

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEANDRO BORGES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PULPARES APÓS TRATAMENTO COM MTA,
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO OU BIODENTINE**

**ALFENAS/MG
2014**

LEANDRO BORGES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PULPARES APÓS TRATAMENTO COM MTA, HIDRÓXIDO
DE CÁLCIO OU BIODENTINE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vivien Thiemy Sakai.

ALFENAS/MG

2014

Araújo, Leandro Borges de.

Avaliação da proliferação, migração e diferenciação de células-tronco pulpareas após tratamento com MTA, hidróxido de cálcio ou Biodentine / Leandro Borges de Araújo - Alfenas, 2014.

54 f. -

Orientadora: Vivien Thiemy Sakai.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Pulpotomia. 2. Células-Tronco. 3. Diferenciação Celular.
I. Sakai, Vivien Thiemy. II. Título.

CDD: 617.6342



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG
 Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas/MG . CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1392 . Fax: (35) 3299-1067



LEANDRO BORGES DE ARAÚJO

“AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE
 CÉLULAS-TRONCO PULPARES APÓS TRATAMENTO COM MTA, HIDRÓXIDO
 DE CÁLCIO OU BIODENTINE”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
 Dissertação apresentada como parte dos
 requisitos para a obtenção do título de Mestre em
 Ciências Odontológicas pela Universidade
 Federal de Alfenas. Área de concentração:
 Odontologia.

Aprovado em: 25/02/2014

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
 Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
 – UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra Maria Cristina Borsatto
 Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru –
 Universidade de São Paulo – FOB-USP

Assinatura:

Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
 Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
 – UNIFAL-MG

Assinatura:

MEU RECONHECIMENTO E GRATIDÃO

À Prof^a. Dr^a. Vivien Thiemy Sakai, orientadora deste trabalho. Pelo seus ensinamentos, apoio e dedicação. Pela força e entusiasmo transmitidos. Exemplo não só de profissional, mas também de ser humano. Muito Obrigado.

À Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz da Silveira Moretti, companheira e alegre. Obrigado por tornar a rotina acadêmica mais extrovertida.

Ao Prof. Tomaz Henrique Araújo, profissional a ser admirado e respeitado. Por me receber de portas abertas dentro do seu laboratório, serei sempre grato.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre iluminando meu caminho. Só tenho a agradecer.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas. Aos professores do PPGCO, Prof. Rafael Tobias Moretti Neto, Prof^a. Ana Beatriz da Silveira Moretti, Prof. Alessandro Aparecido Pereira, Prof. Carlos Roberto Colombo Robazza, Prof^a. Daniela Coelho de Lima, Prof. João Adolfo Costa Hanemann, Prof^a. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, Prof^a. Vivien Thiemy Sakai e Prof^a. Patrícia de Siqueira Ramos, pelos ensinamentos transmitidos.

À colega e amiga Lidiane, que compartilhou este caminho comigo.

À colega da pós-graduação, Paola, pela ajuda no Laboratório de Imunologia e pela gentileza com que sempre se dispôs a me ajudar.

Aos colegas, Marina, Elisa, Andressa, Fernanda, Eduardo, Simone, Josi e Júlio, pelos bons momentos e conhecimentos compartilhados durante o curso.

À Aninha, companheira de laboratório, pelo convívio sadio e toda ajuda para realização das técnicas laboratoriais.

Ao Gabriel, funcionário do laboratório de Bioquímica, fundamental para o andamento desta pesquisa.

Aos funcionários da disciplina de Odontopediatria: Mônica, Sônia, Luzia e Dona Antônia, por toda ajuda durante o curso.

À Martha, funcionária da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UNIFAL, pelo auxílio administrativo dentro da Universidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de Bolsa de Estudos.

Ao Pós-Doutorando Fábio Antônio Colombo, pela grande ajuda nas realização das técnicas laboratoriais na Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, pela generosidade de nos disponibilizar o laboratório de Biologia Molecular.

Aos amigos, Natália Gabriele Hösch e Caio César Floriano pela força e apoio durante toda a trajetória.

Aos pacientes que muito contribuíram para o meu enriquecimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, meu muito obrigado – ainda que antecipadamente – por suas sugestões e críticas que só tenderão a acrescentar qualidade a este trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, brindara-me com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado.

Todos vocês são co-autores deste trabalho!!!

AGRADECIMENTOS ADMINISTRATIVOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, na pessoa do senhor diretor, Prof. Mânio de Carvalho Tibúrcio, e do senhor Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação, Prof. Antônio Carlos Doriguetto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro concedido para a realização da pesquisa.

À Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, pelo fornecimento de MTA para a realização da pesquisa.

À Septodont S/A-France, pelo fornecimento de Biodentine para a realização da pesquisa.

RESUMO

Tratamentos pulpares conservadores, como as pulpotomias de dentes decíduos, requerem a utilização de materiais capeadores que respeitem as propriedades biológicas da polpa dentária remanescente, preservando sua vitalidade, estimulando sua capacidade de defesa e favorecendo sua regeneração. Conhecer as respostas de células-tronco pulpares a esses materiais são de particular interesse. Acredita-se que um material capeador que estimule a regeneração pulpar permitirá a diferenciação de células-tronco pulpares em odontoblastos, induzindo a formação de nova dentina e selando biologicamente a câmara pulpar. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos biológicos do MTA, hidróxido de cálcio (HC) e Biodentine sobre células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED). Para isso, as SHED foram cultivadas em meio de cultura MEM α condicionado com um dos materiais capeadores (MTA, HC ou Biodentine) e submetidas a ensaios de proliferação, migração e diferenciação através da análise de expressão gênica para DMP-1. Os três materiais na concentração de 1 mg/mL induziram um aumento na taxa de proliferação celular, sendo que aos 7 dias foi observado maior número de células para o grupo do HC. Além disso, observou-se maior migração celular em direção ao meio condicionado por Biodentine, seguida pela migração ao MTA e ao HC. Quanto à diferenciação, os resultados sugerem que todos os materiais testados induzem a diferenciação de células-tronco em odontoblastos, sendo o MTA o material com maior potencial odontogênico, visto que a expressão de DMP-1 foi observada a partir do dia 7 e foi mais intensa quando comparado aos demais grupos ao longo do tempo. Portanto, os três materiais permitem proliferação, e induzem migração e diferenciação, características desejáveis para materiais de capeamento pulpar em pulpotomias de dentes decíduos. A possibilidade de induzir células-tronco a se diferenciar em um tipo celular através de uma indução guiada é muito importante, pois possibilita a sua utilização em várias terapias de regeneração e engenharia tecidual.

Palavras-chave: Pulpotomia. Células-Tronco. Diferenciação Celular.

ABSTRACT

Conservative pulp treatments, such as the pulpotomies of primary teeth, require the use of capping materials that respect the biological properties of the remaining dental pulp, thus preserving its vitality, stimulating its defensive ability and enhancing its regeneration. Knowing the responses of dental pulp stem cells to these materials is of particular interest. It is believed that a capping material that stimulates pulp regeneration will allow differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts, inducing the formation of new dentin and sealing the pulp chamber biologically. Therefore, the aim of this study is to evaluate the biological effects of MTA, calcium hydroxide (CH) and Biodentine on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Thus, SHED were cultured in MEM α culture medium conditioned with one of the capping materials (MTA, Biodentine or CH) and tested for proliferation, migration and differentiation through the analysis of DMP-1 gene expression. The three materials at a concentration of 1 mg/mL induced an increase in the rate of cell proliferation, with a greater number of cell observed for CH group at the 7th day. Besides, greater cell migration toward Biodentine conditioned medium was observed, followed by the migration toward MTA and CH. Regarding differentiation, the results suggest that all the tested materials induce stem cell differentiation into odontoblasts, with MTA presenting the greatest odontogenic potential, since DMP-1 expression was observed from day 7 and was more intense when compared to the other groups over time. Therefore, the three materials induce proliferation, migration and differentiation, which are desirable features for pulp capping materials in pulpotomy of primary teeth. The possibility of inducing stem cells to differentiate into a cell type through a guided induction is very important because it enables their use in various regenerative therapies and tissue engineering.

Keywords: Pulpotomy. Stem Cells. Cell Differentiation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 25 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias. 31
- Figura 2 - Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 12,5 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias. 32
- Figura 3 - Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 1 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias. 33
- Figura 4 - Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 1 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias. 34
- Figura 5 - Esquema representativo do ensaio de migração celular utilizando insertos individuais com cultura de células. SHED foram adicionadas no compartimento acima do filtro membranosos, enquanto que os meios condicionados foram colocados dentro dos poços de placas de 24 poços. As placas foram incubadas overnight para permitir a migração celular. 35
- Figura 6 - Meio de cultura MEM α suplementado com 10% FBS, MEM α condicionado por Biodentine, MTA ou HC na concentração de 1 mg/mL e MEM α suplementado com FBS 20% foram colocados em placas de 24 poços e utilizados como estímulo à migração das SHED, semeadas em insertos individuais, através de uma membrana com poros de 8 μ m. Os resultados foram obtidos de três poços por condição e são 35

referentes aos valores de absorvância após a leitura da fluorescência emitida pelo reagente Cell tracker Green. A absorvância correlacionou com o número de células vivas.

Figura 7 - SHED foram cultivadas e estimuladas com meios condicionados por Biodentine, MTA ou Hidróxido de Cálcio (1 mg/mL) ou mantidas sem tratamento (Controle negativo) e coletadas após 1, 7, 14 e 21 dias para avaliação de um marcador de células odontoblásticas (DMP-1: 213 pb) e do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH: 683 pb) por meio de RT-PCR. Células odontoblásticas obtidas de terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizadas como controle positivo. 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma

µL – microlitro

Ca₃SiO₅ - Silicato tricálcico

Ca(OH)₂ – Hidróxido de Cálcio

DDP - Fosfoproteína dentinária

DMP-1 - Proteínas da matriz dentinária 1

DNA – ácido desoxirribonucléico

DPCs – Células pulpares de ratos

DPSC - Células-tronco de polpa dentária de dentes permanentes humanos

DSP - Sialoproteína dentinária

DSPP - Sialofosfoproteína da dentina

HC – Hidróxido de Cálcio

L929 – Células de linhagem fibroblásticas de camundongos

MDPC-23 – Células odontoblásticas de camundongos

mL – mililitro

MTA – Agregado de Trióxido Mineral

MTT – Teste Colorimétrico de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ng – nanograma

OD-21 – Células pulpares indiferenciadas

SHED - Células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos

SRB – Sulforrodamina B

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS.....	16
2.2	MATERIAIS CAPEADORES.....	17
2.3	CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS EXFOLIADOS HUMANOS (SHED)	20
2.4	PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	22
3	PROPOSIÇÃO	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	26
4.2	PREPARO DOS MEIOS CONDICIONADOS.....	26
4.3	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT.....	27
4.4	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – SRB.....	28
4.5	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	28
4.6	AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR RT-PCR.....	29
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5	RESULTADOS	31
5.1	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT.....	31
5.2	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – SRB.....	33
5.3	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	34
5.4	DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR RT-PCR.....	36
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO (s)	54

1 INTRODUÇÃO

Há décadas, dentistas vêm utilizando uma ampla variedade de procedimentos terapêuticos na tentativa de manter a vitalidade da polpa após exposição pulpar por cárie ou traumatismo. Entretanto, resultados clínicos imprevisíveis têm levado os pesquisadores e clínicos a testar diferentes métodos e materiais a fim de alcançar resultados melhores e mais previsíveis (TJÄDERHANE, 2002).

Habitualmente, em Odontopediatria, é realizada a pulpotomia de dentes decíduos quando a remoção da cárie dentária resulta em exposição pulpar, em dentes com polpa normal ou pulpíte reversível, ou em dentes que tiveram exposição pulpar após traumatismo (AAPD 2008-2009). Contudo, a determinação do sucesso ou falha do tratamento é subjetiva, e não existe consenso em relação a quais são os sinais de uma cicatrização pulpar verdadeira. Além disso, os parâmetros que indicam sucesso ou falha variam entre os diversos estudos, dependendo do material, protocolo de estudo, tempo de acompanhamento e métodos de análises (TJÄDERHANE, 2002). Em estudos sobre pulpotomia de dentes decíduos, a ausência de sintomas e de evidências radiográficas de lesões periapicais ou interradiculares, juntamente com a preservação da vitalidade da polpa, são parâmetros clínicos e radiográficos razoáveis, mas apenas a avaliação histológica permite de fato avaliar a organização celular e a estrutura do tecido mineralizado formado em resposta aos materiais capeadores.

