GABRIELA OLIVEIRA BERTI

Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de Hidroxiapatita e Agregado Trióxido Mineral (MTA)

São Paulo

2013

GABRIELA OLIVEIRA BERTI

Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de Hidroxiapatita e Agregado Trióxido Mineral (MTA)

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker

São Paulo

2013

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

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Berti, Gabriela Oliveira.
Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: nanopartículas de hidroxiapatita e agregado trióxido mineral (MTA) / Gabriela Oliveira Berti; orientador Marcelo José Strazzeri Bönecker. -- São Paulo, 2013.
73 p.: il. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida.

1. Biomateriais. 2. Hidroxiapatita. 3. Agregado Trióxido Mineral. 4. Polpa dentária - Células. I. Bönecker, Marcelo José Strazzeri. II. Título.

Berti GO. Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de Hidroxiapatita e Agregado Trióxido Mineral (MTA). Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico esta dissertação a **Deus**, presença constante em minha vida. Obrigada por guiar, proteger e abençoar todos os meus caminhos. Obrigada Senhor por toda força e esperança que animou a minha trajetória. Por ser o maior dos autores desta Dissertação de Mestrado e ainda muito obrigada por todas as pessoas que colocou em minha vida que através delas pude sentir todo o seu amor, carinho e incentivo. Obrigada Senhor por cuidar de tudo que não está ao meu alcance e principalmente por esta amada conquista.

Aos meus pais, **Carlos Alberto Berti e Maria Ap. de Oliveira Berti**, meus amados, pessoas que mais admiro e confio, por toda a dedicação em toda a minha vida, por serem os meus primeiros mestres na arte de educar, por estarem sempre presentes na minha vida, em todos os momentos sejam bons ou não. Muito obrigada pelos conselhos e pelo imenso apoio, porque foi através deles que me senti confiante para seguir em frente. Pá e Mã, vocês lembram uma tarde de domingo que conversávamos e riamos muito, e nesta conversa falei que não tinha ídolos, pois vocês são os meus ídolos, sou a maior fã de vocês. Amo vocês infinitamente.

A minha irmã, **Larissa Oliveira Berti**, minha melhor amiga, sempre companheira, pronta a ajudar em tudo, até quando eu estava aprendendo a dirigir que você usou uma frase parecendo até meio agressiva, mas que me estimulou muito a ser a “Senninha” que modéstia a parte hoje eu sou (rsrsrs). Muito obrigada por ser esta fonte de alegria inesgotável. Admiro muito toda a sua perseverança, amo muito você.

AGRADECIMENTOS

Ao meu admirável orientador, **Marcelo Bönecker,** por ser uma pessoa presente na minha vida durante todo o curso de Mestrado, por ter me dado esta chance maravilhosa, e por ter confiado em mim no momento em que já tinha me considerado uma orientada quando eu ainda era estagiária. Professor sempre te admirei muito, você é um grande profissional e também uma pessoa maravilhosa, com um coração imenso. Eu tenho ORGULHO em dizer que você é o meu orientador. Obrigada por toda a grande ajuda. Existiram momentos que você estava com um milhão de coisas para fazer, mas dava uma pausa para me atender. Professor, obrigada por me guiar para além das teorias, expresso o meu sincero agradecimento e o meu respeito, que sempre serão pouco diante do muito que me ofereceu. Você é uma das pessoas que agradeço a Deus por fazer parte da minha vida. Gostaria que soubesse que é muito especial para mim. Obrigada por acreditar no meu trabalho.

A minha co-orientadora, **Andrea Mantesso**, por ser a minha guia na arte dos estudos com células-tronco e biomateriais. Obrigada por passar parte do seu conhecimento, você é uma grande responsável pela minha formação neste curso de Mestrado. Considero-me uma pessoa abençoada por ter feito parte da sua equipe e nem tenho como agradecer tudo que fez por mim. Teacher, tenho um débito de gratidão com você, obrigada por todo o carinho e por ter acreditado em mim e nesses três anos, me orientando com rigor gerando um crescimento não apenas como aluna, mas também como pessoa. O espelho da pessoa que você é está na Olivia, uma criança linda, extrovertida e muito educada. Obrigada por tudo.

Aos meus avós, **Napoleão Berti**, **Ilydia Carareto Berti** (in memoriam), **Job Thomaz de Oliveira** (in memoriam) e **Gilda Mendonça**. Um dia, quando eu “crescer”, quero ser igual a vocês. Obrigada por toda dedicação, carinho, amor e estímulo, e ainda por todas as orações. Vocês são meus amores pra toda a vida.

A minha fofura, **Mel**. Você é a grande responsável por me fazer feliz em momentos difíceis. Obrigada por sempre estar me esperando na porta de casa com aquela alegria, cheia de carinho para me oferecer.

Ao **Prof. Giancarlo Brito**, por toda a sua dedicação com o intuito de sempre aprimorar este trabalho, por todos os ensinamentos de física e estatística. Obrigada Professor por proporcionar esta parceria entre a física e a odontologia, e fazer com que estas áreas tão distintas façam a diferença quando juntas. Muito obrigada por compartilhar os seus conhecimentos e confiar em mim para a realização dos testes com este seu maravilhoso novo material.

A Profa. **Maria Salete**, a mãe de todos os alunos da Odontopediatria, muito obrigada por todas as nossas conversas, sempre divertidas e sempre com algo de novo para

aprender sobre a vida. Obrigada pela oportunidade de ajudar a escrever um dos capítulos dos seus livros. O dia em que fiquei sabendo que faria parte do seu livro fiquei radiante de tanta felicidade. Espero que Deus devolva em dobro toda a sua dedicação e carinho.

Ao **Fausto Mendes.** Fausto muito obrigada por tanto ensinamento, por todo o seu carinho, por todas as vezes que me fez um elogio sincero mediante a minha postura profissional, tudo isso vindo de você é uma grande honra para mim. Parabéns pela sua família tão linda, você merece.

A **Mari Braga**. Você é um grande exemplo a ser seguido, como profissional e pessoa linda por fora e por dentro que você é, mais linda ainda grávida. Te admiro muito e muitíssimo obrigada por todos os seus ensinamentos.

A **Dani Raggio**, obrigada por contagiar com toda a sua alegria a salinha dos alunos. Dani você é uma pessoa muito especial e ainda uma profissional admirável, muito obrigada por toda a sua dedicação. Fiquei muito feliz em escrever o artigo sobre trauma em Barueri e aprender muito com você.

Ao **Prof. Imparato**, por todos os ensinamentos durante a clínica de graduação, por estar sempre presente e disposto a ajudar, sempre com novas ideias e com um sorriso cativante no rosto.

A **Profa. Ana Estela**, por toda a dedicação nas disciplinas de Docência Universitária e Teleodontopediatria. Por toda a sua simpatia e carisma. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e a enriquecer mais o meu aprendizado.

A **Profa. Márcia Wanderley**, obrigada por acreditar em mim e me dar a oportunidade de participar do estágio de trauma, mesmo eu ainda sendo uma aluna de graduação. Obrigada por esclarecer todas as dúvidas sobre traumatismo dentário, você é uma referência neste assunto.

A **Profa. Ana Lídia**, por ser uma das pessoas mais extrovertidas e cativantes que já conheci, obrigada pelo aprendizado na área de pacientes especiais.

Ao **Prof. Guedes-Pinto**, você é um grande exemplo de Professor, um grande nome na Odontopediatria.

A **Lú Miguita**. Lú primeiramente gostaria de parabenizar a pessoa maravilhosa que você é. Obrigada por toda a sua ajuda e dedicação, sempre acreditei muito em todos os seus conselhos e opiniões. Gostaria que você soubesse que sempre estarei ao seu lado retribuindo os chocolates. E não esqueça do lema “Keep Calm pra vida ficar mais show” (rsrsrsrs). Deus te traga muitas alegrias, torço muito por você.

A **Jenny Abanto**. Jenny você é uma pessoa 100% admirável e amável. Obrigada pelas orações, por todo o carinho e dedicação. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida, agradeço muito também ao Congresso na Argentina, que nos

aproximou muito, foi uma viagem muito especial e divertida. Que Deus te ilumine muito e te traga muitas graças.

Aos meus irmãozinhos, **Calebinho**, **Gú** e **Juanito**, vocês são demais, fontes de muito carinho, amor e amizade. Sinto-me muito feliz perto de vocês e torço muito pelo sucesso de vocês.

A **Thata** e **Aninha**, vocês são simplesmente maravilhosas, chegam sempre na hora certa, sempre sabem o que dizer e quando dizer, obrigada por todo o imenso carinho, que Deus as abençoe.

A **Jú Mattos** e **Heleninha**, vocês são muito meigas e estão sempre com o coração aberto, adoro as nossas conversas, obrigada por todos os conselhos e desabafos e por todos os bons momentos que passamos juntas.

A **Karlinha**, você é uma pessoa extremamente forte. A melhor coisa que nos aconteceu foi a viagem para o Synchrotron, porque foi lá que nos reaproximamos. Obrigada por fazer parte deste trabalho e por toda a sua dedicação.

A **Tamara**, **Dani Hesse** e **Isa**, muito obrigada por todo o entusiasmo, bom humor, por todas as nossas conversas sempre muito alegres, vocês são nossas fontes de alegria.

A **Jú Kimura** e **Patty,** desde o primeiro dia de pós já tivemos uma grande afinidade, vocês são pessoas muito especiais e cada uma de vocês com seu jeito especial alegraram a minha vida.

A **Evelyn** e **Renatinha**, vocês são alegres, alto astral e muito especiais, obrigada por todo o carinho e incentivo.

A **Camilinha**, **Carol** e **Edu**, mesmo com pouco tempo de convivência, vocês tornam os meus dias mais alegres.

Aos especiais **Rafa** e **Levy**, sempre buscando aproveitar a parte divertida da vida, muito obrigada por todos os momentos divertidíssimos.

As queridas **Tati Novaes** e **Alê**, vocês são exemplos de bondade, simplicidade e possuem um grande coração, sempre dispostas a ajudar.

Ao **Cássio** e a **Chris Murakami**, por desde o início estarem presentes na minha trajetória, obrigada.

A **Flavinha**, você nasceu com o dom de ensinar, além disso é uma das pessoas mais bondosas que já conheci, respeito muito você tanto como profissional como pessoa.

A **Lourdes**, **Marina** e **Cibele**, as “Andrezetes”, agradeço por todos os nossos bons momentos, obrigada pela ajuda direta ou indiretamente no laboratório.

Aos funcionários das Disciplinas de Odontopediatria, **Marize**, **Júlio**, **Fátima**, **Anne** e **Antônio** e Patologia Bucal, **Zilda**, **Néia**, **Nair**, **Juvani**, **Eliza** e **Adriana**, por toda a dedicação com muito carinho e o suporte durante todo o meu curso de Mestrado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), pela bolsa de mestrado durante a realização do curso.

A **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo** por todo o aprendizado.

Aos **pacientes** e **responsáveis** que consentiram a utilização de seus dentes para fins desta pesquisa.

“Se amanhã você quiser ser um grande profissional, comece hoje sendo um grande aprendiz”.

Inácio Dantas

RESUMO

Berti GO. Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de Hidroxiapatita e Agregado Trióxido Mineral (MTA) [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013.Versão Corrigida.

As células da polpa dental têm o potencial de responder a estímulos externos e reparar o tecido dentário lesionado. Nos dentes, as lesões cariosas profundas e as lesões traumáticas são frequentes e resultam em alterações pulpares. Com o desenvolvimento da ciência e a busca de formas inovadoras de tratamento utilizando biomateriais de tamanho cada vez menor, verificar a biocompatibilidade desses materiais antes da aplicação clínica se mostra necessário e promissor. Assim, a finalidade deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de uma nova nanopartícula de hidroxiapatita utilizando células pulpares humanas em cultura. As Nanopartículas de Hidroxiapatita (HAp) utilizadas em nosso estudo são um material novo e ainda não disponível para a prática clínica. Como parâmetro comparativo, foi utilizado o material já consagrado na Odontologia para tratamentos endodônticos, o Agregado Trióxido Mineral (MTA). Para tanto, foram realizados testes de biocompatibilidade (MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio)). Foi preparada uma solução de material na concentração de 0,1g/ml diluído em meio de cultura, proporção preconizada pela norma ISO 10.993-12 (ISO, 1996). Esta solução foi diluída em 3 diferentes concentrações (1/10, 1/100 e 1/1000). Também foram realizados testes de migração celular e testes de capacidade de diferenciação, na concentração de 1/100. Como resultados pudemos verificar que as células da polpa foram viáveis quando expostas a diferentes concentrações de HAp, proliferaram mais quando tratadas com HAp na concentração de 1/100, migraram em direção aos materiais estudados e diferenciaram-se em tecido mineralizado quando em contato direto com ambos materiais estudados. Concluímos que o novo material testado é biocompatível e capaz de induzir mineralização em células de polpa dental sugerindo que as HAp podem ter aplicações clínicas futuras em tecidos mineralizados como osso e dente.

Palavras-chave**:** Biocompatibilidade. Células da polpa dental. Nanopartículas. Hidroxiapatita. MTA. Biomaterial.

ABSTRACT

Berti GO. Comparison of dynamic cellular response using to different biomaterials: Nanobeads of Hidroxyapatite and Mineral Trioxide Aggregate (MTA). São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; dissertation; 2013. Corrected Version.

The dental pulp cells have the potential to respond to external stimuli and repair the dental tissue injury. On teeth, deep carious lesions and traumatic injuries are common and result in pulp changes. With the development of science and the search for innovative treatment forms using reduced size biomaterials, to verify the biocompatibility of these materials before clinical application has become necessary and promising. Thus, the purpose of this study was to evaluate the biocompatibility of a new hydroxyapatite nanoparticle using human pulp cells in culture. The nanoparticles of hydroxyapatite (HAp) used in our study are new material and not yet available for clinical practice. As a comparator, we used the material already used in dentistry to root canal treatment, the Mineral Trioxide Aggregate (MTA). To do so, biocompatibility (MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio)). A solution of the material in a concentration of 0.1 g / ml diluted in culture medium recommended by ISO 10993-12 (ISO 1996) standard was prepared. This solution was diluted in three different concentrations (1/10, 1/100 and 1/1000). Were also performed cell migration and differentiation capacity assays at a concentration of 1/100. As results, we found that the pulp cells were viable when exposed to different concentrations of HAp, they proliferated more when treated with 1/100 HAp concentration, migrated toward the studied materials and differed into mineralized tissue when there was direct contact with both materials studied. We conclude that the new material tested is biocompatible and able to induce mineralization of dental pulp cells suggesting that the HAp may have future clinical applications in mineralized tissues such as bone and tooth.

Keywords: Biocompatibility. Dental pulp cells. Nanoparticles. Hydroxyapatite. MTA. Biomaterial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 A Polpa Dentária e suas Células – Resposta a injúria e capacidade de reparação 15
2.2 Biomateriais na Odontologia 19
2.2.1 Agregado Trióxido Mineral (MTA) 22
2.2.2 Hidroxiapatita e suas nanopartículas 25
2.3 Testes de Biocompatibilidade – legislação de detalhes técnicos 30
3 PROPOSIÇÃO 32
3.1 Proposições Específicas 32
4 MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 Biomateriais Utilizados 33
4.2 Cultivo Celular 35
4.3 Avaliação por MTS (proliferação e viabilidade) 35
4.4 Análise Estatística 37
4.5 Ensaio de Migração Celular 38
4.6 Análise de Diferenciação em Tecido Mineralizado 40
5 RESULTADOS 43
6 DISCUSSÃO 55
7 CONCLUSÃO 60
REFERÊNCIAS 61
ANEXO 71

1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo constituído de vários tipos celulares, substância fundamental amorfa e tecidos vasculares e neurais. Durante a homeostase tecidual, após uma lesão ou em decorrência do processo de envelhecimento, a vitalidade da polpa depende da atividade das células pulpares (Tranasi et al., 2009; Lee et al., 2013). A polpa forma uma ação de defesa em resposta a diferentes estímulos que causam danos à sua estrutura. Quando o estímulo não excede a capacidade de cicatrização do tecido pulpar, ocorre a formação da dentina terciária através do potencial de regeneração do complexo dentino-pulpar (Smith et al., 1995; Chan et al., 2005; Modena et al., 2009).

Apesar dos avanços na prevenção da cárie dentária, da melhor compreensão do desenvolvimento da doença e do entendimento da importância de se manter a dentição tanto decídua quanto a permanente hígida, ainda ocorre, frequentemente, lesões cariosas profundas que culminam com a injúria pulpar (Huang et al., 2009). Além disso, injúrias traumáticas, principalmente em dentes anteriores também ocasionam comprometimento frequente da polpa (Ferreira et al., 2009).

A conservação dos dentes com alterações pulpares provocadas por lesões de cárie ou por traumatismo é um desafio terapêutico (Ferreira et al., 2009). Nesse sentido, a odontologia moderna lança mão de ferramentas terapêuticas, em especial relacionadas ao uso de materiais bioativos e/ou protetores do complexo dentinho-pulpar. E assim surge a necessidade de estudos sobre as características, a biocompatibilidade e o potencial bioativo desses materiais.

Com o desenvolvimento da ciência e a busca de novas formas de tratamento, os estudos sobre biocompatibilidade se tornaram indispensáveis e pesquisadores têm se mobilizado na busca da utilização de materiais ideais para auxiliar no reparo pulpar. Desta forma, primeiramente, testes de biocompatibilidade *in vitro* devem ser realizados com o intuito de conhecer as propriedades do biomaterial quando em contato com células e em seguida deve-se testar os novos materiais em modelos *in vivo* (Pereira, 2008; Pereda et al., 2012).

É importante salientar que a odontologia atual conta com numerosos materiais utilizados para proteção e tratamento da polpa lesionada. Dentre esses materiais, podemos citar a hidroxiapatita (HA) e o Agregado Trióxido Mineral (MTA) como os mais utilizados. O MTA é um material já consagrado na Odontologia, e

mostra-se biocompatível em numerosas aplicações clínicas no tratamento endodôntico (Torabinejad; Chivian, 1999; Roberts et al., 2008; Torabinejad; Parirokh, 2010).

