de acordo com a Resolução n°196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo).

As células progenitoras (linhagem SHED) (Figura 1) utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de molares decíduos exfoliados naturalmente. A cultura celular foi previamente processada e estabelecida para o isolamento das células progenitoras. Estas células foram cultivadas e congeladas no banco de células do Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia. Nesta pesquisa foram utilizadas células entre a quinta e sétima passagem.

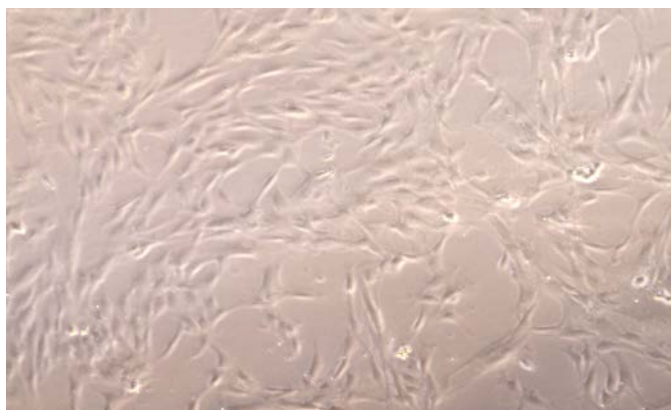


Figura 1- Células progenitoras (linhagem SHED) utilizadas no estudo.

4.1 Cultura celular

As células, previamente descongeladas, foram cultivadas em garrafas para cultivo celular de 75 cm³ – 270 ml (TPP, Trasadingem, Suíça), em meio mínimo essencial, variação alfa (alfa-MEM), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado por calor (SFB-HI), 100 µM de ácido ascórbico, 2 mM de L-glutamina e 1% de solução antimicótica-antibiótica e mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células foram cultivadas até atingirem subconfluência (80% de ocupação do frasco), quando foram tripsinizadas e subcultivadas numa relação de área de 1:4 (a partir de 1 frasco de cultivo celular foram gerados outros quatro frascos).

As células foram posteriormente “plaqueadas” (colocadas em placas de 96 poços), onde receberam os materiais sob a forma de meios condicionados. Todas as etapas estão descritas a seguir.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco para cultura de célula (garrafa 75 cm³ – 270 ml), foram pipetados 10 ml de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) que continham as células desejadas (Figura 2A). Um tubo criogênico contendo as células, (Prolab, São Paulo, Brasil) foi removido e levado imediatamente para o banho maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o

descongelamento do seu conteúdo (Figura 2B). As células foram inseridas no frasco para cultura previamente preparado (Figura 2C) e levadas ao microscópio de luz invertida (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) para verificação da presença de células (Figura 2D). Os frascos permaneceram em estufa com temperatura de 37 °C e tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher ScientificInc, EUA).



Figura 2 - A) caixas removidas do tambor de nitrogênio; B) células sendo removidas do tubo criogênico; C) frasco de cultura; D) verificação da presença de células.

4.1.2 Troca de meio

A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com solução salina tamponada - PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) para remoção de células mortas (Figuras 3A e 3B). Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco e as células novamente levadas à estufa.

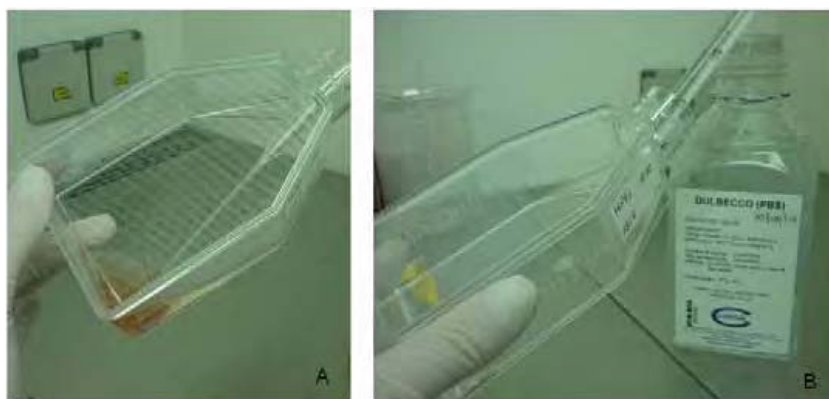


Figura 3 - A) aspiração do meio de cultura; B) lavagem da garrafa com PBS.

4.1.3 Subcultivo

O subcultivo foi realizado quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco, ou seja, 80% de confluência (Figura 4A). Desta forma, as células foram removidas de um frasco e colocadas em dois ou mais frascos, de acordo com o seu crescimento.

O meio de cultura presente no frasco de cultivo foi retirado com auxílio de um pipetador automático (High Tech Lab, Poland) e descartado. As células foram lavadas com 6 ml de PBS e em seguida adicionados 3 ml de tripsina (substância utilizada para destacar as células

do fundo da garrafa). O conjunto foi levado à estufa onde permaneceu por 5 minutos. Em seguida, foram realizadas leves batidas no fundo do frasco apenas para auxiliar a remoção celular (Figura 4B).

Após o período em estufa, 6 ml de meio de cultura foram adicionados sobre a tripsina para sua neutralização. Todo este conteúdo foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado para obtenção do *pellet* (Figura 4C). O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio fresco. Após a homogeneização, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho contendo 10 ml de meio de cultura, preparados previamente (Figura 4D). Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

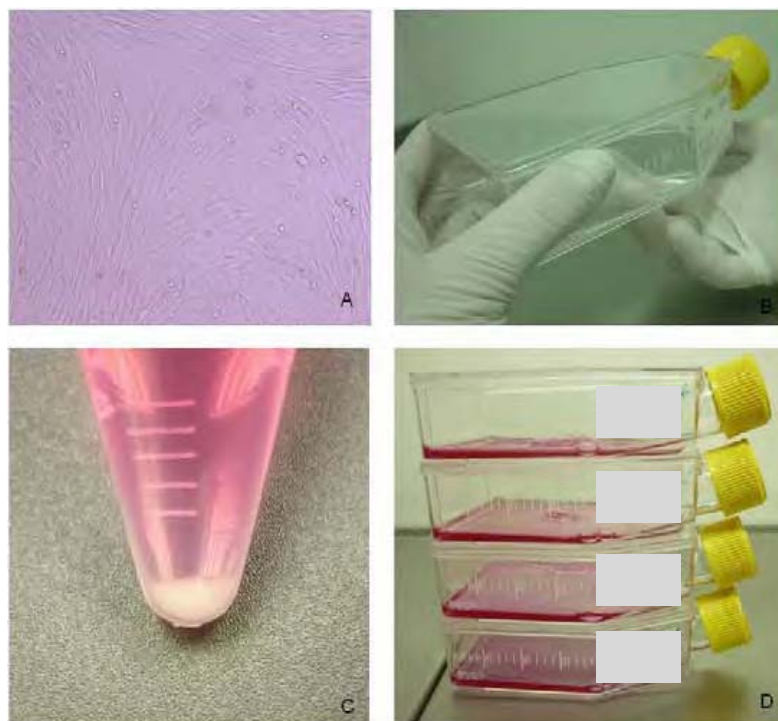


Figura 4 - A) células SHED com 80% de confluência; B) batidas no fundo do frasco para o descolamento das células da garrafa; C) formação do *pellet*; D) frascos contendo as células e meio de cultura.

4.1.4 Contagem celular

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas de 96 poços. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pellet*; porém, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio fresco. Desta suspensão foram retirados 10 μ l para a câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany), a qual foi levada ao microscópio de luz invertida para realização da contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos (Figuras 5A e 5B).

Para obtenção da quantidade de células por ml de meio de cultura, foi utilizada a seguinte fórmula: $C \times 10^4 = n^\circ$ células/ml, onde C corresponde à média das células encontradas nos quadriláteros periféricos.

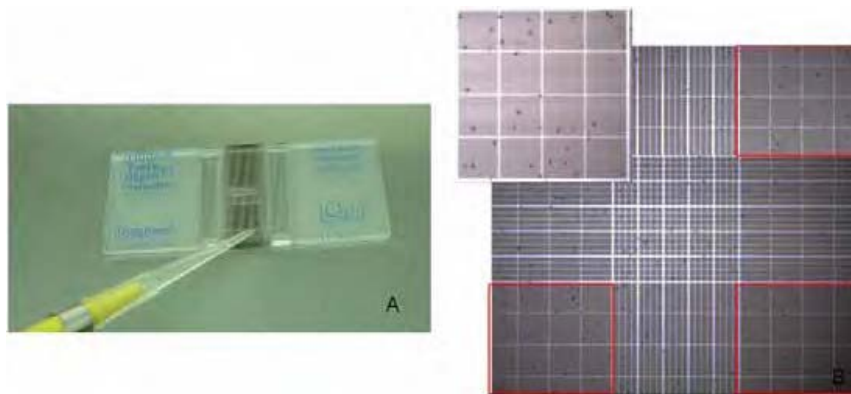


Figura 5 - A) câmara de Neubauer; B) contagem celular dos quadriláteros periféricos.