Na regeneração de um tecido danificado, é necessário que o local da injúria forneça suporte à migração, proliferação e diferenciação de células indiferenciadas (NAKASHIMA; AKAMINE, 2005, ZHANG et al., 2006, ZHANG et al., 2007). A exposição do tecido pulpar devido a um estímulo físico e/ou patológico pode causar comprometimento da vitalidade dos odontoblastos primários (TZIAFAS et al., 1995; SLOAN; SMITH, 2007). Nesta condição, células-tronco pulpares são recrutadas para o local da injúria, as quais podem se proliferar e diferenciar em células odontoblásticas e secretar matriz de dentina reparativa (MATHIEU et al., 2005). Para a formação de barreira dentinária nos procedimentos de pulpotomia, é fundamental que essas células tenham capacidade de diferenciação em odontoblastos (BJØRNDAL; MJÖR, 2001).

Técnicas regeneradoras via terapia com células-tronco são consideradas promissoras para pesquisa e aplicações terapêuticas em Odontologia. Dentes decíduos contêm uma população de células-tronco pós-natais denominadas de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED), as quais são capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial (MIURA et al., 2003). SHED são conhecidas por responder a uma lesão dentária através da migração, proliferação e diferenciação para substituir odontoblastos perdidos, levando à síntese e secreção de dentina terciária (TAKEDA et al., 2008). O mecanismo específico da resposta dessas células-tronco frente a uma injúria dentária e aos materiais capeadores ainda não foi identificado.

Durante o tratamento pulpar, interações entre as células pulpares dentárias e o agente capeador frequentemente interferem na proliferação e diferenciação das células-tronco. Espera-se que um agente capeador ideal apresente uma alta biocompatibilidade (MINAMIKAWA et al., 2011). Atualmente, existem inúmeros agentes capeadores usados para pulpotomia. O Hidróxido de Cálcio (HC) é o padrão ouro em vários estudos sobre biocompatibilidade como agente de capeamento pulpar (PARANJPE; ZHANG; JOHNSON, 2010). Entretanto, cada vez mais evidências têm sugerido que a microinfiltração e porosidade encontradas nos dentes tratados com HC ocorre devido a propriedades físicas deficientes, como alta solubilidade em água, levando ao insucesso da pulpotomia (STANLEY; PAMEIJER, 1997; SCHUURS; GRUYTHUYSEN; WESSELINK, 2000; AL-HEZAIMI et al., 2011).

Assim, muitos pesquisadores têm direcionado os estudos para o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), o qual inicialmente, na década de 90, foi indicado como um material para retro-obturações e para vedamento de perfurações acidentais (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993). Mais tarde, o MTA mostrou potencial para ser usado como agente capeador em pulpotomias (PARANJPE; ZHANG; JOHNSON, 2010). Devido a sua excelente biocompatibilidade, o MTA promove proliferação de células odontoblásticas de camundongos (MDPC-23), células pulpares indiferenciadas (OD-21) e células pulpares de ratos (DPCs) (MOGHADDAME-JAFARI et al, 2005; MASUDA-MURAKAMI et al., 2010). O silicato tricálcico (Ca_3SiO_5) é o principal componente encontrado no MTA. Ele pode induzir a formação de hidroxiapatita e se dissolve lentamente em fluido corporal simulado. Além disso, é relatado que o silicato tricálcico tem um efeito estimulante na proliferação de células L929 (células de linhagem fibroblástica de camundongos) (ZHAO, 2005). Porém, o

MTA apresenta algumas desvantagens como o longo tempo de presa, falhas de manipulação, alteração de cor do elemento dentário e alto custo do material (BER; HATTON; STEWART, 2007; ZARRABI et al., 2010). Devido a estas questões, torna-se necessário o desenvolvimento de um novo material de capeamento pulpar que não apresente as desvantagens do MTA.

Recentemente, um novo cimento à base de silicato tricálcico foi introduzido no mercado (Biodentine). Este novo material tem mostrado melhora no tempo de presa, na manipulação e nas propriedades físicas quando comparado ao MTA (PRADELLE-PLASSE et al., 2009). Apesar do fato deste novo cimento já estar sendo utilizado em clínicas odontológicas como material restaurador (KOUBI et al., 2012) e também como um agente de capeamento em pulpotomias, seu efeito sobre células pulpares ainda não foi demonstrado. Dessa forma, é preciso avaliar a resposta das células-tronco pulpares frente a esse novo material, comparando-o com Ca(OH)_2 e MTA.

Assim, fazem-se necessários mais estudos em busca de um material capeador que estimule a regeneração pulpar, evidenciada pela migração, proliferação e diferenciação de células-tronco pulpares em odontoblastos, induzindo a formação de nova dentina e selando biologicamente a câmara pulpar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS

Durante muitos anos, a fisiopatologia do complexo dentino-pulpar foi muito investigada. Três tipos de dentinogênese são comumente descritas na literatura, primária, secundária e terciária (BAUME, 1980), sendo que a dentina terciária ocorre durante condições patológicas (SMITH et al., 1995). Na exposição pulpar, ocorre a destruição da camada odondoblástica, e o complexo dentino-pulpar regenera-se através do recrutamento e diferenciação de células secretoras e pela estimulação do reparo pela dentinogênese. O objetivo desse processo é formar uma barreira de tecido mineralizado para proteger a polpa de bactérias e de suas toxinas. A finalidade dos tratamentos como o capeamento pulpar e pulpotomia é fazer o selamento da polpa, induzir diferenciação de odontoblastos e estimular a secreção e mineralização de dentina para formação de barreira dentinária (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010).

No desenvolvimento dental ocorrem alterações moleculares e celulares, e o avanço na compreensão dessas alterações durante o reparo tecidual oferece a oportunidade de avaliar a eficácia biológica de diferentes estratégias na terapia pulpar conservadora. O tratamento endodôntico convencional em um dente decíduo pode estimular alterações clínicas acelerando o processo de rizólise. Sendo assim, é de grande importância a realização de um tratamento mais conservador, a fim de manter a integridade do órgão pulpar (ESTRELA et al., 2000; HUNTER, 2003). Deste modo, a técnica de pulpotomia, que consiste na amputação da porção coronária preservando a vitalidade da polpa radicular saudável, pode ser indicada. A câmara pulpar coronária é preenchida com uma base capeadora, e o dente restaurado com um material que impeça a microinfiltração.

Habitualmente, em Odontopediatria, é realizada a pulpotomia em dentes decíduos, sendo de fundamental importância para evitar a perda prematura desses

dentes, quer seja por alterações provocadas por cárie ou por traumatismo, evitando uma série de inconvenientes como a perda de espaço, colapso da oclusão, falta de guia de erupção para os dentes permanentes, além de comprometimento funcional e estético. Quando corretamente indicada, mantém o dente até sua época natural de esfoliação, contribuindo assim para a preservação de suas funções.

Clinicamente, o objetivo dos tratamentos como capeamento pulpar direto e pulpotomia é induzir a diferenciação de células indiferenciadas em células odontoblásticas e estimular secreção dentinária e mineralização a fim de construir uma ponte de dentina (SCHRODER, 1985). A pulpotomia de dentes decíduos é uma técnica estudada há muitos anos, contudo continua causando muitas controvérsias e discussões, visto que muitos dos agentes capeadores pulpares não preenchem todos os requisitos de um material ideal para procedimentos conservadores da vitalidade pulpar (FUKS, 2008; AAPD, 2008-2009; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009).

Para a melhora dos resultados clínicos, o conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos na regeneração pulpar devem ser melhor compreendidos, e novos biomateriais devem ser desenvolvidos baseados nestes resultados. Vários aspectos dos mecanismos moleculares, incluindo as células progenitoras e as vias de diferenciação de odontoblastos, ainda não estão esclarecidos (SMITH; LESOT, 2001).

2.2 MATERIAIS CAPEADORES

Nos últimos 60 anos, o formocresol em sua fórmula diluída a 1/5 foi considerado o medicamento de escolha para a realização de pulpotomias de dentes decíduos (AGAMY et al., 2004; HUTH et al., 2005; FUKS, 2008). Embora muitos estudos demonstrem o alto índice de sucesso clínico e radiográfico das pulpotomias com formocresol em dentes decíduos (WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000; STRANGE et al., 2001; DEAN et al., 2002; MORETTI et al., 2008), este medicamento provoca alterações pulpares destrutivas e irreversíveis, bem como alterações inflamatórias nos tecidos periapicais, incluindo folículos dentários (FUKS et al., 1997; WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000; ZARZAR et al., 2003). Foi comprovado seu potencial mutagênico e carcinogênico (ZARZAR et al., 2003; IARC, 2004; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006; FUKS, 2008), tornando

imprescindível a busca por novos materiais mais compatíveis com a saúde do indivíduo.

Atualmente, outros agentes como o hidróxido de cálcio (WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000; MORETTI et al., 2008), o sulfato férrico (FUKS et al., 1997; IBRICEVIC; AL- JAME, 2003; PAPAGIANNOULIS, 2002; DEERY, 2005; MARKOVIC; ZIVOJINOVIC; VUCETIC, 2005), o agregado de trióxido mineral (MTA) (MORETTI et al. 2008; SAKAI et al., 2009; AGAMY et al., 2004; AEINEHCHI et al., 2007) e o cimento Portland (CONTI et al., 2009; SAKAI et al., 2009) têm sido bastante investigados com o intuito de se encontrar um material que apresente, além de um sucesso clínico e radiográfico idêntico ou superior ao do formocresol, um potencial biológico que favoreça o restabelecimento da saúde pulpar.

A biocompatibilidade do hidróxido de cálcio já está bem demonstrada. Existe indução de necrose superficial do tecido pulpar e formação de tecido mineralizado sem ser altamente citotóxico. Os íons cálcio do hidróxido de cálcio reagem com o dióxido de carbono presente nos tecidos, fazendo com que ocorram granulações de calcita. Tal processo conduz a um acúmulo de fibronectina que possibilita a adesão e diferenciação celular, resultando na formação de tecido mineralizado (DEMARCO et al., 2001; CASAGRANDE; RODE; MARQUES, 2005). O hidróxido de cálcio tem propriedades desinfetante, bactericida e bacteriostática, pois altera o metabolismo enzimático das bactérias devido à liberação de íons hidroxila que tornam o meio alcalino. Estas propriedades são muito importantes, pois a reparação tecidual e a deposição do tecido mineralizado somente ocorrem na ausência de processo infeccioso (WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000).

Histologicamente, a dentina recém-secretada é geralmente porosa (HORSTED; EL ATTAR; LANGELAND, 1981), e a diferença entre esta barreira e a parede dentinária é considerada responsável pela infiltração bacteriana, levando à inflamação da polpa e/ou necrose. Por estas razões, entre outras, os resultados clínicos utilizando hidróxido de cálcio permanecem inconsistentes.

O MTA foi introduzido pela primeira vez por Torabinejad em 1993 como material para cirurgia endodôntica e atualmente é indicado para diversas situações clínicas (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999). Os benefícios do MTA como material de capeamento pulpar têm sido demonstrados em diversos modelos animais como macacos rhesus (FORD et al., 1996), cachorros (TZIAFAS et al., 2002), camundongos (SIMON et al., 2008) e ratos (DAMMASCHKE et al., 2010). Posteriormente, Nair et al.

(2008) confirmaram estes resultados preliminares em seres humanos e ressaltaram, com base em seu estudo clínico randomizado, que o MTA pode ser considerado como novo padrão ouro para capeamento pulpar (PARANJPE; ZHANG; JOHNSON, 2010; PARANJPE et al., 2011).

O MTA apresenta propriedades biológicas semelhantes ao hidróxido de cálcio, induzindo ainda menor grau de inflamação e melhor reparo (ZARRABI et al., 2010). Possui a capacidade de manter a vitalidade pulpar e promover o reparo quando colocado em contato com a polpa dental ou com os tecidos perirradiculares (FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN, 2003). A habilidade do MTA em induzir a formação de barreira de tecido mineralizado ocorre devido a sua biocompatibilidade e excelente capacidade de selamento (TORABINEJAD e CHIVIAN, 1999; CHIBINSKI e CZLUSNIAK, 2003; DOMINGUEZ et al., 2003; KARABUCAK et al., 2005; CHACKO e KURIKOSE, 2006; CAICEDO et al., 2006; MORETTI et al., 2008). O efeito do MTA como agente capeador pode também ser visto nos canais radiculares, nos quais ocorre uma deposição ativa de tecido mineralizado, com estreitamento ou obliteração do canal radicular (estenose) (SALAKO et al., 2003; MENEZES et al., 2004; MAROTO et al., 2005; MORETTI et al., 2008). O MTA apresenta altas taxas de sucesso clínico e radiográfico, contudo seu custo elevado é um inconveniente notável, uma vez que a pulpotomia é considerada como uma técnica de baixo custo apesar de inquestionável valor social.