A hidroxiapatita pode ser construída de estrutura físico-química diversa e recentemente esse material surgiu na forma de nanopartículas (Sadat-Shojai et al., 2011). As nanopartículas utilizadas em nosso estudo têm propriedades inéditas e foram projetadas pelo Professor Giancarlo Brito do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

É importante salientar que o MTA encontra-se disponível comercialmente e é utilizado de forma rotineira na prática clínica, enquanto as nanopartículas de hidroxiapatita foram recentemente desenvolvidas e ainda não estão disponíveis comercialmente, necessitando então, de testes para melhor entendimento de suas propriedades.

Assim sendo, nesse estudo serão realizados ensaios para testar a proliferação e viabilidade, a capacidade de migração e a capacidade de diferenciação de células pulpares frente ao MTA e às nanopartículas de hidroxiapatita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A fim de melhor elaborar a presente revisão de literatura, a mesma será apresentada em tópicos.

2.1 A Polpa dentária e suas Células – Resposta a injúria e capacidade de reparação

A Polpa dentária é formada por tecido conjuntivo frouxo e em conjunto com a dentina forma uma estrutura integrada denominada complexo dentino-pulpar, que tem origem embriológica na papila dentária. Quando examinada histologicamente, evidenciam-se diversos componentes celulares, dentre os quais destacam-se odontoblastos, fibroblastos, células-tronco, macrófagos e outras células imunocompetentes (Nonaka et al., 2005).

Os odontoblastos que são células exclusivas da polpa dentária formam uma camada de revestimento periférica, possuem um prolongamento que se estende no interior da dentina e são responsáveis pela formação do tecido dentinário. Acredita-se que o tempo de vida dos odontoblastos seja o mesmo do dente viável, uma vez que essas são células terminalmente diferenciadas. Outra célula presente no tecido pulpar é o fibroblasto, que é a célula mais numerosa na polpa e tem a função de formar e manter a matriz pulpar, que consiste em colágeno e matriz extracelular (Nanci, 2008).

Além destes tipos celulares existem: os macrófagos, responsáveis por eliminar as células mortas da polpa; os linfócitos, responsáveis pela resposta imunológica; as células dendríticas, responsáveis por capturar e apresentar o antígeno estranho para os linfócitos T; e finalmente as células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco), que por sua vez, podem originar dos diferentes tipos celulares da polpa dental. Diversas funções desempenhadas pela polpa podem ser enaltecidas, especialmente, a formação da dentina, além de várias funções secundárias relacionadas à sensibilidade, hidratação e defesa tecidual (Nonaka et al., 2005; Nanci, 2008).

A polpa dental desenvolve um papel importante na formação e nutrição da dentina, assim como na inervação e defesa do dente. A formação da dentina inicia-se

no momento em que as células mesenquimais indiferenciadas, encontradas na periferia do tecido pulpar, se diferenciam em odontoblastos e começam depositar matriz de colágeno em uma sequência de deposição/mineralização que culmina com a completa formação dos túbulos dentinários (Modena et al., 2009).

O complexo dentino-pulpar tem um potencial de regeneração natural exemplificado pela formação da dentina terciária (Modena et al., 2009). O tecido pulpar está constantemente sujeito a várias agressões ambientais como as causadas por lesão de cárie, calor, trauma mecânico e utilização de diferentes materiais restauradores. A polpa em resposta a estes diferentes estímulos, forma uma ação de defesa que inclui a presença de células inflamatórias e dilatação e permeabilidade dos vasos sanguíneos. Quando o estímulo não excede a capacidade de cicatrização da polpa, pode ocorrer a reparação. Assim, de acordo com os vários tipos de injúria, as células pulpares têm uma capacidade intrínseca de se diferenciarem em odontoblastos e produzirem diferentes tipos de proteínas para reparar a lesão (Smith et al., 1995; Chan et al., 2005; Modena et al., 2009).

A dentina terciária diferente das dentinas primária e secundária que se formam ao longo de toda a margem dentina-polpa, é produzida apenas pelas células que são diretamente afetadas pelos estímulos. Algumas características como a quantidade, a qualidade ou o grau de dentina terciária produzida estão relacionadas com a resposta celular desencadeada, que depende da intensidade e duração dos estímulos. Além disso, a dentina terciária é subclassificada em dentina reacional, ou reparativa (osteodentina) (Nanci, 2008).

Quando a lesão de cárie é removida antes de ocorrer uma lesão pulpar, um processo de reparo inicia-se e a síntese de colágeno é acelerada nessa fase. Se os odontoblastos sobrevivem, eles são capazes de depositar a dentina reacional, se não, as células-tronco migram para o local da lesão e se diferenciam em células semelhantes aos odontoblastos formando então a dentina reparativa (Chan et al., 2005).

A deposição de colágeno no tecido pulpar é aumenta pela ação de citocinas. A síntese de colágeno ocorre através da mediação dos fatores de crecimento de transformação (TGFs) nas subunidades β1 e β2 e interleucinas (IL), em especial a IL-1β (Barkhordar et al., 2002; Chan et al., 2005). Os fibroblastos são recrutados em um microambiente inflamatório para depositar uma quantidade notável de colágeno. A

síntese de colágeno produzida por fibroblastos durante um processo inflamatório é um evento chave no reparo da polpa dentária humana (Chan et al., 2005).

O sucesso no resultado na terapia de polpas vitais depende do tipo e localização da injúria, idade do paciente, modalidade do tratamento (material de capeamento) e integridade da cavidade a ser restaurada (Tziafas, 2004). Nesse sentido, a terapia celular e engenharia tecidual têm-se tornado técnicas promissoras na regeneração do complexo dentino-pulpar, especialmente na regeneração endodôntica (Ishimatsu et al., 2009). Nesse contexto, as células-tronco tem um papel fundamental.

Células-tronco são células indiferenciadas. As suas principais características são: a capacidade de auto-renovação, ou seja, elas são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado e assim proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares tendo então um papel regenerativo quando algum tecido sofre uma lesão ou injúria (Blau et al., 2001; Lemischka, 2005). Essas células já foram isoladas de vários tecidos humanos, incluindo medula óssea, tecido neural e pele, entre outros (Gronthos et al., 2002; Friedlander et al., 2009).

Gronthos et al., no ano 2000, foram os primeiros a encontrar populações de células-tronco na polpa de dentes permanentes (abreviado do inglês DPSC- Dental Pulp Stem Cells) e posteriormente, na polpa de dentes decíduos (abreviado do inglês SHED- Stem Cells from Human Exfoliated Deciduos Teeth) (Miura et al., 2003). Estas células-tronco tanto da polpa de dentes decíduos como as de dentes permanentes, mostraram-se capazes de originar um tecido semelhante ao complexo dentino-pulpar, composto de matriz mineralizada e túbulos delimitados por células semelhantes à odontoblastos (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003).

No entanto, pesquisas realizadas por Miura et al. (2003), verificaram que as células-tronco dos dentes decíduos são diferentes das DPSCs pois apresentam maior taxa de proliferação, maior capacidade de formar colônias e capacidade de osteoindução *in vivo*. Isto pode ocorrer, pois as SHEDs representam uma população de células multipotentes que talvez seja mais imatura do que as DPSCs. Após o transplante *in vivo* as SHEDS foram capazes de induzir a formação óssea, gerar dentina, e sobreviver em cérebro de camundongo junto com a expressão de marcadores neurais (Miura et al., 2003).

Autores como Huang et al. (2010), mostraram evidências de que o tecido pulpar pode ser regenerado no espaço vazio do canal radicular por células-tronco da papila apical e polpa dental uma vez que estas células se diferenciam em odontoblastos e realizam o processo de formação de dentina.

A exata origem e localização das células-tronco no interior da polpa dentária ainda não está clara, no entanto, estas células exibem fenótipo consistente com nicho perivascular (Shi; Gronthos, 2003). Além disso, estudos mostraram que essas células possuem ciclagem lenta e capacidade de resposta à injúria (Técles et al., 2005).

Em seu estudo, Técles et al. (2005), utilizaram terceiros molares humanos recém extraídos para entender a ativação e a migração de células-tronco da polpa dental após preparação de uma cavidade profunda com exposição pulpar. Para tanto, utilizaram a imunomarcação para BrdU (nucleosídeo análogo da timina). Após incubação dos dentes em contato com o nucleosídeo durante 1 dia, o BrdU foi localizado no núcleo das células na região perivascular. A imunomarcação com BrdU foi forte nas células da região dos vasos sanguíneos que rodeiam a cavidade de injúria pulpar e menor nos vasos sanguíneos mais distantes da cavidade. Após 2 semanas de observação depois da incubação, as células positivas foram vistas na periferia da cavidade. Ao fim de 4 semanas, a imunomarcação foi localizada somente nas células presentes na área da cavidade (Técles et al., 2005). Estes resultados demonstram claramente que as células-tronco da região perivascular podem proliferar em resposta à lesão de odontoblastos.

O processo de reparo após a exposição pulpar pode ser influenciado por diferentes materiais, que são biocompatíveis, mas que não são ideais visto que não devolvem a vitalidade celular (Yavari et al., 2012a). Nesse sentido, a engenharia tecidual caminha para utilização de células associadas a esses materiais para acelerar e/ou melhorar o processo de regeneração/reparação tecidual (Miura et al., 2003).

Nesse sentido, o tipo de material utilizado para auxiliar na reparação tecidual, suas propriedades e principalmente a biocompatibilidade do material são considerados de suma importância (Schenk et al., 1994). Nos próximos parágrafos descreveremos sobre a utilização dos biomateriais em Odontologia.

2.2 Biomateriais na Odontologia

Na Odontologia restauradora, tecidos dentinários perdidos são substituídos por materiais sintéticos, como liga de titânio, resinas compostas e cerâmica zircônia (Kim, et al., 2009). Porém, hoje, com advento da engenharia tecidual, existe um maior interesse na regeneração biológica das estruturas dentárias perdidas.

Mesmo diante da valorização dos princípios estéticos e mecânicos dos materiais restauradores, os fatores biológicos são de extrema importância para a manutenção da vitalidade do complexo dentino-pulpar e devem ser levados em consideração para obter o sucesso dos procedimentos clínicos. Assim sendo, alguns materiais odontológicos aplicados sobre o complexo dentino-pulpar podem representar um fator agressivo relacionado principalmente aos seus componentes químicos (Hume; Gerzina, 1996; Moharamzadeh et al., 2007). Por outro lado, outros materiais podem ajudar no processo de reparação (Pereda et al., 2012).

Nesse contexto, a busca da manutenção da vitalidade e integridade pulpar tem sido um fato corriqueiro na Odontologia moderna, por isso a biocompatibilidade é um termo que abrange vários aspectos de um mesmo material (Calixto, 2001).

Biocompatibilidade e durabilidade são dois fatores de suma importância na avaliação de um biomaterial. Afinal, o tecido vivo deve sobreviver em contato com o esses materiais (Byrom, 1991), os mesmos não devem ocasionar reações adversas ao organismo e devem manter sua função durante sua vida útil (Byrom, 1991).

A biocompatibilidade, segundo o dicionário da língua portuguesa, significa compatibilidade entre um implante e o tecido biológico em que é inserido ou com o qual é posto em contato (Infopédia, [2013]). Neste contexto, a biocompatibilidade determina a capacidade do material funcionar para uma aplicação específica e na presença de uma integração ao hospedeiro sem oferecer riscos à segurança do paciente (Schenk et al., 1994).

De maneira geral, um biomaterial é qualquer substância, exceto medicamentos, que pode ser usado por qualquer período de tempo como parte de um sistema que objetiva o tratamento ou à reposição de um tecido, órgão ou função do corpo (Schmalz, 2002). Pode-se afirmar, ainda, que um biomaterial é uma

substância pura de natureza sintética e natural, que poderá ser utilizado de maneira temporária ou permanente com o objetivo de aumentar, substituir ou melhorar a situação dos tecidos ou órgãos (Williams, 1987).

Sendo assim, um biomaterial deve induzir uma reação inicial benigna e esta reação deve ocorrer rapidamente e ser substituída por uma reação de formação tecidual com finalidade de repor os tecidos perdidos (Gregui; Campos Junior, 1994).

Há mais de 60 anos, o hidróxido de cálcio é utilizado principalmente nos procedimentos de reparação pulpar por apresentar propriedade de estimular a dentina esclerótica e reparativa e proteger a polpa contra estímulos térmicos e antibacterianos (Foreman; Barnes, 1990). Esse material é indicado para capeamento pulpar direto e indireto, apicificação, apicigênese, tratamento de reabsorção de canal e perfuração de canal, sendo certamente um dos materiais mais estudados e classificado como padrão ouro em testes de biocompatibilidade (Demarco et al., 2001; Farhad; Mohammadi, 2005).

Sua elevada alcalinidade promove um processo de necrose superficial por coagulação em meio à injúria tecidual. Essa necrose estimula a síntese de colágeno que é incorporado a sais minerais compondo uma matriz calcificada (fibrodentina). A fibrodentina estimula uma cascata de diferenciação celular que culmina na formação de uma barreira de tecido mineralizado (Schroder, 1985; Goldberg; Smith, 2004).

A presença dessa barreira de tecido mineralizado deve ser reconhecida não só como uma barreira estrutural contra futuras lesões, mas também como sinal de recuperação biológica representada pela atividade dos odontoblastos (Stanley; Pameijer, 1997; Modena et al., 2009). No entanto, a importância dessa barreira de tecido mineralizado formado após o capeamento tem sido contestada por estudos que mostram múltiplos defeitos e inclusões celulares ocorridas após o capeamento com hidróxido de cálcio (Modena et al., 2009).

Podemos citar outras limitações do hidróxido de cálcio como sua baixa adesividade à estrutura dental, alta solubilidade em fluídos teciduais, baixa resistência mecânica e pouca compatibilidade com o tecido pulpar quando comparado a outros biomateriais como o MTA (Accorinte et al., 2008).

Em seu estudo, Lacativa et al. (2012), tiveram como objetivo avaliar por meio da técnica de implante intra-ósseo os materiais mais comumente usados para a terapia pulpar na área de odontopediatria: hidróxido de cálcio, pasta Guedes Pinto e pasta CTZ (cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco e eugenol). Trinta animais

foram utilizados para realização do estudo. Estes animais foram divididos em grupos de acordo com o biomaterial, 10 animais para cada grupo testado, e ainda foram divididos em períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Os animais receberam um implante em cada lado da parte inferior da sínfise mandíbular. No final dos períodos de observação, os animais foram sacrificados e as amostras foram preparadas para exame histológico. Observou-se, após 4 semanas, que nos animais tratados com hidróxido de cálcio e com a pasta CTZ ocorreu inflamação grave tecidual, com uma grande quantidade de tecido necrótico, presença de linfócitos, reação de corpo estranho e reabsorção óssea. A pasta Guedes Pinto induziu pouca ou nenhuma inflamação. Após 12 semanas, os grupos tratados com hidróxido de cálcio e com a pasta Guedes Pinto apresentaram reações inflamatórias muito leves, e ainda foi observado substituição por tecido ósseo recém-formado, enquanto resposta inflamatória moderada a severa foi observada com a pasta CTZ. Os autores então concluíram que entre todos materiais testados, apenas a pasta Guedes Pinto apresentou biocompatibilidade aceitável (Lacativa et al., 2012).

Camargo et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade do cimento de mamona, em comparação com materiais de capeamento pulpar comumente usados, como o hidróxido de cálcio e o MTA. Efeitos citotóxicos claros foram detectados apenas com grupo que utilizou o hidróxido de cálcio.

Miura et al. (2010) avaliaram o efeito citotóxico do hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado, otosporin e formocresol sobre as células-tronco de polpa dental humana de dentes permanentes e concluíram que todos estes materiais produzem efeitos tóxicos em contato com esse tipo de células. Mesmo com a toxicidade comprovada, algumas drogas ainda são utilizadas como padrão ouro na terapia pulpar.

A seguir, os materiais utilizados nesse estudo são descritos com maiores detalhes.

2.2.1 Agregado Trióxido Mineral (MTA)

O MTA foi desenvolvido nos anos 90 e mostra-se biocompatível em numerosas aplicações clínicas, como capeamento pulpar, pulpotomia, reparação de perfurações e apexificação (Torabinejad; Chivian, 1999; Roberts et al., 2008; Torabinejad; Parirokh, 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram algumas características do MTA (além da biocompatibilidade) como excelente vedação e alta capacidade de indução de formação de tecido duro (Parirokh; Torabinejad, 2010).

Análises histológicas observando a resposta pulpar frente a exposição com o MTA comparado com o hidróxido de cálcio mostraram uma formação mais homogênea da barreira de dentina com menor inflamação pulpar, sugerindo o MTA como um material que desempenha uma resposta biológica favorável (Chacko; Kurikose, 2006).

Uma revisão de literatura, realizada por Tessare et al. (2005), mostrou que o MTA apresenta-se como um material superior quando é comparado com outros materiais utilizados em tratamentos endodônticos para tratamento de perfurações de furca e reabsorção radicular lateral. Isto é devido a sua capacidade de selamento e adaptação tridimensional que evitam microinfiltrações. Estas características impedem o desenvolvimento de infiltração severa no local da reparação. Outras características citadas pelos autores são a biocompatibilidade, o pH alcalino, e a não necessidade de um campo cirúrgico seco durante o uso clinico.

O MTA tem mostrado propriedades importantes para a regeneração celular e reposta a injúria. Pereda et al. (2012), avaliaram a expressão gênica de RNAm e receptores que controlam o processo de reabsorção óssea (receptor-ativador do fator nuclear kappa beta (RANK); receptor do fator ativador nuclear kappa beta ligado (RANKL), e osteoprotegerina (OPG), utilizando o MTA em cultura de macrófagos murinos. Eles observaram que o MTA tem o potencial de reduzir os processos inflamatórios bem como promover a cicatrização (Pereda et al., 2012).