A quantidade de células a ser utilizada foi definida de acordo com uma curva padrão.

4.1.5 Curva padrão de viabilidade e crescimento celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação de quantidades diferentes de células cultivadas por poço em placa de 96 poços sem aplicação dos tratamentos. Para obtê-la, foram cultivadas 1×10^3 , 2×10^3 , 4×10^3 , 8×10^3 , células por poço, sendo utilizados oito poços para cada quantidade de células. O experimento foi realizado em triplicata, e as placas permaneceram em estufa por 1, 3 e 5 dias a 37°C , 5% CO_2 .

4.1.6 Plaqueamento

Após a determinação da quantidade ideal de células a ser utilizada por poço da placa de 96 poços, foi realizado o plaqueamento. Para cada material testado foram plaqueados 4 poços por placa, sendo o experimento realizado em triplicata. Desse modo, obtivemos 12 amostras de cada cimento para cada período analisado.

As células permaneceram em estufa a 37°C , 5% CO_2 por 24 horas.

4.2 Materiais Bioativos

Os materiais testados neste estudo foram o hidróxido de cálcio PA (Biodinâmica, Ibioporã, Brasil), o MTA branco (Angelus, Londrina, Brasil) e a Biodentine (Septodont, Saint Maur des Faussés, França),

(Quadro 1). Estes foram aplicados sobre as células sob a forma de meios condicionados (Cavalcanti et al., 2005), para evitar o contato direto desses com as células.

Quadro 1 - Composição química dos materiais

Material	Composição
MTA	SiO ₂ , K ₂ O, Al ₂ O ₃ , Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , CaO, Bi ₂ O ₃ , MgO. Resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio
Biodentine	Pó: silicato de tricálcio e carbonato de cálcio; solução aquosa: cloreto de cálcio
Hidróxido de Cálcio PA	Hidróxido de cálcio PA (99% a 100%)

4.2.1 Divisão dos grupos experimentais

As culturas celulares foram submetidas aos ensaios e cada experimento proposto foi constituído por:

- a) Grupo controle (células sem tratamento);
- b) Células tratadas com hidróxido de cálcio PA;
- c) Células tratadas com MTA branco;
- d) Células tratadas com Biodentine.

Os materiais foram aplicados sobre as células sob a forma de meios condicionados, e foram mantidos em contato com as células pelos períodos de 1, 3 e 5 dias para os ensaios de XTT e SRB e 1, 7 e 14 dias para o ensaio de alizarin vermelho, e de 7 dias para o

ensaio da fosfatase alcalina. Estes meios condicionados foram trocados a cada 3 dias.

4.2.2 Preparo dos meios condicionados

Os meios condicionados do MTA e do hidróxido de cálcio foram obtidos pela manipulação de 1 g do material com água destilada, conforme recomendações dos fabricantes. Seguida da mistura deste material manipulado recém preparado com 5 ml de meio de cultura alfa-MEM no interior de tubos Falcon de 50 ml. A Biodentine foi preparada da mesma forma, porém sua manipulação obedeceu o fabricante ao misturar o conteúdo de um sachê do material (700 mg) com 0,18 ml de água destilada. A esta mistura foi então adicionada 3,5 ml de meio de cultura alfa-MEM no interior de um tubo Falcon de 50 ml. Essas proporções seguiram as recomendações da *American Society for Testing and Materials*, 1992; onde para cada 0,2 g da substância a ser testada verte-se 1 ml de meio de cultura. Os tubos preparados foram homogeneizados em vórtex e mantidos em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora (Figura 6A). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para fazer a diluição do conteúdo dos mesmos. Para isso foi coletado 1 ml da mistura que foi então homogeneizada com 99 ml de meio alfa-MEM para utilização sobre as culturas celulares (Figura 6B). Essa combinação proporcionou uma concentração de 1% para todos os materiais (2 mg/ml).

Após a obtenção dos meios condicionados, foram inseridos 200 µl destes em cada poço das placas de 96 poços, utilizando-se 4 poços para cada cimento e controle. Os testes foram independentes e realizados em triplicata para cada grupo.

As células foram processadas de acordo com cada um dos ensaios a seguir.

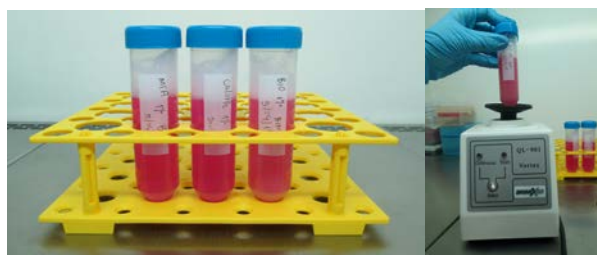


Figura 6 – A) preparo dos meios condicionados em tubos Falcon; B) homogeneização dos meios condicionados em vórtex.

4.3 Ensaio de XTT

As células foram cultivadas em placas de 96 poços, em cada poço foram colocadas 1.000 células, as placas permaneceram em estufa durante 24 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi aspirado e foram colocados 200 μ l de meio condicionado em cada poço. Estes permaneceram em contato com as células durante 1, 3 e 5 dias, e a cada dois dias estes meios foram trocados.

Após o contato das células com os meios condicionados a avaliação da viabilidade e do crescimento celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico do reagente XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida). Esse teste baseia-se na redução do corante XTT a um precipitado de formazan laranja, resultante da atividade de enzimas desidrogenases, presentes somente em células metabolicamente ativas. Desta forma, essa conversão somente ocorre em células viáveis, conseqüentemente a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células vivas na amostra.

Primeiramente, prepararam-se os reagentes envolvidos no ensaio. A proporção do sal de XTT (Sigma-Aldrich Co., Germany)

(Figura 7A), é de 1 mg para cada ml de PBS. Em seguida, foi preparada 0,00069 g de menadiona (Sigma-Aldrich Co., Germany) para cada ml de acetona (Sigma-Aldrich Co., Germany).

Após o preparo dos reagentes foi produzida uma solução de XTT. Esta era constituída de 158 μ l de PBS, 40 μ l do reagente preparado de XTT e 2 μ l do reagente preparado de menadiona.

Os meios condicionados foram removidos das placas de 96 poços. Em seguida, foram colocados 200 μ l da solução de XTT em cada poço (Figura 7B).

Finalmente, as placas foram levadas à estufa por 3 horas a 37 °C envolvidas em papel alumínio devido à sensibilidade da solução à luz. Após este período, foram levadas ao espectrofotômetro (Asys Hitech GmbH, Áustria) para leitura dos resultados em comprimento de onda de 490 nm (Figura 7C).

Os valores de absorbância foram normalizados pelo controle e submetidos à análise estatística.

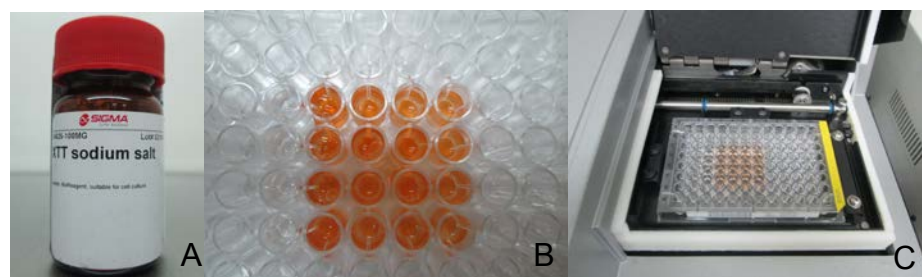


Figura 7- A) frasco de XTT; B) placa após colocação da solução de XTT; C) placa em leitora de microplacas (espectrofotômetro).

4.4 Ensaio de SRB

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Em cada poço foram cultivadas 1.000 células em meio α -MEM. Aguardou-se

o período de 24 horas de incubação em estufa 37 °C e 5% de CO₂, para colocá-las em contato com 200 µl dos meios condicionados. Estes permaneceram em contato com as células durante 1, 3 e 5 dias, e a cada dois dias este meio foi trocado.