Foi lançado no mercado atual um novo cimento a base de silicato de cálcio chamado Biodentine, cujo pó é composto de silicato tricálcico, carbonato de cálcio e óxido de zircônia, e o líquido é composto por água, cloreto de cálcio (acelerador de presa) e policarboxilato modificado (agente superelástico) (LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012). Este material tem sido indicado pelo fabricante como um substituto dentinário em diversas situações clínicas, inclusive em pulpotomias. Laurent et al. (2008) demonstraram biocompatibilidade da interação da Biodentine com células pulpares e habilidade de induzir a diferenciação a odontoblastos e mineralização em cultura de células pulpares. Este novo material inicialmente foi desenvolvido como um material restaurador. Os principais benefícios do Biodentine sobre outros materiais são: o tempo de presa reduzido (poucos minutos comparado à horas para o MTA) e melhores propriedades mecânicas. Além disso, sua capacidade de vedação, quando em contato com a dentina, foi confirmada *in vitro* com baixa penetração de nitrato de prata. Por conter silicato tricálcico, o fabricante estabeleceu que o Biodentine é

bioativo, ou seja, o material apresenta a propriedade de formar tecidos normais na sua superfície através de uma série de reações bioquímicas e biofísicas que ocorrem na interface material-tecido. Entretanto, esta bioatividade ainda não foi claramente demonstrada.

As propriedades físicas e aplicações clínicas do Biodentine estão amplamente descritas na literatura, mas sua bioatividade e efeitos biológicos em células pulpares não estão bem esclarecidas. Zanini et al. (2012) estudaram os efeitos biológicos do Biodentine sobre células pulpares imortalizadas (OD-21) de camundongos. OD-21 foram cultivados com e sem Biodentine. A proliferação celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTS após 2, 3 e 5 dias de estímulo. A expressão de vários marcadores biomoleculares foi analisada por PCR em tempo real e confirmou a diferenciação de células OD-21 em odontoblastos durante o período da cultura de células. Os resultados demonstraram um aumento da proliferação celular e da biomineralização quando comparado ao grupo controle, sugerindo que este material pode ser considerado adequado para aplicações clínicas na regeneração do complexo dentino-pulpar.

2.3 CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS EXFOLIADOS HUMANOS (SHED)

Existe um grande interesse na identificação de populações de células-tronco capazes de regenerar estruturas dentárias organizadas, com a intenção de utilizar o potencial de terapias com células pós-natais para tratar os danos causados por trauma, câncer, cárie dentária e doença periodontal (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; SHI et al., 2005).

Polak e Bishop (2006) definiram células-tronco como células originadas de clones capazes de auto-renovação e de diferenciação em várias linhagens celulares. Células-tronco pós-natais apresentam características específicas: existem como células indiferenciadas e mantêm esse fenótipo em função do ambiente e/ou de populações celulares adjacentes até que sejam expostas e respondam a sinais apropriados, têm habilidade de auto-replicação por longo período de tempo e mantêm seu potencial de diferenciação múltipla por toda a vida do organismo (NAKASHIMA; AKAMINE, 2005). Estas células têm sido isoladas de vários tecidos, tais como a

medula óssea, tecido neural, pele, retina e epitélio dentário, entre outros (FUCHS; SEGRE, 2000; BIANCO et al., 2001; BLAU; BRAZELTON; WEIMANN, 2001).

Gronthos et al. (2002) identificaram populações de células-tronco pós-natais na polpa de dentes permanentes humanos (DPSC), dando início à utilização de um novo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração tecidual *in vivo*. Também foi observado que o remanescente pulpar derivado de dentes decíduos contém uma população de células-tronco pós-natais capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial, as quais foram denominadas de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED) (MIURA et al., 2003).

Foi demonstrado que DPSC e SHED têm a habilidade de gerar um complexo semelhante ao dentino-pulpar quando co-implantadas com partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcio no tecido subcutâneo de camundongos imunodeprimidos. Implantes de DPSC e SHED desenvolveram áreas de tecido pulpar vascularizado, circundado por uma camada bem definida de células semelhante a odontoblastos, alinhadas ao redor de dentina mineralizada, com seus processos estendendo-se dentro de estruturas tubulares. Além disso, as fibras colágenas orientavam-se perpendicularmente à camada de odontoblastos dentro da dentina, característica de dentina primária. O material semelhante à dentina formado nos implantes tinha um aspecto globular mineralizado, compatível com a estrutura de dentina em dentes humanos. Além disso, as células semelhantes aos odontoblastos e às demais células pulpares originaram-se dos tecidos do doador (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003). Sakai et al. (2010) confirmaram que SHED se diferenciaram em odontoblastos funcionais, capazes de produção de dentina tubular, quando implantadas em fatias de dentes no dorso de camundongos.

Assim os dentes decíduos, podem ser uma fonte viável de células-tronco para reparar estruturas dentárias danificadas, visto que as SHED podem ser congeladas e utilizadas posteriormente no indivíduo doador quando necessário (NOR, 2006).

2.4 PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Na regeneração de um tecido danificado é necessário que o local da injúria forneça suporte à migração, proliferação e diferenciação de células indiferenciadas (NAKASHIMA e AKAMINE, 2005; ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Para a formação de barreira dentinária nos procedimentos de pulpotomia, é fundamental que essas células tenham capacidade de diferenciação em odontoblastos. Para isto, a migração de células progenitoras ao sítio injuriado para diferenciação em uma nova geração de células semelhantes a odontoblastos é um importante evento de recrutamento celular durante a regeneração, quando a vitalidade dos odontoblastos primários está comprometida (SLOAN; SMITH, 2007).

A migração celular é necessária para a manutenção da homeostase dos tecidos e regeneração de órgãos e tecidos lesionados (GILBERT, 2003). As células devem migrar para locais onde são necessárias, caso contrário, o desenvolvimento e a regeneração seriam impossíveis (SINGER e CLARK, 1999). Por outro lado, a migração celular desregulada pode resultar no desenvolvimento de uma série de patologias, incluindo metástases tumorais e angiogênese, inflamação crônica, e várias disfunções da resposta imune (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005). DPSC e SHED são conhecidas por responder a uma lesão dentária através da migração, proliferação e diferenciação para substituir odontoblastos perdidos, levando à síntese e secreção de dentina terciária, frequentemente chamada de ponte de dentina (TAKEDA et al., 2008). O mecanismo específico da resposta dessas células-tronco frente a uma injúria dentária ainda não foi identificado.

As células são conhecidas por detectar e responder ao meio ambiente local através de mediadores, receptores e sinais bioquímicos (LARSEN et al., 2006). A diferenciação de células-tronco pode ser estimulada em um determinado fenótipo por meio da manipulação das condições da cultura nas quais são mantidas. Nesse sentido, é possível controlar ou restringir as vias de diferenciação disponíveis e gerar seletivamente culturas enriquecidas com um fenótipo particular. Essas manipulações incluem o estímulo de células com citocinas, fatores de crescimento, aminoácidos e íons ativos, bem como co-cultura com um tipo celular ou tecido específico (POLAK; BISHOP, 2006)

Um dos grandes desafios da odontologia regenerativa, é promover a diferenciação de células-tronco pulpares em odontoblastos. Odontoblastos são células pós-mitóticas, responsáveis pela secreção de dentina primária. Após a dentinogênese primária, os odontoblastos permanecem funcionais e secretam dentina secundária fisiológica em uma taxa contínua, porém reduzida. Essas células retêm a capacidade de responder a estímulos ambientais leves e localmente regulam sua atividade secretória durante a dentinogênese reacional, levando à regeneração de dentina. Estímulos mais intensos podem causar a morte da população de odontoblastos existentes e, então, a regeneração de dentina é mediada por células provenientes de uma população precursora de odontoblastos (células-tronco) durante o processo de dentinogênese reparadora (SLOAN; SMITH, 2007).

Em vários modelos experimentais, células-tronco de tecidos adultos de várias espécies foram isoladas e demonstraram sua alta taxa proliferativa e capacidade para se diferenciar em células formadoras de nódulos mineralizados *in vivo* (TSUKAMOTO et al., 1992; ABOUT et al., 2000). A especificidade dentinogênica de tais depósitos mineralizados não está clara. Quando DPSC foram semeadas em uma superfície de dentina e implantadas em camundongos imunodeprimidos, uma estrutura semelhante à dentina reparadora foi depositada de maneira desorganizada na superfície dentinária (BATOULI et al., 2003).

Trabalhos anteriores com a utilização de SHED sugerem que estas células podem ser diferenciadas em células semelhantes a odontoblastos *in vivo* (CORDEIRO et al., 2008), inclusive com a capacidade de secretar uma estrutura dentinária tubular organizada (SAKAI et al., 2010).

O fenótipo dos odontoblastos tem sido caracterizado principalmente por análises bioquímicas de proteínas da matriz dentinária que correspondem aos marcadores de diferenciação terminal. Odontoblastos secretam colágeno tipo I e outras proteínas não colágenas tais como a osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, osteocalcina, proteínas da matriz dentinária 1, 2 e 3 (DMP-1, DMP-2 e DMP-3, respectivamente) e sialofosfoproteína da dentina (DSPP), uma proteína que subsequentemente é clivada para originar dois produtos, a sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária (DPP) (HE et al., 2008). Embora também expresso em baixos níveis em tecidos ósseos, o gene DSPP é considerado o principal marcador de odontoblastos (GRONTHOS et al., 2000; SHI et al., 2005; MIURA et al., 2003; ALLIOT-LICHT et al., 2005), e DMP-1 tem se mostrado crucial na formação dos

dentos, sendo implicado na regulação da mineralização (HE et al., 2003; PRESCOTT et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2010).

A avaliação de uma ou duas características de uma célula não é suficiente para se determinar conclusivamente se a célula resultante é um odontoblasto verdadeiro (HARGREAVES et al., 2008). Até o presente momento, análises citológicas de polarização das células, seus processos e a matriz extracelular dentinária relacionada ainda são necessárias para assegurar a identidade dos odontoblastos, visto que todas estas proteínas também são secretadas em diferentes quantidades por osteoblastos (PRIAM et al., 2005). Além disso, marcadores seletivos dos estágios iniciais ou intermediário de diferenciação dos odontoblastos não foram bem elucidados (PRIAM et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho é avaliar, *in vitro*, os efeitos do MTA, HC e Biodentine em SHED, com relação à proliferação celular, migração e diferenciação em odontoblastos.

Os objetivos específicos são:

- a) Determinar as curvas de crescimento celular de SHED quando mantidas em meio condicionado por MTA, HC e Biodentine;
- b) Avaliar a capacidade de migração de SHED em direção ao meio condicionado por MTA, HC e Biodentine;
- c) Avaliar a expressão de um gene relacionados à mineralização e diferenciação odontoblástica (DMP-1) após tratamento com meios condicionados por MTA, HC e Biodentine.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Seguindo princípios éticos e jurídicos, utilizamos células de projeto analisado pelo Comitê de ética em pesquisa da Unifal-MG, recebendo o parecer APROVADO, com protocolo número 040/2011. Células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED), fornecidas pelo Prof. Bruno Cavalcanti (Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP) foram mantidas em meio de cultura MEM α (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro bovino fetal 10% (FBS, Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ e divididas numa proporção de 1:3 quando atingiam 80% de confluência. O meio foi trocado a cada dois dias. Para todos os experimentos, foram utilizadas SHED nas passagens de 4 a 8.

As culturas foram divididas em três grupos experimentais, conforme o tratamento a que foram submetidas: Biodentine (grupo 1), MTA (grupo 2) ou HC (grupo 3). Os materiais foram aplicados sobre as células na forma de meios condicionados, de modo a evitar o contato direto destes com as células.

4.2 PREPARO DOS MEIOS CONDICIONADOS

Inicialmente, todos os meios condicionados foram preparados na concentração de 50 mg/mL de acordo com a descrição abaixo.