Minamikawa et al. (2011) tiveram como objetivo de seu estudo avaliar a citotoxicidade do MTA e seu potencial de desintoxicação pelo aminoácido antioxidante N-acetilcisteína (NAC). As células da polpa dentária de incisivos superiores extraídos de ratos foram cultivadas diretamente no MTA com ou sem NAC diluído em meio de cultura. O número e o comportamento das células foram

avaliados 24 horas após o cultivo celular. O número de células ligadas ao MTA foi 60% maior quando NAC foi adicionado ao meio de cultura. Além disso, a área e o perímetro das células encontradas no grupo com NAC foi 2 vezes maior. Este estudo demonstrou que a presença de NAC pode melhorar substancialmente o comportamento das células da polpa dental em conjunto com o MTA e sugere uma maior exploração do NAC para determinar o seu valor terapêutico para melhorar a biocompatibilidade do MTA.

O MTA é, atualmente, o material de eleição para o selamento de perfurações radiculares devido às excelentes propriedades físico-químicas e biológicas que tem revelado nas pesquisas e na clínica. Assim, o objetivo do estudo de Miranda (2007) foi avaliar a citotoxicidade do cimento experimental MBPc (pasta cirurgia de Moraes/Berbert) em comparação com o MTA, que já está mundialmente estabelecido como material biocompatível. O cimento experimental é a base de resina epóxica e hidróxido de cálcio, e vem sendo estudado em trabalhos que relatam selamentos de perfurações radiculares. A linhagem celular utilizada neste estudo foi a L929 formada por células derivadas de fibroblastos de camundongo. Para analisar a citotoxicidade este estudo utilizou a técnica de difusão em agar com corante vermelho neutro e evidenciou que todas as amostras foram consideradas satisfatórias, pois nenhuma cultura exposta aos cimentos revelou níveis de toxicidade aparente (Miranda, 2007).

Yavari et al. (2012a), realizaram estudo comparando a microinfiltração microbiana de quatro materiais dentários, entre eles o MTA. Neste estudo utilizaram setenta pré-molares inferiores, que foram instrumentados, e obturados. Aleatoriamente dividiram os dentes em 4 grupos experimentais. Cada grupo correspondia a um material dentário a ser aplicado. Removeram 2 mm da guta-percha presente na porção coronal dos dentes tratados e neste local acrescentaram os materiais que foram estudados. A porção coronária foi exposta à saliva humana. De acordo com os resultados do estudo, o MTA e uma mistura enriquecida com cálcio foram mais eficazes em evitar a microinfiltração quando comparados com o amálgama e compósitos de resina (Yavari et al., 2012a).

Em outro estudo o mesmo grupo de pesquisadores também concluíram que o MTA é um material eficiente na prevenção da microinfiltração coronária em comparação com outros materiais como o cimento de ionômero de vidro e a resina composta (Yavari et al., 2012b).

O MTA mostra excelentes propriedades biológicas em estudos *in vivo* e *in vitro* (Holland et al., 2001; Yasuda et al., 2008). Esse material possui a capacidade de estimular a formação de cristais de hidroxiapatita em cultura de osteoblastos humanos (Salles et al., 2012) e possui também a capacidade de estimular a reparação do tecido pulpar através da mineralização do mesmo (Yasuda et al., 2008).

Além disso, os efeitos do MTA na diferenciação osteo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária já foram investigados (Wang et al., 2013). Este grupo de células foi isolado a partir de polpas de incisivos de rato sob efeito inflamatório e cultivadas com meio de cultura tratado com o MTA. Testes como MTT (brometo de 3 – [4,5- dimetil -2- tiazolil] -2,5- difenil- tetrazólio) e citometria de fluxo foram realizados para avaliar a proliferação destas células. Atividade de fosfatase alcalina, coloração com alizarina vermelha e análise de Western blot foram realizadas com o objetivo de investigar a capacidade de diferenciação. As células que foram tratadas com o MTA demonstraram maior atividade da fosfatase alcalina e formaram mais nódulos de calcificação em comparação com o grupo não tratado com o biomaterial (Wang et al., 2013).

Varalakshmi et al. (2013) também estudaram o potencial de diferenciação odontoblástica de células pulpares humanas. Compararam o efeito combinado da estatina e α- fosfato tricálcico com o efeito do MTA. Foram avaliadas a proliferação celular, adesão celular em discos de dentina, atividade da fosfatase alcalina, expressão de marcadores osteogênicos e odontoblásticos e ainda a mineralização destas células sob a presença dos biomateriais. O crescimento celular e a atividade de fosfatase alcalina no grupo tratado com do fosfato tricálcico foi maior em comparação com o MTA. Já a mineralização foi equivalente nos dois grupos.

Embora vários estudos apontem o MTA como um bom material para realização de tratamentos pulpares, pesquisas continuam no sentido de melhor entender algumas das propriedades deste material, tendo em vista o fato de que ainda existem numerosas controvérsias em relação às bases biológicas dos mecanismos de regulação da resposta da polpa na presença de qualquer material (Tziafas, 2004; Miranda, 2007).

2.2.2 Hidroxiapatita e suas nanopartículas

A Hidroxiapatita (HA) é um componente mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. É um mineral osteocondutor de suma importância para regeneração tecidual (Varma et al., 1999).

A HA é estudada há muitos anos. Os estudos mais antigos já relatavam a biocompatibilidade do material e sua aplicabilidade envolvendo a ortopedia (Heimke, 1989) e a odontologia (Deeb et al., 1988). E, até os dias atuais, a hidroxiapatita é muito utilizada para recuperação de tecidos mineralizados (Akkouch et al., 2013).

Alguns parâmetros são utilizados para verificar as propriedades da HA assegurando um adequado comportamento *in vivo.* O controle de tais parâmetros microestruturais é de extrema importância, pois varia de acordo com a metodologia empregada na preparação da amostra (Costa et al., 2009).

A produção atual de HA sintética é realizada seguindo metodologias hidrotérmicas, sol-gel, química úmida e deposição biomimética. Características como tempos de reação, pH, temperatura e matéria-prima podem afetar a composição e propriedades do produto final (Zakaria et al., 2013).

Além destas características a biocompatibilidade do material também deve ser testada antes de sua utilização comercial e terapêutica. São poucos os trabalhos que analisam a biocompatibilidade da HA *in vitro*. Ruano et al. (1996), estudaram a proliferação e a viabilidade de fibroblastos expostos a um meio de cultura com HA. As células proliferaram em contato com a HA embora tenham mostrado um atraso de cerca de 24 horas nas culturas tratadas com o material em relação ao controle (células cultivadas sem HA). Durante todo o experimento, a viabilidade celular do grupo controle foi menor, porém após o sexto dia de cultivo celular, não ocorreu mais esta diferença estatística. Como conclusão os autores enalteceram que ocorreu a comprovação de que *in vitro* a HA é um material biocompatível e que o atraso na proliferação celular ocorreu provavelmente pela presença dos cristais que competiram pelo espaço nas placas.

Em estudo *in vivo* a biocompatibilidade da HA comercializada foi comparada com uma nova HA desenvolvida. Os materiais foram aplicados no tecido muscular e na tíbia de ratos. A HA tanto comercial como a desenvolvida no laboratório de

maneira cuidadosa foram totalmente biocompatíveis com a tíbia do rato e ainda ocorreu continuidade entre hidroxiapatita artificial e osso natural. Não foi encontrada diferença significante entre o comportamento biológico da hidroxiapatita preparada a partir de pó da partícula comercial ou da nova hidroxiapatita testada pelos autores (Denissen et al., 1980).

Outra característica deste material é a capacidade de mineralização. A hidroxiapatita associada a outros materiais promove a diferenciação óssea a partir de osteoblastos derivados de células-tronco de polpa dental (Akkouch et al., 2013). Akkouch et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de projetar uma nova matriz para aplicação em implantes ósseos. Essa matriz era composta por hidroxiapatita, colágeno e um compósito denominado poly (l-lactide-co-ε-caprolactone). Esse conjunto foi conjugado com osteoblastos humanos, obtidos através da diferenciação de células-tronco da polpa dental. Os resultados mostraram que houve um aumento da mineralização do tecido onde o conjunto foi aplicado, revelando a eficácia desta matriz que continha hidroxiapatita para diferenciação óssea.

Recentemente algumas pesquisas com hidroxiapatita foram realizadas utilizando principalmente a HA em tamanho nanométrico. A Nanotecnologia engloba o desenvolvimento de materiais em uma escala atômica e molecular menor que 100nm o que faz com que os nanomateriais apresentem propriedades diferenciadas em relação aos demais materiais (Gleiter, 2000).

A Nanopartícula de Hidroxiapatita ($Ca10(PO4)_6(OH)_2$) (HAp) é um material novo e ainda não disponível para a prática clínica, porém pesquisas tem demonstrado que este é um material biocompatível, com características de bioatividade e baixa solubilidade (Sadat-Shojai et al., 2011).

A hidroxiapatita na natureza é um dos principais componentes presente em tecidos duros (Figura 2.1) (Cunha, 2010; Zakaria et al., 2013). E este material quando sintetizado em escala nanométrica possui propriedades semelhantes à hidroxiapatita natural (Zakaria et al., 2013).

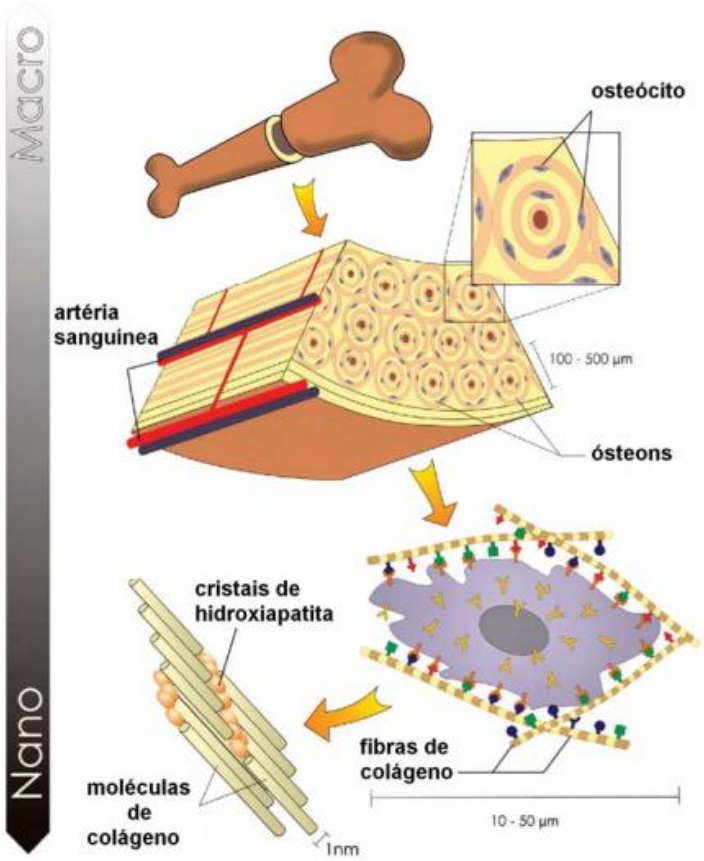


Figura 2.1 - Estrutura óssea apresenta a composição do osso em diferentes escalas de tamanho (Cunha, 2010)

As nanopartículas de hidroxiapatita têm o potencial de aderir à membrana dos glóbulos vermelhos, modificando a aparência dessas células, gerando depressões sobre a superfície da membrana sem causar ruptura da bicamada lipídica. Elas tem também o potencial de influenciar a diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas (Han et al., 2012).

Estudo avaliando células-tronco obtidas da medula óssea de coelho e células provenientes de osteossarcoma mostrou que o tamanho das partículas de hidroxiapatita tem influência na proliferação celular e diferenciação óssea. Quanto menor o tamanho das nanoparticulas (neste caso 20nm), maior o potencial para estimular a formação óssea e inibir o crescimento de células de osteossarcoma (Cai et al., 2007).

As nanopartículas de HA foram analisadas em linhagem de fibroblastos de camundongos (L929). A resposta desta linhagem celular em contato com as nanopartículas esféricas e a hidroxiapatita disponível comercialmente foi

investigada. As nanopartículas esféricas de HA se mostraram mais biocompatíveis em comparação com a hidroxiapatita disponível comercialmente (Fu et al., 2008).

O ensaio com MTT (brometo de 3 – [4,5- dimetil -2- tiazolil] -2,5- difenil-tetrazólio) foi realizado no estudo de Chen et al. (2011) para verificar a proliferação e viabilidade celular de fibroblastos de camundongos em contato com nanopartículas de HA com a superfície tratada ou não com ácido dodecanóico. Os resultados do teste indicaram que a HAp de 100nm de comprimento e 20nm de diâmetro, quando tratada com o ácido dodecanoico, apresenta partículas com tamanho aumentado para 150nm em comprimento e 50nm de diâmetro. Evidenciaram também que independentemente dos diferentes tipos (com superfície tratada ou não) e concentrações de HAp, os fibroblastos apresentaram um aumento de proliferação celular e inibição do dano da membrana celular. E quando estes resultados foram comparados com o grupo controle (células cultivadas com poliestireno) houve uma maior viabilidade e proliferação celular encontradas em osteoblastos, tratados com as nanopartículas de HA.

Também para testar a biocompatibilidade das nanopartículas de hidroxiapatita *in vivo*, Gasperini (2010) realizaram um estudo sobre o reparo ósseo da tíbia de coelhos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta tecidual e a biocompatibilidade de esferas de hidroxiapatita em partículas nanométricas em comparação com as esferas de hidroxiapatita produzidas a partir de partículas micrométricas, ambos no estado sinterizado e não-sinterizado (sem tratamento térmico). Os materiais foram implantados em defeitos ósseos nas tíbias de 12 coelhos. As esferas (425 – 600µm) tiveram as propriedades físicas e químicas caracterizadas por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho de Fourier (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e foram submetidas ao teste de dissolução. Concluiu-se que todos os materiais se mostraram biocompatíveis e osteocondutores, porém a neoformação óssea foi mais acentuada nos grupos de hidroxiapatita e nanohidroxiapatita não-tratadas termicamente.

As nanopartículas de HA (Hap) podem ser usadas de forma eficaz para o tratamento de doenças ósseas tais como a osteoporose. Quando produzidas em escala nanométrica, as partículas têm como vantagem o aumento da área de superfície, melhorando o processamento celular (Fox et al., 2012).

Na odontologia, as HAp mostraram a sua capacidade de infiltrar a estrutura de colágeno presente na dentina desmineralizada. Isto foi evidenciado através de

estudo utilizando pré-molares humanos, extraídos por motivos ortodônticos, estimulando a remineralização do tecido dentinário com este material. Neste caso, as amostras de dentina foram completamente desmineralizadas em ácido fórmico. A matriz de colágeno restante das amostras de dentina foi infiltrada com uma gama de nanopartículas de sílica coloidal e de soluções de HA. A avaliação da infiltração foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia por dispersão de raios X de energia (EDS) de digitalização (Besinis et al., 2012).

Lopes (2012) avaliaram a biocompatibilidade das mesmas nanopartículas de hidroxiapatita utilizadas em nosso estudo quando inoculadas subcutaneamente em ratos. Para tanto os autores utilizaram 30 ratos machos (Wistar) que receberam 0,30 gramas de hidroxiapatita nanoparticulada na região do dorso e avaliaram após 03, 07, 14, 21, 45 e 60 dias de tratamento. Os autores afirmam que o material foi totalmente reabsorvido após 45 dias.

Su et al. (2005) realizaram estudo *in vivo* utilizando nanopartículas de hidroxiapatita como agente direto de proteção pulpar em dentes de cães. Alterações histológicas no local de exposição pulpar foram analisadas nos períodos de 7, 30 e 60 dias de pós-operatório. Observou-se a formação de dentina reparadora e ligeira resposta inflamatória durante o processo de cicatrização do tecido pulpar quando comparado com o hidróxido de cálcio. Contudo, os resultados indicaram que as nanopartículas de hidroxiapatita possuem biocompatibilidade com o tecido pulpar, mas quando se trata da formação de ponte de dentina, não são tão eficazes quanto o hidróxido de cálcio.

Em resumo, de um modo geral, as nanopartículas de HA sintéticas estão sendo muito procuradas por apresentarem semelhança à HA natural encontrada no tecido mineralizado humano (Zakaria et al., 2013). Mas, a resposta tecidual pode ser afetada pelo tamanho das partículas de HA. Nesse sentido, as partículas de HA menores que 100nm são desejáveis porque elas contribuem para uma melhor adesão, crescimento celular, e compatibilidade com o hospedeiro (Zakaria et al., 2013).

2.3 Testes de Biocompatibilidade – legislação de detalhes técnicos

Uma grande preocupação existente antes da comercialização de materiais terapêuticos é referente aos possíveis efeitos adversos provenientes destes materiais que entram no mercado comercial odontológico sem terem sido submetidos a um programa rigoroso e extenso de testes laboratoriais. Nessas condições, novos materiais podem, assim, chegar ao mercado e ao paciente, com efeitos mais prejudiciais do que benéficos. Entretanto, no momento se dá a necessária e obrigatória importância aos testes biológicos, não concebendo comportamentos empíricos e relapsos, sendo possível fazer-se nos laboratórios especializados das universidades e da indústria farmacêutica uma avaliação racional quanto aos aspectos reacionais dos medicamentos e materiais odontológicos (Oliveira, 2000; Boaventura et. al., 2012).

A indicação de qualquer material odontológico deve ser baseada em suas propriedades físicas e biológicas, reveladas pela sequência de testes de biocompatibilidade inicialmente *in vitro* e posteriormente *in vivo* em animais e depois em humanos. No entanto, os resultados destas metodologias podem não ser conclusivos, mas devem servir de base para a recomendação do uso clínico dos materiais (Busato et al., 1997).