Em seguida, cada poço contendo as células foi lavado com 100 µl de PBS. Estas foram fixadas com 100 µl de ácido tricloroacético 10% e mantidas em geladeira a 4 °C por 1 hora. A placa foi lavada três vezes em água corrente e seca totalmente em estufa. Logo após, foi realizada a marcação das proteínas celulares com 100 µl da solução de Sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich Co., Germany), 0,4% em ácido acético 1% e esta mantida por 1 hora em temperatura ambiente (Figuras 8A e 8B).

Os poços foram então lavados com ácido acético 1% para remoção do corante não ligado e novamente secos em estufa (Figura 8C). Em seguida, houve a solubilização do SRB ligado, com 100 µl de tris-base 10 mM. As placas foram agitadas (Figura 8E) até a completa dissolução do corante, e finalmente levadas à leitora de absorvância em espectrofotômetro a 570 nm (Figura 8F). Da mesma forma, os valores de absorvância foram normalizados pelo controle e submetidos à análise estatística.

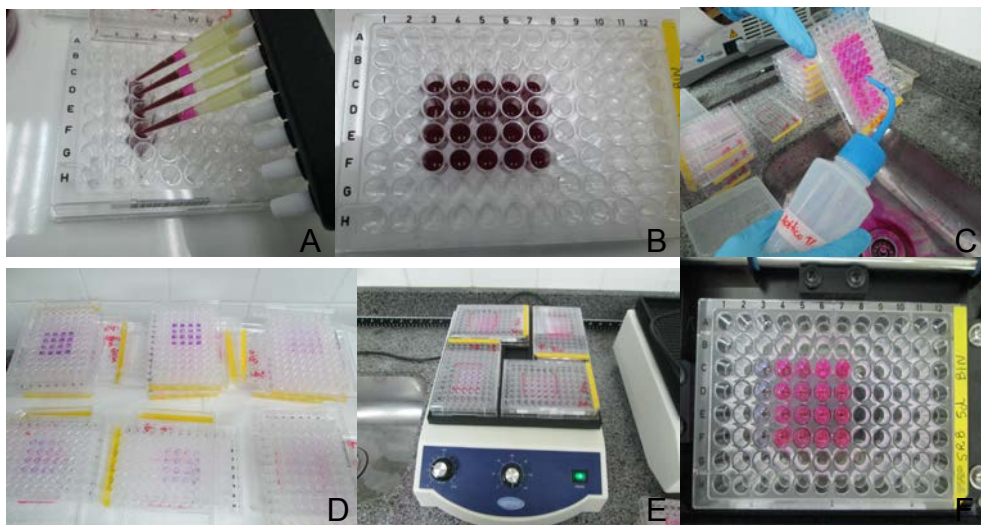


Figura 8 – A) e B) colocação do corante de SRB; C) lavagem com ácido acético 1%; D) placas secas em temperatura ambiente; E) placas agitadas para dissolução do corante; F) placa em espectrofotômetro.

4.5 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

Após o período de 7 dias de incubação das células em contato com os meios condicionados, a atividade da fosfatase alcalina pôde ser mensurada através do kit *Alkaline Phosphatase Assay Colorimetric* (ABCAM, Cambridge MA, USA) (Figura 9A).

Primeiramente foram cultivadas 1.000 células, em placas de 96 poços durante 7 dias. Após este período as células foram lavadas com PBS, e, em seguida, foram adicionados 80 μ l da solução tampão de ALP em cada poço, seguida da raspagem da monocamada de células presente no fundo dos poços.

Posteriormente, foi preparada uma solução 5 mM de pNPP (*p-Nitrophenyl-phosphate*), onde 2 tabletes de pNPP foram dissolvidos em um tubo Falcon contendo 5,4 ml da solução tampão de ALP. A combinação foi agitada em vórtex para haver melhor dissolução

do produto. Essa mistura foi preparada e mantida em gelo, até o momento de sua utilização. Cada poço contendo as amostras recebeu 50 μ l da solução preparada de pNPP.

A placa foi fechada e envolta com papel alumínio, incubando-a em estufa durante 60 minutos a 25 °C. Após esse período, foram adicionados 20 μ l da solução de parada (*stop solution* 1 X 10 ml) em cada poço. Durante a incubação, a solução de pNPP reagiu com a ALP liberada pelas células, e a reação foi reduzida numa coloração amarela que pôde ser lida em espectrofotômetro a 405 nm (Figura 9B).

Para o preparo da curva padrão diluiu-se 40 μ l da solução 5 mM de pNPP em 160 μ l da solução tampão de ALP para gerar uma solução de pNPP de 1 mM. Foram adicionados 0, 4, 8, 12, 16, 20 μ l em cada poço, em duplicata para gerar 0, 4, 8, 12, 16, 20 nmol/poço de pNPP padrão, e normalização do volume final em 120 μ l com a solução tampão. Em cada poço contendo os padrões, foram adicionados 10 μ l da solução de enzima ALP.

Os valores de absorbância foram normalizados pelo controle e submetidos à análise estatística.

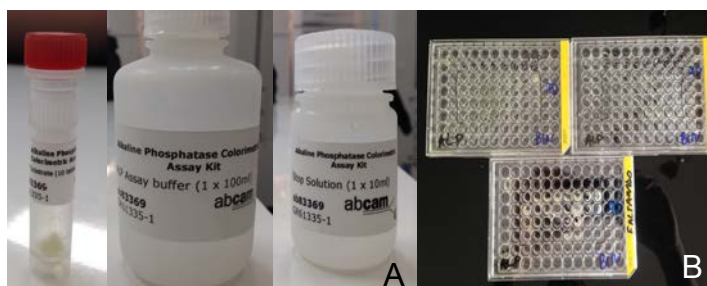


Figura 9 - A) Kit *Alkaline Phosphatase Assay Colorimetric*; B) placas finalizadas para leitura em espectrofotômetro.

4.6 Análise de formação de nódulos minerais (Ensaio de Alizarin Vermelho)

A análise visual de zonas de mineralização na monocamada de células foi realizada por meio do corante de alizarin vermelho (Sigma Aldrich Co., Alemanha), com as células cultivadas em placas de 24 poços. Para isso foram plaqueadas e cultivadas 5.000 células por poço em 1 ml de meio α -MEM, durante três dias.

Após o crescimento celular e depois das células atingirem uma conformação tecidual, aspirou-se o meio de cultivo de cada poço, com o cuidado de não aspirar as células do interior dos poços. Posteriormente foram aplicados 1 ml dos meios condicionados, contendo os cimentos testados, em cada poço. Estes permaneceram em contato com as células durante 1, 7 e 14 dias. Os meios foram trocados a cada três dias.

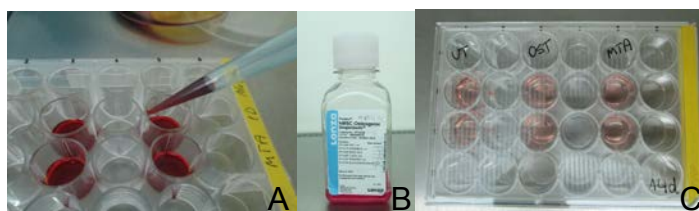
Também foram confeccionados dois controles, controle não tratado (células em contato com meio puro) e controle tratado (células em contato com meio osteogênico hMSC) (Lonza Group Ltd., EUA) (Figura 10B), meio específico que estimula a formação de nódulos de mineralização pelas células.

Em seguida as células foram lavadas com 0,5 ml de PBS, e fixadas com 0,5 ml de formaldeído 10% em temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas, delicadamente, três vezes consecutivas, com 0,5 ml de água destilada, durante 5-10 minutos cada lavagem, a fim de retirar a substância fixadora anterior.

Após remover a água, foram adicionados 0,25 ml da solução do corante de alizarin vermelho em cada poço (Figura 10A). A placa foi incubada em temperatura ambiente por no mínimo 20 minutos, o excesso de corante foi removido e os poços lavados quatro vezes com 0,5 ml de água deionizada, agitando a placa suavemente por cinco minutos em cada lavagem. Finalmente, foram adicionados 0,5 ml de água em cada poço para prevenir a desidratação celular (Figura 10C). Desta

forma, a placa estava pronta para observação em microscopia de fase. As células diferenciadas contendo zonas de mineralização foram coradas pela solução do corante de alizarin vermelho.

Este experimento foi realizado em duplicata para cada material testado e também para os controles tratados e não tratados.