No grupo 1, cada cápsula de Biodentine (Septodont, St-Maur-des-Fossés, Cedex, França) foi preparada conforme a instrução do fabricante. Uma dose do líquido foi dispensada dentro da cápsula descartável contendo 700 mg do pó e misturada em amalgamador durante 30 segundos. A mistura foi inserida em um tubo para centrífuga de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 14 mL de meio de cultura.

No grupo 2, cada frasco de MTA (MTA White, Angelus, Londrina, PR, Brasil) foi preparado numa placa de vidro estéril, dispensando-se 1 g do pó e 7 gotas de água destilada. A mistura foi espatulada durante 30 segundos e inserida em um tubo para centrífuga de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 20 mL de meio de cultura.

No grupo 3, a cada 1,5 g de Hidróxido de Cálcio (Biodinâmica, Iporã, PR, Brasil) dispensados diretamente em um tubo para centrífuga de 50 mL, foram adicionados 30 mL de meio de cultura.

Os meios foram mantidos em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora e, então, centrifugados a 400 rpm, 4°C por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado utilizando seringa com filtro Millex® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) (poro de 0,45 µm), separado em alíquotas em novos tubos para centrífuga de 15 mL e então congelados a -20°C. Quando necessários, os meios foram descongelados e diluídos em meio de cultura até se atingir as concentrações necessárias para cada experimento.

4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT

A proliferação celular foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), em SHED semeadas em placas de 96 poços nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. Para cada grupo, 2,5 x 10³ células por poço foram semeadas em triplicata utilizando-se 200 µL de meio condicionado nas concentrações de 25 mg/mL, 12,5 mg/mL e 1 mg/mL e mantidas na incubadora durante 8 horas. Como controles negativo e positivo, as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% ou 20% de FBS, respectivamente. Todos os meios foram trocados a cada dois dias.

Após cada período experimental, os meios foram removidos e 200 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL de MEM α suplementado com 1% de FBS foram adicionados em cada poço. As placas foram envoltas por papel alumínio e incubadas a 37°C por 4 horas.

Em seguida, as placas foram centrifugadas a 200 x g, 18°C por 7 minutos, o meio contendo MTT foi aspirado, e então 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA) foram adicionados em cada poço. A absorbância foi

determinada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 560 nm.

4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – SULFORODAMINA B (SRB)

Células, na contagem de 1×10^4 , foram semeadas em cada poço de placas de 96 poços utilizando-se 200 μ L de meio de cultura suplementado com FBS a 10%. Após 8 horas, as células foram estimuladas com meio condicionado por Biodentine, MTA ou Hidróxido de Cálcio na concentração de 1 mg/mL. Como controle negativo, utilizou-se meio com FBS a 10%, e como controle positivo, meio suplementado com FBS a 20%. As células foram fixadas nos períodos de avaliação (1, 3, 5 e 7 dias) por meio da adição de ácido tricloroacético gelado (concentração final de 10%) e incubadas por 1 hora a 4°C. As placas foram lavadas em água corrente 5 vezes e mantida ao ar livre para secar. A proteína celular, então, foi corada por meio da adição de SRB 4% em ácido acético 1% e incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. O excesso de SRB foi removido pela lavagem dos poços com ácido acético 1%, e as placas foram deixadas para secar. SRB remanescente foi solubilizado em Tris-base 10 mM não tamponado, e a absorbância determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram obtidos a partir de 3 poços por condição.

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Um ensaio fluorescente *in vitro* para determinar o efeito de MTA, Hidróxido de Cálcio e Biodentine na migração de SHED através de uma membrana com poros de 8 μ m foi realizado. SHED, cultivadas por 24 horas em meio sem FBS, na contagem de 2×10^5 , foram semeadas em insertos individuais num volume de 200 μ L de meio de cultura. Os insertos foram mantidos em cada poço contendo 100 μ L de meio condicionado na concentração de 1 mg/mL, nos três diferentes grupos, durante a noite para permitir a migração das células. Em seguida, os insertos foram removidos, e as

células localizadas nos poços foram tripsinizadas, coletadas em tubo de microcentrífuga e centrifugadas a $3.835 \times g$, 4°C , por 10 minutos. Os pellets foram lavados com PBS e novamente centrifugados a $3.835 \times g$, 4°C , por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, os pellets foram transferidos para uma nova placa de 24 poços com $450 \mu\text{L}$ de PBS e $50 \mu\text{L}$ de Cell Tracker™ Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a $20 \mu\text{M}$ por poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos. A absorbância relacionada às células foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 485 nm .

4.6 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR RT-PCR

Os meios condicionados, na concentração de 1 mg/mL , foram utilizados para estimular a diferenciação de SHED. Para isto, as células foram mantidas nestes meios, os quais foram trocados a cada dois dias, e após 1, 7, 14 e 21 dias as células foram coletadas para análise da expressão de um marcador de diferenciação de odontoblastos (DMP-1) por RT-PCR.

As células foram coletadas em 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em tubos de microcentrífuga para extração do RNA. Odontoblastos removidos de terceiros molares humanos recém-extraídos também foram coletados em 1 mL de Trizol e usados como controle positivo.

Para a extração de RNA, $0,2 \text{ mL}$ de clorofórmio foi adicionado a cada tubo, o qual foi incubado em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a $13.226 \times g$ e 4°C durante 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado $0,5 \text{ mL}$ de isopropanol, e então o tubo foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, o tubo foi centrifugado a $13.226 \times g$ e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e o pellet lavado com 1 mL de álcool 75% e centrifugado a $9.469 \times g$ e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e, então, o pellet (RNA) foi dissolvido em $20 \mu\text{L}$ de água livre de DNase e RNase.

A concentração de RNA foi avaliada no equipamento Nanodrop 2000C (Wilmington, DE 19810, EUA). Para a RT-PCR foram utilizados $1 \mu\text{g}$ de RNA

(concentração de 0,04 µg/µL) , 12,5 µL de 2x Reaction Mix, 0,5 µL de SS III Taq Mix, 0,5 µL de cada primer (sense e anti-sense 10 mM) e água livre de DNase e RNase para completar um volume total de 25 µL. A diferenciação de SHED foi monitorada por meio da detecção de um marcador de odontoblastos: DMP-1 (primer sense 5'-CAGGAGCACAGGAAAAGGAG-3' e primer anti-sense 5'-CTGGTGGTATCTTGGGCACT-3', tamanho antecipado 213 pb). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como gene de referência constitutivo (primer sense 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' e primer anti-sense 5'-CACCCACCTTCTTGATGTCATC-3', tamanho antecipado 683 pb).

O processo de ciclagem térmica constituiu-se de transcrição reversa por 30 minutos a 55°C e 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação pela PCR. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C durante 1 minuto). As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo.

Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese horizontal, em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL), a 60 V durante 120 minutos. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador com intervalos de peso molecular igual a 100 pb. O cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

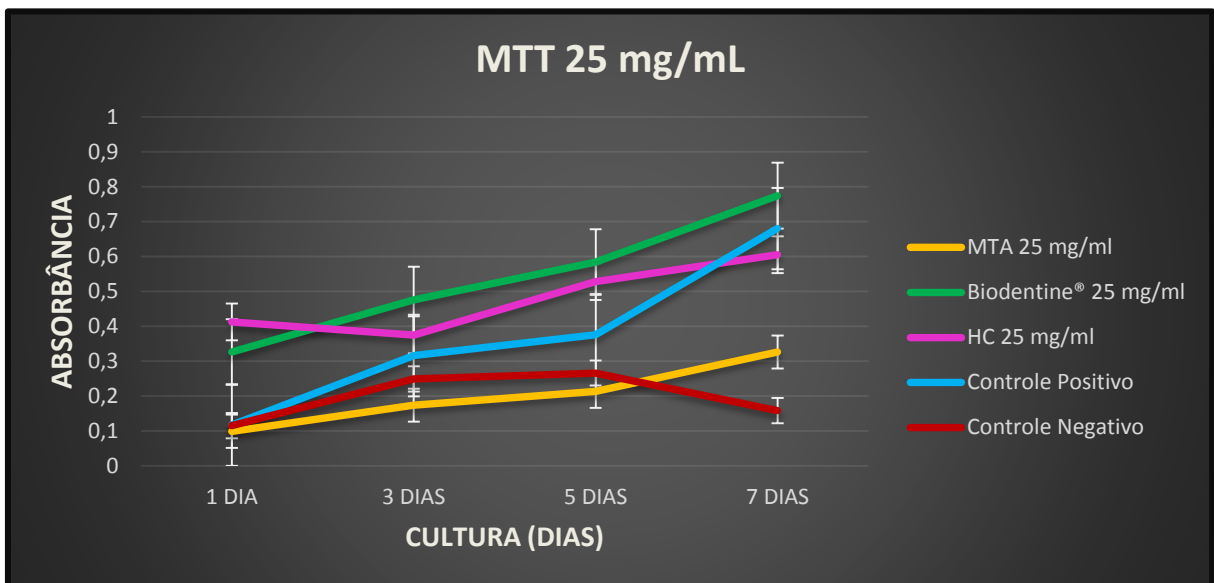
A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad, Reino Unido). Para proliferação celular (SRB e MTT), os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey. Os dados do ensaio de migração foram analisados pelo teste de análise de variância a um critério (ANOVA). Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Dados foram expressos como valor médio e desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MTT

Para avaliação da citotoxicidade, foram testadas inicialmente duas concentrações diferente (25 e 12,5 mg/mL). Os valores iniciais de absorbância (24 horas após o estímulo) nos grupos de células tratadas com meios condicionados por Biodentine e HC a 25 mg/mL foram muito elevados quando comparados aos demais grupos, sendo que esta discrepância permaneceu ao longo do tempo (Figura 1).

Figura 1. Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 25 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias.

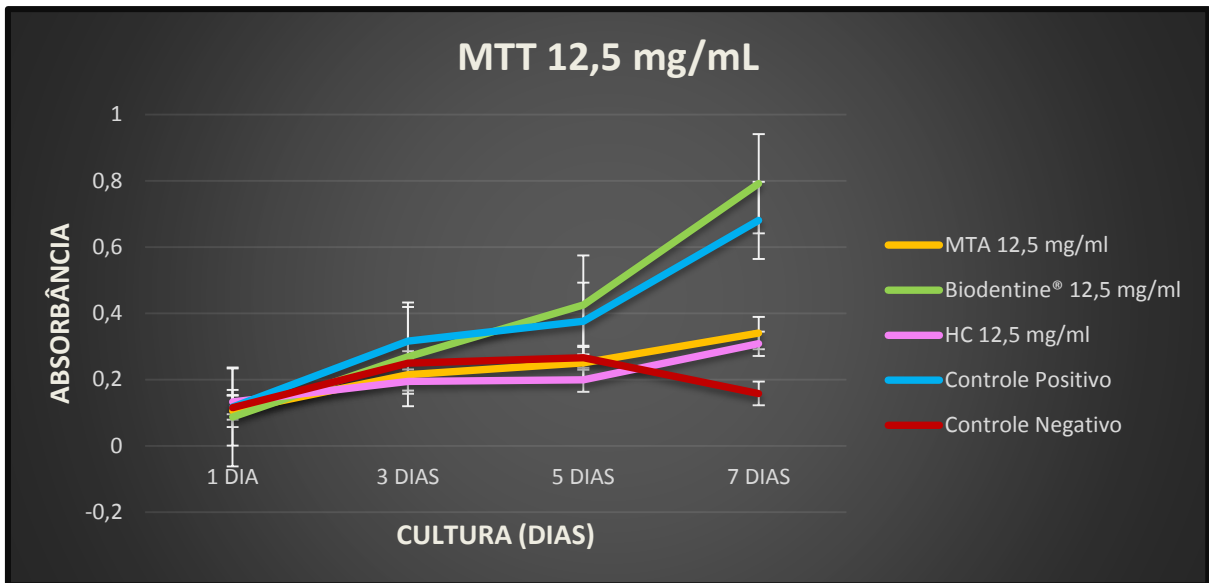


Fonte: Do autor.

Para a concentração de 12,5 mg/mL, o padrão de distribuição das curvas foi mais homogêneo, sendo que os valores iniciais de absorbância (24 horas após estímulo) dos três materiais e controles foram praticamente idênticos ($p > 0,05$). As taxas de proliferação ao final do experimento dos grupos de células tratadas com meios condicionados apresentaram valores de absorbância estatisticamente maiores quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística

entre as células cultivadas com meio condicionado por MTA e HC a 12,5 mg/mL, assim como não houve diferença entre as cultivadas com meio condicionado por Biodentine a 12,5 mg/mL e o controle positivo ($p > 0,05$) (Figura 2).