A caracterização por si só do biomaterial não habilita o seu uso como biocomponente. Assim sendo, os testes laboratoriais como ditos anteriormente *in vitro* e posteriormente *in vivo*, devem ser realizados. Estes testes sempre devem ser realizados seguindo normas técnicas e éticas, de forma que os testes *in vivo* serão realizados somente se os resultados dos testes *in vitro* forem satisfatórios. Caso ocorram reações tóxicas no componente celular do teste *in vitro* a possibilidade deste material ser utilizado como um biomaterial é questionada, podendo ser descartada em muitos episódios (Pereira, 2008).

Os ensaios de biocompatibilidade na grande maioria dos estudos são realizados segundo a norma ISO 10.993-5. Essa norma descreve métodos com o objetivo de avaliar biologicamente dispositivos médicos e odontológicos e a parte 5 trata da avaliação da citotoxidade *in vitro*. E ainda as exigências legais da ANVISA (norma RDC nº56/2001), são descritas da seguinte maneira: “os produtos para saúde devem ser projetados e fabricados de forma que seu uso não comprometa o

estado clínico e a segurança dos pacientes, nem a segurança e saúde dos operadores ou, quando for o caso, de outras pessoas, quando usados nas condições e finalidades previstas. Os possíveis riscos existentes devem ser aceitáveis em relação ao benefício proporcionado ao paciente e devem ser reduzidos a um grau compatível com a proteção à saúde e a segurança das pessoas". Segundo a norma RDC nº56/2001 da Anvisa, os fatores de risco para um determinado material em contato com o organismo seriam como exemplo a toxicidade, incompatibilidade biológica, contaminantes residuais, entre outros (Resolução RDC n° 56/2001).

Assim, a resposta biológica de células de mamíferos deve ser avaliada *in vitro* utilizando parâmetros biológicos adequados (ISO, 1992) como colocar o material de forma direta ou indireta sob a cultura celular de mamíferos, monitorando alterações, entre as quais a incorporação de corantes vitais (MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio) ou MTT (brometo de 3 – [4,5- dimetil -2- tiazolil] -2,5- difenil- tetrazólio).

Nesse sentido, o parâmetro mais comumente utilizado para aferir a toxidade é a viabilidade celular, sendo possível diferenciar células vivas ou mortas, utilizando um corante vital. Ao expor células em cultura a este corante é possível visualizar a intensidade da cor desenvolvida diretamente proporcional ao número de células presentes no meio, ou seja, quanto mais intensa a cor, mais células viáveis estão presentes no meio de cultura em conjunto com o corante vital (Ciapetti et al., 1996; Rogero et al., 2000; Rogero et al., 2003).

A diferença entre os testes de viabilidade celular MTT e MTS é a estrutura dos corantes vitais. O MTT é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial resultando em um sal de formazan de cor púrpura. Esta redução ocorre somente nas células vivas. Assim sendo, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados. A desvantagem da utilização deste corante é a necessidade do uso de solventes orgânicos como o DMSO ou o isopropanol para dissolver os cristais de formazan que são insolúveis em água (Nozaki et al., 2012). O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT, pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazan, porém os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário (Nozaki et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a biocompatibilidade das nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) comparando-as com o Agregado Trióxido Mineral (MTA) em contato com células de polpa dental.

3.1 Proposições Específicas

1) Avaliar a proliferação e a viabilidade de células de polpa dental expostas a diferentes concentrações de HAp e de MTA.
2) Avaliar a capacidade de migração de células de polpa dental em direção às HAp e ao MTA.
3) Avaliar o potencial de mineralização de células de polpa dental expostas aos materiais estudados (HAp e MTA).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FOUSP, parecer 205.708 (Anexo A).

4.1 Biomateriais Utilizados

As nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Giancarlo Brito do Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de São Paulo e apresentam tamanho de 50nm por 21nm por 2nm e morfologia no formato de placas ovais (Figura 4.1). Esse material pode ser utilizado em pó, líquido, blocos com variados formatos e, também, em forma de pasta.

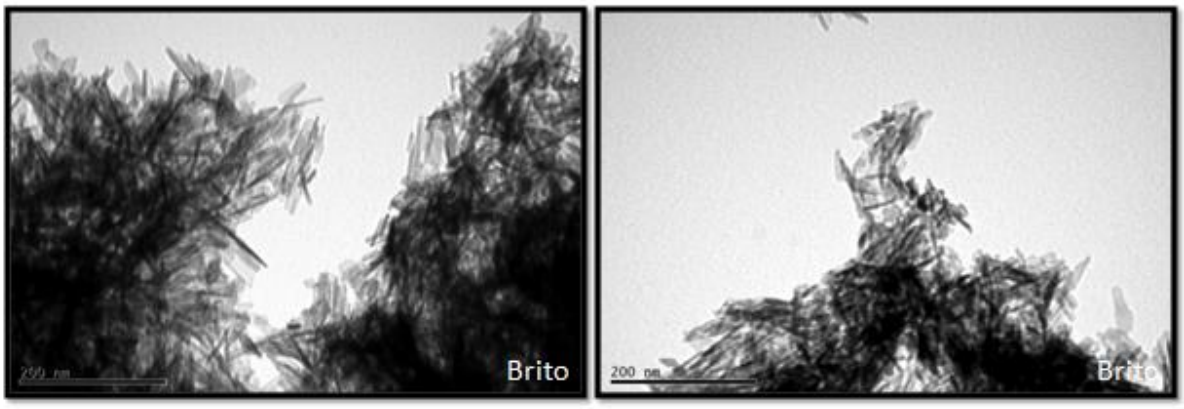


Figura 4.1 - Aparência das nanopartículas desenvolvidas pelo Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Imagem capturada por microscopia eletrônica de transmissão

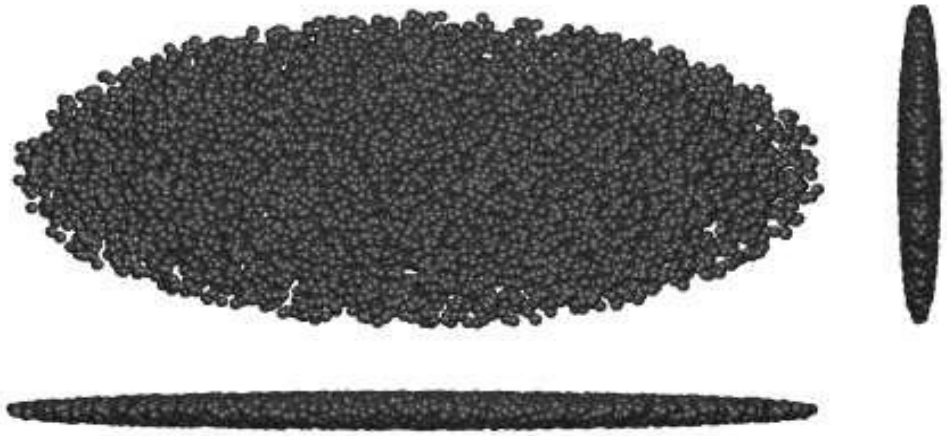


Figura 4.2 - Morfologia das nanopartículas de hidroxiapatita utilizadas neste estudo

A Figura 4.2 é parte do resultado obtido pela análise computacional das curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS - Small Angle X rays Scattering) das nanopartículas de hidroxiapatita utilizadas neste trabalho (Comunicação verbal 1)[1].

A síntese de partículas de HA de tamanho nanométrico foi realizada utilizando o processo de coprecipitação, seguindo os critérios metodológicos de Mamani, (2009).

Antes de expor o material com as células em cultivo, a esterilização das nanopartículas de hidroxiapatita foi realizada em autoclave a 123ºC durante 20 minutos. Nesse estudo utilizamos as HAp na forma de pasta na maioria dos ensaios com exceção do ensaio de migração no qual utilizamos as HAp na forma de pó.

O MTA utilizado nos experimentos foi comprado. O mesmo é comercialmente fabricado pela Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A e os lotes utilizados foram nº. 21045 e 25695.

[1] Informação obtida de Brito et al. Em artigo em desenvolvimento.

4.2 Cultivo Celular

Foram utilizadas células derivadas de polpa dental de terceiros molares humanos que foram cultivadas em garrafas de cultivo T75. As células ficaram no meio de cultura de manutenção que foi constituído de αMEM (Minimum Essential Medium Eagle – α modification, Sigma®, M4526) com 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, A5955), 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco®), 100µl de ácido ascórbico e 1% L-Glutamina (Glutamax^{TM}, Gibco®, 35050061). Este meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. O monitoramento do crescimento celular foi realizado através de microscópio invertido de fase e aspectos como vitalidade celular, coloração e aspecto do meio foram analisados.

Quando as células atingiram 80% de confluência elas foram subcultivadas ou congeladas de acordo com a necessidade dos experimentos realizados.

Para tanto, após atingirem 80% de confluência na garrafa, as células foram sub-cultivadas de acordo com a necessidade de novas garrafas. Para tanto, a monocamada celular foi lavada com PBS, sem cálcio e magnésio pH 7,2 e as células foram separadas com a solução de tryple E (Invitrogen) em temperatura de 37ºC. As células em suspensão foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura fresco tanto para aquisição de alíquotas para novo crescimento celular quanto para congelamento quando necessário.

4.3 Avaliação por MTS (proliferação e viabilidade)

Este ensaio foi realizado segundo a norma ISO 10.993-5 (Avaliação biológica dos dispositivos médicos – Parte 5: Ensaios de citotoxidade *in vitro*) (ISO, 1992).

O plaqueamento foi realizado em triplicata. $3{,}5x10^3$ células provenientes de população heterogênea da polpa dentária de terceiros molares foram plaqueadas em cada poço de placas de 96 poços contendo 100µl meio de cultura. Os grupos experimentais foram (Figura 4.3):

Grupo 1: Células com pasta de HAp diluída em meio de cultura

Grupo 2: Células com MTA diluído em meio de cultura

Grupo 3: Células com somente meio de cultura (controle)

Após 24 horas do plaqueamento das células foi realizada a exposição da linhagem celular aos materiais (HAp e MTA). Primeiramente foi preparada uma solução de material na concentração de 0,1g/ml diluído em meio de cultura, proporção preconizada pela norma ISO 10.993-12 (ISO, 1996). Esta solução foi diluída em 3 diferentes concentrações (1/10, 1/100 e 1/1000).

A solução de meio de cultura tratada com o biomaterial de acordo com as diferentes diluições foi depositada na placa de cultivo celular. Após 24 horas em estufa, foi retirado o meio de tratamento, as células foram lavadas 3 vezes com PBS (1x) e meio de cultura de manutenção foi adicionado aos poços. Este teste de citotoxicidade avalia a viabilidade celular, em resposta imediata ou em curto prazo (Freshney, 2000), assim o período de exposição da cultura aos cimentos, no presente estudo, foi de 24 horas.

A viabilidade celular foi mensurada pela incubação com corante vital MTS incubado por 3 horas. Após o período de incubação em cada dia de análise, a velocidade de crescimento e multiplicação celular foi medida indiretamente. A quantidade de MTS metabolizada pela população de células foi diretamente proporcional ao número de células viáveis. Para realizar essa medida a placa foi levada a um leitor de Elisa (espectofotômetro) (EL_X800 Universal Microplate Reader, Bio-Tec Instruments, INC), para placas de 96 poços, utilizando filtro de 490nm para leitura das densidades ópticas, utilizando o programa de leitura (KC Junior).

Para avaliar o potencial de proliferação celular foram realizadas leituras nos seguintes períodos de análise: 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias e 8 dias após o tratamento.

Este experimento foi realizado com populações mistas de polpa dental na terceira passagem e em triplicata para cada dia de análise.

Os dados de valor de absorbância obtidos foram armazenados em planilha do programa Microsoft Excel 2007 para posterior análise estatística.

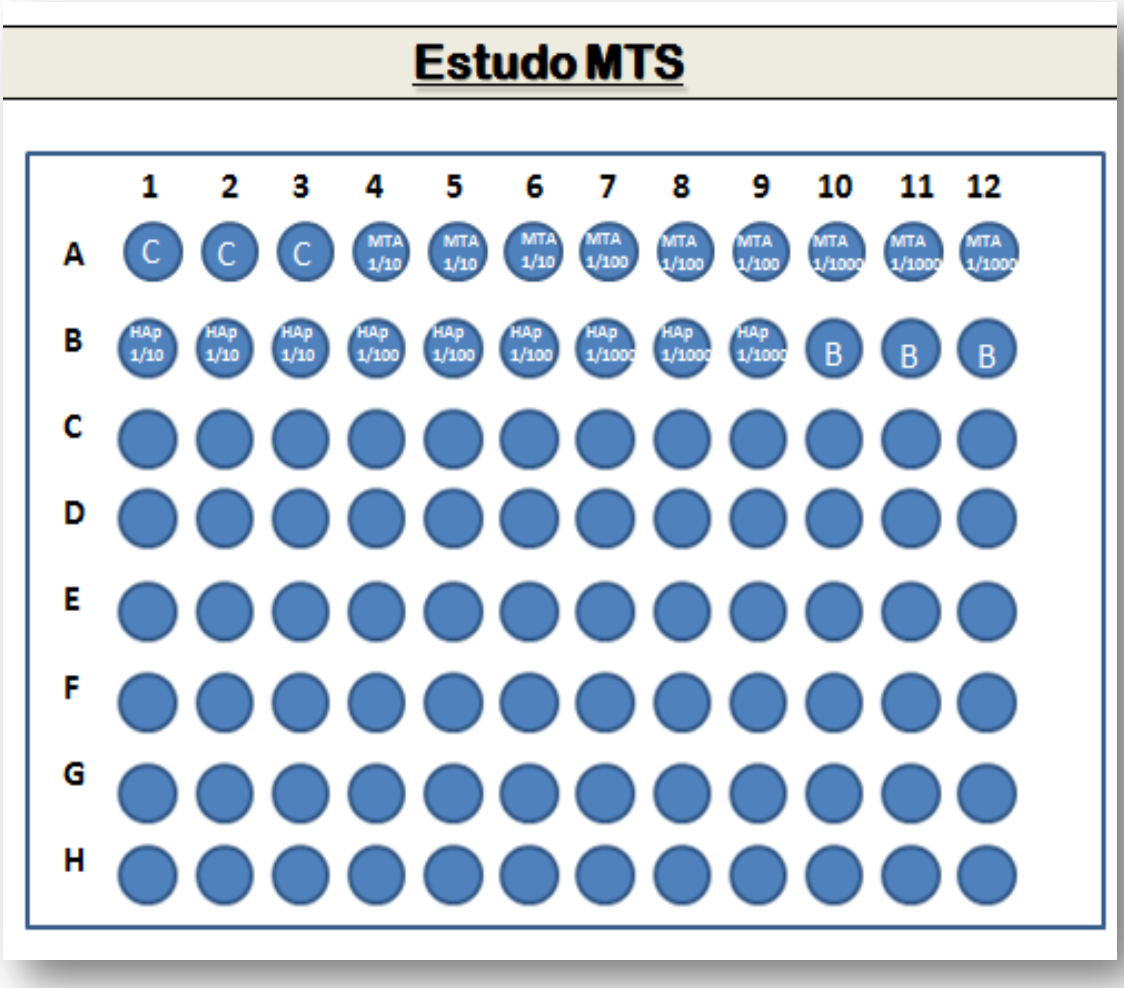


Figura 4.3 - Esquema de plaqueamento do ensaio com MTS em placa de 96 poços. C = Grupo controle, células cultivadas sem biomaterial. HAp = Grupo plaqueado com nanopartículas de hidroxiapatita. MTA = Grupo plaqueado com agregado trióxido mineral. B = branco (meio de cultivo+ MTS)

4.4 Análise Estatística do Ensaio de MTS

Os valores armazenados na planilha do Excel foram transferidos para o programa Origin 8 para a realização da análise estatística. Foram calculados o

desvio padrão e o desvio padrão da média (barra de erro) das amostras. De posse das médias e erros estatísticos, foram realizados testes de compatibilidade z aos pares, através da comparação entre ($a \pm \sigma_a$) e ($b \pm \sigma_b$) sendo as médias **a** da amostra 1 e **b** da amostra 2; e σ_a e σ_b as respectivas barras de erro. As comparações realizadas foram: 1) MTA versus controle; 2) HAp versus controle e 3) MTA versus HAp com resultados com valor de z maior ou igual a 1 considerados estatisticamente discrepantes. Vale lembrar que o valor de z maior ou igual a 1 representa o parâmetro mais rigoroso do teste utilizado. Nesse mesmo teste, poderíamos considerar discrepantes valores de z até 3.

$$Z = \frac{|a - b|}{\sqrt{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}}$$

4.5 Ensaio de Migração Celular

Para esse ensaio, $1x10^4$ células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços, previamente demarcadas com uma linha para identificar a área a ser raspada para remoção das células. Após as células atingirem 90 a 100% de confluência do poço, monitoradas por microscópio invertido de fase, a metade do poço demarcada foi raspada com uso de raspador celular (*cell scraper,* TTP®, código 99002) e ponteira de 1ml estéril com a ponta ativa cortada em aproximadamente metade de seu comprimento para a remoção de todas as células presentes nesta área.

Na área onde foram removidas as células, foi acomodada uma lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro, previamente tratada com colágeno contendo HAp ou MTA (Figura 4.4). As lamínulas foram colocadas a 2mm da linha de raspagem das células.