Figuras 10 - A) colocação do corante de alizarin vermelho sobre as células no interior dos poços; B) meio osteogênico; C) células lavadas e prontas para visualização em microscópio.

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos em relação à citotoxicidade foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial, mediante o teste paramétrico de análise de variância um fator (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$). A atividade de ALP também foi analisada por ANOVA um fator ($p < 0,05$), complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: Statistix9 (trial version) e GraphPad PRISM (versão 6.01).

5 RESULTADOS

5.1 Curva padrão de viabilidade e crescimento celular

De acordo com os resultados obtidos na curva padrão de viabilidade e crescimento celular, realizada previamente, verificou-se que a quantidade ideal de células a ser utilizada no plaqueamento é de 1.000 células por poço da placa de 96 poços. O uso de maior número de células por poço não se justifica a medida que já foi obtida uma boa absorvância com uma menor quantidade de células. Além disso, a utilização de muitas células por poço poderia gerar uma confluência exagerada e, em seguida, queda da viabilidade celular levando a falsos resultados.

5.2 Citotoxicidade

Após 1, 3 e 5 dias dos meios condicionados em contato com células, as placas foram levadas para leitura no espectrofotômetro. A estatística descritiva dos resultados dos testes de citotoxicidade quanto à sobrevivência celular (XTT) e densidade celular (SRB) estão nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre as células progenitoras, após teste de XTT, os valores indicados são as médias de absorbância e entre parênteses, o desvio padrão

Tempo de Exposição	Controle	MTA	Biodentine	Hidróxido de cálcio
1 dia	1 (0,0930)	1,1954 (0,2695)	1,5062 (0,2620)	1,2217 (0,2441)
3 dias	4,722 (0,974)	4,184 (0,471)	5,059 (0,499)	2,9507 (0,3350)
5 dias	5,719 (0,826)	5,864 (0,449)	11,398 (1,934)	5,546 (1,103)

Tabela 2 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre as células progenitoras, após teste de SRB, os valores indicados são as médias de absorbância e entre parênteses, o desvio padrão

Tempo de Exposição	Controle	MTA	Biodentine	Hidróxido de cálcio
1 dia	1 (0,1654)	0,9427 (0,2702)	1,318 (0,485)	0,86 (0,391)
3 dias	4,306 (1,218)	3,883 (1,106)	6,389 (1,218)	5,035 (1,037)
5 dias	21 (3,91)	14,42 (2,162)	25,58 (7,49)	20,5 (7,5)

A citotoxicidade dos extratos dos materiais bioativos foi determinada nas células progenitoras após os períodos de exposição de 1, 3 e 5 dias utilizando-se os testes de XTT e SRB. O hidróxido de cálcio foi o material mais citotóxico, apesar desta diferença ter sido significativa somente após três dias do contato com as células, no teste de XTT (Figura 11). Já no teste de SRB o material mais citotóxico foi o cimento MTA, sendo significativa esta citotoxicidade apenas para o período de 5 dias de exposição (Figura 13). A relação das células viáveis e de densidade celular diante dos diferentes períodos dos materiais testados após realização dos testes também estão expressas nas figuras 12 e 14.

*Unidades arbitrárias
(normalizadas pelo controle)*

Figura 11 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) dos valores de absorvância após realização do teste de XTT, segundo o tempo de contato entre as células e os meios condicionados; asteriscos representam diferenças entre os cimentos em cada período.

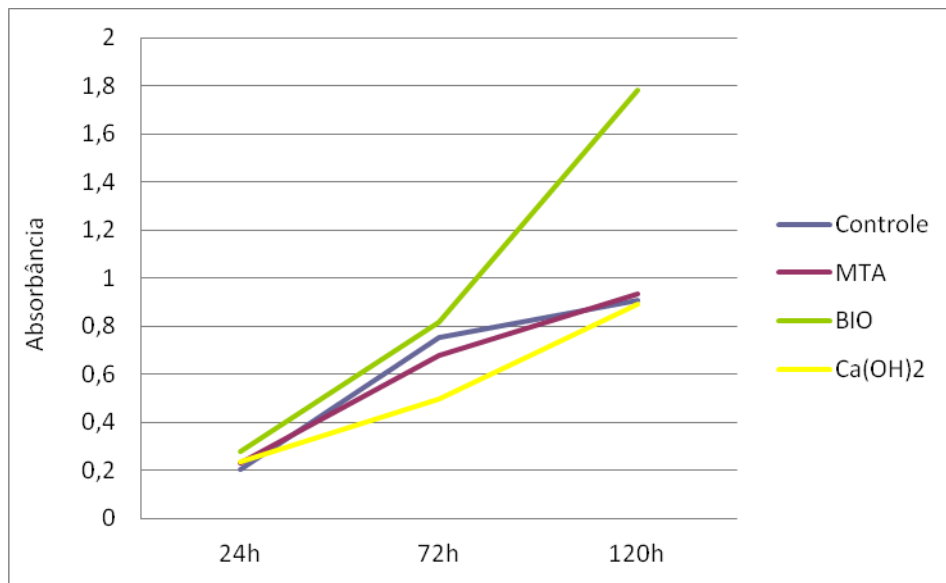


Figura 12 - Resultados da sobrevivência celular (teste XTT) após 1, 3 e 5 dias de exposição a diferentes materiais (MTA, hidróxido de cálcio e Biodentine).

*Unidades arbitrárias
(normalizadas pelo controle)*

Figura 13 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) dos valores de absorbância após realização do teste de SRB, segundo o tempo de contato entre as células e os meios condicionados; asteriscos representam diferenças entre os cimentos em cada período.

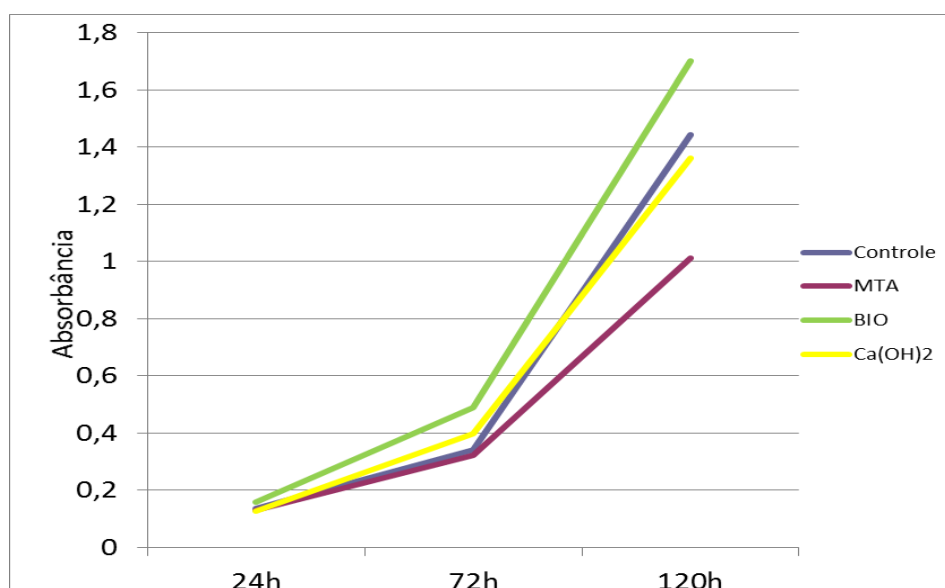


Figura 14 - Resultados da densidade celular (teste SRB) após 1, 3 e 5 dias de exposição a diferentes materiais (MTA, hidróxido de cálcio e Biodentine).

O cimento Biodentine foi o mais biocompatível entre os materiais testados, aumentando a viabilidade e proliferação celular consideravelmente, sendo o resultado semelhante com o teste de densidade celular (SRB). Por outro lado, o MTA demonstrou uma citotoxicidade maior, em relação aos demais cimentos, para os períodos de 3 e 5 dias, com redução da densidade celular, observada com valores médios de absorbância de 3,883 e 14,420, respectivamente, no teste de SRB.

Com os resultados obtidos e, relevando as diferenças estatísticas existentes entre os materiais e o grupo controle, foi possível observar que em ambos os testes de citotoxicidade, os cimentos apresentaram um comportamento crescente tanto na proliferação como na densidade celular, com o decorrer dos períodos, havendo então um padrão de similaridade entre os testes escolhidos.

Portanto, a influência dos materiais na forma de meios condicionados, na sobrevivência celular pôde ser classificada da maior

toxicidade para a menor seguindo-se com $\text{Ca(OH)}_2 > \text{MTA} > \text{Biodentine (XTT)}$ e $\text{MTA} > \text{Ca(OH)}_2 > \text{Biodentine (SRB)}$. Embora, todos os biomateriais tenham apresentado baixos índices de proliferação celular após o primeiro dia de contato, em ambos os testes.