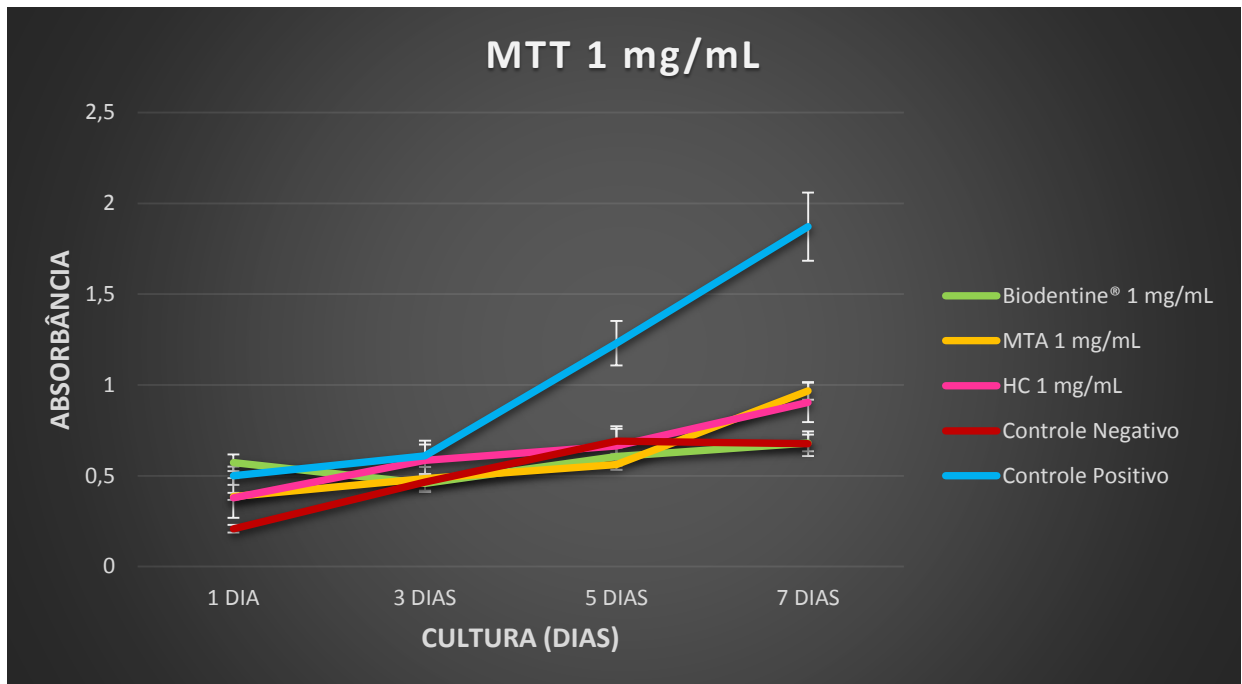
Figura 2. Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 12,5 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias.



Fonte: Do autor.

No ensaio de proliferação utilizando meios condicionados na concentração de 1 mg/mL, após 24 horas de estímulo, os grupos tratados com meios condicionados e o controle positivo não tiveram diferença estatística entre si ($p > 0,05$), e o controle negativo teve menor taxa de proliferação comparado ao grupo tratado com meio condicionado por Biodentine e o controle positivo ($p < 0,05$) (Figura 3). Na avaliação de 3 dias de experimento, todos os grupos apresentaram viabilidade celular semelhante ($p > 0,05$), e aos 5 dias de experimento o controle positivo teve grande aumento na taxa de proliferação ($p < 0,05$) e os demais grupos tiveram semelhança entre si ($p > 0,05$). Com 7 dias de estímulo, o controle positivo manteve-se com maior taxa de proliferação que os demais grupos ($p < 0,05$), o grupo tratado com meio condicionado por MTA e grupo tratado com meio condicionado por HC tiveram taxa de proliferação semelhante entre si ($p > 0,05$), mas com maior proliferação que o controle negativo e o grupo tratado com meio condicionado por Biodentine ($p < 0,05$).

Figura 3. Comparação das taxas de proliferação de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 1 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias.



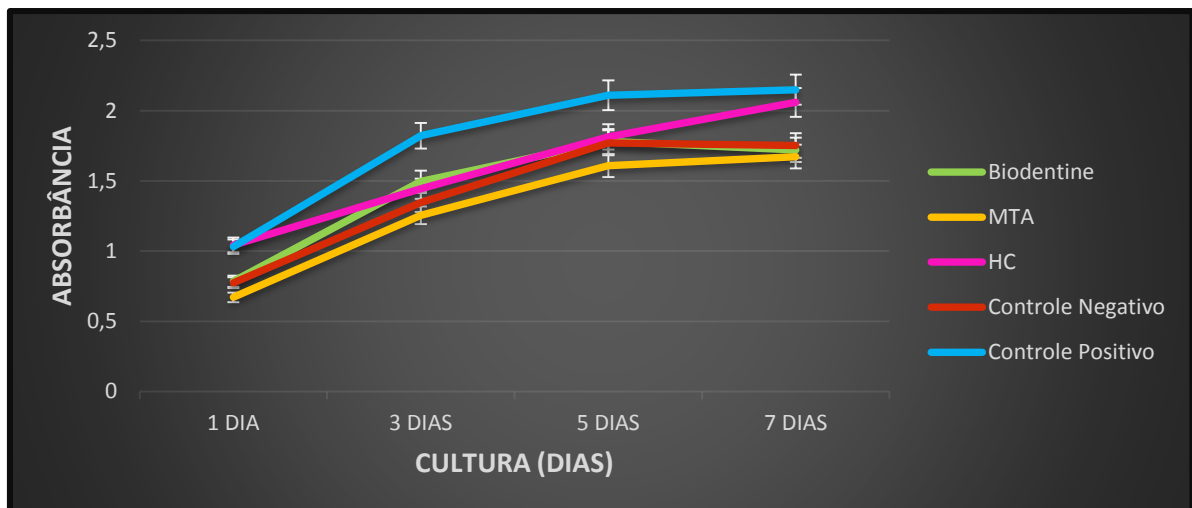
Fonte: Do autor.

5.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – SRB

Na figura 4, observam-se as taxas de proliferação de SHED cultivadas em meio condicionado por MTA, Biodentine ou HC nas concentração de 1 mg/mL e grupos controles, em todos os períodos temporais avaliados (1, 3, 5 e 7 dias). Na avaliação de 24 horas, o grupo tratado com meio condicionado por MTA apresentou uma inibição da proliferação comparado HC e controle positivo, enquanto o grupo tratado com meio condicionado por Biodentine e controle negativo apresentaram semelhança na taxa de proliferação. Com maior taxa de proliferação, o controle positivo e tratado com meio condicionado por HC apresentaram semelhança entre si e diferiram estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$). Na avaliação de 3 dias, todos os grupos tiveram aumento na taxa de proliferação, com o grupo do meio condicionado por Biodentine apresentando proliferação maior estatisticamente que o grupo do meio condicionado por MTA ($p < 0,05$) e controle negativo ($p < 0,05$). No período de 5 dias, a proliferação

das células tratadas com meio condicionado por MTA foi menor estatisticamente que os demais grupos, enquanto o controle positivo teve uma maior taxa de proliferação ($p < 0,05$). Os grupos controle negativo, tratado com meio condicionado por Biodentine e tratado com meio condicionado por HC apresentaram taxas de proliferação semelhantes entre si ($p > 0,05$). Ao final do experimento, o controle positivo e o grupo tratado com meio condicionado por HC apresentaram a maior taxa de proliferação ($p < 0,05$), e os grupos tratados com meio condicionado por Biodentine ou MTA e controle negativo mostraram não haver diferença entre si ($p > 0,05$).

Figura 4. Proliferação celular de SHED tratadas com meio de cultura condicionado por MTA, Biodentine ou HC na concentração de 1 mg/mL ou em meio de cultura suplementado com 10% de FBS (controle negativo) ou 20% de FBS (controle positivo) durante 7 dias.



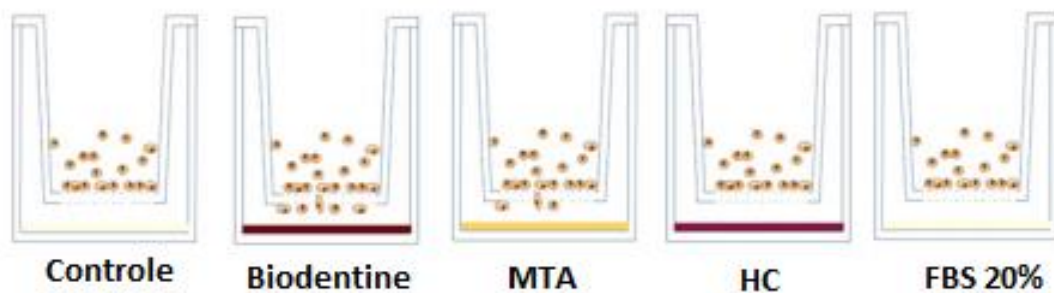
Fonte: Do autor.

5.3 MIGRAÇÃO CELULAR

A migração de SHED em direção ao estímulo foi avaliada por meio de um ensaio de migração celular utilizando o reagente Cell Tracker™ Green CMFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Meios condicionados por Biodentine, MTA e HC nas concentração de 1 mg/mL foram utilizados como possíveis estímulos à migração das células e comparados com MEM α suplementado com FBS 10% (controle negativo) ou suplementado com FBS 20% (controle positivo). Observou-se que o número de células que migraram através da membrana porosa em direção ao meio condicionado por Biodentine e MTA diferiram dos demais grupos, sendo maior estatisticamente que

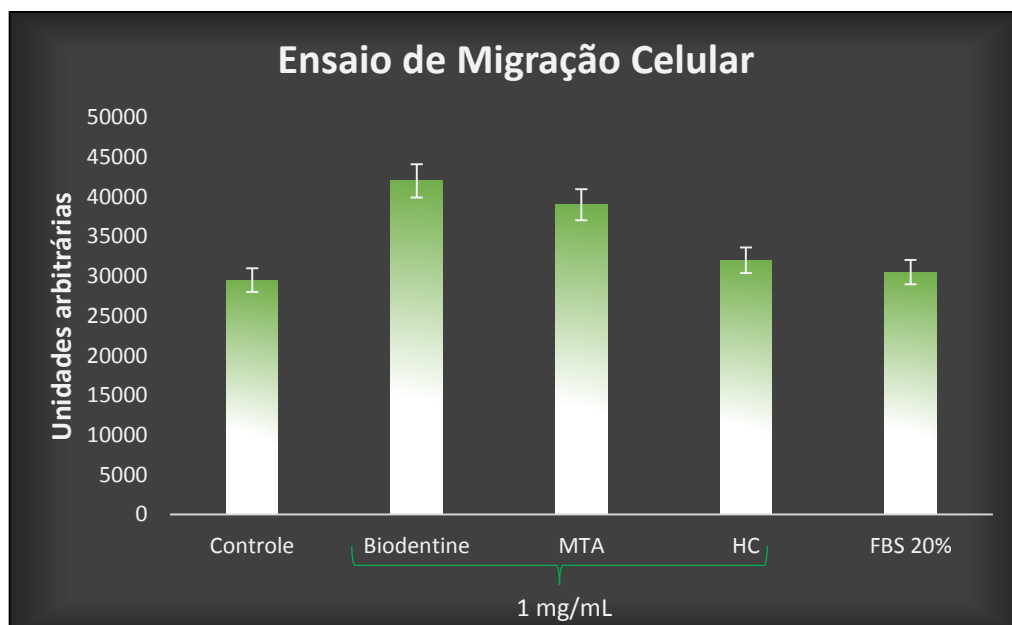
os grupos controles e meio condicionado por HC ($p < 0,05$). Além disso, as taxas de proliferação foram semelhantes entre o controle positivo e entre o grupo cultivadas com meio condicionado por HC ($p > 0,05$) (Figura 5 e 6).

Figura 5. Esquema representativo do ensaio de migração celular utilizando insertos individuais com cultura de células. SHED foram adicionadas no compartimento acima do filtro membranoso, enquanto que os meios condicionados foram colocados dentro dos poços de placas de 24 poços. As placas foram incubadas *overnight* para permitir a migração celular.



Fonte: Do autor.