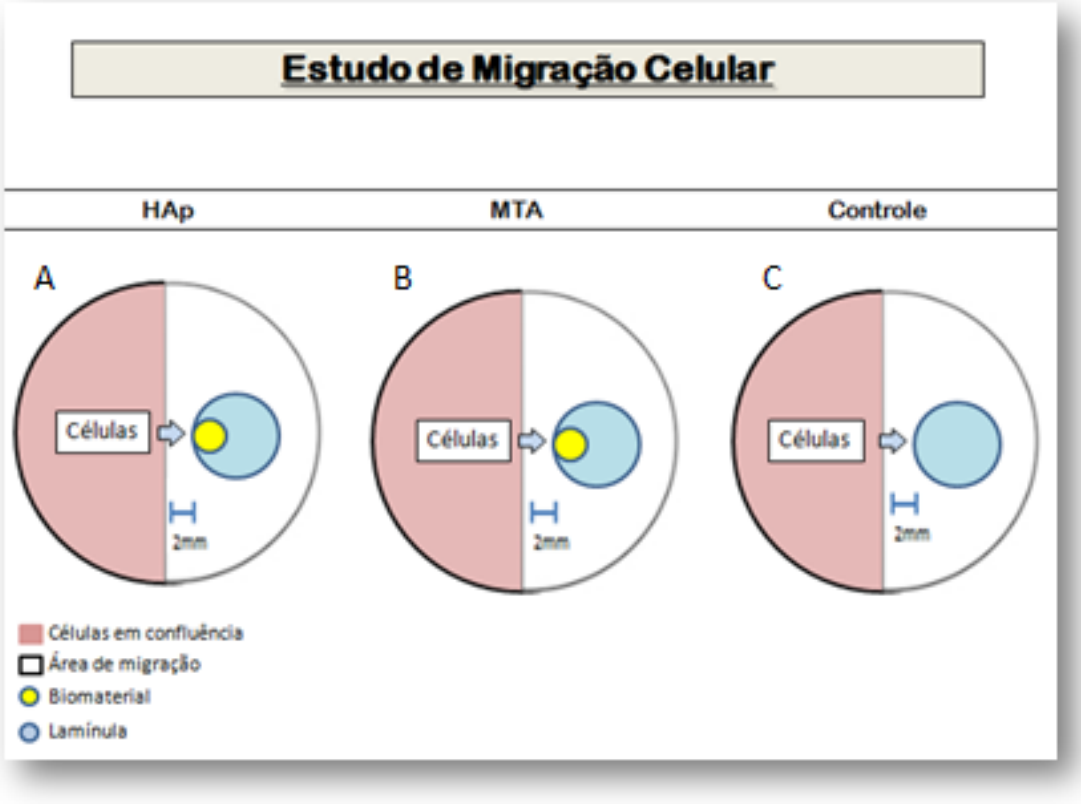


Figura 4.4 - Ensaio de Migração Celular e grupos analisados. A, lamínula com HAp e colágeno. B, lamínula com MTA e colágeno. C, lamínula somente com colágeno

Para o preparo das lamínulas, 4µl de colágeno (Millipore Indústria e Comércio Ltda, lote: pso1748640) foi colocado sobre a lamínula. A lamínula contendo o colágeno foi colocada na estufa a 37ºC por 15 minutos para a geleificação do colágeno, de forma que não ocorresse total solidificação do mesmo, para o biomaterial penetrar no colágeno. Após este período o biomaterial foi colocado sobre o colágeno e novamente a lamínula foi então colocada na estufa a 37ºC por 5 minutos, para que o colágeno terminasse de solidificar e o material apresentasse uma melhor aderência ao colágeno. Posteriormente, as lamínulas foram acomodadas nos poços contendo as células à 2mm da linha de demarcação.

Testes prévios foram realizados para padronizar o tempo de geleificação/solidificação do colágeno e a quantidade de colágeno e do biomaterial acima citados.

Inicialmente foi testada a quantidade de colágeno. Para tanto, as lamínulas foram colocadas em uma placa petri e então gotas de colágeno foram inseridas

sobre as lamínulas nas seguintes quantidades: 2, 3, 4 e 5µl. Em seguida testamos a quantidade do biomaterial na gota (0,03g, 0,02g, 0,01g e 0,008g). O passo seguinte foi testar o tempo de solidificação do colágeno em estufa e o tempo para inserir o biomaterial na gota de colágeno. Assim, foram testados períodos de 3, 5, 10 e 15 minutos, antes da inserção do biomaterial e após a inserção períodos de 2, 3, 4 e 5 minutos.

No teste para padronizar a quantidade dos materiais, 4µl de colágeno foi o que melhor se adaptou com a quantidade de biomaterial utilizada, 0,010g para as nanopartículas de hidroxiapatita e 0,008g do MTA.

A migração celular foi monitorada a cada 24 horas por um período até que ocorresse a migração total das células em direção ao material sobre a lamínula. Em todos estes períodos foram capturadas imagens utilizando microscópio Nikon Ecclipse TS100. As características da tomada fotográfica como distância do foco e intensidade de luz, tempo de exposição e ganho foram padronizadas e controladas.

Este experimento foi realizado com populações mistas de polpa dental em terceira passagem e em triplicata.

4.6 Análise de Diferenciação em Tecido Mineralizado

A análise de diferenciação em tecido mineralizado foi efetuada das seguintes formas, analisando: 1º) as células migratórias que entraram em contato com o biomaterial e colágeno, 2º) as células cultivadas com os biomateriais (HAp ou MTA) em diferentes concentrações (1/10, 1/100, 1/1000) após 1, 2, 4, 6 e 8 dias de contato, e 3º) as células plaqueadas e cultivadas em meio de cultura contendo 1/100 de cada biomaterial após 2 e 10 dias de contato.

Todas as placas foram coradas com alizarina vermelha, com o objetivo de evidenciar a formação ou não de nódulos mineralizados pelas células induzidas pelo biomaterial.

A primeira análise foi efetuada após o término do ensaio de migração celular, quando a área sem células foi preenchida. Todas as placas de ensaio de migração foram coradas com alizarina vermelha, com o objetivo de conhecer a formação ou

não de nódulos de mineralização pelas células migratórias em contato com o biomaterial.

As células foram então lavadas com PBS 1X, e em seguida, foram fixadas com paraformoldeído 4% (1 ml por poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período foram lavadas com PBS 1X com posterior adição de alizarina vermelha (Synth® Lote: 59431) (1ml por poço). A alizarina agiu por um período de 18 horas (*overnight*).

Na segunda análise foram plaqueadas $3,5x10^3$ células, por poço, em placas de 96 poços, cultivadas com HAp ou MTA, diluídos nas concentrações de 1/10, 1/100 e 1/1000. Como controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultura sem adição de biomateriais. Após 1, 2, 4, 6 e 8 dias do tratamento com o biomaterial as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformoldeído 4% (100µl por poço) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS 1X e em seguida coradas com alizarina vermelha (Synth® Lote: 59431) (100µl por poço). A alizarina permaneceu nos poços por um período de 18 horas (*overnight*).

Na terceira análise foram plaqueadas 10^4 células, por poço, em uma placa de 48 poços (Figura 4.5). Após 48h, as células foram tratadas com os biomateriais em uma concentração de 1/100. Esta concentração foi escolhida com base nos resultados da análise de viabilidade por MTS. Após 2 e 10 dias de cultivo, as células foram coradas com alizarina vermelha como descrito anteriormente por 18 horas (*overnight*).

Em todos os ensaios, após a coloração com a alizarina, as placas foram então lavadas 5 vezes com H_2O MilliQ sob agitação. Em seguida foram capturadas imagens com uso do microscópio Nikon Eclipse TS100. As características da tomada fotográfica como distância do foco e intensidade de luz, tempo de exposição e ganho foram padronizadas e controladas.

Todos esses experimentos foram realizados com populações mistas de polpa dental em terceira passagem e em triplicata.

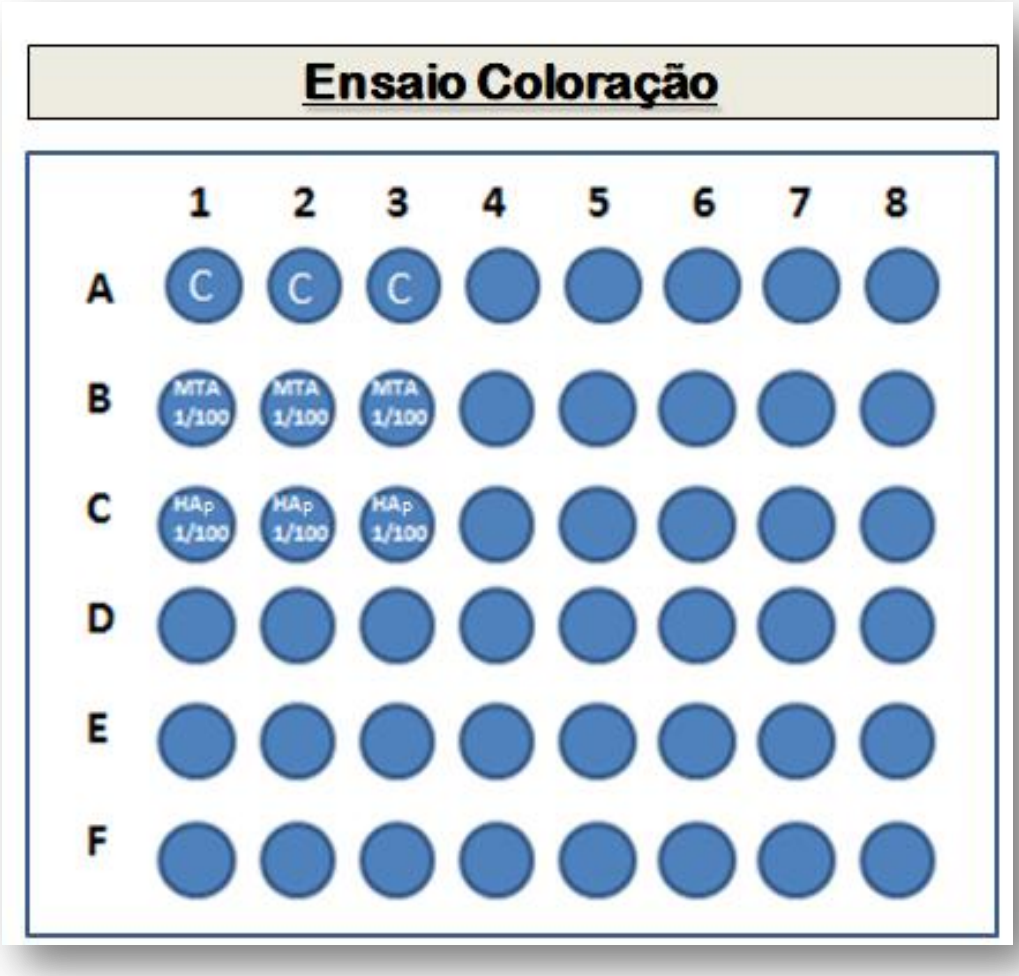


Figura 4.5 - Esquema da placa de análise de diferenciação em tecido mineralizado com coloração alizarina vermelha

5 RESULTADOS

Inicialmente foi realizado o teste de proliferação e viabilidade celular pela técnica com MTS, cultivando as células com os biomateriais estudados em diferentes concentrações (1/10, 1/100, 1/1000). Estes testes permitiram a análise da citotoxicidade destes materiais *in vitro*.

Foi possível observar que em todos os grupos, com exceção do Grupo da HAp 1/1000, durante os primeiros 6 dias de cultivo, ocorreu maior proliferação celular dos grupos com tratamento quando comparados com os grupos controle. De um modo geral, as curvas de viabilidade do MTA (todos os grupos) e da HAp 1/100 seguem o mesmo padrão de forma que há um lento aumento na viabilidade das células até o quarto dia, seguido de um aumento acentuado a partir do quarto dia. Após o sexto dia de cultivo, os grupos apresentavam desaceleração ou mesmo queda na viabilidade celular. Nesse período todos os grupos com exceção do MTA 1/10 permaneceram em níveis próximos do controle.

A partir do 6^0 dia era possível observar que as células das amostras já estavam 100% confluentes.

Os Grupos MTA 1/10 e 1/100 e HAp 1/100 foram os que tiveram maior proliferação até o quinto dia de cultivo em comparação com os demais grupos estudados.

O grupo HA 1/10 apresentou curva viabilidade celular muito semelhante ao controle. Interessantemente, o grupo da HA 1/1000 que permaneceu abaixo do controle em todo o período de observação, mostra um aumento substancial da viabilidade celular após o quinto dia de cultivo.

Podemos visualizar estes resultados nos gráficos 5.1, 5.2 e 5.3 abaixo:

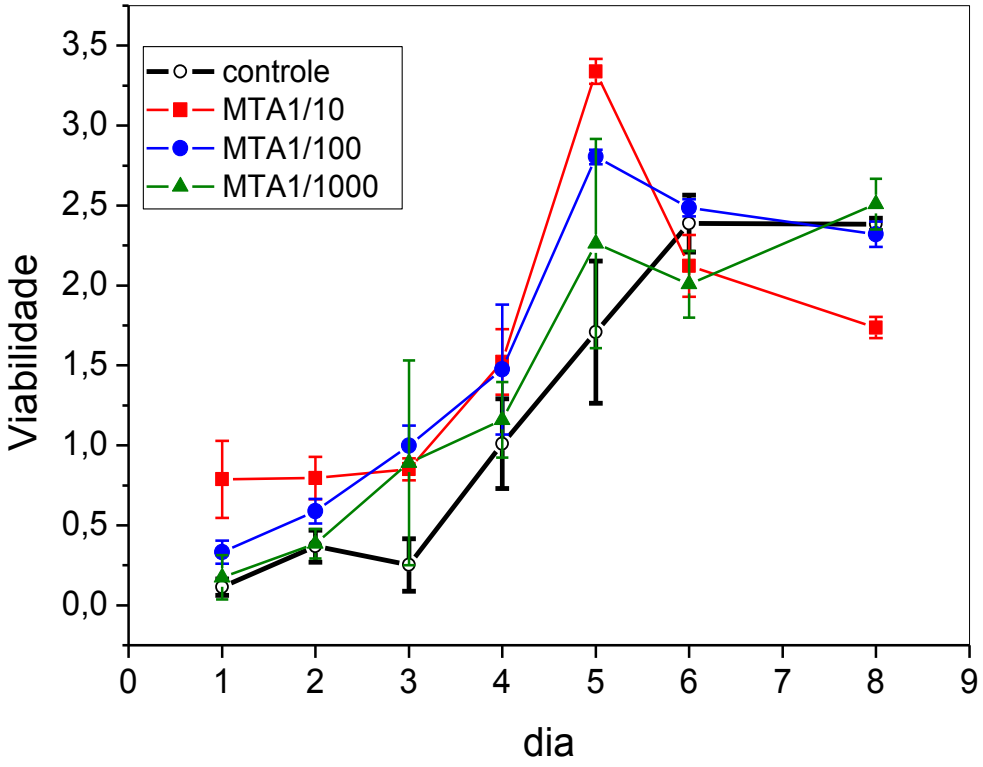


Gráfico 5.1 - Análise comparativa do ensaio de proliferação e viabilidade celular das células de população mista de polpa dental tratadas com três diferentes concentrações de MTA (1/10, 1/100 e 1/1000) do 1º ao 8º dia de cultivo celular

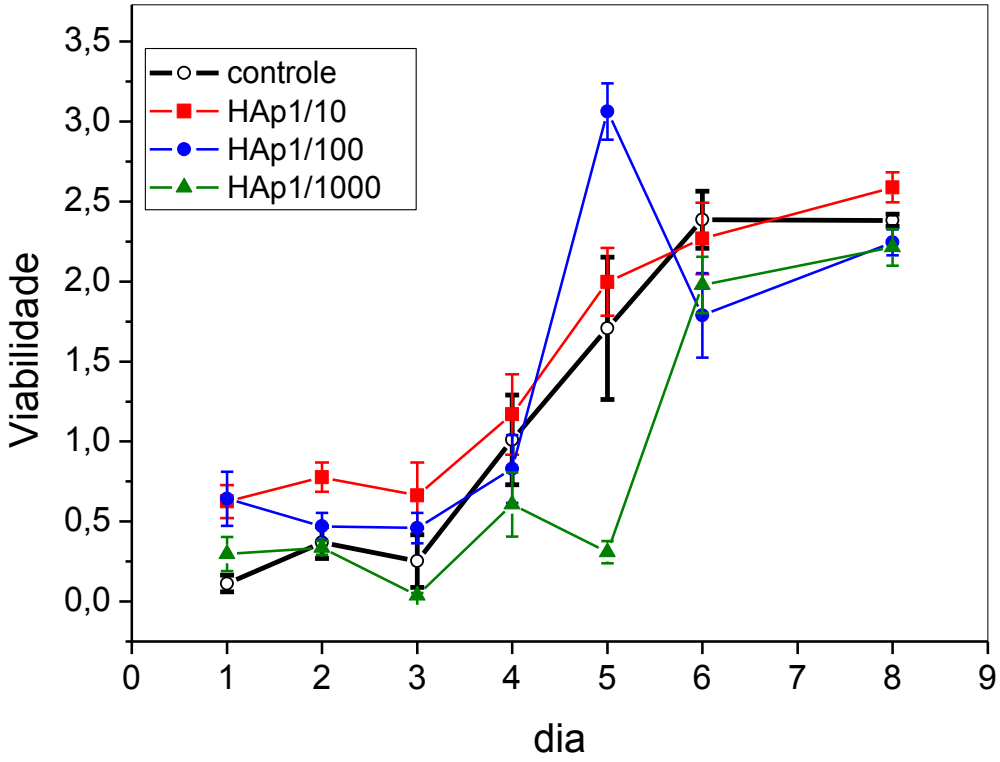


Gráfico 5.2 - Análise comparativa do ensaio de proliferação e viabilidade celular das células de população mista de polpa dental tratadas com três diferentes concentrações de HAp (1/10, 1/100 e 1/1000) do 1º ao 8º dia de cultivo celular