Para testar a hipótese de igualdade entre os diferentes materiais foi realizado o teste de variância um fator (ANOVA). Com a finalidade de observar quais biomateriais dentro de cada período apresentaram diferenças estatísticas, foi aplicado o teste de Tukey (5%), tanto para o XTT quanto para SRB, conforme descrição das tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Tukey (5%) para os cimentos dentro de cada período (teste XTT)

	Período	Média	Igualdade
Biodentine	1 dia	1,5062	A
MTA		1,1954	B
Ca(OH)_2		1,2217	B
Biodentine	3 dias	5,0594	A
MTA		4,1840	B
Ca(OH)_2		2,9507	C
Biodentine	5 dias	11,398	A
MTA		5,864	B
Ca(OH)_2		5,546	B

Períodos entre si não comparáveis. Letras iguais são ausência de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes são diferenças significantes entre um mesmo período.

Tabela 4 - Tukey (5%) para os cimentos dentro de cada período (teste SRB)

	Período	Média	Igualdade
Biodentine	1 dia	1,3179	A
MTA		0,9427	AB
Ca(OH) ₂		0,8600	B
Biodentine	3 dias	6,389	A
MTA		5,035	B
Ca(OH) ₂		3,883	C
Biodentine	5 dias	25,577	A
MTA		20,502	AB
Ca(OH) ₂		14,420	B

Períodos entre si não comparáveis. Letras iguais são ausência de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes são diferenças significantes entre um mesmo período.

5.3 Fosfatase Alcalina

A estatística descritiva dos resultados do teste de ALP quanto à atividade da enzima fosfatase alcalina estão na tabela 5. Após 7 dias do contato dos meios condicionados com as células, as placas foram levadas para leitura no espectrofotômetro.

Tabela 5 - Atividade da ALP induzida pelos materiais sobre as células progenitoras, os valores indicados são as médias de absorbância e entre parênteses, o desvio padrão

Tempo de Exposição	Controle	MTA	Biodentine	Hidróxido de cálcio
7 dias	1 (0,404)	1,444 (0,453)	1,2 (0,525)	2,437 (0,939)

Após a realização do teste de ALP, foi possível observar que o cimento de Ca(OH)_2 estimulou os maiores índices de atividade da enzima fosfatase alcalina sobre as células progenitoras, sob as condições deste estudo. Este resultado foi estatisticamente significativo para o período analisado em relação aos demais cimentos (Figura 15).

Com a finalidade de observar quais cimentos dentro do período de 7 dias apresentaram diferenças estatísticas, foi aplicado o teste de Tukey (5%), conforme descrição da tabela 6 e figura 15.

Tabela 6 - Tukey (5%) para os cimentos após 7 dias do contato células/meios condicionados (teste ALP)

	Período	Média	Igualdade
Biodentine	7 dias	1,2119	B
MTA		1,4435	B
Ca(OH)_2		2,4373	A

Letras iguais são ausência de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes são diferenças significantes entre o mesmo período.

UI ALP / ug de proteína

Figura 15 - Gráfico de colunas (média ± desvio padrão) dos valores de atividade de fosfatase alcalina para o período de 7 dias, segundo o cimento testado; asteriscos representam diferenças entre os cimentos no período.

5.4 Alizarin Vermelho

Ao observarmos sob o microscópio as células coradas com a solução de alizarin vermelho, foi possível verificar que todos os materiais estimularam maior formação de nódulos mineralizados a partir do sétimo dia de contato com as células progenitoras, em relação ao grupo controle. Porém, o MTA foi o material que apresentou uma melhor formação dessas estruturas mineralizadas, uma vez que para este cimento, os nódulos se apresentaram de forma mais organizada e homogênea (Figura 18). Contudo, tanto para o Ca(OH)_2 quanto para a Biodentine, o processo de mineralização obtido se apresentou de forma generalizada e maciça, abrangendo quase que a totalidade das células a partir do sétimo dia de contato (Figuras 19 e 20).

As figuras de 16 a 20 comprovam o processo de mineralização obtido após o contato dos materiais com as células progenitoras em relação ao grupo controle não tratado e ao grupo contendo meio osteogênico.



Figura 16 - Imagens obtidas após o ensaio do alizarin vermelho para o grupo controle (1, 7 e 14 dias, respectivamente; aumento de 40X).

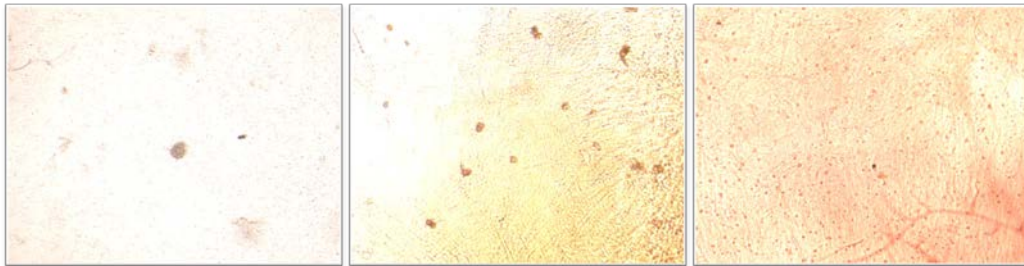


Figura 17 - Imagens obtidas após o ensaio do alizarin vermelho para o grupo do meio osteogênico (1, 7 e 14 dias, respectivamente; aumento de 40X).

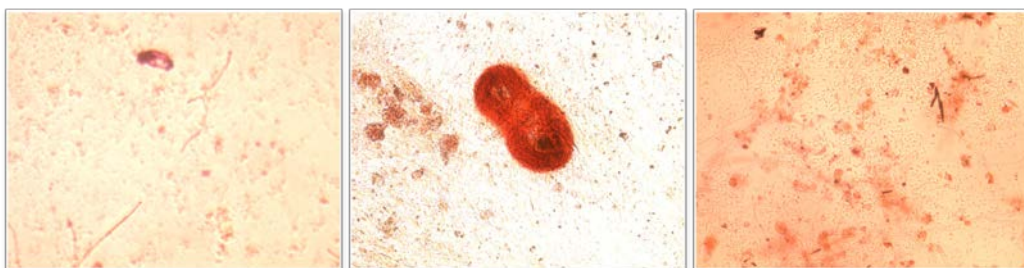


Figura 18 - Imagens obtidas após o ensaio do alizarin vermelho para o grupo do MTA (1, 7 e 14 dias, respectivamente; aumento de 40X).

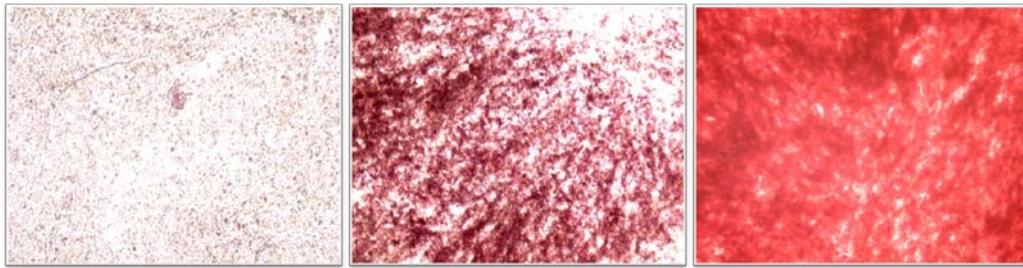


Figura 19 - Imagens obtidas após o ensaio do alizarin vermelho para o grupo da Biodentine (1, 7 e 14 dias, respectivamente; aumento de 40X).

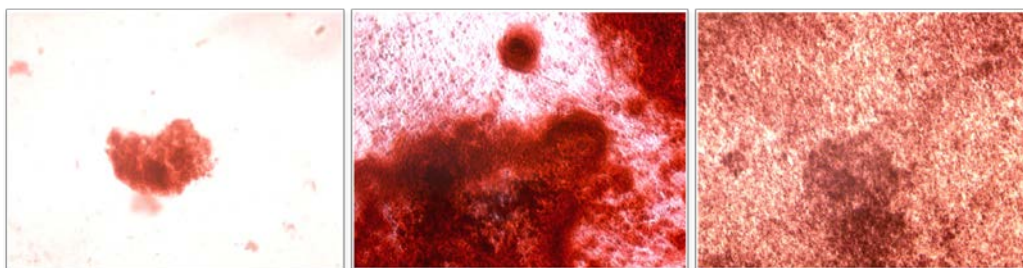


Figura 20 - Imagens obtidas após o ensaio do alizarin vermelho para o grupo do Ca(OH)_2 (1, 7 e 14 dias, respectivamente; aumento de 40X).