Figura 6. Meio de cultura MEM α puro, MEM α condicionado por Biodentine, MTA ou HC em concentração de 1mg/mL e MEM α suplementado com FBS 20% foram colocados em placas de 24 poços e utilizados como estímulo à migração das SHED, semeadas em insertos individuais, através de uma membrana com poros de 8 μ m. Os resultados foram obtidos de três poços por condição, e são referentes aos valores de absorbância após a leitura da fluorescência emitida pelo reagente Cell tracker Green. A absorbância correlacionou com o número de células vivas.



Fonte: Do autor.

5.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR RT-PCR

Os níveis de expressão dos genes DMP-1 e GAPDH em SHED cultivadas em meios condicionados na concentração de 1 mg/mL ou meio FBS 10% (grupo controle) foram avaliados por 1, 7, 14 e 21 dias. Os níveis de mRNA expressos em células odontoblásticas obtidas de terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizados como controle positivo para DMP-1 e GAPDH.

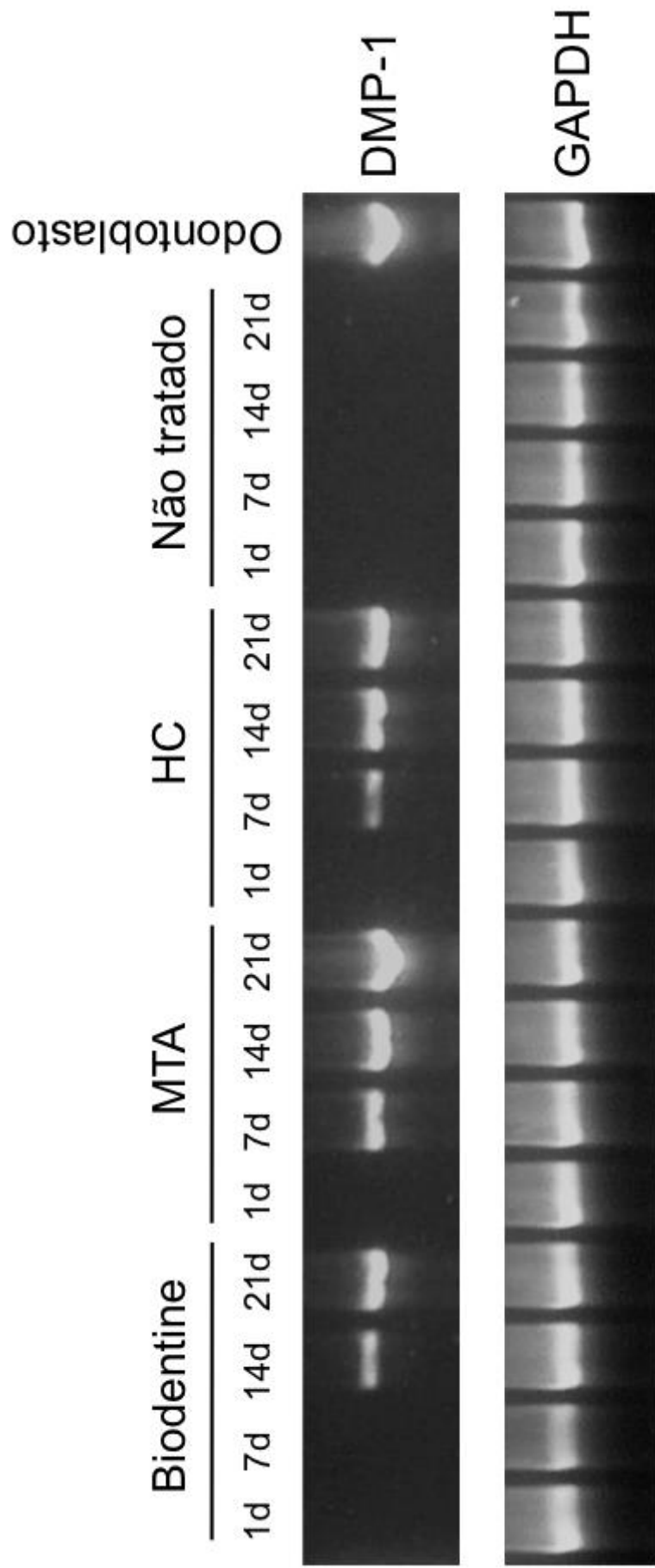
Como mostra a figura 7, todas as amostras expressaram o gene constitutivo GAPDH. No grupo de células que receberam o meio condicionado por Biodentine como tratamento, não houve expressão de DMP-1 nos primeiros 7 dias. Aos 14 dias, observou-se uma leve expressão comparada àquela ocorrida no dia 21, quando a expressão de DMP-1 foi bem evidente.

No grupo de células tratadas com meio condicionado por MTA, observou-se expressão de DMP-1 aos 7, 14 e 21 dias, aumentando a expressão progressivamente (Figura 7).

As células cultivadas em meio condicionado por HC também expressaram DMP-1 nos dias 7, 14 e 21, porém com menor intensidade que a observada no grupo anterior (Figura 7).

As células que receberam apenas meio suplementando com FBS a 10% (controle negativo), não tiveram expressão de DMP-1 em nenhum período avaliado. Já as células odontoblásticas utilizadas como controle positivo apresentaram marcação positiva do gene DMP-1 e foram utilizadas como padrão para verificar se houve expressão dos demais grupos (Figura 7).

Figura 7. SHED foram cultivadas com meios condicionados por Biodentine, MTA ou Hidróxido de Cálcio (1 mg/mL) ou mantidas sem tratamento (Controle negativo) e coletadas após 1, 7, 14 e 21 dias para avaliação de marcadores de células odontoblásticas (DMP-1: 213 pb) e do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH: 683 pb) por meio de RT-PCR. Células odontoblásticas obtidas de terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizadas como controle positivo os marcadores.



Fonte: Do Autor.

6 DISCUSSÃO

Os recentes avanços no campo da biologia celular e molecular, assim como nas pesquisas com células-tronco, têm levado ao desenvolvimento de estratégias que visam à regeneração de órgãos e tecidos doentes ou traumatizados (BIANCO; ROBEY; SIMONS, 2008; ESTRELA et al., 2011). Nos últimos anos, tanto a medicina quanto a odontologia vêm explorando o potencial de aplicação de células-tronco de diferentes origens e a engenharia de tecidos para o reparo de tecidos danificados por doenças como câncer, diabetes, problemas cardiovasculares, desordens neurológicas, doenças autoimunes, cárie dentária, doença periodontal, assim como para a criação de tecidos ausentes devido a problemas congênitos (LANGER; VACANTI, 1993; NAKASHIMA; AKAMINE, 2005; CASAGRANDE et al., 2011; LODI; LANNITI; PALMIERI, 2011).

No caso da endodontia regenerativa e dos tratamentos pulpares conservadores de dentes decíduos, as células-tronco pulpares assumem papel de importância, uma vez que são facilmente obtidas de terceiros molares e dentes decíduos exfoliados. Além da facilidade de obtenção, estas células possuem grande potencial de diferenciação em odontoblastos (MIURA et al., 2003), e suas principais funções são promover o desenvolvimento dos diferentes tecidos nos quais se encontram, assim como, no caso de injúrias, proporcionar a sua reparação (SUCHÁNEK et al., 2007).

A polpa dentária apresenta uma capacidade de defesa e regeneração tecidual bastante limitada. Quando a polpa sofre agressão e a camada de odontoblastos é afetada, células-tronco migram em direção à área lesada e proliferam sob a ação de fatores de crescimento que são liberados da dentina adjacente parcialmente dissolvida pelos ácidos bacterianos presentes no processo. Estas células, então, diferenciam-se em células odontoblastos e começam a secretar dentina (SMITH; LESOT, 2001; SMITH, 2003; ZHANG; YELICK, 2010). No entanto, em casos de agressões mais severas que resultam em inflamação da polpa coronária, o tecido pulpar no local perde sua capacidade de defesa e regeneração e, então, tratamentos pulpares conservadores, como a pulpotomia, podem ser indicados.

Desse modo, faz-se necessário o uso de materiais capeadores que respeitem as propriedades biológicas da polpa dentária remanescente, preservando sua

vitalidade e induzindo a formação de barreira dentinária. Biocompatibilidade e não-toxicidade são, portanto, duas propriedades requeridas para que um material considerado ideal possa ser utilizado em pulpotomia (MODENA, 2009), visto que este deve estar em íntimo contato com os tecidos. Desta forma, conhecer as respostas celulares a esses materiais são de particular interesse (ABBASIPOUR et al., 2012).

No presente trabalho, foram utilizadas células-troncos para avaliar os efeitos biológicos (proliferação, migração e diferenciação) de três materiais indicados para a pulpotomia de dentes decíduos. Os materiais foram testados em concentrações de acordo com protocolos de trabalhos que avaliaram a concentração máxima e a concentração ideal para uso diretamente em cultura de células (PENG et al., 2011; MING ONG, 2012; DU et al., 2013). Quando testados na forma de meios condicionados na concentração de 25 mg/mL, observamos uma discrepância na curva de crescimento celular resultante do ensaio colorimétrico MTT (Figura 1). Logo na análise de 24 horas, observaram-se altos valores de absorvância para Biodentine e HC, o que provavelmente ocorreu devido ao pó presente na composição de ambos materiais que decantou no fundo dos poços e interferiu na leitura pelo espectrofotômetro, e não devido à maior atividade metabólica das células desses grupos, com conseqüente alteração de cor. Isso pôde ser comprovado pois, a olho nu, não era detectada alteração de cor nos poços, o que não justifica os altos valores encontrados. Além disso, foi demonstrado que MTA e outros cimentos a base de silicato tricálcico na concentração de 25 mg/mL foram citotóxicos em SHED (MING ONG et al., 2012), e que concentrações acima de 20 mg/mL causam uma queda na viabilidade celular (HAKKI et al., 2009). Por esses motivos, neste estudo foi descartado o uso dos materiais capeadores na concentração de 25 mg/mL para os demais experimentos.

Com a utilização de meios condicionados na concentração 12,5 mg/mL, a distribuição das curvas de crescimento foram mais homogênea, com valores iniciais (24 horas) semelhantes, e com a proliferação observada para os grupos Biodentine e controle positivo superior àquela induzida pelos demais materiais ao final do experimento (Figura 2). O Biodentine estimulou uma maior proliferação quando comparado aos demais materiais. O MTA e HC tiveram valores semelhantes durante os períodos avaliados (1, 3, 5 e 7 dias), não apresentando diferença estatisticamente significativa entre ambos os materiais. Os três agentes capeadores testados induziram uma taxa de proliferação maior que o controle negativo, mostrando então serem

materiais biocompatíveis. Em estudo prévio, a proliferação de células pulpares dentárias humanas estimulada por hidróxido de cálcio ou por silicato tricálcico (principal componente do MTA e Biodentine) como meios condicionados em diferentes concentrações foi avaliada (PENG et al., 2011). Os resultados mostraram não haver diferença estatística entre os grupos nos períodos de 1, 3 e 5 dias na concentração de 10 mg/mL, mas com proliferação estatisticamente maior de ambos os grupos comparada a do controle negativo no dia 7 (PENG et al., 2011), o que sugere excelente biocompatibilidade desses materiais e que corrobora com os dados do presente trabalho. No entanto, quando as células foram estimuladas por 21 dias com meios condicionados a 12,5 mg/mL para análise da diferenciação celular, observamos uma queda acentuada da viabilidade celular a partir do 14º dia, provavelmente devido ao pó do material que, com o passar dos dias, foi se acumulando no fundo dos poços e/ou sobre as células, privando-as dos nutrientes básicos presentes no meio de cultura (dados não mostrados). Assim, não foi possível completar o experimento do ensaio de diferenciação, e por esse motivo também descartamos o uso de meios condicionados na concentração de 12,5 mg/mL.

No presente estudo, os materiais testados na concentração de 1 mg/mL apresentaram proliferação maior ou semelhante ao controle negativo, sugerindo ausência de citotoxicidade. No ensaio de proliferação MTT utilizando meios condicionados na concentração de 1 mg/mL, observamos que o MTA e o HC tiveram valores semelhantes e maiores estatisticamente que o Biodentine e controle negativo (Figura 3).

O ensaio de MTT utiliza um reagente que é metabolicamente reduzido pelas mitocôndrias nas células viáveis corando produtos de formazan, cuja intensidade pode ser medida espectrofotometricamente em um leitor de placas. Como o reagente baseia-se na atividade mitocondrial, pode essa função ser inibida por variações dos níveis celulares de NADH, glicose e de outros fatores, gerando resultados falso-negativos, como se as células não estivessem vivas ou não proliferando (HOUGHTON et al., 2007). Devido a estas limitações, a segunda principal técnica para análise de citotoxicidade é o ensaio de sulforrodamina B (SRB). Este baseia-se na absorção do corante rosa aminoxantina por aminoácidos nas células. Quanto maior o número de células, maior quantidade de corante é absorvido e, após a fixação, quando as células são lisadas, o corante libertado vai gerar uma cor mais intensa e com maior absorbância (SKEHAN, 1990).

O ensaio de SRB é sensível e mais rápido do que os ensaios baseados em formazan. Além disso ele fornece uma melhor linearidade, uma boa relação sinal-ruído e tem um ponto final estável, que não necessita de em mensuração imediata, tal como o ensaio de MTT (KEEPERS et al., 1991). Por esse motivo, além dos ensaios de proliferação de MTT, realizamos também os ensaio de SRB a fim de se alcançar um resultado de proliferação celular com maior fidelidade.

Analisando a proliferação através da técnica SRB, os resultados mostraram que as células que receberam tratamento com meios condicionados por Biodentine, MTA ou HC tiveram aumento do número de células ao longo do experimento, o que sugere uma boa biocompatibilidade desses materiais. Aos 3 dias de experimento, o Biodentine e HC tiveram valores maiores que o MTA, porém ao final do experimento, dentre os materiais, somente o HC teve um aumento significativo na taxa de proliferação em relação ao controle negativo, enquanto o Biodentine e MTA tiveram valores semelhantes entre si e comparados ao do controle negativo. Em trabalho anterior utilizando-se da técnica de histomorfometria, foi avaliada a proliferação celular de Biodentine, MTA e HC, sendo que os resultados encontrados mostraram taxas de proliferação celular induzida pelo MTA e Biodentine semelhantes, como encontrado em nosso trabalho pela técnica SRB (TRAN et al., 2012).

Porém, existem resultados contrários aos encontrados em nosso estudo, em que o MTA estimulou uma proliferação celular significativamente maior que o HC e o controle negativo (GUVEN et al., 2013). Além disso, as células tratadas com HC apresentaram acentuada queda na viabilidade celular, enquanto que aquelas tratadas com MTA mantiveram a taxa de proliferação, indicando ausência de citotoxicidade deste material (CAMARGO et al., 2009). Contradizendo os trabalhos anteriores e corroborando com o presente estudo, Cavalcanti, Rode e Marques (2005) relataram não haver uma diminuição do número de células pulpares quando tratadas com meio condicionado por cimento de hidróxido de cálcio. A discrepância entre os dados destes estudos pode ser explicada pelas diferenças entre as técnicas experimentais utilizadas, tanto em relação ao preparo dos meios condicionados, como aos métodos de extração e cultivo das células e de análise da proliferação.

A proliferação de células-tronco e a migração dessas células progenitoras para o local da lesão geralmente são necessárias para que ocorra a regeneração tecidual. Células indiferenciadas que têm a capacidade para sofrer mitose, um pré-requisito para a regeneração, residem no nicho de células-tronco e necessitam migrar para o

tecido danificado para realizar a regeneração tecidual (CHEN; JIN, 2010) e manter a homeostasia local (GILBERT, 2003). As células devem migrar para locais onde possibilitem sua ação, caso contrário a regeneração e desenvolvimento de órgãos e tecidos seria impossível (SINGER; CLARK, 1999). Por outro lado, a migração celular desregulada pode resultar em desenvolvimento de uma série de patologias, incluindo metástase e angiogênese, inflamação crônica, e várias disfunções da resposta imune (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005). Além disso, as células migram para onde há uma maior concentração de agentes quimioatrativos (WELF et al., 2012). Assim, meios condicionados por materiais que liberem mais atrativos para as células estimulariam uma maior migração celular.

A migração de SHED em direção ao estímulo foi avaliada por meio de um ensaio utilizando o reagente Cell Tracker™ Green. Os resultados mostraram que o número de células que migraram através da membrana porosa em direção ao meio condicionado por Biodentine e MTA diferiram dos demais grupos, sendo maior estatisticamente que os grupos controles e meio condicionado por HC ($p < 0,05$). No trabalho de D'Anto et al. (2010), o MTA apresentou migração celular significativamente maior que o controle negativo. A capacidade do MTA e do Biodentine em estimular a migração celular deve ser considerado uma questão importante na indução da regeneração tecidual. Curiosamente, o presente trabalho é o primeiro a fornecer uma evidencia do efeito de migração de Biodentine em células-tronco pulpares.

Além disso, a capacidade de migração das células cultivadas com meio condicionado por HC e controle positivo foram menores que MTA e Biodentine ($p > 0,05$), sugerindo haver fatores ainda não identificados que tornou os resultados da migração celular, inversamente proporcionais ao de proliferação pela técnica SRB.

Odontoblastos são células essenciais para a formação de dentina reparativa em um dente que sofreu agressão. Um material que estimule a diferenciação de células-tronco em células odontoblásticas e seja biocompatível pode ser considerado um bom material de capeamento pulpar. Neste estudo, DMP-1 foi selecionado como marcador específico de diferenciação para detectar potencial odontogênico de SHED tratadas com diferentes materiais. DMP-1 é um dos primeiros genes expressos na diferenciação precoce em odontoblasto e desempenha uma importante função regulatória da mineralização (NARAYANAN et al., 2006). Sabe-se, contudo, que a avaliação de apenas um marcador de diferenciação não é suficiente para se

determinar conclusivamente se as células resultantes são odontoblastos verdadeiros, sendo, portanto, uma limitação deste trabalho.

Em trabalho de Peng et al. (2011), o padrão de expressão de marcadores odontogênicos (DSPP, DMP-1, osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I) de células tratadas com extrato de silicato tricálcico (principal componente do MTA e Biodentine) e células tratadas com extrato de HC mostrou similaridade no padrão de expressão dos genes. Além disso, o silicato tricálcico exerceu maior potencial odontogênico quando comparado com HC (PENG et al., 2011). No presente estudo, as células tratadas com meios condicionados por MTA, Biodentine e HC apresentaram aumento progressivo da expressão do gene DMP-1, alcançando a maior intensidade no dia 21. Embora o número de células que se diferenciaram não tenha sido quantificado, através da intensidade das bandas, sugere-se que o MTA apresente maior potencial de indução de expressão de DMP-1 quando comparado aos demais materiais, visto que em todo o período experimental a intensidade das bandas foi superior. Este elevado potencial de indução de diferenciação do MTA foi seguido do HC, o qual também induziu a expressão de DMP-1 já aos 7 dias, embora de maneira menos intensa. Em relação ao Biodentine, sugere-se uma indução mais tardia de diferenciação das células, visto que a expressão de DMP-1 só foi detectada a partir de 14 dias de estímulo, embora aos 21 dias a intensidade da banda tenha sido semelhante àquela observada para o grupo HC.

Coletivamente, nossos dados sugerem que, na concentração de 1 mg/mL, os três materiais avaliados exercem efeitos biológicos sobre as SHED. O Biodentine estimulou maior migração e menor diferenciação do que os demais materiais, o MTA apresentou maior poder indutor de diferenciação e migração, enquanto que o HC estimulou maior proliferação e teve considerável efeito indutor de diferenciação. Há uma opinião sobre a relação inversa entre a proliferação e diferenciação, sendo que células em diferenciação tendem a diminuir a taxa de proliferação (YANG et al., 2007). Esta relação só pôde ser constatada em nosso estudo no grupo tratado com MTA, o qual apresentou maior diferenciação e menor proliferação celular. Peng et al. (2011) mostraram que o silicato tricálcico foi capaz de induzir a diferenciação de células pulpares indiferenciadas em células semelhantes a odontoblastos, enquanto também promoveu a proliferação de tais células (PENG et al., 2011), resultado este consistente com os nossos dados para HC.

A bioatividade da proliferação, diferenciação e migração de células-tronco pulpares é regulada por uma cadeia composta de várias moléculas sinalizadoras, como os fatores de crescimento, receptores e sistemas de controle transcricionais (HE et al., 2008). No presente trabalho, as diferenças de resposta celular encontradas nos diferentes experimentos frente ao tratamento com o diversos materiais capeadores provavelmente ocorreram devido a liberação de fatores de crescimento, ativação das vias de sinalização celular e regulação transcricional e pós-transcricional de maneiras diferenciadas (HE et al., 2008). No entanto, a avaliação desses fatores não está no escopo deste trabalho.

Presume-se, portanto, que os três materiais estejam bem indicados para pulpotomias, uma vez que todos eles são biocompatíveis e induzem diferenciação de células-tronco pulpares em odontoblastos. Além disso, a possibilidade de induzir células-tronco a diferenciar em um tipo celular através de uma indução guiada é muito importante, pois possibilita a sua utilização em várias terapias de regeneração e engenharia tecidual.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que tanto o Biodentine, o MTA e o HC apresentaram efeitos biológicos sobre as SHED, permitindo proliferação celular contínua até o final do estímulo por 7 dias. Além disso, os três materiais estimularam a migração celular e induziram a expressão do gene DMP-1, o qual é relacionado à mineralização e diferenciação odontoblástica, podendo ser considerados biocompatíveis, regeneradores e, portanto, adequados para utilização em pulpotomias de dentes decíduos.

REFERÊNCIAS

- ABOUT, I. et al. Human dentin production in vitro. **Exp Cell Res.**, v. 258, n. 1, p. 33-41, 2000.
- ABBASIPOUR, F. et al. Comparing the effects of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture on neuronal cells using an electrophysiological approach. **Iran Endod J.**, v. 7, n. 2, p. 79-97, 2012.
- AEINEHCHI, M. et al. Randomized controlled trial of mineral trioxide aggregate and formocresol for pulpotomy in primary molar teeth. **Int Endod J.**, v.40, n. 4, p. 261-7, 2007.
- AGAMY, H. A. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatr Dent.**, v. 26, n. 4, p. 302-9, 2004.
- ALLIOT-LICHT, B. et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. **Cell Tissue Res.**, v. 321, n. 3, p. 391-400, 2005.
- AI-HEZAIMI, K. et al. A hybrid approach to direct pulp capping by using emdogain with a capping material. **J Endod.**, v. 37, p. 667-72, 2011.
- AMERICAN ACADEMY ON PEDIATRIC DENTISTRY (AAPD) Clinical Affairs Committee-Pulp Therapy subcommittee; American Academy on Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. **Pediatr Dent.** 2008-2009.
- BAUME, L. J. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. **Monogr Oral Sci.**, v. 8, n. 1, p. 220, 1980.
- BATOULI, S. et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **J Dent Res.**, v. 82, n. 12, p. 976-81, 2003.
- BER, B. S.; HATTON, J. F.; STEWART, G. P. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. **J Endod.**, v.33, p. 1231-4, 2007.
- BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells.** v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell.**, v. 4, n. 2, p. 313-9, 2008.
- BJØRNDAL, L.; MJÖR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries—characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence Int.**, v. 32, n. 4, p. 717-36, 2001.
- BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829-41, 2001.

- CAICEDO, R. et al. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. **Aust Dent J.**, v. 51, n. 4, p. 297-305, 2006.
- CAMARGO, S. E. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. **Int Endod J.**, v. 42, p. 227-37, 2009.
- CASAGRANDE, B. N.; RODE, S. M.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. **Int Endod J.**, v. 38, p. 505-9, 2005.
- CASAGRANDE, L. et al. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. **J Dent Res.**, v. 89, p. 603-8, 2010.
- CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 1-7, jan. 2011.
- CAVALCANTI, B. N.; RODE, S. M.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. **Int Endod J.**, v. 38, p. 505-9, 2005.
- CHACKO, V.; KURIKOSE, S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. **J Clin Pediatr Dent.**, v. 30, n. 3, p. 203-9, 2006.
- CHEN, F. M.; JIN, Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 16, p. 219–55, 2010.
- CHIBINSKI, A. C.; CZLUSNIAK, G. D. The use of mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomies: a case report. **Publ UEPG Ci Biol Saúde**, v. 9, n. 3, p. 21-7, 2003.
- CONTI, T. R. et al. Pulpotomies with Portland cement in human primary molars. **J Appl Oral Sci.**, v. 17, n. 1, p. 66-9, 2009.
- CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod.**, v. 34, n. 8, p. 962-9, 2008.
- DAMMASCHKE, T. et al. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. **J Endod.**, v. 26, p. 814–9, 2010.
- D'ANTÒ, V. et al. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. **J Endod.**, v. 36, n. 11, p. 1839-43, 2010.
- DEAN, J. A. et al. Comparison of eletrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. **Int J Paed Dent.**, v. 12, n. 3, p. 177-82, 2002.
- DEMARCO, F. F. et al. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agentes. **Quintessence Int.**, v. 32, p. 211-20, 2001.
- DEERY, C. Formocresol and ferric sulfate have similar success rates in primary molar pulpotomy in carious primary molars does a pulpotomy performed with ferric sulphate, compared with formocresol, result in greater clinical/radiographic success? **Evid Based Dent.**, v. 6, n. 3, p.70, 2005.