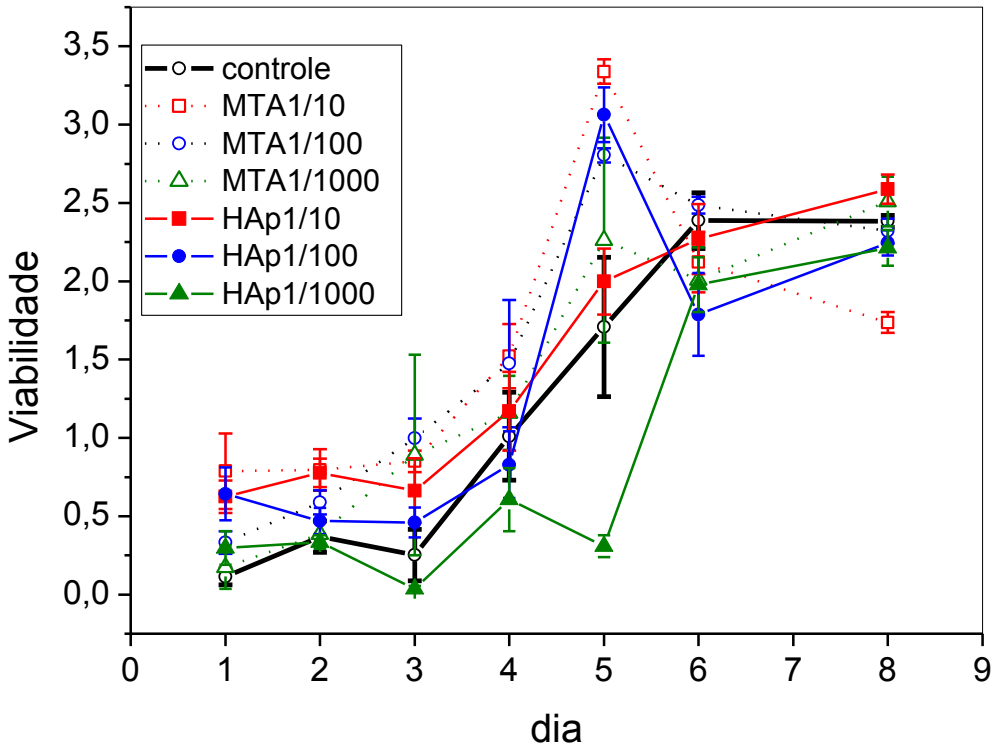


Gráfico 5.3 - Análise comparativa do ensaio de proliferação e viabilidade celular das células de população mista de polpa dental tratadas com três diferentes concentrações de HAp e MTA (1/10, 1/100 e 1/1000) do 1º ao 8º dia de cultivo celular

Após a análise comparativa dos dados foi realizado o teste z de compatibilidade. A Tabela 5.1 relaciona estatisticamente a compatibilidade (teste z) entre as amostras estudadas (controle, MTA e HAp). Valores de $z \leq 1$ (teste para 1 sigma, ou seja, valor da barra de erro) podem ser considerados estatisticamente semelhantes. O oposto, ou seja, z maior ou igual a 1 são portanto, considerados estatisticamente diferentes.

Tabela 5.1 - Teste z de compatibilidade (1sigma) entre as culturas controle, MTA e HAp

Dia	Compatibilidade (controle/MTA)			Compatibilidade (controle/HAp)			Compatibilidade (MTA/HAp)		
	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000
1	2,74	2,50	0,423	4,45	3,00	1,55	0,622	1,69	0,695
2	2,57	1,74	0,118	3,01	0,777	0,310	0,118	1,04	0,486
3	3,35	3,60	0,967	1,56	1,09	1,30	0,866	3,420	1,34
4	1,48	0,941	0,407	0,423	0,518	1,17	1,09	1,41	1,79
5	3,61	2,45	0,702	0,590	2,83	3,11	5,95	1,43	2,97
6	1,01	0,534	1,38	0,412	1,88	1,64	0,450	2,59	0,107
8	8,44	0,703	0,777	2,05	1,55	1,40	7,45	0,667	1,51

*Caixa branca – amostras com valores discrepantes (estatisticamente significantes). Os demais (caixas cinza) são estatisticamente semelhantes.

A analise estatística, quando comparamos o MTA com o controle, mostrou que a viabilidade das células cultivadas com MTA 1/10 é estatisticamente significante maior do que a viabilidade encontrada no grupo controle. Essa diferença também estatisticamente significante maior ocorre nos primeiros dias de cultivo no grupo 1/100. Já no grupo 1/1000, a viabilidade celular se assemelha à do grupo controle passando a ser estatisticamente igual.

No caso da comparação entre HAp e controle, verificou-se que viabilidade celular no grupo HAp 1/10 é estatisticamente significante maior que o grupo controle nos primeiros dias de análise. No quarto dia, a viabilidade celular passa a ser estatisticamente semelhante. No grupo 1/100, a viabilidade celular do grupo tratado é igual ao controle nos primeiros dias de tratamento, passando a ser estatisticamente significante maior a partir do quinto dia refletindo o pico de crescimento que ocorre nesse grupo. No grupo 1/1000, houve também uma diferença estatística significante em praticamente todos os períodos da análise, mas nesse caso, essa diferença ocorre em virtude da menor viabilidade das células do grupo tratado, e não o inverso como nos outros grupos tanto do MTA quanto da HAp.

Por fim, quando comparamos o MTA com a HAp, podemos afirmar que na concentração de 1/10, ocorre uma viabilidade estatisticamente significante maior no grupo de MTA 1/10 no quarto e quinto dias de análise, refletindo o pico de crescimento previamente descrito nesse grupo. Na concentração de 1/100, o grupo do MTA apresenta maior viabilidade celular (com diferença estatisticamente

significante) do que o grupo HAp na mesma concentração. Essa situação somente se inverte no quinto dia de cultivo frente ao pico de crescimento visto no grupo HAp 1/100. Na concentração de 1/1000, assim como descrito no parágrafo anterior, também houve uma diferença significante entre os grupos do MTA e da HAp, mas agora por causa do menor numero de células viáveis com HAp 1/1000.

No ensaio de migração celular as placas foram monitoradas por um período de 1 a 10 dias, momento final em que ocorreu total migração de todos os grupos testados. É importante salientar que os materiais testados foram presos às lamínulas de vidro que foram colocadas à 2 mm da linha que margeava as células. Assim, esse período de 10 dias foi o tempo que todos os grupos necessitaram para que as células percorressem esse espaço de 2 mm até chegar na lamínula.

No grupo controle, no primeiro dia de monitoramento das células foi observada pequena migração celular. Após dois dias de cultivo já existia, em comparação com o 1º dia, uma maior quantidade de células que migraram em direção à lamínula e assim sucessivamente. No 4º dia, raras células encontravam-se sobre a lamínula (Figura 5.1L). Após 6 dias, as células apresentavam confluência entre a linha de demarcação e a lamínula de vidro (Figura 5.1O e 5.1R). Nos demais períodos de 7 a 10 dias, pudemos verificar grande quantidade de células sobre a lamínula de vidro.

No grupo do MTA verificamos no 1º dia, migração celular menor em comparação com o grupo controle. Já no segundo dia, esta migração celular estava aumentada de forma similar ao grupo controle. No 3º dia de monitoramento, observou-se algumas células já no interior da lamínula e no 4º dia este número celular tinha aumentado (Figura 5.1K). No 5º dia, já existia confluência entre a linha de delimitação e a lamínula e ainda presença de muitas células no interior da lamínula com o biomaterial. Nos demais dias, observamos um aumento da quantidade de células sobre a lamínula (Figura 5.1Q).

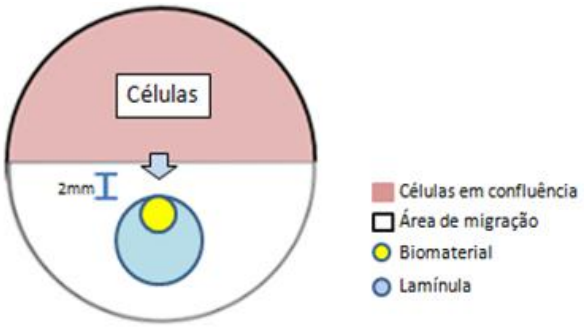
No grupo das HAp houve dificuldade de aderência entre o pó do material e a gota de colágeno prejudicando a realização desse ensaio. A HAp se dispersou na placa de cultura e ficou imersa no meio de cultura. Já no 1º dia observamos que grande parte das HAp aderiram na região onde existia as células, uma pequena parte das partículas se estabeleceu nas imediações da lamínula e uma pequena porção ficou boiando e acabou sendo removida em virtude da troca do meio de cultura celular. Entretanto, a partir do 3º dia percebeu-se a migração das células em

direção à lamínula. No 5º e 6º dia, existiam células próximas à lamínula (Figura 5.1P), e foi possível verificar células migratórias sobre a lamínula em quantidade inferior aos demais grupos após o 6º dia de cultivo.

Em resumo, foi possível constatar que as células nos grupos controle e MTA iniciaram o processo de migração celular mais rapidamente que o grupo tratado com HAp. Mas, apesar da demora, foi possível observar células migratórias para a área acelularizada nas amostras tratadas com HAp. Assim, podemos dizer que no grupo de HAp houve um atraso de aproximadamente 72 horas em relação aos outros grupos. Comparando o grupo do MTA com o controle, podemos dizer que nas primeiras 24 horas, houve um atraso na migração no grupo do MTA, mas esse quadro foi revertido já a partir do dia seguinte (48 horas), visto que o grupo do MTA mostrava mais células em direção à lamínula quando comparado ao controle.

Diferentemente do que ocorreu com as HAp, não ocorreu dispersão do MTA na placa de cultivo.

A Figura 5.1 apresenta o aspecto da migração celular no 4º e 6º dias de monitoramento nos diferentes grupos:


Células
2mm
Células em confluência
Área de migração
Biomaterial
Lamínula

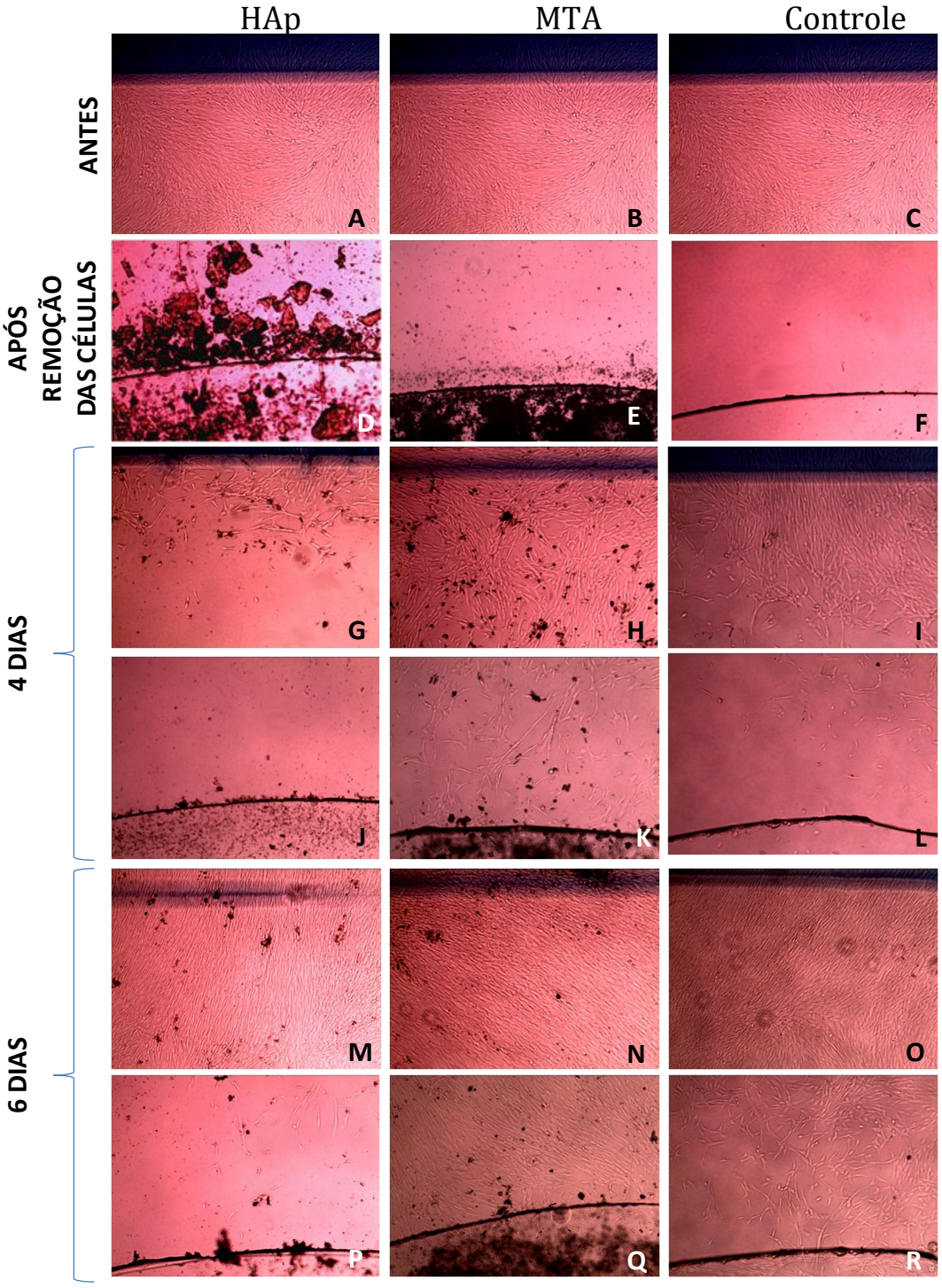

HAp
MTA
Controle
ANTES
APÓS REMOÇÃO DAS CÉLULAS
4 DIAS
6 DIAS
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R

Figura 5.1 - Ensaio de Migração Celular analisado durante 6 dias. A, B e C, área de migração antes da remoção das células. D, E e F, área de migração logo após a remoção das células e adição do biomaterial (HAp, MTA e controle, respectivamente). G, H, I, J, K e L, área de migração após 4 dias de monitoramento. G e J, células migrando em direção a lamínula com HAp. H e K, células migrando em direção a lamínula com MTA. I e L, células migrando em direção a lamínula somente com colágeno. Sendo que nas amostras cultivadas com MTA (H e K) apresentaram maior migração celular em comparação com as células cultivadas com colágeno (I e L), seguidas de células cultivadas com HAp (G e J). M, N, O, P, Q e R, área de migração após 6 dias de monitoramento. M, N e O, apresenta células com total confluência na área próxima à linha de raspagem. P, células próximas a lamínula do grupo de HAp. Q, células totalmente confluentes e em contato com o material (MTA) sobre a lamínula. R, região de migração com uma grande quantidade de células sobre a lamínula do grupo controle

Para analisar se as células apresentavam algum aumento na capacidade de mineralização quando na presença destes materiais, foi realizada a coloração com alizarina vermelha (Figura 5.2). Essa análise foi incialmente realizada durante o ensaio de migração celular para verificar se houve formação de nódulos de mineralização nas células migratórias ou apenas em contato com o material. No grupo das HAp ocorreu a formação de nódulos mineralizados maiores, em maior quantidade e dispersos por toda a placa (Figura 5.2C), enquanto o grupo do MTA exibia nódulos menores e em menor quantidade (Figura 5.2G).

No grupo controle, células cultivadas sem a presença de biomateriais, não foi possível observar a formação de nódulos mineralizados (Figura 5.2K).

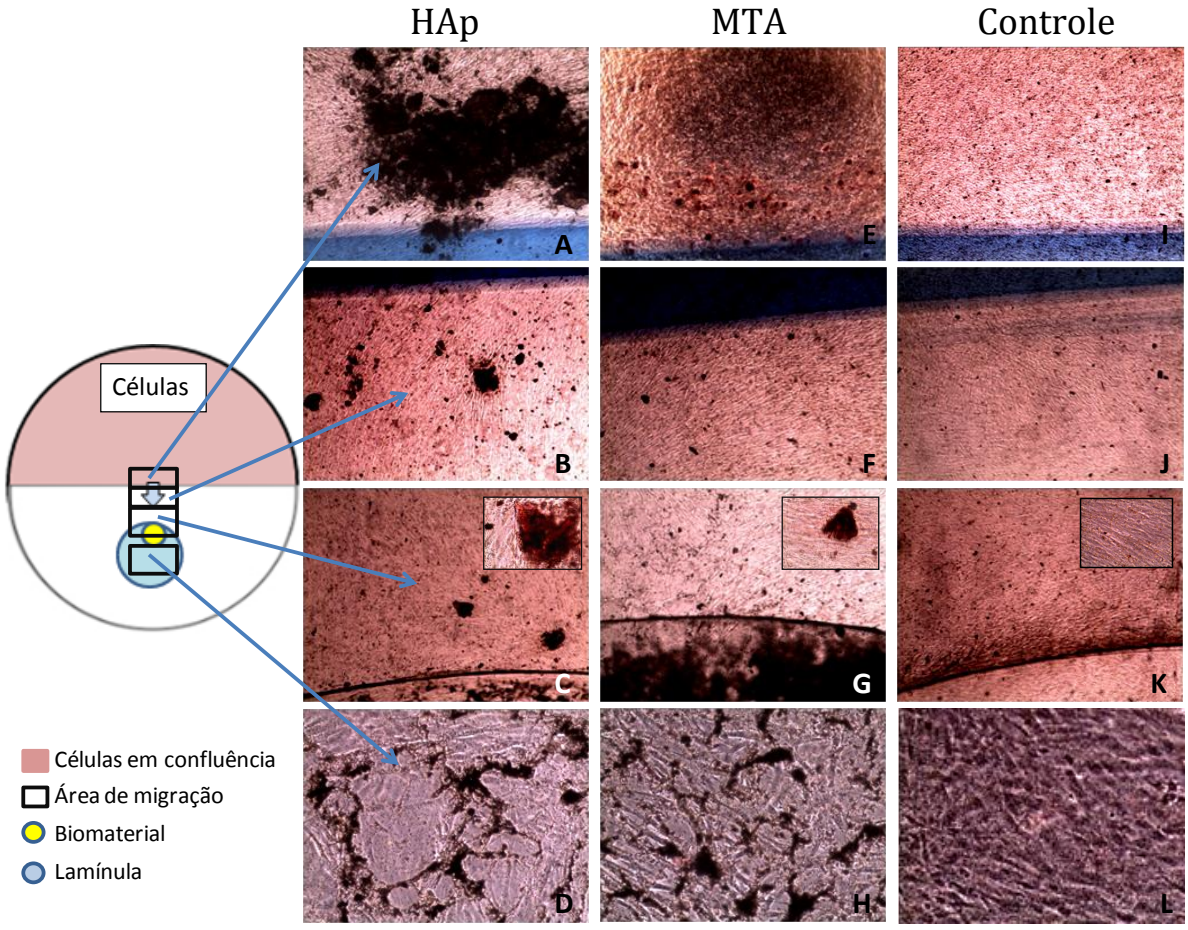


Figura 5.2 - Ensaio de migração celular coradas com alizarina vermelha após 10 dias de cultivo. A-D, células cultivadas com Nanopartículas de hidroxiapatita (HAp). E-H, células cultivadas com Agregado Trióxido Mineral (MTA). A-C, E-G e I-K, aumento de 4x. D, H e L, aumento de 10x

Como no experimento anterior foi utilizado o colágeno para fixar o biomaterial nas lamínulas de vidro, a análise da capacidade de mineralização frente aos materiais foi realizada novamente, mas agora com as células cultivadas no material diluído apenas em meio de cultura. E, para saber se a mineralização encontrada no ensaio de migração era dose dependente, a capacidade de mineralização foi então estudada em diferentes concentrações de biomaterial (1/10, 1/100 e 1/1000). Após 1, 2, 4, 6 e 8 dias, as células foram submetidas a coloração com alizarina vermelha para evidenciação de nódulos de mineralização.