6 DISCUSSÃO

6.1 Ensaios de citotoxicidade

Para todos os ensaios realizados nesta pesquisa, foram utilizadas células progenitoras previamente estabelecidas a partir de cultura primária da polpa dental de dentes decíduos esfoliados (SHED). A razão da sua utilização deve-se ao fato desse tipo celular apresentar características semelhantes às células do tecido original, porém com menores alterações genéticas por não serem imortalizadas. Além, de possuírem potencial reparativo em tecidos dentais e não dentais (Miura et al., 2003).

As células foram utilizadas apenas até a sétima passagem, porque de acordo com a caracterização da cultura realizada por nossa equipe em trabalho prévio, a partir de passagens superiores começam a ocorrer alterações morfológicas e envelhecimento celular.

Em relação aos ensaios de citotoxicidade escolhidos, alguns autores têm relatado bons resultados com células primárias humanas quando realizado o teste MTT (Issa et al., 2008). No entanto, em testes piloto prévios, o MTT revelou baixa absorvância, em torno de 0.1 a 0.3 para o grupo controle, resultados não aceitáveis. Talvez essa taxa reduzida de absorvância seja devido ao baixo número de células utilizadas em cada poço. Porém, quando utilizamos a mesma quantidade celular, o ensaio de XTT mostrou resultados de absorvância maiores, em torno de 0.4 a 0.8. Também foi relatada melhor absorvância, por (Scudiero et al., 1988), ao utilizar XTT em relação ao MTT em teste de

citotoxicidade utilizando fibroblastos humanos, assim como em nossos resultados.

Berridge et al. (2005) relataram que a redução do sal tetrazolium pode ocorrer em locais diferentes. O MTT primariamente é reduzido no meio intracelular, enquanto o XTT na superfície celular. Além disso, a redução do MTT não seria totalmente realizada pela enzima succinil desidrogenase nas mitocôndrias, mas também estaria associada com o citoplasma e membranas não mitocondriais, endossomos e lisossomos. Esses fatores poderiam estar relacionados com as diferenças encontradas em relação à absorvância do MTT e XTT.

O XTT têm mostrado bons resultados em culturas primárias de osteoblastos humanos (Scelza et al., 2012), em células da gengiva humana (Reichl et al., 2006; Urcan et al., 2010; Van Landuyt et al., 2012), polpa dental humana, células mesenquimais de medula óssea e do ligamento periodontal (Schwarze et al., 2002).

Quando comparado ao MTT, e, em condições ideais, o XTT oferece um grau elevado de sensibilidade, economia de tempo e trabalho por eliminar a necessidade de solubilizar o formazan antes de medições de absorvância (Roehm et al., 1991). No entanto, deve ser associado à outra substância como a menadiona para que seja melhor absorvido pelas células e assim gerar boa absorvância (Roehm et al., 1991).

Em nosso estudo, também optamos pela realização de outro ensaio de citotoxicidade, o SRB, a fim de comprovarmos além do metabolismo celular, gerado pelo XTT, valores de densidade celular fornecidos pelo teste do SRB. Trata-se de um corante de coloração rosa brilhante que se liga a base dos aminoácidos de proteínas celulares em condições ligeiramente ácidas e que se dissocia em meio básico (Vichai, Kirtikara, 2006). A ligação que ocorre entre o corante e as células é estequiométrica, e a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional ao total de proteínas e consequentemente

pode ser correlacionada com o número de células presente (Papazisis et al., 1997; Vichai, Kirtikara, 2006). Este ensaio é de fácil execução e reprodutibilidade, podendo ser mantido em ambiente seco e guardado para análises laboratoriais posteriores quando necessário (Nedel et al., 2011).

A citotoxicidade dos biomateriais MTA, Biodentine e Ca(OH)_2 foi testada pelos ensaios de XTT e SRB em culturas de células progenitoras da polpa de dentes decíduos. Nossos resultados mostraram um aumento significativo do metabolismo celular para as células expostas a Biodentine após 5 dias de contato. Este fato também pôde ser observado no ensaio de SRB para o mesmo período, indicando um aumento do número de células, em relação ao grupo controle. O estímulo dessa proliferação celular pode estar relacionado com a presença do silicato de tricálcio (Ca_3SiO_5), que é um dos principais componentes da Biodentine. Esse constituinte ainda está relacionado com o aumento da proliferação, diferenciação e mineralização de células-tronco da polpa humana (Zhao et al., 2005; Mizuno, Banzai, 2008).

A biocompatibilidade de componentes cálcicos como o silicato de cálcio, silicato de dicálcio (Chen et al., 2009; Zhao et al., 2010) e silicato de tricálcio (Zhao et al., 2005) já foi constatada em outros estudos. A proliferação celular induzida pelos íons cálcio e silicone foi anteriormente hipotetizada (Valerio et al., 2009) e nossos resultados confirmam essa hipótese.

Porém, ambos os ensaios de citotoxicidade demonstraram índices reduzidos de absorbância para todos os materiais testados após o primeiro dia de contato com as células. Isto significa baixos índices de densidade e proliferação celular depois do primeiro período de estímulo. Essa redução inicial da proliferação e densidade celular pode ter sido causada pelo número reduzido de células colocadas em cada poço, ou pela maior liberação de hidróxido de cálcio pelos materiais testados neste período (Leiendecker et al., 2012), evidenciada,

pelo aumento de pH, que inclusive causou uma alteração de cor no meio de cultura (Bin et al., 2012; Scelza et al., 2012; Zanini et al., 2012). Fato este, já observado com o MTA em culturas de fibroblastos e macrófagos (Haglund et al., 2003). Porém, os materiais não foram citotóxicos neste período, uma vez que apresentaram uma taxa de absorvância semelhante ao controle.

Da mesma forma, o Ca(OH)_2 PA foi mais citotóxico (XTT), quando comparado ao MTA e Biodentine, muito provavelmente pela maior liberação dos íons hidroxilas (OH^-), tornando o meio mais alcalino que os demais materiais, justificada pelo fato de sua composição ser “praticamente” 100% de Ca(OH)_2 (Huang et al., 2004). Outro estudo também constatou uma citotoxicidade maior quando foi utilizado o cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) e um aumento da produção de ROS em células da polpa humana (Camargo et al., 2009). Além disso, durante o capeamento pulpar, e, devido ainda ao seu alto pH, a fina camada de dentina que recobre a cavidade pulpar sofre necrose e a polpa é exposta a um processo inflamatório maior quando comparado aos outros cimentos (Pitt Ford, 1980).

Desta forma a formação de dentina reparativa em resposta ao Ca(OH)_2 após o capeamento pulpar, pode não ser devido a bioindutividade deste material, e, sim, um resultado do mecanismo de defesa da polpa induzido pela natureza irritante do hidróxido de cálcio (Goldberg et al., 2003; Almushayt et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que ambos os testes de citotoxicidade apresentaram a mesma tendência e comportamento, tornando nossos dados mais confiáveis. Uma vez que, aumentaram os valores de absorvância com o passar do tempo para todos os materiais avaliados (Nedel et al., 2011). Esse desempenho semelhante indica que os materiais têm ausência de citotoxicidade e aumento da proliferação e da densidade celular quanto maior for o período de contato celular com os meios condicionados.

6.2 Fosfatase Alcalina

Frequentemente a atividade da fosfatase alcalina (ALP) é avaliada por se tratar de um importante marcador da atividade de osteoblastos (Garnero, Delmas, 1996; Magnusson et al., 1999). Ela é uma glicoproteína presente na membrana plasmática dessas células (Morris et al., 1992), e possui importante papel no processo de mineralização como: hidrólise de fosfatos ésteres orgânicos resultando numa alta concentração local de fosfatos inorgânicos, facilitando a precipitação de fosfato de cálcio (Tagger, Tagger, 1989), destruição fisiológica de fatores inibitórios do crescimento celular como pirofosfato inorgânico e adenosina trifosfato através da atividade de hidrolases, e atua ainda no transporte de fosfato inorgânico e do cálcio (Register et al., 1986). Por essas características sua presença é indicativa de osteoblastos e conseqüentemente de formação óssea (Huang et al., 2010).