- DOMINGUEZ, M. S. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp – therapy materials. **J Endod.**, v. 29, n. 5, p. 324-33, 2003.
- DU, R. et al. Role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in driving tricalcium silicate-induced proliferation and biomineralization of human dental pulp cells in vitro. **J Endod.**, v. 39, n. 8. p. 1023-9, 2013.
- ESTRELA, C. et al. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and dycal. **Braz Dent J.**, v. 11, n.1, p. 3-9, 2000.
- ESTRELA, C. et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. **Braz Dent J.**, v. 22, n. 2, p. 91-98, 2011.
- FERRACANE, J. L.; COOPER, P. R.; SMITH, A. J. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**, v. 98, p. 2–14, 2010.
- FORD, T. R. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **J Am Dent Assoc.**, v. 127, p. 1491–4, 1996.
- FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-55, 2000.
- FUKS, A. B. et al. Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow-up. **Pediatr Dent.**, v.19, p. 327-30, 1997.
- FUKS, A. B. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. **Pediatr Dent.**, v. 30, n. 3, p. 211-9, 2008.
- FUNTEAS, U. R.; WALLACE, J. A.; FOCHTMAN, E. W. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Aust Endod J.**, v.29, n. 1, p. 43-4, 2003.
- GILBERT, S. F. The morphogenesis of evolutionary developmental biology. **Int J Dev Biol.**, v. 47, p. 467–77, 2003.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, 2000.
- GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res.**, v. 81, n. 8, p. 531-5, 2002.
- GÜVEN, E. P. et al. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. **Int Endod J.**, doi:10.1111/iej.12115. 2013.
- HAKKI, S. S. et al. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts, **J Endod.**, v. 35, p. 513-19, 2009.
- HARGREAVES, K. M. et al. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? **J Endod.**, v. 34, n. 7, p. 51-6, 2008.
- HE, G. et al. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. **Connect Tissue Res.**, v. 44, n. 1, p. 240-5, 2003.

- HE, H. et al. Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. **Cell Biol Int.**, v. 32, p. 827-34, 2008.
- HORSTED, P.; EL ATTAR, K.; LANGE LAND, K. Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 52, p. 531–53, 1981.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-87, 2007.
- HUNTER, M. L. Premature exfoliation of primary molars related to the use of formocresol in a multivisit pulpotomy technique: a case report. **Int J Paediatr Dent.**, v. 13, n. 5, p. 246-50, 2003.
- HUTH, K. C. et al. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques--randomized controlled trial. **J Dent Res.**, v. 84, n. 12, p. 1144-8, 2005.
- IARC Classifies Formaldehyde as Carcinogenic to Humans. International Agency for Research on Cancer (2004) disponível em: <http://www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/archives/pr153a.html>, acesso em 16 jun. 2012.
- IBRICEVIC, H.; AL-JAME, Q. Ferric sulphate and formocresol in pulpotomy of primary molars: long term follow-up study. **Eur J Paediatr Dent.**, v. 4, n. 1, p. 28-32, 2003.
- KARABUCAK, B. et al. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. **Dent Traumatol.**, v. 21, p. 240-43, 2005.
- KEEPERS et al. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **Eur J Cancer.**, v. 27, n. 7, p. 897–900, 1991.
- KOUBI, G. et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth—a prospective study. **Clin Oral Investig.**, v. 3, n. 2, p. 57-61, 2012.
- LANGER, R; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 1993.
- LARSEN, M. et al. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 18, p. 463–71, 2006.
- LAURENT, P. et al. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. **Dent Materials.**, v. 24, p. 1486-94, 2008.
- LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. Biodentine induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **Int Endod J.**, v. 45, p. 439-48, 2012.
- LEE, S. J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J Endod.**, v. 19, p. 541–4, 1993.
- LODI, D; LANNITI, T; PALMIERI, B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. **J Exp Clin Cancer Res.**, p. 30-9, 2011.

- LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat Immunol.**, v. 6, p. 1182–90, 2005.
- MARKOVIC, D.; ZIVOJINOVIC, V.; VUCETIC, M. Evaluation of three pulpotomy medicaments in primary teeth. **Eur J Paediatr Dent.**, v. 6, n. 3, p. 133-8, set, 2005.
- MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **Am J Dent.**, v. 18, p. 151-4, 2005.
- MASUDA-MURAKAMI, Y. et al. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. **Acta Histochem.**, v. 112, p. 452–8, 2010.
- MATHIEU, S. et al. Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. **Arch Oral Biol.**, v. 50, p. 109–13, 2005.
- MENEZES, R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and white Portland cements as wound dressings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 98, p. 376-9, 2004.
- MINAMIKAWA, H. et al. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. **J Endod.**, v. 37, p. 637–41, 2011.
- MING ONG, R. et al. Cytotoxicity of accelerated white MTA and Malaysian white Portland cement on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): an in vitro study. **Singapore Dent J.**, v. 33, p. 19-23, 2012.
- MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, 2003.
- MOGHADDAME-JAFARI, S. et al. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. **J Endod.**, v. 31, p. 387–91, 2005.
- MORETTI, A. B. S. et al. The effectiveness of MTA, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. **Int Endod J.**, v. 41, n. 7, p. 547-55, 2008.
- MODENA, K. C. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **J Appl Oral Sci.**, v. 17, n. 6, p. 544-54, 2009.
- NAIR, P. N. et al. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. **Int Endod J.**, v. 41, p. 128–50, 2008.
- NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **J Endod.**, v.31, n. 10, p. 711-8, 2005.
- NARAYANAN, K. et al. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 19064–71, 2006.
- NÖR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Oper Dent.**, v. 31, n. 6, p. 633-42, 2006.
- PAPAGIANNIOLIS, L. Clinical studies on ferric sulphate as a pulpotomy medicament in primary teeth. **Eur J Paediatr Dent.**, v. 3, n. 3, p. 126-32, 2002.

- PARANJPE, A.; ZHANG, H.; JOHNSON, J. D. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. **J Endod.**, v. 36, p. 1042–7, 2010.
- PARANJPE, A. et al. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. **J Endod.**, v. 37, p. 1691–5, 2011.
- PENG, W. et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **J Endod.**, v. 37, n. 9, p. 1240-6, 2011.
- POLAK, J. M.; BISHOP, A. E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1068, p. 352-66, 2006.
- PRADELLE-PLASSE, N. et al. Emerging trends in (bio) material research. An example of new material: preclinical multicentric studies on a new Ca₃SiO₅-based dental material. In: Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites. 1st ed. Goldberg M, editor. **Oxford, UK: Coxmoor Publishing Company**, p. 184-203, 2009.
- PRESCOTT, R. S. et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. **J Endod.**, v. 34, p. 421, 2008.
- PRIAM, F. et al. New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. **Arch Oral Biol.**, v. 50, n. 2, p. 271-80, 2005.
- SAKAI, V. T. et al. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. **Brit Dent J.**, v. 8, n. 3, p. 128-9, 2009.
- SAKAI, V. T. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res.**, v. 89, n. 8, p. 791-6, 2010.
- SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate and formocresol as pulpotomy agents in rat molars. **Dent Traumatol.**, v. 19, n. 6, p. 314-20, 2003.
- SCHRODER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **J Dent Res.**, v. 64, p. 541–8, 1985.
- SCHUURS, A. H. B.; GRUYTHUYSEN, R. J. M.; WESSELINK, P. R. Pulp capping with adhesive resin-based composite versus calcium hydroxide: a review. **Endod Dent Traumatol.**, v. 16, p. 240–50, 2000.
- SHI, S. et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to re-generate and repair dental structures. **Orthod Craniofac Res.**, v. 8, n. 3, p. 191-9, 2005.
- SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p.1107–12, 1990.
- SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Dis.**, v. 13, n. 2, p. 151-7, 2007.
- SIMON, S. et al. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. **Int Endod J.**, v. 41, p. 781–90, 2008.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.**, v. 341, p. 738–46, 1999.

- SMITH, A. J. et al. Reactionary dentino-genesis. **Int J Dev Biol.**, v. 39, p. 273–80, 1995.
- SMITH, A. J.; LESOT, H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 12, p. 425–37, 2001.
- SMITH, A. J. Vitality of dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **J Dent Educ.**, v. 67, n. 6, p. 678-89, 2003.
- SRINIVASAN, V.; PATCHETT, C. L.; WATERHOUSE, P. J. Is there life after Buckley's formocresol? Part I – a narrative review of alternative interventions and materials. **Int J Paediatr Dent.**, v. 16, n. 2, p. 117-27, 2006.
- STANLEY, H. R.; PAMEIJER, C. H. Dentistry's friend: calcium hydroxide. **Oper Dent.**, v. 22, p. 1–3, 1997.
- STRANGE, D. M. et al. Outcome of formocresol/ZOE sub- base pulpotomies utilizing alternative radiographic success criteria. **Pediatr Dent.**, v. 23, n. 4, p. 331-36, 2001.
- SUCHÁNEK, J et al. Human dental pulp stem cells – Isolation and long term cultivation. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 50, n. 3, p. 195-201, 2007.
- TAKEDA, T. et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. **J Dent Res.**, v. 87, p. 676–81, 2008.
- TJÄDERHANE, L. The mechanism of pulpal wound healing. **Aust Endod J.**, v. 28, n. 2, p. 68-74, 2002.
- TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J Endod.**, v. 25, n. 3, p. 197-205, 1999.
- TRAN, X. V. et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. **J Dent Res.**, v. 91, n. 12, p. 1166-71, 2012.
- TSUKAMOTO, Y. et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. **Arch Oral Biol.**, v.37, n. 12, p. 1045-55, 1992.
- TZIAFAS, D. et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Arch Oral Biol.**, v. 40, p. 883-93, 1995.
- TZIAFAS, D. et al. The dentino-genic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **Int Endod J.**, v. 35, p. 245–54, 2002.
- WATERHOUSE, P. J.; NUNN, J. H.; WHITWORTH, J. M. An investigation of the relative efficacy of Buckley and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. **Brit Dent J.**, v. 188, n. 1, p. 32-6, 2000.
- WELF, E. S. et al. Migrating fibroblasts reorient directionality by a metastable, PI3K-dependent mechanism. **J Cell Biol.**, v. 197, p. 105–114, 2012.
- YANG, X. C. et al. The odontogenic potential of Stro-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. **J Tissue Eng Regen Med.**, v. 1, p. 66–73, 2007.

ZANINI, M. et al. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J Endod.**, v. 38, p. 1220–6, 2012.

ZARZAR, P. A. et al. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. **J Dent.**, v. 31, n. 7, p. 479-85, 2003.

ZARRABI, M. H. et al. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. **J Endod.**, v. 36, p. 1778–81, 2010.


ZHANG, W. et al. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. **Biomaterials**, v. 27, n. 33, p. 5658-68, 2006.

ZHANG, W. et al. Tissue engineering of blood vessel. **J Cell Mol Med.**, v. 11, n. 5, p. 945-57, 2007.


ZHANG, W; YELICK, P. C. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. **Int J Dent.**, Published online 2010 April 28. doi: 10.1155/2010/856087 IOD:856087, 2010.

ZHAO, W. Y. et al. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. **Biomaterials**, v. 26, p. 6113–21, 2005.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063

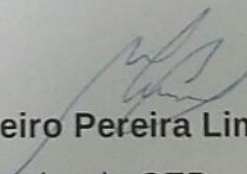


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Declaro para todos os fins que o projeto intitulado “MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE DENTINA POR ODONTOBLASTOS DIFERENCIADOS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO PULPARES” foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifal-MG, recebendo o parecer **APROVADO**, *ad referendum* ao comitê a ser registrado em Ata da 83ª. Reunião, a realizar-se em 06 de abril de 2011, protocolo N^o 040/2011.

Alfenas, 25 de março de 2011.



Prof. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Coordenador do CEP