Na concentração de 1/10, foi praticamente impossível verificar a formação de nódulos mineralizados devido a grande quantidade dos materiais (Figura 5.3A e 5.3D) e na concentração de 1/1000, constatamos que a quantidade de HAp e MTA

foi insuficiente para induzir a formação de nódulos mineralizados após os 8 dias de observação (Figura 5.3C e 5.3F).

Assim, consideramos que a concentração de 1/100 era a mais indicada para visualizar as células e os nódulos de calcificação (Figura 5.3B e 5.3E). É importante salientar que a HAp é mais solúvel em meio de cultura do que o MTA. Nesse ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e o tamanho reduzido da área de análise impossibilitou observação temporal das amostras (análises nos dias 1, 2, 4, 6 e 8).

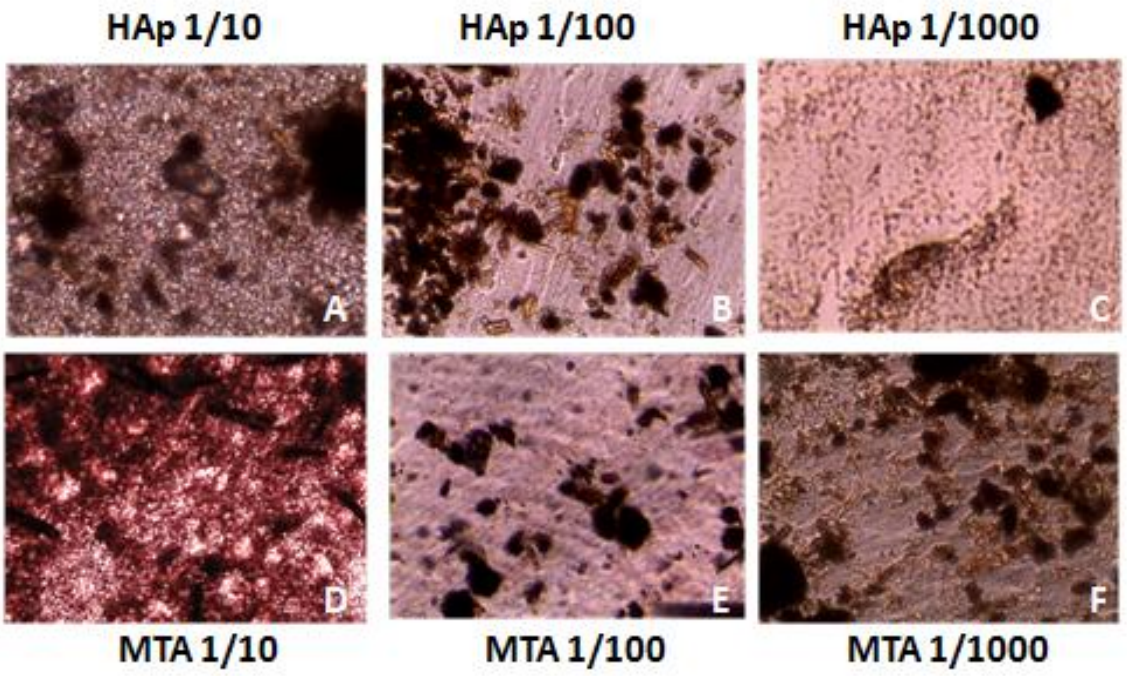


Figura 5.3 - Teste da concentração do biomaterial após 8 dias de cultivo com os biomateriais. A, B e C, concentração de 1/10, 1/100 e 1/1000 de HAp, respectivamente. D, E e F, concentração de 1/10, 1/100 e 1/1000 de MTA, respectivamente

Para confirmar a eficácia da indução de mineralização entre os biomateriais, as células foram então novamente cultivadas na presença dos biomateriais na concentração de 1/100 e analisadas após 2 e 10 dias de cultivo. Mas, nesse ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços.

Após 2 dias, as células de polpa cultivadas com as nanopartículas de HA apresentaram a formação de nódulos de mineralização e cristais maiores que o

grupo tratado com MTA (Figura 5.4A e 5.4B). No 10º dia após o tratamento com os biomateriais foi possível observar que os cristais estavam em tamanho ainda maior e os nódulos de mineralização mais bem delimitados em comparação com 2 dias de cultivo (Figura 5.4D e 5.4E). Não houve formação de nódulos de mineralizaçãoo no grupo controle (figura 5.4C e 5.4F).

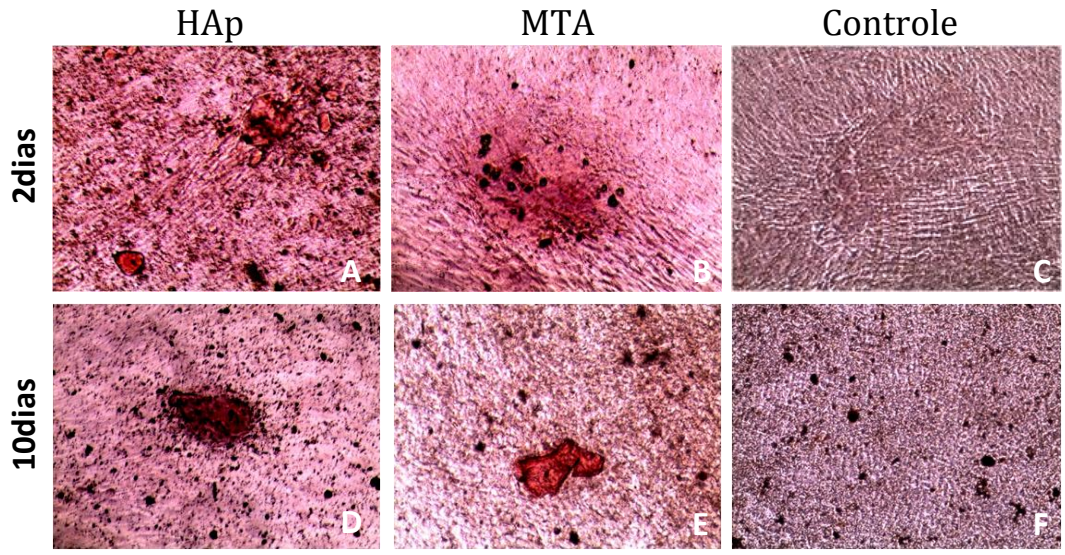


Figura 5.4 - Ensaio de diferenciação celular verificado pela coloração de alizarina vermelha no 2º e 10º dia de cultivo com os materiais. A, B e C, células coradas com alizarina vermelha após 2 dias de cultivo. D, E e F, células coradas com alizarina vermelha após 10 dias de cultivo. Aumento de 10x

6 DISCUSSÃO

Hoje a Odontologia caminha para o uso de técnicas operatórias minimamente invasivas e de materiais odontológicos cada vez mais bioativos e biocompatíveis (Torabinejad; Chivian, 1999; Roberts; Toth, 2008; Ferreira et al., 2009;Torabinejad; Parirokh, 2010). Assim, torna-se fundamental o estudo do comportamento celular induzido pela estrutura, composição e presença do material restaurador.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou explorar a dinâmica da interação entre células e um novo biomaterial para obter informações sobre sua possível citotoxicidade e para estabelecer parâmetros de controle e otimização deste novo material. Para tanto, foram efetuados testes *in vitro* que estão relatados na literatura, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e economicamente acessíveis (Rogero et al., 2003; Chen et al., 2011; Minamikawa et al., 2011; Wang et al., 2013).

Assim, no presente estudo foram avaliadas as nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) desenvolvidas no Instituto de Física (IF) da Universidade de São Paulo em relação a biocompatibilidade, capacidade de migração e o potencial de mineralização de células derivadas de polpa dental humana.

Não há relatos na literatura de nanopartículas de hidroxiapatita com as mesmas características das desenvolvidas pelo IF. Essas apresentam partículas na forma monomérica (99,9%), ou seja, não apresentam aglomeração. Adicionalmente, a distribuição de tamanho de partículas é estreita e as mesmas exibem alto grau de cristalinidade, deste modo, a partícula inteira é formada por um monocristal de HAp e não há desorganização atômica.

Muitas HAp comerciais apresentam tamanho semelhante, porém, com alto grau de aglomeração. Sendo livres, as partículas de HAp podem interagir com os tecidos receptores mais facilmente. Além disso, as HAp comerciais têm alta porcentagem de outros fosfatos de cálcio como bruxita e TCP (tri cálcio fostato).

Portanto, o material testado nesse estudo é inédito pelo alto grau de pureza, por estar na forma monomérica (nanopartículas livres) e pelo elevado grau de cristalinidade.

Há muitas décadas o tamanho das partículas de HA sintéticas é discutido. A utilização de partículas de hidroxiapatita com tamanho reduzido resulta em HA com melhor sinterização e densificação devido à maior área de superfície (LeGeros,

1993). Adicionalmente, a HA micropartículada apresenta melhor bioatividade (Stupp; Ciegler, 1992).

Hoje em dia este assunto ainda é muito presente, mas na investigação das partículas em tamanho nanométrico. Relatos têm demonstrado que o tamanho dos cristais de nanopartículas de HA, a sua morfologia e seus compósitos com partículas inorgânicas são importantes para o desenvolvimento do material (Zhou; Lee, 2011). Zhou e Lee (2011), por exemplo, observaram que a HA em escala nanométrica pode ser ideal para aplicação biomédica devido à sua boa compatibilidade celular e tecidual e a capacidade de integração óssea.

Em se tratando de um material inédito, além da importância estrutural da nanopartícula de hidroxiapatita, também foi levado em consideração a escolha correta de testes de biocompatibilidade, a fim de explorar a possibilidade de utilizar este novo material em tratamentos clínicos. Este estudo é inédito, assim sendo tivemos dificuldade em realizar maiores comparações com a literatura já existente.

Nesse sentido, no presente trabalho foi realizado o que é preconizado pela ANVISA nas normativas RDC nº56/2001 e ISO 10.993-5 (Osorio et al., 1998; Rogero et al., 2003). Testes *in vitro* apresentam algumas vantagens importantes para análises iniciais de materiais biológicos como a capacidade de limitar o número de variáveis experimentais e a possibilidade de obtenção de dados de maneira fácil e em curto espaço de tempo (Rogero et al., 2003). A extrapolação dos resultados de testes *in vitro* pode ser repensada utilizando um biomaterial de referência apropriado (Rogero et al., 2003). No presente trabalho realizamos analises com nanopartículas de HA (HAp), material novo e não disponível para prática clínica, e como referência utilizamos o Agregado Trióxido Mineral (MTA), material já consagrado na prática clínica (Parirokh; Torabinejad, 2010).

Nos testes de viabilidade as células de polpa dental humana foram cultivadas, com cada material, em diferentes concentrações e comparadas com a mesma população celular cultivada apenas com meio de cultivo convencional. Foi possível observar que as diferentes concentrações dos materiais utilizados em nosso estudo (1/10, 1/100 e 1/1000) interferem na sobrevivência celular. De forma interessante as células responderam melhor na concentração de 1/10 de MTA e 1/100 para a HAp, chegando a um pico de crescimento celular no 5º dia após o seu tratamento com os biomateriais. É importante salientar que a viabilidade celular dessas amostras foi maior que a do grupo controle (células sem estímulo de biomateriais).

Após o 6º dia de cultivo, em todos os grupos, inclusive o controle, houve uma tendência a paralisação na viabilidade celular, de forma que ou as células apresentavam uma queda na viabilidade ou o aumento era pequeno. Esse tipo de resposta celular é esperada uma vez que as células apresentam inibição por contato e nesse momento do cultivo, a placa já estava em total confluência. Por essa razão, foi dada mais ênfase aos resultados obtidos até o sexto dia de cultivo em todas as amostras.

Não acreditamos que a HAp do Instituto de Física ou o MTA competiram pelo espaço na placa de cultivo em nossos ensaios visto que independente da concentração utilizada para cultivo das células com os biomateriais, após 6 dias de cultivo, quando a falta de espaço então passa a ser um fator importante, a viabilidade das células é similar. É importante salientar que nessa constatação, estamos observando a tendência da curva e não os números absolutos.

A análise de viabilidade mostra que no grupo do MTA, as concentrações de 1/10 e 1/100 fazem diferença (resultados estatisticamente significativos) em relação ao controle. Essa diferença diminui progressivamente no grupo 1/100 e não existe no grupo 1/1000 mostrando que para ser biologicamente efetivo em relação à viabilidade celular, devemos optar por concentrações de MTA de 1/10 ou 1/100 a partir da diluição de 0,1g/ml preconizada pela norma ISO 10.993-12.

Já a HAp é mais efetiva na concentração 1/100, sendo que em termos de viabilidade celular, essa concentração é similar ao MTA 1/10. No entanto, a concentração de 1/10 também é efetiva e é a que mais se assimila ao grupo controle considerando todos os grupos tratados.

É importante salientar que quando comparamos a HAp ao MTA colocando-se de lado análise estatística que mostra números absolutos e observando-se também as curvas dos gráficos de viabilidade, notamos que apesar da diferença estatisticamente significante em favor do MTA, na concentração de 1/100, esses 2 materiais se comportam de maneira semelhante.

Essas constatações serão importantes em testes subsequentes *in vivo* quando teremos que novamente manipular e comparar esses materiais. Nesse sentido, surgem questões como: o que é mais importante, o número expressivamente maior de células viáveis ou uma situação mais inerte (igual ao controle) e que por sua vez pode causar menos distúrbio no processo de reparo? Será que diferentes concentrações do biomaterial podem gerar respostas distintas

no hospedeiro? Por exemplo, se quisermos a formação de uma ponte de tecido mineralizado em casos de exposição pulpar, devemos utilizar a HAp na concentração de 1/10 e se quisermos somente o recobrimento de uma cavidade sem exposição pulpar devemos utilizar a concentração 1/100?

Além da viabilidade foi também analisada a migração celular. A análise de migração de células em direção a um material é de extrema importância para o entendimento de suas características bioativas e ainda pode contribuir em casos de patologias visto que a migração de uma célula ou grupo de células, de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para algumas funções do organismo (Horwitz et al., 2004).

Nos ensaios de migração celular foi possível observar que as células migraram em direção à HAp, MTA e no grupo controle. Porém a migração para a HAp, foi mais demorada que os outros grupos de estudo. Infelizmente para este ensaio em específico, observamos que apesar de utilizarmos o colágeno a fim de fixar os biomateriais sobre uma área padrão específica, a HAp não se fixou. Esse fato prejudica os resultados e a análise dos mesmos. De um modo geral podemos dizer que a migração das células tratadas com MTA é similar ao controle, o que indica que as células proliferam para fechar um espaço aberto e não exatamente para ir de encontro ao material. No caso da HAp a condição da placa com partículas espalhadas por toda a parte, inclusive no interior da área raspada impede uma análise mais detalhada. O que podemos dizer é que houve o fechamento da área raspada com um atraso de vários dias. Novos ensaios modificando a metodologia são necessários.

Mais estudos serão necessários também para verificar a interação da HAp com o colágeno, visto que o colágeno é encontrado em praticamente todo o corpo humano, é responsável pela modulação das forças exercidas nos tecidos e é importante para a adesão e proliferação celular (entre outras funções), desta forma também auxiliando na reparação tecidual (Mayne; Burgeson, 1987; Lee et al., 2001; Nozaki et al., 2012).

A hidroxiapatita (HA) é um mineral natural e corresponde à parte principal dos tecidos duros em mamíferos, incluindo o osso e dentes. Por isso, é um material muito utilizado em aplicações clínicas, principalmente na Ortopedia e Odontologia. Na Odontologia, algumas das funções da HA envolvem a reparação da porção mineralizada óssea ou dentária, bem como o revestimento de implantes (Zhou; Lee,

2011). Baseado nestes fatos foi analisado a capacidade de diferenciação (em tecido mineralizado) das células de polpa dental quando em contato com a HAp ou MTA.

Foi possível observar que as células de polpa formam nódulos mineralizados apenas quando em contato direto com os materiais estudados. Isso foi observado tanto nas células cultivadas com os materiais diluídos em meio de cultura quanto nos ensaios de migração celular. No grupo controle, onde havia ausência de qualquer material, não houve formação de nódulos mineralizados.

A capacidade de indução a diferenciação celular utilizando HAp já foi observada usando células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelho (Cai et al., 2007). As HAp auxiliam na proliferação celular e o tamanho das partículas do material é favorável para auxiliar nessa função biológica (Cai et al., 2007).

Os resultados encontrados com o MTA utilizado no estudo corroboram com achados da literatura. O MTA também é conhecido como um bom material para indução de mineralização pulpar (Varalakshmi et al., 2013) e estimula a formação de cristais de hidroxiapatita em cultura de osteoblastos humanos (Salles et al., 2012). Assim, o fato das HAp mostrarem cristais maiores e mais dispersos na placa de cultivo, quando comparamos os resultados obtidos com o MTA, é ainda mais significativo.

Apesar de resultados obtidos em testes *in vitro* não serem necessariamente os mesmos da prática clínica, uma vez que não pode-se levar em conta variáveis da dinâmica tecidual, deve-se lembrar que os métodos *in vitro* são reprodutíveis, sensíveis, de baixo custo e minimizam as variáveis (Briseño; Willershausen, 1991; Osorio et al., 1998; Makkawy et al., 1998; Rogero et al., 2003; Queiroz et al., 2005). Deste modo, é seguro afirmar que um material que demonstre alta toxicidade celular em testes *in vitro*, possivelmente produzirá efeitos tóxicos aos tecidos vivos. O contrário também é verdadeiro de forma que um material que é biocompatível e apresenta algum efeito biomodulador *in vitro*, possivelmente terá os mesmos efeitos *in vivo* (Osorio et al., 1998; Miranda 2007).

O presente estudo demonstrou que a HAp projetada pelo Instituto de Física da USP é biocompatível e é capaz de induzir as células de polpa dental humana promoverem a mineralização. O próximo passo agora será a aplicação deste material em estudos *in vivo* tanto na polpa dental quanto em outros tecidos.

7 CONCLUSÃO

A Nanopartícula de Hidroxiapatita testada no presente estudo é biocompatível e induz a mineralização promovida por células de polpa dental humana.

REFERÊNCIAS[2]

Accorinte MdLR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, et al. Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide Cement as Pulp-capping Agents in Human Teeth. J Endod. 2008;34(1):1-6.

Akkouch A, Zhang Z, Rouabhia M. Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly (-lactide-co-{varepsilon}-caprolactone) scaffold. J Biomater Appl. 2013 May 2. doi: 10.1177/0885328213486705.

Barkhordar RA, Ghani QP, Russell, TR, Hussain MZ. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002;28(3):157-9.

Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. Dent Mater. 2012 Sep;28(9):1012-23.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell. 2001;105(7):829-41.

Boaventura JMC, Roberto AR, Becci ACO, Ribeiro BCI, Oliveira MRB, Andrade MF. Importância da biocompatibilidade de novos materiais: Revisão para o cimento de ionômero de vidro. Rev Odontol Univ Cid São Paulo. 2012 jan-abr;24(1):42-50.

Briseño BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. Silicone and resin-based sealers. J Endod. 1991;17(11):537-40.

Busato ALS, Costa CAS, Estrela C. Dental restorative material biocompatibility. Braz Endod J. 1997;2(2):14-22.

Byrom D. Biomaterials.London: MacMillan Publishers; London; 1991. Chapter: Miscellaneous biomaterials; p. 333-59.

[2] De acordo com Estilo Vancouver.

Cai Y, Liu Y, Yan W, Hu Q, Tao J, Zhang M, et al. Role of hydroxyapatite nanoparticles size in bone cell proliferation. J Mater Chem. 2007;17:3780-7. doi: 10.1039/b705129h.

Calixto RFE. Implante de um floculado de resina derivada do óleo de mamona (Ricinus Communis) em alvéolo de rato imediatamente pós extração dental. Avaliações histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia de reparo ósseo [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2001.

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

Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. J Clin Pediatr Dent. 2006;30(3):203-9.

Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, et al. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts *in vitro*. Arch Oral Biol. 2005;50(5):469-79.

Chen L, Mccrate JM, Lee JC, Li H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. Nanotechnology. 2011 Mar 11;22(10):105708.

Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. Biomaterials. 1996 Jul;17(13):1259-64.

Costa ACFM, Lima MG, Lima LHMA, Cordeiro VV, Viana KMS, Souza V, et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Ver Eletr Mater Processos..2009 [citado 20 mar. 2013]v. 4.3:29-38. http://www.dema.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/viewFile/105/123.

Cunha MA. Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia; 2010.

Deeb El, Tompach PC, Morestad AT. Porous hydroxylapatite granules and blocks as alveolar ridge augmentation materials: a preliminary report. J Oral Maxillofac. Surg. 1988 Nov;46(11):955-70.

Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. Quintessence Int. 2001;32(3): 211-20.

Denissen HW, de Groot K, Makkes PC, van den Hooff A, Klopper PJ. Tissue response to dense apatite implants in rats. J Biomed Mater Res. 1980 Nov;14(6):713-21.

Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. Int Dent J. 2005;55(5):293-301.

Ferreira JMS, Andrade EMF, Katz CRT, Rosenblatt A. Prevalence of dental trauma in deciduous teeth of Brazilian children. Dent Traumatol. 2009;25:219–23.

Foreman PC, Barnes IE. Review of calcium hydroxide. Int Endod J. 1990;23(6):283-97.

Fox K, Tran PA, Tran N. Recent advances in research applications of nanophase hydroxyapatite. Chemphyschem. 2012 Jul 16;13(10):2495-506.

Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4. ed. New York: Wiley-Liss; 2000.

Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. Int Endod J. 2009;42(11):955-62. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01622.x.

Fu Q Rahaman MN, Nai Z, Wenhai H, Deping W, Liying Z, et al. In vitro study on different cell response to shperical hyroxyapatite nanoparticles. J Biomater. Appl 2008 Jul;23(1)**:**37-50. doi: 10.1177/0885328207081350.

Gasperini F. Avaliação da biocompatibilidade de nanohidroxiapatitas no reparo ósseo de tíbias de coelhos [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2010.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: a Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(1):13-27.

Gleiter H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. Acta Mater. 2000 Jan;43(1):1-29.

Gregui SLA, Campos Junior A. Estudo comparativo da bocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Rev Fac Odontol Bauru. 1994 out-dez;2(4):73-81.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

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

Han Y, Wang X, Dai H, Li S. Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions. ACS Appl Mater Interfaces. 2012 Sep 26;4(9):4616-22.

Heimke G. Advanced ceramics for biomedical applications. Angew Chem.1989; 28:111-6.

Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J Endod. 2001;27:281–4.

Horwitz AF, Webb DJ, Zhang H. Cell Migration: an overview. Methods Mol Biol. 2004; 294:3-11.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009;88(9):792-806.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. Tissue Eng Part A. 2010 Feb;16(2):605-15.

Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(2):172-9.

Infopédia. Enciclopédia e Dicionários Porto Editora [citado 20 jul. 2013]. Disponível em: http://www.infopedia.pt/pesquisa-global/biocompatibilidade.

Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK, et al. Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. J Endod. 2009;35(6):858-65.

ISO - International Standard. Iso 10993-12. Biological evaluation os medical devices - Tests for citotoxicity: in vitro metods, Part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva; 1996.

ISO - International Standard. Iso 10993-5. Biological evaluation os medical devices - Tests for citotoxicity: in vitro methods, Part 5. Geneve; 1992.

Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(5):e94-100.

Lacativa AM, Loyola AM, Sousa CJ. Histological evaluation of bone response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. Braz Dent J. 2012;23(6):635-44.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. Int J Pharm. 2001 Jun 19;221(1-2):1-22.

Lee YH, Kim GE, Song YB, Paudel U, Lee NH, Yun BS, et al. Davallialactone Reduces Inflammation and Repairs Dentinogenesis on Glucose Oxidase-induced Stress in Dental Pulp Cells. J Endod. 2013 Nov;39(11):1401-6.

LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. Clin Mater. 1993;14(1):65-88. Review.

Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. Ann N Y Acad Sci. 2005;1044:132-8.

Lopes JFS. Avaliação da biocompatibilidade de hidroxiapatita nanoparticulada em subcutâneo de ratos [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2012.

Makkawy HA, Koka S, Lavin MT, Ewoldsen NO. Cytotoxicity of root perforation repair materials. J Endod. 1998 Jul;24(7):477-9.

Mamani JB. Estrutura e propriedades das nanopartículas preparadas via sol-gel [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Física; 2009.

Mayne R, Burgeson RE. Structure and function of collagen types. London: Academic Press; 1987.

Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, et al. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. J Endod. 2011 May;37(5):637-41.

Miranda RB. Citotoxicidade de alguns cimentos reapradores de perfuração radicular sobre células L929 [dissertação]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”; 2007.

Miura CAS, Sá MS, Lima RS, Machado AAM, Telles PDS. Avaliação da toxicidade de materiais endodônticos em células-tronco da polpa dentária. Rev Odontol Bras Central. 2010;19(50):192-5.

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

Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):544-54.

Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. Dent Mater. 2007;23(1):40-4.

Nanci A. Ten Cate histologia oral. Desenvolvimento, estrutura e função. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Capítulo 8, Complexo dentina-polpa; 191-238.

Nonaka CFW, Goulart Filho JAV, Costa ALL, Galvão HC, Carvalho RA. Histologia da polpa dentária - uma revisão dos achados atuais / Pulp histology - a review of the present aspects. Rev Bras Patol Oral. 2005 jan-abr;4(1):42-49.

Nozaki ACM, Marques RFC, Diniz IMA, Marques MM, Marchi J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando a aplicação como biomaterial. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais; 22-25 ago. 2012 [citado 10 jan. 2013]; Natal, Brasil. Disponível em: http://www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos_completos/.

Oliveira M. Compatibilidade biológica de materiais odontológicos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia de Araraquara; 2000.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod. 1998 Feb;24(2):91-6.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. J Endod. 2010;36(3):400-13.

Pereda GO, Fudinaga AC, Beltrán HS, Peroni L, Stach-Machado D. Inflammatory and bone regulators expression in murine macrophages under exposure of commercial and experimental mineral trioxide aggregate. Aust Dent J. 2012 Sep;57(3):284-91.

Pereira KR. Avaliação da biocompatibilidade “in vitro” e “in vivo” de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Física; 2008.

Queiroz CES, Soares JÁ, Leonardo R, Carlos IZ, Dinelli W. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos Topseal e Sealer. 26 em culturas de macrófagos - Avaliação da produção de óxido nítrico. JBE. 2005;5(20):390-5.

Resolução - RDC/ANVISA nº56, de 6 de abril de 2001 [citado 8 mar 2013]. Disponível em http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/RES_056.pdf.

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

Rogero SO, Higa OZ, Saiki M, Correa OV, Costa I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. Toxicol In Vitro. 2000 Dec;14(6):497-504.

Rogero SO, Lugão AB, IkedaII TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Mater Res. 2003;6(3):317-20.

Ruano R, Jorge AG, Jaeger MMMarques. Estudo in vitro da biocompatibilidade da hidroxiapatita utilizada em Implantodontia. RPG Rev Pos-grad. 1996 abr-jun;3(2):135-41.

Sadat-Shoujai M, Atai M, Nodehi A. Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles. J Nraz Chem Soc. 2011;22(3):571-82.

Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. J Endod. 2012 Jul;38(7):971-6.

Schmalz, G. Materials science: biological aspects. J Dent Res. 2002;81(10):660-3.

Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants. 1994;9(1):13-29.

Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res. 1985;64 Spec No:541-8.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003;18(4):696-704.

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

Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. Oper Dent. 1997; 22(1):1-3.

Stupp SI, Ciegler GW. Organoapatites: materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. J Biomed Mater Res. 1992 Feb;26(2):169-83.

Su Q, Ye L, Zhou XD. [Experimental study of the pulpal response of dogs capping with nHA-PA66]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005 Jan;36(1):43-5. [Chinese].

Técles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. Arch Oral Biol. 2005;50(2):103-8.

Tessare PO, Bernardes Fonseca M, Borges Britto ML, Fava AS. Propriedades, características e aplicações clínicas do Agregado Trióxido Mineral – Mta. Uma nova perspectiva em endodontia. Revisão de literatura. E.J.E.R.: Eletctr J Endod Rosario. 2005 Abr [cited 2013 Jan 10];1:1-15. Available from: http://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/1399/30-60-1-PB.pdf?sequence=1.

Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. J Endod. 1999;25(3):197-205.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. J Endod. 2010;36(2):190-202.

Tranasi M, Sberna MT, Zizzari V, D'Apolito G, Mastrangelo F, Salini L, et al. Microarray evaluation of age-related changes in human dental pulp. J Endod. 2009;35:1211–7.

Tziafas, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. Caries Res. 2004;38(3):314-20.

Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with α-tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. J Endod. 2013 Jun;39(6):806-12.

Varma, Hk; Yokoqawa Y, Espinosa FF, Kawamoto Y, Nishizawa K, Nagata F, et al. In vitro calcium phosphate growth over functionalizes cotton fibers. J Mater Sci Mater Med. 1999 Jul;10(7):395-400.

Zakaria SM, Sharif Zein SH, Othman MR, Yang F, Jansen JA. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review. Tissue Eng Part B Rev. 2013 Oct;19(5):431-41.

Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2011 Jul;7(7):2769-81.

Wang Y, Yan M, Fan Z, Ma L, Yu Y, Yu J. Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF-κB pathway. Oral Dis. 2013 Sep 19. doi: 10.1111/odi.12183. [Epub ahead of print].

Williams DF. Definitions in biomaterial. New York: Elsevier; 1987.

Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kodowaki T, Takashi S. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. J Endod. 2008;34:1057–60.

Yavari HR, Samiei M, Shahi S, Aghazadeh M, Jafari F, Abdolrahimi M, Asgary S. Microleakage comparison of four dental materials as intra-orifice barriers in endodontically treated teeth.Iran Endod J. 2012a;7(1):25-30.

Yavari H, Samiei M, Eskandarinezhad M, Shahi S, Aghazadeh M, Pasvey Y. An in vitro comparison of coronal microleakage of three orifice barriers filling materials. Iran Endod J. 2012b Summer;7(3):156-60.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação da dinâmica da resposta celular do capeamento pulpar em dentes humanos utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de Hidroxiapatita e MTA. Estudo ex vivo analisando resposta a injuria mediada por células-tronco

Pesquisador: Marcelo José Strazzeri Bönecker
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 11870912.0.0000.0075
Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 205.708
Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:
"Sabendo que as células-tronco possuem um potencial de auto-renovação, a finalidade desse estudo será avaliar a dinâmica da resposta pulpar ao capeamento direto em dentes humanos, utilizando dois tipos de biomateriais: o MTA e as Nanoparticulas de Hidroxiapatita, material novo e ainda não disponivel para a prática clinica. Os objetivos do resente estudo serão avaliar a proliferação e viabilidade celular frente aos diferentes materiais
utilizados nessa pesquisa, avaliar a migração celular da população mista da polpa dental frente à utilização de pasta de nanoparticulas de HA e pó de nanoparticulas de HA e avaliar ex vivo, a resposta celular baseada na expressão da BRdU e HSP25.
A amostra será constituida por dentes terceiros molares higidos e com ápice radicular aberto, extraidos por motivos ortodônticos. Será composta de três grupos para analise: grupo controle; grupo com MTA e grupo com nanoparticulas de hidroxiapatita. Cada um desses grupos citados será composto por 20 amostras. Serão 5 amostras para cada periodo de análise: 48hs, 5 dias, 14 dias e 28 dias de cultura. Após a exodontia, uma caixa
oclusal será preparada em cada dente com broca tronco-cônica diamantada, e em seguida será feita uma exposição pulpar com uma broca diamantada esférica. A coroa do dente e o local da exposição da pulpar serão secos e o local da exposição será preenchido com MTA,

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

nanoparticulas de hidroxiapatita ou somente com meio de cultura celular. As coroas serão presas em fios ortodônticos metálicos com aplicação de selante Fluroshield (Dentsply, Brasil), e suspensas com apoio nos poços adjacentes ficando os ápices radiculares imersos no meio de cultura sem tocar no fundo da placa. Nas primeiras 24 horas será acrescido ao meio de cultura BrdU.
No final de cada período de cultura, os dentes serão fixados, desmineralizados e os tecidos preparados para análise histológica e imunohistoquímica. Para avaliação da diferenciação das células pulpares, formação da dentina reparativa e localização das células que respondem a injuria e de ciclagem lenta, odontoblastos e células pulpares serão analisados em relação a coexpressão de BrdU e Heat-shock protein (HSP-25)."

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:
Avaliar a proliferação e viabilidade celular frente aos diferentes materiais utilizados nessa pesquisa.

Objetivo Secundário:
Avaliar ex vivo, a resposta celular pulpar baseada na presença de inflamação local e na organização tecidual (morfologia), na formação da barreira mineralizada, e na organização do tecido pulpar nos diferentes grupos estudados. Avaliar ex vivo, a resposta celular baseada na expressão da BRdU e HSP25."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:
Somente são esperados os desconfortos e riscos decorrentes da cirurgia. Salienta-se o fato de que caso seja encontrado células-tronco no material coletado essas células não serão utilizadas para clonagem.

Benefícios:
O material que for coletado servirá para importante pesquisa para um melhor conhecimento sobre o uso de células-tronco em Odontologia, o que no futuro pode melhorar a qualidade de vida da população."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem delineada e com referencial teórico adequado. Em parecer anterior, solicitou-se esclarecimentos sobre o número de sujeitos (terceiros molares higidos), já que havia discrepância entre o número informado na folha de rosto e o descrito no projeto. Além disso, pediu-se pequena alteração no TCLE, bem como revisão do cronograma.
As pendências foram sanadas.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: TCLE; 2- carta de autorização da clínica; 3- folha de rosto.

Recomendações:

Nenhuma recomendação adicional.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo nenhuma recomendação adicional, sugere-se aprovação pelo CEP.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP-FOUSP.

SAO PAULO, 26 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br