A presença de níveis elevados desta enzima parece ser necessária para iniciar o processo de mineralização de tecidos conjuntivos (Liu et al., 2005), uma vez que é responsável pelo aumento local de fosfato inorgânico para a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (Azari et al., 2008). Acredita-se ainda, que a fosfatase alcalina esteja envolvida na sinalização transmembrana, promovendo a formação de cristais na matriz extracelular e removendo inibidores de nucleação (Hui et al., 1993). Beertsen et al. (1992), mostraram que a ALP está envolvida na indução da deposição de hidroxiapatita em matrizes de colágeno *in vivo*. Além de participar dos processos de adesão, migração e diferenciação de osteoblastos (Hui et al., 1993).

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada na cultura celular por meio da liberação celular de p-nitrophenol após 7 dias do contato das células progenitoras com os meios condicionados. Após a realização do ensaio, foi possível observar que o Ca(OH)_2 foi o material

que mais estimulou a atividade desta enzima, alcançando o nível de 2.5 de absorvância em 7 dias, contrariando nossa hipótese experimental inicial, que subestimou a ação deste material quanto ao processo de mineralização. Este resultado diferiu do obtido por Zanini et al. (2012), onde no mesmo período, houve redução da taxa da atividade da ALP, em torno de 0.05 de absorvância. Talvez, a diferença obtida, seja devido a concentração utilizada de Biodentine em nosso estudo (2 mg/ml), no trabalho de Zanini, a concentração testada foi de 1 mg/ml. Este mesmo trabalho também foi realizado num período menor (3 dias), diferindo de nossa pesquisa que avaliou a Biodentine em até 7 dias. Além disso, a análise desse autor utilizou outra linhagem celular, (células pulpares imortalizadas de murino (OD-21)).

Os outros cimentos (MTA e Biodentine) foram similares entre si, porém, superiores, ao grupo controle. Provavelmente, o aumento da atividade da ALP estimulada pelo Ca(OH)_2 PA deve-se ao pH elevado e conseqüente da dissociação iônica deste material no meio de cultura (Estrela et al., 1995). E, possivelmente essa dissociação foi maior devido ao fato da própria composição do Ca(OH)_2 ser 100% hidróxido de cálcio, propiciando um meio mais alcalino e favorável para a ação desta enzima.

6.3 Alizarin Vermelho

Apesar de todos os materiais terem aumentado a sobrevivência e proliferação celular, isto não pode ser relacionado com a funcionalidade das mesmas (Paranjipe et al., 2010), por isso optamos também pela realização de um teste que avaliasse a função celular em relação ao processo de mineralização (alizarin vermelho) (Peng et al., 2011).

Considerando os resultados obtidos com o ensaio do alizarin vermelho, ficou evidente que todos os materiais estimularam a mineralização nas células progenitoras. Processo verificado, principalmente, após sete dias da estimulação induzida pelos cimentos. Fato que não ocorreu no controle sem tratamento, onde não foram verificados sinais de mineralização (An et al., 2012). Laurent et al. (2012) verificaram a ocorrência da mineralização após 2 dias de contato para os mesmos cimentos, e após 14 e 28 dias de contato, os focos de mineralização eram mais numerosos e de vários tamanhos (Estrela et al., 1995). Os autores visualizaram focos morfológicamente semelhantes à osteodentina.

Em nosso estudo, a mineralização estimulada pelos materiais Ca(OH)_2 e Biodentine foi generalizada e muito evidente após 7 dias de exposição aos cimentos. Contudo a mineralização provocada pelo cimento MTA foi visualmente menor, porém, composta de nódulos mineralizados característicos e bem organizados, semelhantes aos focos de osteodentina descritos por Laurent et al. (2012).

Sob maior aumento, pudemos observar que muitas células expostas ao MTA, estavam aprisionadas no próprio mineral formado, e o mesmo foi evidenciado por Zanini et al., 2012, a respeito da Biodentine. Porém, a biomineralização deste autor foi somente avaliada após 5 dias, e, nossa pesquisa propôs uma avaliação sob um período mais longo (14 dias). Talvez, por isso, a diferença entre os materiais, considerando que ambos possuem em suas composições componentes cálcicos e silicatos.

Desta forma, a biomineralização estimulada pelo MTA, parece representar mais o processo de osteodentina do que a formação de dentina terciária (reparativa). Entretanto esses achados devem ser confirmados em outros estudos *in vivo* que permitam melhor descrição da natureza do tecido mineralizado formado.

Ainda em estudo de Laurent et al. (2012), foram verificadas partículas de Biodentine aprisionadas no tecido mineralizado recém formado. Gandolfi et al. (2010) ressaltaram que as partículas de Biodentine pareciam estar completamente integradas ao novo tecido e suas estruturas, sugerindo que suas propriedades físico-químicas poderiam promover o processo de mineralização, como o que ocorre com os cimentos a base de MTA. Laurent et al. (2012), também encontraram partículas de Ca(OH)_2 aprisionadas no interior de macrófagos circundantes ao material, fato também verificado por Kitasako et al. (2006).

Independente das morfologias minerais encontradas, o processo de mineralização obtido neste estudo foi muito importante, pois se trata de um dos mecanismos essenciais para que ocorra o completo reparo da polpa exposta (Kim EJ et al., 2013). Além disso, o depósito de mineral na matriz extracelular é considerado um estágio avançado do processo de diferenciação odontoblástica sofrido pelas células pulpares progenitoras (Jittapiromsak et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos relacionados à mineralização, podemos fazer uma correlação com os níveis de atividade de ALP. Uma vez que, após a análise de sete dias, o nível de atividade desta enzima foi elevado para todos os cimentos, período este, que coincidiu com o início do processo de mineralização observado no ensaio de alizarin vermelho. Essa informação é condizente com a hipótese de que esta enzima seja necessária para iniciar a mineralização de tecidos conjuntivos (Liu et al., 2005).

Nos últimos cinco anos, o MTA foi considerado o material de escolha para o capeamento da polpa. Não obstante, apesar dos resultados *in vitro* e clínicos, o MTA apresenta algumas desvantagens, como o longo tempo de presa e a descoloração do elemento dental devido à presença em sua composição de alguns óxidos (Maroto et al., 2005).

Resultados de alguns estudos revelaram que a Biodentine apresenta uma boa capacidade de selamento e tempo de presa reduzido em relação ao cimento de MTA (Villat et al., 2010). Estas informações, juntamente com os resultados obtidos em nossa pesquisa e demais estudos, especialmente os resultados relacionados com a citotoxicidade e biomineralização, indicam que este material apresenta propriedades superiores para se tornar um material de capeamento pulpar de escolha em relação aos demais materiais estudados.

Portanto, devido a suas vantagens (menor tempo de presa, melhores propriedades mecânicas e fácil manipulação), a Biodentine pode ser considerada uma alternativa promissora em detrimento de outros materiais capeadores, quando da indução da regeneração e reparo do complexo dentino-pulpar (Zanini et al., 2012).

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e com os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- a) Todos os biomateriais foram biocompatíveis, porém a Biodentine foi o material que apresentou maiores índices de viabilidade e densidade celular nos testes de XTT e SRB, respectivamente;
- b) O hidróxido de cálcio PA foi o material que mais estimulou a atividade de fosfatase alcalina no período de sete dias;
- c) Todos os materiais induziram a mineralização no teste de alizarin vermelho a partir do sétimo dia de contato. Sendo que o Ca(OH)_2 e Biodentine apresentaram uma mineralização superior.

8 REFERÊNCIAS*

Accorinte MLR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E, Jr. et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod.* 2008;34(1):1-6.

Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. *J Endod.* 2006;32(9):872-5.

Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* 2006;13(7):611-20.

An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(3):789-95.

Atari M, Barajas M, Hernandez-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Ferres Padro E, et al. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol.* 2011;26(8):1057-70.

Azari F, Vali H, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Croisy A, Sears SK, et al. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Struct Biol.* 2008;162(3):468-79.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

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;38(4):495-500.

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009;42(3):227-37.

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

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

Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod.* 2009;35(5):682-5.

Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. 2003. *Int Endod J.* 2009;42(5):414-20.

Cox DA, Cohen ML. 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):289-92.

D'Anto V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2010;36(11):1839-43.

Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T, Schafer E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J.* 2006;39(3):213-9.

Estrela C, Sydney GB, Pesce HF, Felipe Junior O. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J.* 1995;6(1):5-9.

Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(6):756-63.

Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2011;18(1-2):176-84.

Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2010;43(10):917-29.

Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1996;59 Suppl 1:S2-9.

Gencay K, Seymen F, Selvi S, Kiziltan B. In vitro evaluation of pH changes induced by calcium hydroxide liners. *Quintessence Int.* 2004;35(7):560-2.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular,

spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.

Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, et al. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent.* 2003;16(1):66-76.

Graham GM, Thrasher TA, Popovic MR. The effect of random modulation of functional electrical stimulation parameters on muscle fatigue. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2006;14(1):38-45.

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

Güven EP, Yalvac ME, Şahin F, Yazıcı MM, Rizvanov AA, Bayırlı G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. *J Endod.* 2011;37(5):650-6.

Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(6):739-45.

Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol.* 2006;77(6):1003-7.

Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385-8.

Huang FM, Yang SF, Chang YC. Effects of root canal sealers on alkaline phosphatase in human osteoblastic cells. *J Endod.* 2010;36(7):1230-3.

Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(7):767-71.

Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* 1993;274(3):429-37.

Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials.* 2011;33(7):2109-18.

Issa Y, Brunton P, Waters CM, Watts DC. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dent Mater.* 2008;24(2):281-7.

Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1823-33.

Jittapiromsak N, Sahawat D, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Acemannan, an extracted product from Aloe vera, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1997-2006.

Kim EJ, Bu SY, Sung MK, Choi MK. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2013;152(1):105-12.

Kim YB, Shon WJ, Lee W, Kum KY, Baek SH, Bae KS. Gene expression profiling concerning mineralization in human dental pulp cells treated with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2010;36(11):1831-8.

Kitasako Y, Shibata S, Tagami J. Migration and particle clearance from hard-setting Ca(OH)₂ and self-etching adhesive resin following direct pulp capping. *Am J Dent.* 2006;19(6):370-5.

Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45(5):439-48.

Laurent P, Camps J, De Meo M, Dejoui J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca₃SiO₅-based posterior restorative material. *Dent Mater.* 2008;24(11):1486-94.

Lee SY, Min KS, Choi GW, Park JH, Park SH, Lee SI, et al. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide-induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2012;38(3):405-10.

Leiendecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod.* 2012;38(6):829-33.

Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):329-35.

Liu J, Jin T, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2005;41(7):232-8.

Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Akamine A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(4):33.

Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res.* 1999;14(11):1926-33.

Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod.* 2004;30(2):80-3.

Maroto M, Barberia E, Planells P, Garcia Godoy F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. *Am J Dent.* 2005;18(3):151-4.

Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem.* 2009;112(5):452-8.

Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod.* 2008;34(6):666-70.

Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system. *J Endod.* 2009;35(6):843-6.

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

Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* 2008;41(11):933-8.

Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod.* 2005;31(5):387-91.

Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner.* 1992;19(3):287-98.

Murray EJ, Behnam K, Grisanti MS, Murray SS. Purification and quantification of calcium-activated neutral proteases I and II and novel isoforms from cultured osteoblastic cells by ion-exchange fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 2000;144:25-32.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-90.

Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 1994;162(1):18-28.

Nedel F, Soki FN, Conde MC, Zeitlin BD, Tarquinio SB, Nor JE, et al. Comparative analysis of two colorimetric assays in dental pulp cell density. *Int Endod J.* 2011;44(1):59-64.

Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J.* 2006;39(6):429-42.

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;32(3):210-3.

Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Methods.* 1997;208(2):151-8.

Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod.* 2010;36(6):1042-7.

Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2011;37(9):1240-6.

Perard M, Le Clerc J, Meary F, Perez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;24(6):1527-34.

Pitt Ford TR. Pulpal response to MPC for capping exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;50(1):81-8.

Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. *Int Endod J*. 2002;35(10):840-7.

Register TC, McLean FM, Low MG, Wuthier RE. Roles of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. Effect of selective release of membrane-bound alkaline phosphatase and treatment with isosmotic pH 6 buffer. *J Biol Chem*. 1986;261(20):9354-60.

Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*. 2006;80(8):465-72.

Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*. 2008;24(2):149-64.

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991;142(2):257-65.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012;45(1):12-8.

Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod*. 2002;28(11):784-6.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.

Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeelee AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent*. 2012;34(7):e202-8.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):273-80.

Subramaniam P, Konde S, Prashanth P. An in vitro evaluation of pH variations in calcium hydroxide liners. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2006;24(3):144-5.

Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5(3):139-46.

Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006;39(5):415-22.

Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res.* 2010;89(8):773-8.

Tamburic SD, Vuleta GM, Ognjanovic JM. In vitro release of calcium and hydroxyl ions from two types of calcium hydroxide preparation. *Int Endod J.* 1993;26(2):125-30.

Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995;21(12):603-8.

Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997;23(4):225-8.

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5.

Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012a;91(12):1166-71.

Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a Calcium-silicate-based Restorative Cement on Pulp Repair. *J Dent Res.* 2012b;

Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials.* 2010;31(8):2010-4.

Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. *Biomed Mater.* 2009;4(4):045011.

Van Landuyt KL, Geebelen B, Shehata M, Furche SL, Durner J, Van Meerbeek B, et al. No evidence for DNA double-strand breaks caused by endodontic sealers. *J Endod.* 2012;38(5):636-41.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112-6.

Villat C, Tran XV, Pradelle-Plasse N, Ponthiaux P, Wenger F, Grosgeat B, et al. Impedance methodology: A new way to characterize the setting reaction of dental cements. *Dent Mater.* 2010;26(12):1127-32.

Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nor JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil.* 2008a;35(12):940-6.

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.* 2008b;34(9):1057-60.

Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1996;75(8):1590-7.

Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, et al. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(4):583-92.

Zander HA, Glass RL. The healing of phenolized pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1949;2(6):803-10.

Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012;38(9):1220-6.

Zhao L, Zhu ML, Zhang X, Tan WS. [Effect of calcium on aggregation and growth of 293 cells]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2005;21(3):482-5.

Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep.* 2011;39(1):215-20.

Zhao Y, Zhang Y, Zhou W, Liu X, Zeng S, Luo Q. Characteristics of calcium signaling in astrocytes induced by photostimulation with femtosecond laser. *J Biomed Opt.* 2010;15(3):035001.

Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, et al. In Vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39(4):478-83.

Zhu Q, Chen G, Huang Y. [The relationship between sensitivity to arsenic trioxide and antioxidative capacity of malignant hematopoietic cells]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2000;22(5):359-61.

ANEXO - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco de dentes permanentes e deciduos

Área Temática:

Pesquisador: Bruno das Neves Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

CAAE: 02210312.1.0000.0077

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46420

Data da Relatoria: 26/06/2012

Apresentação do Projeto:

Com o advento da engenharia tecidual e busca de novas alternativas no que diz respeito ao tratamento e regeneração de tecidos perdidos, o uso de células-tronco tem ganhado espaço na ciência em geral. Mais precisamente na Odontologia, são de interesse os estudos envolvendo células-tronco adultas obtidas a partir de dentes humanos, sejam esses deciduos ou permanentes. Nesse contexto, de forma a garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade entre nosso grupo e grupos de pesquisas internacionais, o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células. Para isso, tecido pulpar humano obtido a partir de um terceiro molar extraído por razões terapêuticas serão processados para obtenção de fibroblastos por explante (grupo controle). Outros 3 tecidos pulpares obtidos da mesma forma serão processados para obtenção das células-tronco (DPSC) por digestão enzimática. E finalmente, 3 tecidos pulpares humanos serão obtidos a partir da raspagem de molares deciduos exfoliados naturalmente e processados também por digestão enzimática para o isolamento das células-tronco (SHED). As células obtidas (fibroblastos, DPSC e SHED) serão submetidas a ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica com o uso de suplementos específicos em seus meios de cultivo, bem como estimuladas a diferenciação dentinogênica com o uso de BMP-2, de modo a serem caracterizadas como células-tronco. Dessa forma, espera-se constituir um banco validado de células-tronco pulpares para a execução de futuros experimentos na área de engenharia tecidual.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e deciduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células para garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade frente os grupos de pesquisas internacionais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes. Os dentes selecionados são dentes que seriam exfoliados/extraídos, tendo em vista os períodos de troca dentária (dentes deciduos) ou a necessidade terapêutica (terceiros molares inclusos). Os benefícios poderão ser observados na independência da Instituição de Pesquisa à qual o projeto está vinculado, de modo que de receptora de doações de linhagens, passaremos a doadores, técnica

dominada por poucos centros no Brasil. Além disso, o potencial de pesquisas com estes tipos celulares é altamente promissor, fazendo com que a expansão e arquivamento das linhagens permita a geração de pesquisa de alto impacto no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e está adequada para realização

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi atendido a solicitação de mudança do tcle

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as considerações anteriores, o projeto está aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA