GIOVANNA SARRA

Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos

São Paulo

2019

GIOVANNA SARRA

Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

Coorientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2019

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.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Sarra, Giovanna.

Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos / Giovanna Sarra; orientador Manoel Eduardo de Lima Machado; coorientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2019.

105 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Capeamento da polpa dentária. 2. Células-tronco. 3. Polpa dentária. 4. MTA Pro Root. 5. Biodentine. I. Machado, Manoel Eduardo de Lima. II. Marques, Márcia Martins. III. Título.

Sarra G. Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 19/02/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Emanuela Prado Ferraz

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Stella Nunes Araujo Moreira

Instituição: Universidade Ibirapuera

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Cleber Keiti Nabeshima

Instituição: Universidade Cruzeiro do Sul

Julgamento: Aprovado

*Aos meus pais: Hernani e Rommi, por sempre caminharem ao meu lado, tornando
qualquer desafio mais leve.*

*Aos meus avós: Djanira, Thereza e Venâncio, por todo amor e carinho dedicados à
minha criação.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos **meus pais** por sonharem comigo e por tornarem possível que eu seguisse adiante em todos os passos na minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível. Obrigada por sempre priorizarem meus estudos e nunca medirem esforços para que a educação viesse em primeiro plano. Sei o quanto vocês dois se doaram, abdicando muitas vezes das suas vidas, para ter certeza de que estavam fazendo o melhor para mim e para o Hernaninho.

À minha mãe querida, **Rommi**, por ser minha melhor amiga, confidente, meu ombro amigo e meu abraço apertado nos dias mais difíceis. Por sempre celebrar minhas conquistas e me motivar a continuar adiante, por ser minha fã número 1. Ela, que oferece seu colo quando eu preciso de carinho, que levanta todos os dias às 5:30h da manhã pra me acordar, dar mais 5 minutinhos de sono, preparar meu café, me dar carona até a FOU SP e desejar que eu tenha um ótimo dia, mesmo quando eu passo o caminho todo dormindo. Obrigada por sempre me ajudar a resolver meus problemas, por me preparar incontáveis marmitinhas e me esperar ansiosa para o jantar, mesmo quando chegava depois das 23h. Por ser meu ouvido ao escutar minhas angústias, preocupações e minhas histórias mirabolantes, quando estou super empolgada com alguma ideia. Mãe, espero um dia poder fazer pelos meus filhos pelo menos metade do que você faz por mim!

Ao meu pai, **Hernani**, por ser a pessoa que mais se preocupa comigo no mundo! Que quer saber se eu já cheguei, onde eu estou e se vou demorar. Que para qualquer coisa que estiver fazendo para “quebrar algum galho” pra mim. Ele, que tem a solução pra qualquer problema, que faz tudo com tanta dedicação e capricho, e puxa minha orelha quando algum feito meu não segue seus padrões de qualidade. Obrigada pai, por sempre sair de onde estiver pra me socorrer, por atender aos meus pedidos de um dia pro outro com seus improvisos, seja montando uma super mesa-operatória (ou caminha dos ratos) ou moendo e peneirando 5 kg de ração de um dia pro outro, afinal, os ratinhos não podem passar fome. Obrigada pelas caronas, às 03h da tarde ou às 10h da noite e por sempre esperar aqueles 15 minutinhos a mais quando eu me atraso em algum experimento. Pai, não tenho dúvidas que meu perfeccionismo e os meus “mas por quê?” vieram de você.

Ao meu irmão, “**Hernaninho**”. Um dia eu li uma frase na internet que dizia alguma coisa assim: a relação entre irmãos é uma coisa engraçada, eu não empresto um carregador ao meu irmão, mas lhe doaria um rim. Ele, que vive pra puxar minha orelha, me criticar e falar mal de mim sempre que puder, mas aí de quem mexer comigo! Obrigada por cuidar de mim e segurar na minha mão desde que nasci. O que seria de mim sem todas as nossas conversas antes de dormir, que sempre resultam em alguma aposta, competição ou qualquer outra maluquice.

Aos meus **avós, Djanira, Thereza** (*in memorian*) e **Venâncio** (*in memorian*). Posso me considerar uma pessoa privilegiada por ter tido a oportunidade de desfrutar tanto tempo com meus queridos avós. Vocês marcaram a fase mais importante da minha construção como pessoa e, não tenho dúvidas de que, muito do que sou, tem as mãos de vocês. Obrigada por se dedicarem com tanto amor, carinho e zelo à minha criação e educação.

E não poderia deixar de agradecer ao meu namorado, parceiro e companheiro de toda essa loucura. **Rodrigo**, obrigada por sempre me apoiar e abraçar todas as minhas escolhas, por andar lado a lado comigo durante todos esses anos. Desde esclarecer minhas dúvidas de Excel ou estatística no meio da semana, que sempre parecem tão óbvias para você, até os incontáveis finais de semana de laboratório que (mesmo de cara feia) você sempre me acompanhou. Obrigada por compreender inquestionavelmente essa rotina maluca, por estar comigo em qualquer situação e, principalmente, por recarregar minhas energias e me transmitir essa paz que só você tem.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, **Prof. Manoel Eduardo de Lima Machado**, por ter me aceitado como sua orientada e ter me acolhido em sua equipe. Obrigada por ter contribuído tanto para que eu evoluísse e me tornasse a profissional que sou hoje. Sou muito grata por todos os seus ensinamentos, tenho muita admiração pelo profissional que o senhor é. O senhor é um grande nome da Endodontia e uma inspiração pra mim. Foi uma honra ter sido sua aluna!

À minha querida **Profa. Márcia Martins Marques**, razão pela qual sou apaixonada pela ciência e pelo mundo acadêmico. Se hoje estou aqui, tudo devo a você! Obrigada por ter me escolhido como sua aluna de Iniciação Científica e ter despertado em mim o amor pela pesquisa básica. Nunca canso de lhe dizer que a senhora é uma das mulheres pela qual mais tenho admiração no mundo. Sou muito grata pela forma que cuidou de mim e ajudou a guiar meus passos até aqui. A senhora é o meu exemplo de mulher, professora e pesquisadora!

A todos os **professores** da FOUSP e do nosso Departamento pela dedicação na construção da nossa formação acadêmica. Em especial, aos professores **Carla Sipert, Celso Caldeira, Ericka Pinheiro, Giulio Gavini, Maine Skelton e Marcelo dos Santos**. Me sinto privilegiada por ter tido a oportunidade de conviver e aprender com vocês. Obrigada pelo empenho em ministrar com tanta qualidade as disciplinas e por estarem sempre dispostos a sanar nossas duvidas. Vocês tiveram enorme contribuição na minha formação como mestre!

Ao **Prof. Dr. Victor Arana-Chavez**, obrigada por ter nos permitido trabalhar em seu laboratório, utilizando as instalações e infra-estrutura do Biotério, parte essencial para a execução deste trabalho.

Aos meus anjos-da-guarda do laboratório: **Ana Clara, Héctor, Stella Moreira e Roberta Couto**. **Ana**, não tenho palavras para agradecer tudo que você me ensinou e ainda tem ensinado. Obrigada pelo seu companheirismo, paciência, disponibilidade, pelas infinitas horas lado a lado no fluxo ou microscópio, por atender a todas as minhas chamadas desesperadas e pelos áudios de 5 minutos no WhatsApp. Eu não sei o que seria de mim nesse laboratório sem você. Sei que ganhei uma grande amiga! Estamos juntas a 5 anos e a cada dia aprendo algo

novo. Quando crescer, quero ser igual a você! **Héctor**, ainda estou contabilizando nossas horas de convivência em bancada. Esse trabalho com certeza é seu também, obrigada por se fazer tão presente em todas as etapas dele e por estar comigo sempre que precisei. Fizemos um ótimo trabalho como dupla! Apesar de nem sempre te escutar (e me arrepender depois), agradeço muito por todos os ensinamentos e por aguentar minhas crises de desespero, sempre falando que eu exagero. **Stella**, você é um exemplo de pesquisadora para mim, uma grande nome da regeneração em endodontia! Não conheço ninguém tão determinada e competente quanto você. Obrigada por sempre se preocupar comigo e por me abraçar em tantos projetos. Sou muito grata por confiar tanto em mim. É uma honra poder trabalhar ao seu lado, que realiza tudo com tanta perfeição e sabedoria. **Rô**, minha mãe científica, com quem dei meus primeiros passos e aprendi do zero o cultivo celular nos primeiros meses de IC. Que falta você faz! Tenho muito carinho por você e te desejo tudo de melhor sempre.

A toda **turma do laboratório**: **Ana Clara, Thais Miniello, Gi Lopes, Stella, Sueli, Carol Hirota, Danilo, Ana Victória, Gabi, Tomaiz, Pablo, Fernando, Samantha, Profa. Cris, Profa. Emanuela, Profa. Graça, Natasha, Natalia Tartaroti, Natalia Bueno, Osmar, Rennan, Profa. Carla, Prof. Fernando, Claudia, Lais, Priscila, Tomaz, Leticia, Ju Garuba, Rapha, Bruno, Emanuel**. Foi uma delícia ter passado esse tempo com vocês! Desde os amigos mais antigos, aos novos que estão chegando. Sempre tivemos uma ótima convivência e sou muito grata por termos nos cruzado nessa trajetória. Das infinitas horas de fluxo em experimentos longos, da frustração quando algum resultado não saia como esperávamos, do companheirismo aos finais de semana, da explosão de alegria quando o ensaio dá certo... Da fofoca do final de semana, dos momentos de risada e descontração, de todas as vezes que nos unimos para ajudarmos uns aos outros. Vocês estiveram presentes nos momentos mais intensos da minha caminhada como pesquisadora. Obrigada por sempre tornarem o nosso ambiente alegre e feliz. Sou muito grata por tudo que vocês me ensinaram.

A todos os **funcionários e técnicos** da FOU SP, que viabilizaram a execução deste trabalho: **Aldo, Carlos, Débora, David, Elisa, Glauci, Leandro, Kátia, Selminha** e tantos outros que são fundamentais para o bom andamento da faculdade. Agradeço ao carinho, dedicação e ajuda sempre que possível. Em especial, gostaria de agradecer à nossa técnica **Silvana** por cuidar tão bem desse

laboratório e por ser essa mãezona de todos. Eu tenho muita admiração pelo seu capricho, organização e perfeccionismo em tudo que faz! Obrigada por sempre se preocupar com nós e estar sempre disposta a nos escutar, tenho muito carinho por você. **Elis** e **Douglas**, sou muito grata a ajuda de vocês, sempre prontos para me ajudar em tudo que precise, seja no cuidado e manejo dos ratinhos, a preparar soluções ou “quebrando algum galho”, vocês são demais! Ao **Paulo**, técnico do ICB, que me ajudou incansavelmente nesta reta final com os histológicos. Obrigada pela qualidade do serviço prestado e por me atender sempre tão prontamente, você abraçou este trabalho comigo e eu agradeço demais a você por isto.

À turma do **PAE** noturno: **Cleber, Kareen, Iandara, Alê, Diego, Lorena, Hector, Taina, Edgar, Marco, Rene, Thais Nejm**, aprendi tanto nesses dois anos com vocês... Por todos os laboratórios, aulas teóricas e clínicas juntos!

Aos **amigos de pós-graduação**: **Itallo, Samuel, Giovani, Olívia, Ju Couto, Ju Costa, Erika, Fernanda, Bru Iatarola, Miriam, Vinícius, Luiza Paz, Carol Santos, Sandra, Claudia, Diana, Yael, Amanda, Gustavo, Juan, Carlinhos, Sávio, Karin, Le Sakae, Lais, Erick, Laura**. Obrigada pela companhia de vocês, seja nas disciplinas, laboratórios, bandejões, cafézinhos, Happy Hours ou na salinha do Sr Aldo! Vocês com certeza deixaram esse mestrado muito mais divertido e mais leve. Desejo todo o sucesso do mundo pra todos vocês.

Em especial: **Stephanie**, a peruana mais doida que eu conheço! Amiga, sou muito feliz pela sua amizade e espero que a gente ainda viva muitas aventuras juntas. **Kareen**, você entrou na minha vida no momento certo! Obrigada por me escutar, por ser tão presente e preocupada. Espero que continuemos sempre nos ajudando e apoiando quando precisarmos! **Lorena** e **Carol Hornink**, que saudades eu sinto das nossas manhãs juntas! Formamos uma ótima equipe, vocês são demais. **Rapha** e **Taina**, vai ser difícil superar esse SBENDO! Obrigada pela companhia maravilhosa e por tanta loucura e risadas, vocês são muito especiais. **Bruna Gontijo**, tenho muito carinho por você, amiga. Sua presença sempre alegra qualquer um! Saudades dos nossos finais de tarde juntas. **Hermano**, te admiro demais! Você é muito querido, um exemplo pra mim. **Ju Pereira**, essa amiga já é de longas datas... Sou muito feliz pela nossa trajetória juntas, desde a graduação até aqui! **Leonardo**, você tem muita luz, Leo... Um exemplo de dedicação e companheirismo, te desejo todo sucesso do mundo! **Rennan**, que delícia ter tido a

oportunidade de trabalhar com você (um exemplo de pesquisador) e de quebra ganhar um amigo muito especial... Você vai muito longe!

Iandara, você foi o melhor presente que esse mestrado me deu... Uma amiga, companheira, irmã pra vida toda! Nossa ligação é de outras vidas. Você foi a minha pessoa nesses últimos dois anos. O que seria de mim sem você pra escutar minhas reclamações, angústias e preocupações (que, vamos combinar, não foram poucas), seu abraço sempre que precisei, sua companhia pros momentos mais doidos. Sem as nossas viagens, churrascos e festinhas. Você é o tipo de amiga que eu sei que posso contar pra mandar foto do lookinho do final de semana ou pedir pra ler essa dissertação inteira. Em você eu sei que posso confiar pra encarar comigo a loucura de montar 10 aulas da qualificação ou aguentar até o final os perrengues que a gente consegue se meter! Obrigada por cuidar tanto de mim (literalmente), se preocupar com o meu bem e estar sempre disponível. Que a gente continue se apoiando, se entendendo e caminhando assim: sempre juntinhas!

A todos os **alunos de graduação** que tive o prazer de poder praticar a docência, foi uma delícia ter convivido com vocês! Obrigada por, diversas vezes, alegrarem meu dia e recordarem o verdadeiro motivo para tudo isso. Fico feliz por ter contribuído um pouquinho para suas formações e, acima de tudo, por tudo que vocês me ensinaram.

Ainda, agradeço à **CAPES** pela concessão de bolsa, viabilizando a execução e realização deste mestrado, à **FOUSP** pelo suporte acadêmico e pela infraestrutura e à **Universidade Ibirapuera**, pela utilização dos laboratórios e infraestrutura.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mario Quintana

RESUMO

Sarra G. Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

As células-tronco são capazes de secretar, no meio em que são cultivadas, fatores tróficos importantes para a regeneração tecidual. Estudos já revelaram que o meio condicionado (MC) por células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) pode desencadear respostas angiogênicas e de modulação da inflamação que podem ser importantes no processo de reparo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da associação do MC pelas hDPSCs (MC-hDPSCs) e do MTA ProRoot no capeamento pulpar direto em ratos. Para isso, foram utilizados ratos da linhagem Wistar divididos em 5 grupos experimentais: CT (controle negativo; sem material capeador); BD (controle positivo; Biodentine); MTA (MTA ProRoot); MC (MC-hDPSC); e MTA+ (MTA ProRoot + MC-hDPSC). As hDPSCs foram descongeladas, recaracterizadas imunofenotipicamente através de citometria de fluxo e cultivadas até P4. Quando observada a subconfluência, as células foram incubadas com meio clonogênico fresco sem suplementação. Após 24h, esse meio foi coletado e centrifugado para obtenção do MC-hDPSC concentrado. Cavidades classe I foram preparadas na oclusal dos dois primeiros molares superiores de cada animal e uma pequena exposição pulpar padronizada foi realizada. O procedimento de capeamento pulpar foi realizado de acordo com cada grupo e, então, as cavidades foram seladas. Os animais foram sacrificados após 4 e 8 semanas (n=6 dentes por grupo e tempo experimental) e as peças foram preparadas para análise histológica. Os seguintes quesitos foram avaliados: formação de dentina reparadora, grau de cobertura das pontes formadas, vitalidade e condição do tecido pulpar. As células apresentaram perfil imunofenotípico de hDPSC. O grupo CT demonstrou 33,3% e 25% de formação de ponte dentinária nos tempos experimentais de 4 e 8 semanas, respectivamente. Essas pontes foram sempre incompletas e o tecido pulpar apresentou vitalidade somente em 33,3% das amostras em 4 semanas. O grupo MC apresentou formação de ponte em 100% das amostras em 4 semanas e em 60%

das amostras em 8 semanas. Houve vitalidade pulpar em 100% das amostras em 4 semanas, mas essa taxa caiu para 20% em 8 semanas. Os grupos BD e MTA+ apresentaram formação de ponte em 100% das amostras nos dois tempos, enquanto o grupo MTA não foi capaz de formar pontes em 40% e 20% das amostras em 4 e 8 semanas, respectivamente. Ainda, dentina reparadora apresentando túbulos dentinários foi observada em algumas amostras apenas dos grupos MTA+ e BD. Todas as amostras (100%) apresentaram vitalidade pulpar para esses 3 grupos em 4 semanas. Quanto a condição do tecido pulpar vital, para BD, MTA e MTA+ houve maior porcentagem de tecido livre de inflamação no tempo de 8 semanas, se comparado ao de 4 semanas. MTA+ apresentou maiores taxas de tecido com ausência de sinais inflamatórios se comparado ao MTA isolado, sendo essas porcentagens de 75% para o grupo MTA+ e 25% para MTA em 8 semanas. O MC-hDPSC associado ao MTA demonstrou melhorias no desempenho da formação de ponte dentinária, organização do tecido neoformado e modulação da resposta inflamatória e parece demonstrar potencial promissor para aplicação em procedimentos capeadores.

Palavras-chave: Capeamento pulpar direto. Meio condicionado por células-tronco. Células-tronco da polpa dentária humana. MTA Pro Root. Biodentine.

ABSTRACT

Sarra G. Effect of the association of human dental pulp stem cells conditioned medium and MTA ProRoot in the repair of exposed rat pulps [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Stem cells are able to secrete important trophic factors for tissue regeneration in the medium in which they are grown. Studies have revealed that human dental pulp stem cell (hDPSCs) conditioned medium (CM) can trigger angiogenic and inflammation modulation responses that may be important in the repair process. The aim of this study was to evaluate the effect of the association of CM by hDPSCs (CM-hDPSCs) and MTA ProRoot on direct pulp capping procedure in rats. For this, Wistar rats were used and divided into 5 experimental groups: CT (negative control; no capping material used); BD (positive control; Biodentine); MTA (MTA ProRoot); CM (CM-hDPSC); and MTA+ (ProRoot MTA + CM-hDPSC). hDPSCs were thawed, immunophenotypically recharacterized by flow cytometry and cultured until P4. When subconfluence was observed, cells were incubated with fresh clonogenic medium without any supplementation. After 24h, this medium was collected and centrifuged to obtain concentrated CM-hDPSC. Class I cavities were prepared in the occlusal of the two first upper molars of each animal and a small standardized pulp exposure was performed. The pulp capping procedure was performed according to each group and then the cavities were sealed with Bulk Fill composite. The animals were sacrificed after 4 and 8 weeks (n = 6 teeth per group and experimental time) and the pieces were prepared for histological analysis. The following aspects were evaluated: reparative dentin formation, coverage degree of the formed bridges, vitality and pulp tissue condition. The cells showed hDPSC immunophenotypic profile. The CT group showed 33.3% and 25% of dentin bridge formation at the experimental times of 4 and 8 weeks, respectively. These bridges were always incomplete and pulp tissue showed vitality only in 33.3% of the samples at 4 weeks. The CM group showed bridge formation in 100% of the samples at 4 weeks and 60% of the samples at 8 weeks. Pulp vitality occurred in 100% of the samples at 4 weeks, but this rate dropped to 20% at 8 weeks. The BD and MTA+ groups showed bridge formation in

100% of the samples at both times, while the MTA group presented a 40% and 20% failure at 4 and 8 weeks, respectively. Still, reparative dentin presenting dentinal tubules was observed in some samples only for MTA + and BD groups. All samples (100%) showed pulp vitality for these 3 groups within 4 weeks. Regarding the condition of the vital pulp tissue, for BD, MTA and MTA+ there was a higher percentage of inflammation-free tissue at 8 weeks, compared to 4 weeks. MTA+ showed higher rates of tissue with no inflammatory signs compared to MTA used alone. These percentages were 75% for the MTA+ group and 25% for MTA at 8 weeks. CM-hDPSC associated with MTA has shown improvements in dentin bridge formation, neoformed tissue organization and inflammatory response modulation and seems to show promising potential for application in pulp capping procedures.

Keywords: Direct pulp capping. Stem cell conditioned medium. Human dental pulp stem cells. MTA Pro Root. Biodentine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	do inglês, <i>alkaline phosphatase</i>
APC	Alofococianina
BD	Biodentine
BGLAP	do inglês, <i>bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein</i>
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumine</i>
CT	Controle negativo
CM	do inglês, <i>conditioned medium</i>
CM-hDPSC	do inglês, <i>human dental pulp stem cell conditioned medium</i>
DMP-1	do inglês, <i>dentin matrix protein1</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DSPP	do inglês, <i>dentin sialophosphoprotein</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HC	Hidróxido de cálcio
HE	Hematoxilina e eosina
ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	Fluoresceína
hDPSC	do inglês, <i>human dental pulp stem cell</i>
IgGK1	Imunoglobulina G 1 kappa
i.p.	Intraperitoneal
MC	Meio condicionado
MC-hDPSC	Meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana
MClono	Meio clonogênico
MSCs	do inglês <i>mesenchymal stem cells</i>
MSC-FBS	do inglês <i>mesenchymal stem cell fetal bovine serum</i>
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTA+	Agregado de trióxido mineral associado ao meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana
P	Passagem de subcultivo
PBSA	do inglês, <i>calcium and magnesium-free phosphate buffered saline</i>
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído

PTFE	Politetrafluoretileno
rhBMP2	do inglês, <i>recombinant human bone morphogenetic protein2</i>
VEGF	do inglês, <i>vascular endothelial growth fator</i>
α -MEM	do inglês, α - <i>minimal essential médium</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
mL	Mililitros
mM	Milimolar
CO ₂	Dióxido de carbono
cm ²	Centímetros quadrados
pH	potencial hidrogênico
kDa	Kilo Dalton
RPM	Rotações por minuto
µm	Micrometros
µL	Microlitros
mg/kg	Miligramas por Kilogramas
mm	Milímetros
g	Gramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	COMPLEXO DENTINA-POLPA	29
2.2	CAPEAMENTO PULPAR DIRETO	32
2.2.1	Hidróxido de Cálcio	34
2.2.2	Agregado de Trióxido Mineral (MTA)	35
2.2.3	Material à base de silicato tricálcico (Biodentine)	36
2.2.4	Cicatrização ou Regeneração?	37
2.2	MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS-TRONCO	41
2.3.1	Células-tronco da polpa dentária humana	41
2.3.2	Meio Condicionado por células-tronco da polpa dentária humana (MC-hDPSC)	43
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	FASE 1: ETAPA <i>IN VITRO</i>	49
4.1.1	Cultivo Celular	49
4.1.2	Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo	51
4.1.3	Obtenção e concentração do meio condicionado por hDPSCs (MC-hDPSC)	52
4.2	FASE 2: ESTUDO <i>IN VIVO</i>	54
4.2.1	Modelo experimental <i>in vivo</i> - Delimitação da amostra e Grupos experimentais	54
4.2.2	Procedimentos experimentais	55
4.2.2.1	Exposição pulpar	55
4.2.2.2	Preparo dos materiais capeadores	57
4.2.2.3	Capeamento pulpar	58
4.2.2.4	Coleta das amostras	60
4.2.3	Processamento histológico	60
4.2.4	Análise histológica	61
4.2.4.1	Análise da formação de dentina reparadora	61

4.2.4.2	<i>Classificação do grau de cobertura com dentina reparadora formada...</i>	61
4.2.4.3	<i>Avaliação da vitalidade pulpar em resposta aos materiais capeadores.</i>	61
4.2.4.4	<i>Condição do tecido pulpar vital</i>	62
5	RESULTADOS	63
5.1	FASE 1: ESTUDO <i>IN VITRO</i>	63
5.1.1	Perfil imunofenotípico das células	63
5.2	FASE 2: ESTUDO <i>IN VIVO</i>	65
5.2.1	Formação de dentina reparadora	65
5.2.2	Grau de cobertura do tecido pulpar com dentina reparadora formada	67
5.2.3	Vitalidade do tecido pulpar em resposta aos materiais capeadores	71
5.2.4	Condição do tecido pulpar vital	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da Odontologia é a manutenção da vitalidade do complexo dentino-pulpar frente a exposições por trauma ou após a remoção do tecido dental perdido pela lesão de cárie. Quando a exposição pulpar ocorre em dentes jovens, sem a completa formação das raízes, o problema se faz ainda mais grave, uma vez que o processo de rizogênese é interrompido. Na presença de uma injúria de grande extensão e alta intensidade, havendo exposição pulpar, a camada odontoblástica subjacente à lesão é destruída e o complexo dentina-polpa aciona a proliferação, diferenciação e migração de células secretoras e estimuladoras da dentinogênese reparativa. Nesse processo, após a morte dos odontoblastos primários subjacentes à lesão, ocorre a indução de diferenciação de células-tronco da polpa dentária em células odontoblasto-símile e a consequente secreção de dentina terciária. Isso ocorre em condições patológicas e o principal objetivo é formar uma barreira de tecido mineralizado para proteger a polpa.

Uma vez exposta, a contaminação da polpa dentária deve ser evitada e ela deve ser protegida com algum material que permita que este processo de reparo possa ocorrer, detendo a necrose pulpar e evitando futuros tratamentos endodônticos ou pelo menos o adiando até que a formação da raiz de dentes jovens esteja completa. O capeamento pulpar direto é o tratamento que busca a formação de dentina reparadora e a manutenção da vitalidade pulpar através da aplicação de um material dentário diretamente sobre a polpa exposta.

O material utilizado neste procedimento deve ter algumas propriedades, tais como a capacidade de: controlar a infecção e a inflamação; apresentar adesividade à dentina para evitar infiltração; ser de fácil manipulação; promover a formação de tecido dentinário; e ser biocompatível e bioestimulador, ou seja, ser capaz de modular a resposta do tecido pulpar frente à agressão. Entretanto, nenhum dos materiais presentes até o momento é capaz de cumprir todos esses requisitos.

O material mais utilizado para o capeamento pulpar nos últimos anos foi o Hidróxido de Cálcio (HC). Contudo, mais recentemente, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e o material à base de silicato tricálcico (Biodentine) também têm sido indicados para este fim. Tanto o MTA, quanto o Biodentine, vem demonstrado altas taxas de sucesso, apresentando resultados favoráveis que parecem superar as

desvantagens do HC. Entretanto, a maior parte das informações presentes até o momento baseia-se apenas em acompanhamentos clínicos e radiográficos, com curtos períodos de acompanhamento.

Algumas análises histológicas disponíveis vêm mostrando que o tecido reparador formado após emprego do MTA é desorganizado, amorfo e com a presença de restos pulparez aprisionados em seu interior. Concluem que este processo não pode ser considerado como uma regeneração, mas sim um processo de cicatrização, uma vez que os tecidos perdidos não são repostos morfológica e funcionalmente. Por outro lado, as pontes dentinárias associadas ao uso do Biodentine foram certas vezes descritas como possuindo um maior volume de tecido neoformado quando comparadas com aquelas associadas ao MTA e, em alguns casos, apresentando organização tubular.

Assim, há uma busca crescente no sentido de desenvolver outras soluções capazes de superar as desvantagens ainda existentes dos materiais disponíveis até o momento. Além dos biomateriais, outras técnicas também tem sido propostas para o reparo dos tecidos pulparez, tais como a terapia celular e a engenharia tecidual. Esta última técnica, baseada na tríade células-tronco, fatores de crescimento e arcabouços (*scaffolds*), tem buscado novas soluções regenerativas capazes de restaurar, repor, manter ou melhorar as funções biológicas dos tecidos. Na Odontologia, o interesse em pesquisas relacionadas à engenharia tecidual tem tido bastante foco, principalmente após o isolamento e caracterização de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs, do inglês *human dental pulp stem cells*).

Atualmente, sabe-se que o efeito terapêutico das células-tronco não está apenas em sua capacidade de proliferação, integração e diferenciação, mas principalmente em sua atividade parácrina, ou seja, na sua capacidade de secretar fatores tróficos e de crescimento, citocinas e quimiocinas que exercem impacto benéfico sobre o tecido danificado. Esses fatores secretados, quando utilizados isoladamente sem a própria célula-tronco, podem causar reparação tecidual em diversas condições de lesões a órgãos e tecidos. Tais fatores podem ser encontrados no meio em que as células-tronco são cultivadas e, desta forma, o meio é denominado meio condicionado (MC).

Já foi demonstrado que o MC por células-tronco mesenquimais pode ser capaz de promover a secreção de citocinas pró e antiinflamatórias em células da polpa dentária *in vitro* e de atenuar a resposta inflamatória inicial na polpa dentária

de ratos *in vivo* após reimplante dentário. Além disso, o MC por hDPSCs (MC-hDPSC), mostrou ser capaz de alterar o comportamento de células endoteliais, resultando em efeitos proangiogênicos e de promaturação que sugerem fortemente que os fatores tróficos liberados pelas hDPSCs são capazes de desencadear respostas angiogênicas pronunciadas. O MC-hDPSC vem sendo descrito como uma ferramenta atraente, não invasiva e acelular para abordagens terapêuticas em medicina regenerativa. Na odontologia, essa nova abordagem é extremamente promissora e deve ser mais explorada para aplicações clínicas.

Baseado no exposto, acreditamos que polpas expostas poderiam responder melhor ao capeamento pulpar se, em semelhança às técnicas de engenharia tecidual, fossem associados fatores de crescimento a um biomaterial. Assim sendo, a manipulação de materiais capeadores com meio condicionado por células-tronco (e.g. rico em fatores de crescimento) poderia constituir um capeamento pulpar alternativo, em uma técnica acelular, que poderia melhorar as taxas de sucesso alcançadas pelos materiais capeadores utilizados até o momento. Apesar de ainda não sabermos com clareza a composição exata do MC por células-tronco, acreditamos que as hDPSCs são capazes de produzir e secretar para o meio de cultivo diversos fatores importantes para a sinalização e modulação do processo de reparação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPLEXO DENTINA-POLPA

O complexo dentina-polpa é uma unidade biológica constituída pelo tecido dentinário e pelo tecido pulpar, mantendo uma íntima relação estrutural, embriológica e funcional. Desta forma, a dentina e a polpa não são consideradas estruturas isoladas, mas sim um complexo cujas repercussões e mecanismos de resposta tecidual agem de forma integrada, mantendo uma profunda relação ao longo de toda vida do elemento dental. Enquanto a polpa dentária tem como função essencial formar a matriz dentinária, a dentina, por sua vez, protege a polpa das agressões do meio externo, revestindo-a com um tecido duro mineralizado (Pashley, 1996; Goldberg et al., 2011; Machado, 2017).

A vitalidade do complexo dentina-polpa durante toda a vida de um dente contrasta com a perda de material celular do esmalte após a erupção na cavidade oral. Como consequência importante dessa vitalidade, o complexo dentina-polpa é capaz de responder a lesões e estímulos nocivos que afetam o dente. Quando a dentina é agredida física e/ou quimicamente, a polpa responde a esses estímulos buscando diminuir a permeabilidade dentinária através da formação de dentina, desde que esses estímulos não excedam sua capacidade de reparação. A natureza e magnitude da resposta irão refletir a extensão da lesão e as condições do tecido no complexo (Smith, 2002; Huang, 2011; Smith et al., 2012).

A relação entre a dentina e a polpa começa no germe dentário, quando as primeiras camadas de dentina são depositadas por odontoblastos recentemente diferenciados da papila dentária. Os odontoblastos são células pós-mitóticas organizadas como uma camada de células em paliçada ao longo da interface entre a polpa dentária e a dentina (Bleicher, 2014). A dentina primária (desenvolvimental) é formada por estas células durante o desenvolvimento do dente. No pós-desenvolvimento, os odontoblastos continuam depositando dentina secundária (fisiológica) lentamente durante toda a vida útil do elemento dental (Kuttler, 1959; Orchardson; Cadden, 2001; Bleicher, 2014). A dentina terciária, por sua vez, é depositada em resposta a uma lesão ou dano aos tecidos dentários. Difere da

primária e da secundária não apenas em sua taxa de deposição, mas também em sua composição (Cooper et al., 2010).

Diversas injúrias podem causar danos ao complexo dentina-polpa. Dentre elas, podemos destacar os procedimentos restauradores (preparos cavitários e materiais aplicados sobre a dentina), lesões de cárie e desgastes ou traumas dentários. Em geral, estes estímulos podem ocorrer em pequena ou grande extensão e em baixa ou alta intensidade, refletindo de forma significativa no tipo de dentina terciária a ser formada (Bjørndal, 2008; Smith et al., 1995).

Desta forma, a dentina terciária pode ser subclassificada como reacional ou reparadora. A matriz dentinária reacional é depositada por odontoblastos sobreviventes que regulam sua atividade secretora em resposta a um estímulo relativamente leve (de pequena extensão e baixa intensidade). Por sua vez, a dentina reparadora é secretada por uma nova geração de células (células odontoblasto-símile) diferenciadas a partir populações de células-tronco progenitora. Este processo ocorre em resposta a um estímulo de maior extensão e intensidade, culminando na morte dos odontoblastos primários (Smith et al., 1995; Bjørndal; Darvann, 1999). Este processo é mais complexo, uma vez que requer recrutamento inicial de células progenitoras, sinalização da diferenciação celular e secreção de matriz dentinária (Sloan; Smith, 2007; Tziafas; Kodonas, 2010).

Após o recrutamento e migração de células-tronco e progenitoras ao sítio da injúria, essas células passam a se proliferar, expandir, e então a se diferenciar em células odontoblasto-símile, sobre influência da sinalização de moléculas bioativas (Smith et al., 2016). As células odontoblásticas sintetizam matriz orgânica de colágeno tipo I e tipo V e participam ativamente de sua mineralização secretando proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas não colágenas envolvidas na nucleação e no controle do crescimento da fase mineral, tais quais: sialofosfoproteína dentinária (DSPP, do inglês *dentin sialophosphoprotein*), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1, do inglês *dentin matrix protein1*), fosfatase alcalina (ALP do inglês *alkaline phosphatase*) e osteocalcina (BGLAP do inglês *bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*). Todos estes componentes da matriz orgânica dentinária subsequentemente irão ser mineralizados, formando um tecido duro reparativo (Goldberg et al., 2011; Bleicher, 2013).

O processo inflamatório, ocasionado pela injúria pulpar, é responsável por induzir o processo de reparo. O complexo dentina-polpa reage ao estímulo nocivo

através de uma combinação entre inflamação e mineralização. O equilíbrio entre a pulpíte e o reparo é fundamental para preservar a vitalidade pulpar. Assim, ambos os processos devem estar em harmonia para que o reparo possa ocorrer. Caso contrário, se a resposta inflamatória acontecer de forma demasiadamente intensa, os efeitos sobre o tecido pulpar serão deletérios, dificultando o processo de reparo e podendo levar à morte celular. Em casos de infecção do tecido pulpar, o problema se faz ainda mais grave. Haverá então a necessidade de equilíbrio entre os processos infeccioso, inflamatório e de reparo, de forma a favorecer a recuperação do tecido pulpar (Goldberg et al., 2008; Cooper et al., 2010; Komabayashi; Zhu, 2010).

Tradicionalmente, o manejo de lesões cariosas profundas tem sido com remoção completa (ou não seletiva) do tecido cariado que, muitas vezes, pode levar à exposição não intencional da polpa e, conseqüentemente, ao tratamento endodôntico. Entretanto, as estratégias de manejo para tratamento da polpa moderadamente exposta estão mudando nos últimos anos. Há o ressurgimento de uma tendência a evitar-se a pulpectomia e retornar às técnicas de tratamento vital da polpa, como a pulpotomia parcial ou completa e o capeamento pulpar direto. Essas mudanças são resultados de uma melhor compreensão da resposta reparadora do complexo dentina-polpa (Bjørndal et al., 2019).

O sucesso da dentinogênese reparadora depende do adequado reestabelecimento da integridade morfofuncional do complexo dentina-polpa, tornando-o capaz de formar tecido dentinário na área adjacente à lesão, com uma resposta inflamatória controlada. Para isso, pode-se optar pela proteção do complexo dentina-polpa através da aplicação de materiais específicos entre o tecido pulpar e o material restaurador, evitando danos adicionais causados pelo procedimento operatório, toxicidade dos materiais restauradores e penetração de microorganismos devido à infiltração (Téclès et al., 2005; Chogle et al., 2012; Cohenca et al., 2013).

Os últimos anos têm sido marcados pelo desenvolvimento de novos materiais para este fim, resultando em tratamentos mais previsíveis do ponto de vista clínico. Entretanto, as evidências científicas ainda não são consistentes em relação a questões críticas como o prognóstico dos tratamentos, superioridade entre os materiais empregados e qualidade da ponte neoformada e tecido pulpar subjacente (Bjørndal et al., 2019).

2.2 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO

Dentre as diversas tendências na endodontia contemporânea, podemos destacar o desenvolvimento de terapias biologicamente minimamente invasivas, a preservação da polpa dentária em um estado saudável com vitalidade mantida, a prevenção da periodontite apical e a melhora das taxas de sobrevivência em longo prazo dos dentes com distúrbios pulpare. Quanto à terapia da polpa vital, o capeamento direto é uma abordagem menos invasiva para manter a polpa exposta, podendo melhorar o resultado do tratamento em longo prazo, empregando uma estratégia biologicamente menos invasiva (Wei; Ling, 2019).

Como destacado anteriormente, a exposição do tecido pulpar coloca em risco a manutenção da vitalidade do complexo dentina-polpa. Esta perda de vitalidade é ainda mais grave quando acomete dentes com rizogênese incompleta, onde a formação do elemento dental é interrompida, resultando em um dente com raízes mais curtas e paredes dentinárias mais delgadas, podendo levar à fratura radicular e perda do elemento (Hargreaves et al., 2013).

Em geral, existem três principais causas para a exposição da polpa vital: lesões de cárie, fatores mecânicos e trauma. A exposição por cárie ocorre quando a lesão cariosa avança suficientemente em direção ao tecido pulpar, expondo-o antes mesmo da remoção completa do tecido cariado. Por outro lado, se a exposição ocorre durante a preparação de uma cavidade sem cárie, chamamos de exposição mecânica. Geralmente, esse tipo de exposição ocorre acidentalmente durante o preparo do dente. A exposição traumática, por sua vez, é resultado de um trauma (como por exemplo, durante a prática de esportes) capaz de fraturar a parte coronal do dente (Komabayashi et al., 2016).

As opções de tratamento frente à exposição pulpar giram em torno da pulpectomia seguida de tratamento endodôntico, pulpotomia (parcial ou completa) e capeamento pulpar direto, sendo este último considerado como a técnica menos invasiva. O capeamento pulpar direto é um tratamento para a polpa vital exposta que envolve a colocação de um material dentário diretamente sobre a área pulpar exposta a fim de facilitar tanto a formação de uma barreira protetora (Bergenholtz et al., 1985; Couve, 1986; Aguilar; Linsuwanont, 2011) quanto a manutenção da vitalidade pulpar (Zander; Glass, 2005; Bergenholtz, 2005).

Diversos fatores podem afetar diretamente os resultados do tratamento baseado no capeamento pulpar direto. Dentre eles, podemos destacar a idade do paciente e a condição clínica da polpa relacionada a sintomatologia do paciente. Pacientes mais jovens tendem a responder com uma taxa de sucesso maior do que pacientes com idade mais avançada (Cho et al., 2013; Lipski et al., 2018). Este fator provavelmente está relacionado com a alta taxa metabólica e capacidade reparativa da polpa mais jovem. Além disto, no geral, a polpa vital pode ser classificada em três condições clínicas: polpa normal, pulpite reversível ou pulpite irreversível. O capeamento pulpar é indicado em casos de polpa normal ou pulpite reversível, quando o paciente não apresenta sintomas clínicos ou quando os sintomas desaparecem após a remoção do estímulo nocivo (Komabayashi et al., 2016).

O primeiro tratamento capeador direto foi realizado em 1756 por Pfaff, utilizando folha de ouro (Komabayashi et al., 2016). Desde então, diversos materiais têm sido recomendados para capeamento pulpar direto (Dammachke, 2008; Alex, 2018). Os capeadores pulpares são materiais odontológicos utilizados na proteção do complexo dentina-polpa e devem reparar a polpa sem causar danos às células e à matriz extracelular, de forma a manter o tecido conjuntivo especializado com características de normalidade, bem como promover a formação de tecido dentinário (Pashley, 1996; Tjäderhane, 2002).

Algumas propriedades são desejadas e consideradas essenciais para um material capeador ideal, tais quais: capacidade de controlar infecção; controlar inflamação; apresentar adesividade à dentina, evitando infiltração; ser de fácil manipulação; promover a formação de tecido dentinário; ser biocompatível; e ser bioestimulador, ou seja, ser capaz de modular a resposta do tecido pulpar frente à agressão (Modena et al., 2009; Komabayashi; Zhu, 2010; Ferracane et al., 2010).

Atualmente, existem diversos materiais disponíveis no mercado para serem utilizados nos procedimentos capeadores. Dentre eles, os mais utilizados e descritos na literatura são o Hidróxido de Cálcio, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e, mais recentemente, o Material à base de silicato tricálcico (Biodentine) (Komabayashi et al., 2016). Entretanto, outros materiais como cimentos de óxido de zinco e eugenol (Holland et al., 1981) e ionômero de vidro fotoativado (Felton et al., 1991) já foram descritos.

2.2.1 Hidróxido de Cálcio

Historicamente, o Hidróxido de Cálcio tem sido o material mais utilizado para procedimentos de capeamento pulpar direto. Foi introduzido na odontologia em 1921 por Hermann e por diversas décadas foi considerado o “padrão-ouro” dos materiais capeadores (Baume; Holz, 1981; Hilton, 2009). Quimicamente o HC é uma base forte com pH alcalino de 12,5 a 12,8. Sua ação principal é baseada na dissociação iônica dos íons cálcio (Ca^{2+}) e hidroxila (OH^-), garantindo seu pH elevado que lhe confere excelente propriedades antibacterianas, minimizando ou eliminando a penetração de bactérias e subsequente irritação do tecido pulpar, além de ajudar a manter o estado de alcalinidade do tecido pulpar exposto. Essas propriedades são importantes para auxiliar na formação tecidual (Barthel et al., 1997; Farhad; Mohammadi, 2005).

O HC, em contato com o tecido pulpar exposto, induz uma lesão química causada pelos íons hidroxila, gerando um efeito inicial de desenvolvimento de uma necrose superficial (Pallotta et al., 2010). Esta necrose causa uma leve irritação e estimula a polpa a se defender e reparar, formando uma ponte reparadora de dentina através da diferenciação celular, secreção de matriz extracelular e subsequente mineralização pela saturação da zona com íons cálcio (Holland et al., 1979, Farhad; Mohammadi, 2005; Schröder, 1985; Mohammadi; Dummer, 2011). Entretanto, os estudos vêm relatando que a barreira de tecido mineralizada que se forma apresenta pouca qualidade, bem como descontinuidade e um longo tempo é demandado para sua formação, o que propicia invasão bacteriana e complicações na reparação tecidual (Nair et al., 2008; Brignardello-Petersen, 2019).

De fato, o HC apresenta diversas desvantagens, tais quais a inflamação da superfície pulpar, podendo apresentar necrose após o capeamento, presença de defeitos de túnel na ponte dentinária, alta solubilidade em fluidos orais, falta de adesão, degradação ao longo do tempo e, somando todos estes fatores, a falta de uma vedação hermética da polpa subjacente contra infecções recorrentes devido à microinfiltração (Cox et al., 1996; Cox et al., 2001; Kitasako et al., 2008).

Como resultado das desvantagens encontradas no uso do HC, um número significativo de materiais vem sendo testados e relatados na literatura nas últimas duas décadas como alternativa ao HC. Essas novas classes de materiais parecem trazer

resultados mais promissores, o que justifica o retorno do foco dos estudos dos procedimentos capeadores na comunidade endodôntica.

2.2.2 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma (Estados Unidos da América) e introduzido pela primeira vez na odontologia por Torabinejad em 1993, como proposta de um material para cirurgia paraendodôntica, com o principal objetivo de promover o selamento das áreas de comunicação do interior do dente com o ambiente exterior. Hoje em dia, o MTA é indicado em diversas situações clínicas como, por exemplo, para capeamento pulpar direto, como cimento endodôntico, reparação de perfurações, plugs apicais para dentes com ápice aberto e selamento coronário após procedimentos de revascularização (Tawil et al., 2015). O MTA vem sendo caracterizado como um material bioestimulador ou bioativo, devido ao fato de promover reações teciduais bastante favoráveis (Torabinejad; Parirokh, 2010; Parirokh; Torabinejad, 2010a). A bioatividade é uma característica referida à capacidade de um biomaterial de formar hidroxiapatita mineral em sua superfície (Sanz et al., 2019).

Quimicamente, o MTA é constituído por um pó (branco ou cinza) composto por partículas hidrofílicas que, na presença de água, se solidificam. Este pó é formado por uma mistura composta majoritariamente por silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e óxido de bismuto (que lhe confere radiopacidade). Sua manipulação consiste na incorporação com água destilada, fornecida pelo fabricante (Camilleri et al., 2005; Camilleri, 2008, Garcia et al., 2011).

Seu mecanismo de ação descrito na literatura baseia-se nos princípios de que o MTA forma HC que libera íons cálcio, os quais favorecem a fixação e proliferação celular; cria um ambiente antibacteriano pelo pH alcalino; modula a produção de citocinas; incentiva a diferenciação e migração de células que irão formar matriz extracelular a ser mineralizada; e forma hidroxiapatita ou apatita carbonatada na superfície em contato com o MTA, fornecendo um selamento biológico (Parirokh; Torabinejad, 2010b). Ainda, outros fatores que parecem favorecer o reparo são sua ótima capacidade seladora, que dificulta a infiltração marginal; baixa solubilidade; e

radiopacidade satisfatória (Roberts et al., 2008; Parirokh; Torabinejad, 2010a; Torabinejad; Parirokh, 2010).

A literatura tem demonstrado que o tecido pulpar responde favoravelmente ao MTA, com a deposição de uma barreira completa de tecido mineralizado, em um menor tempo de formação quando comparado ao HC, e um sinal mínimo de inflamação ao tecido, mantendo a polpa remanescente com características de normalidade. Além disto, o índice de sucesso das terapias pulpares usando MTA tem sido superiores às técnicas utilizando materiais à base de HC (Li et al., 2015; Paula et al., 2018). Entretanto, as principais desvantagens do MTA tem sido o alto índice de manchamento coronário, dificuldade de manipulação, seu alto custo e seu longo tempo de presa, resultando em alta solubilidade em um estágio inicial, podendo levar à microinfiltração (Fridland; Rosado, 2003; Chiang; Ding, 2010; Możyńska J et al, 2017).

2.2.3 Material à base de silicato tricálcico (Biodentine)

O Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France) foi lançado em 2009 com a proposta de ser um “substituto da dentina” e vem sendo frequentemente descrito na literatura como um material extremamente promissor, sendo o principal representante dos cimentos à base de silicatio tricálcico usados na odontologia. As críticas positivas na literatura são devido a suas propriedades físicas superiores à dos demais materiais, melhor manuseio, excelente biocompatibilidade e ampla gama de aplicações clínicas, semelhantes às do MTA (Malkondu et al., 2014).

O produto está disponível na forma de uma cápsula contendo a proporção ideal do pó para subsequente adição do líquido. A composição do pó é formada por silicato tricálcico, carbonato e óxido de cálcio e óxido de zircônio (radiopacificador); enquanto o líquido contém cloreto de cálcio dihidratado, que atua como acelerador, Areo e água purificada. Ambas as substâncias presentes no líquido contribuem para tempos de presa reduzidos (de 10 a 12 minutos). Além disso, a composição do líquido acelera a reação de hidratação e reduz a quantidade de água necessária para a mistura, fornecendo consistência adequada, o que também contribui para o fácil manuseio da mistura (Kaur et al., 2017).

O Biodentine está associado a um alto pH (12) e à liberação de íons cálcio e silício, o que estimula a mineralização e cria uma “zona de infiltração mineral” ao longo da sua interface com a dentina, proporcionando uma melhor vedação. Caron et al. (2014) encontraram que o Biodentine exibe propriedades de vedação superiores ao do MTA. De acordo com Rajasekharan et al. (2018), como o Biodentine supera as principais desvantagens do MTA, ele tem um grande potencial para revolucionar as diferentes modalidades de tratamento em odontologia, especialmente após lesões traumáticas. No entanto, são necessários mais estudos clínicos de longo prazo e de alta qualidade para conclusões definitivas. Por outro lado, as revisões de literatura e os ensaios clínicos randomizados vêm demonstrando que o Biodentine e o MTA apresentam resultados similares quanto às taxas de sucesso tanto para capeamento pulpar direto ou aplicação após pulpotomia (Awawdeh et al., 2018; Mahmoud et al., 2018; Tran et al., 2019).

2.2.4 Cicatrização ou Regeneração?

A regeneração e a cicatrização são dois processos relacionados ao reparo, porém distintos entre si. Regeneração refere-se à proliferação de células e tecidos a fim de substituir as células e tecidos perdidos ou danificados, com restauração da estrutura normal do tecido. Por outro lado, a cicatrização refere-se a uma resposta à lesão que envolve a formação de um tecido com características de fibrose, com estrutura tecidual permanentemente alterada (Gurtner et al., 2008).

Diversos estudos na literatura vêm demonstrando altas taxas de sucesso dos procedimentos capeadores, sobretudo, através de avaliações clínicas e radiográficas. Brizuela et al. (2017) realizaram um ensaio clínico randomizado com dentes permanentes apresentando exposição pulpar que foram diretamente capeados com Hidróxido de Cálcio (HC), agregado trióxido mineral (MTA) ou Biodentine. Foram realizados exames clínicos de acompanhamento em 1 e 3 semanas, 6 meses e 1 ano. Em uma semana, os pacientes apresentaram 100% de sucesso clínico em todos os grupos. Ao longo do tempo, foi possível notar algumas poucas falhas (sobretudo no grupo HC). Não houve diferença estatística entre os materiais estudados.

Katge e Patil (2017) compararam o capeamento pulpar direto da polpa jovem de molares permanentes através de avaliação clínica e radiográfica. Os pacientes selecionados tinham os primeiros molares bilaterais com envolvimento de cárie. De acordo com o desenho da boca dividida, os pacientes foram divididos em grupo Biodentine (lado direito) e MTA (lado esquerdo) como materiais capeadores utilizados no procedimento. A avaliação foi feita após 6 e 12 meses. O estudo relatou uma taxa de 100% de sucesso para ambos os materiais utilizados nos dois períodos.

Parinyaprom et al. (2018) também comparou as taxas de sucesso do capeamento direto utilizando MTA e Biodentine em dentes permanentes com exposição pulpar após 6 meses, utilizando exames clínicos e radiográficos para determinar o sucesso. Ele encontrou uma taxa de sucesso de 92,6% para o MTA e de 96,4% para o Biodentine, sem diferença significativa. A descoloração cinza estava presente em 55% dos dentes capeados com MTA. Já no grupo Biodentine, nenhuma descoloração foi observada.

Entretanto, a informação disponível sobre a qualidade do tecido neoformado após o capeamento pulpar direto ainda é bastante controversa. Alguns estudos em humanos já foram conduzidos, mas a maioria deles se baseia em modelos *in vivo*, utilizando principalmente ratos e realizando avaliações através de técnicas histológicas (Khalil et al., 2013; Moazzami et al., 2014; Liu et al., 2015; Chang et al., 2016; Long et al., 2017; Liu et al., 2017; Okamoto et al., 2018; Trongkji et al., 2018; Yaemkleebbua et al., 2019) ou microtomográficas (Kim et al., 2016; Okamoto et al., 2018; Yaemkleebbua et al., 2019). Contudo, os resultados sobre a morfologia e organização da dentina reparadora ainda é um assunto bastante discutido.

Simon et al. (2008) foi o primeiro a utilizar murinos para avaliação *in vivo* do reparo pulpar. Em seu estudo, a exposição foi realizada no centro da face palatina do primeiro molar inferior de camundongo e capeada diretamente com MTA Pro-Root. Os animais foram eutanasiados em 3 dias, 1, 3, 5 e 11 semanas e analisados histologicamente através da coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), imunohistoquímica para detecção da expressão de DSPP, microscopia eletrônica de varredura e análise radiográfica para determinar a resposta pulpar e a formação de ponte dentinária. As análises demonstraram formação de ponte dentinária calcificada em 5 e 11 semanas, entretanto o aspecto da dentina apresentou uma morfologia globular, sem a presença de túbulos dentinários.

Tran et al. (2012), em um modelo animal, realizaram exposições mecânicas da polpa em primeiros molares superiores de ratos e realizaram o procedimento capeador utilizando Biodentine, MTA ou HC. Após 7 dias, os resultados demonstraram que o Biodentine e o MTA induziram a proliferação celular e a formação de focos de mineralização, que foram fortemente positivos para osteopontina. Em períodos mais longos, até 1 mês, foi observada a formação de ponte dentinária homogênea no local da lesão, secretada por células com fenótipo odontoblástico. Por outro lado, o tecido reparador induzido pelo HC apresentou organização porosa.

Tran et al. (2019) caracterizaram a dentina reparadora formada após capeamento pulpar direto em ratos usando Biodentine e MTA. Os espécimes foram avaliados através de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman 30 dias após o processo capeador. Os resultados mostraram que a ponte de dentina reparadora observada em ambos os grupos apresentou túbulos dentinários e composição semelhante à dentina primária.

Através de análise histológica e por tomografia computadorizada, Nowicka et al. (2015) avaliou a formação de ponte de dentina reparadora após capeamento pulpar direto com HC, MTA, Biodentine e adesivo Single Bond Universal em molares humanos. Após exposição mecânica da polpa, o procedimento capeador foi realizado e os dentes foram extraídos 6 semanas depois. A dentina reparadora formada no grupo HC, MTA e Biodentine foi significativamente superior em termos de espessura e volume do que à formada no grupo do adesivo. Ainda, as pontes de dentina no grupo Biodentine apresentaram os maiores volumes médio e máximo. Entretanto, o grupo MTA apresentou a maior densidade média.

Por outro lado, Dammaschke et al. (2019) publicaram um estudo da avaliação histológica do tecido duro formado após procedimento de capeamento direto em humanos. Terceiros molares de pacientes adultos tiveram seus tecidos pulpaes expostos e então foram capeados diretamente com MTA e restaurados com resina composta. Após 7 meses, os dentes foram avaliados clínica e radiograficamente e então extraídos para processamento histológico. Os autores encontraram que o tecido mineralizado neoformado era principalmente atubular e não apresentava características de dentina comum em nenhum dos casos. Não foram observadas células exibindo características de odontoblastos. Na verdade, as células exibiam uma forma plana ou cuboidal, semelhante a fibroblastos. Os autores sugerem que

esses resultados podem ser considerados mais apropriadamente como um processo de cicatrização do que como uma resposta genuína de regeneração.

Ainda, Ricucci et al. (2014) estudou o tecido dentinário e as alterações celulares associadas à cárie/restaurações na presença ou ausência de exposições pulpares. Eles encontraram que, quando havia exposição pulpar e o procedimento de capeamento era realizado, os defeitos eram reparados pela deposição de um tecido calcificado distrófico amorfo que se assemelhavam mais aos cálculos pulpares do que à dentina, às vezes aprisionando restos pulpares. Este tecido duro atubular era revestido por fibroblastos e fibrilas colágenas. Assim, o estudo conclui que a dentinogênese reparadora não pode ser considerada como um processo regenerativo, uma vez que o tecido duro formado não possui características da dentina genuína.

Uma revisão de literatura com o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes materiais capeadores em dentes com exposição pulpar foi realizada por Matsuura et al. (2019) onde foram incluídas avaliações clínicas e radiográficas em longo prazo da eficácia de diferentes materiais para capeamento pulpar direto. Dentre os estudos incluídos na análise, foi encontrada uma média de 18 meses de acompanhamento para o HC (intervalo entre 6 e 36 meses); de 19 para o MTA (intervalo entre 6 e 36 meses); e de 14,3 meses (intervalo de 6 a 31.8) para o Biodentine. Nestes períodos, a média do índice de sucesso foi de 52% para o HC, 76,3% para o MTA e 96,4% para o Biodentine.

As contravérsias encontradas principalmente em relação à qualidade da dentina neoformada e a condição do tecido pulpar adjacente vem levando diversos estudos a testar novos materiais a serem aplicados com a finalidade de recuperar a polpa exposta (Dianat et al., 2018; Ali et al., 2019; Imura et al., 2019; Wu et al., 2019). Além disto, a literatura ainda não é clara sobre a taxa de sucesso dos materiais capeadores presentes até o momento em um acompanhamento em longo prazo. Do ponto de vista biológico, parece fazer sentido a busca por um material capeador que seja capaz de promover um tecido mais próximo possível à morfologia e funcionalidade do complexo dentino-pulpar.

2.3 MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS-TRONCO

Além dos biomateriais, técnicas como a terapia celular e a engenharia tecidual também tem sido propostas para o reparo dos tecidos pulpares. A engenharia tecidual é tradicionalmente baseada na tríade células-tronco, fatores de crescimento e arcabouços (*scaffolds*) e tem avançado exponencialmente nos últimos anos na busca por novas soluções regenerativas capazes de restaurar, repor, manter ou melhorar as funções biológicas dos tecidos (Morotomi et al., 2019).

2.3.1 Células-tronco da polpa dentária humana

Células-tronco são células indiferenciadas e que possuem grande potencial de proliferação e diferenciação, podendo se transformar em pelo menos um tipo de célula diferenciada ou madura (Denham et al., 2005). As células-tronco sofrem divisão assimétrica dando origem a outra célula-tronco e a uma célula progenitora. Estas células estão presentes em todo o corpo humano, constituindo de 0,1 a 5% da medula óssea humana e das células hematopoiéticas circulantes (Pivoriūnas et al., 2010). As células-tronco são classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação, podendo ser: unipotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em apenas um tipo de célula adulta; multipotentes, se diferenciando em dois ou mais tipos celulares; pluripotentes, capazes de se transformar em todos os tipos de células de um organismo adulto, exceto linhagens extra embrionárias; e totipotentes, que podem se transformar em qualquer tipo de célula adulta e também nos tecidos extra embrionários (Denham et al., 2005).

As células-tronco podem ser isoladas de diversos tecidos do corpo humano. As células-tronco provenientes de tecidos embrionários, por exemplo, podem originar células que podem se diferenciar em todos os tipos celulares, sendo consideradas células pluripotentes. Já as células-tronco provenientes dos tecidos mesenquimais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*) são células multipotentes. Elas podem se diferenciar numa grande variedade de células, mas de uma forma um pouco mais limitada. Em geral, as MSCs têm grande capacidade de diferenciação

em tecidos conjuntivos especializados (Liao; Chen, 2014; D'Alimonte et al., 2017).

As MSCs correspondem a populações de células estromais responsáveis pelo equilíbrio e por diferentes processos de regeneração quando os tecidos sofrem agressão, gerando algum tipo de lesão (D'Alimonte et al., 2017). O primeiro tipo de célula-tronco mesenquimal foi isolado da medula óssea, sendo denominado como células-tronco hematopoiéticas (Friedenstein; Kuralesova, 1971). Desde então, as MSCs foram isoladas de diversos outros tecidos somáticos, incluindo os tecidos dentoalveolares. A primeira célula-tronco de origem dental foi isolada do tecido da polpa dentária humana por Gronthos et al. (2000) e chamada de hDPSC (do inglês *human dental pulp stem cells*). Posteriormente, as células-tronco foram isoladas de diversos outros tecidos dento-alveolares, tais quais: dos dentes decíduos (Miura et al., 2003), da gengiva (Górski, 2016), do ligamento periodontal (Seo et al., 2004), da papila apical (Sonoyama et al., 2008), folículo dentário (Morsczech et al., 2005) e de cistos periapicais humanos (Marrelli et al., 2013).

A polpa dentária é considerada uma excelente e não invasiva fonte de células-tronco para aplicações em terapias regenerativas. De acordo com a literatura, elas podem se diferenciar em linhagens mesodérmicas (adipócitos, odontoblastos, condrócitos e osteócitos), ectodérmicas (neurócitos) e endodérmicas (Huang et al., 2009). Ainda, já foi relatada sua capacidade de regeneração em tecidos ósseo, adiposo ou neuronal (Cristaldi et al., 2018; Matsubara et al., 2015).

Diversos estudos vêm sendo relatados na literatura demonstrando o alto grau de capacidade de proliferação e diferenciação das hDPSCs e sua potencial aplicação para regeneração de tecidos conjuntivos diferenciados. Iohara et al. (2004) demonstrou a capacidade de hDPSCs, tratadas com proteína óssea morfogenética recombinante 2 (rhBMP2, do inglês *recombinant human bone morphogenetic protein2*), em se diferenciar em odontoblastos e produzir matriz dentinária. Pedroni et al. (2019) avaliou o potencial de membranas celulares de hDPSCs para futura aplicação em regeneração óssea e concluiu que o uso dessas estruturas tridimensionais é promissor para o tratamento da perda óssea, sendo uma técnica útil principalmente para defeitos ósseos críticos ou qualquer tipo de defeito ósseo em pacientes portadores de doenças que prejudicam a regeneração óssea, como diabetes *mellitus*, osteonecrose da mandíbula relacionada à medicação e osteoporose. Diniz et al. (2018) demonstrou em um modelo de estudo *in vivo* que a associação de hDPSCs com *scaffolds*, fatores de crescimento e fotobiomodulação

pode ajudar na regeneração de tecido ósseo de defeitos de calvária em ratos, apresentando um tecido ósseo neoformado bem organizado com uma matriz interconectada por finas trabéculas ósseas.

2.3.2 Meio Condicionado por células-tronco da polpa dentária humana (MC-hDPSC)

Recentemente descobriu-se que o efeito terapêutico das células-tronco reside não apenas em sua proliferação, integração e diferenciação nas células do tecido, mas principalmente em sua atividade parácrina, ou seja, na sua capacidade de secretar fatores tróficos e de crescimento, citocinas e quimiocinas com propriedades regenerativas e anti-inflamatórias. A literatura vem demonstrando que as células-tronco causam reparação tecidual graças à sua capacidade de secretar tais fatores, os quais exercem impacto benéfico sobre o tecido danificado (Yang et al. 2013). Ainda, vários estudos sobre fatores secretados por células-tronco mostraram que o fator secretado sozinho, sem a própria célula-tronco, pode causar reparação tecidual em diversas condições de lesões a órgãos e tecidos (Pawitan, 2014).

Os fatores secretados podem ser encontrados no meio em que as células-tronco são cultivadas e, desta forma, o meio é denominado meio condicionado (MC). O MC contendo produtos secretados por células-tronco pode, portanto, ser utilizado em terapia sem células, o que representa uma alternativa à terapia baseada em células, com vantagem de riscos menores, menor impacto com questionamentos éticos, possibilidade de administração alogênica e produção em massa. Estudos confirmam que o efeito terapêutico do MC é comparável ao efeito da aplicação de células-tronco (Pawitan, 2014; Vackovcá; Kubinová, 2016; Al-Sharabi et al., 2014), sendo uma técnica mais segura e prática do que o uso das próprias células-tronco (Stanko et al., 2018).

De acordo com Kichenbrand et al. (2019), em uma revisão de literatura que teve como objetivo investigar o uso terapêutico de meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana, diversas foram as aplicações encontradas no campo da medicina, como: promoção de angiogênese, neurogênese, redução de acidente vascular cerebral ou isquemia e regeneração de órgãos. Ainda, os autores

se referem ao MC por hDPSCs (MC-hDPSC) como uma ferramenta atraente, não invasiva e acelular para abordagens terapêuticas em medicina regenerativa. Concluem que essa nova abordagem é extremamente promissora e deve ser mais explorada para aplicações clínicas.

Os autores destacam algumas áreas descritas na literatura que tiveram resultados favoráveis e estimulantes, como por exemplo: a aplicação em reparação de tecidos dentários; em doenças cardiovasculares e isquêmicas, promovendo neovascularização e redução da isquemia; distúrbios osteoarticulares; doenças neurológicas; insuficiência de órgãos, como no tratamento de patologias que causam insuficiência hepática ou pulmonar; e diabetes *mellitus*, onde os fatores neurotróficos, angiogênicos e imunomoduladores podem ajudar a reduzir a polineuropatia e angiopatia (Kichenbrand et al., 2019).

Em 2014, Al-Sharabi et al. descreveu o potencial de fatores parácrinos encontrados no meio condicionado por células-tronco da medula óssea sobre a diferenciação osteo e odontogênica de hDPSCs em um estudo *in vitro*. Depois disso, Murakami et al. (2015) testou os efeitos tróficos do MC-hDPSC na angiogênese, neurogênese, migração e efeitos antiapoptoses sobre hDPSCs *in vitro* e encontrou resultados superiores do que quando o MC por células-tronco da medula óssea e do tecido adiposo foram aplicados. Ainda, o MC-hDPSC foi capaz de promover diferenciação odontoblástica das hDPSCs.

Murakami et al. (2015) também testou o efeito do MC-hDPSC em um modelo de estudo experimental *in vivo* de regeneração pulpar em dentes permanentes com ápice fechado em cães e demonstrou a formação de um tecido conjuntivo frouxo após a aplicação do MC-hDPSC, com maior volume de tecido neoformado e maior densidade de vascularização e inervação quando comparado com o MC por células-tronco da medula óssea e do tecido adiposo.

No estudo de Al-Sharabi et al. (2017), o MC por células-tronco da medula óssea foi aplicado no alvéolo de primeiros molares superiores extraídos e reimplantados em um modelo *in vivo* utilizando ratos. A presença do MC atenuou a resposta inflamatória inicial da polpa dentária, quando comparada com o grupo sem o uso MC. Ainda, De Cara et al. (2019) aplicou MC por células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos em um modelo ortotópico de regeneração pulpar em ratos e, na análise histológica realizada 30 dias após o tratamento, os animais do grupo com MC apresentaram formação de tecido conjuntivo no interior dos canais

radiculares, apresentando vasos sanguíneos dispersos preenchidos com hemácias, células inflamatórias e fibras de colágeno, enquanto nenhum tecido foi formado no grupo sem o uso do MC e o canal radicular permaneceu vazio. Estes resultados foram importantes para demonstrar o potencial benéfico de MC por células-tronco sobre o tecido pulpar, podendo este ser considerado como uma ferramenta promissora a ser testada no reparo do complexo dentina-polpa.

Gharaei et al. (2018) estudaram o efeito do MC-hDPSC no comportamento de células endoteliais *in vitro* e, através do teste de ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), detectaram uma ampla gama de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, incluindo VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), inibidor tecidual de metaloproteinase 1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, ativador do plasminogênio e fator 1 derivado de células estromais. Ainda, o MC-hDPSC acelerou significativamente as fases de adesão, desde a sedimentação até a fixação e espraçamento, bem como a taxa de proliferação e migração das células. Desta forma, os autores concluem que os efeitos pró-angiogênicos e de promaturação apresentados pelo MC-hDPSC sugerem fortemente que os fatores tróficos liberados pelas hDPSCs são capazes de desencadear respostas angiogênicas pronunciadas.

Diante do exposto nesta revisão, a associação de materiais capeadores tradicionalmente utilizados com o MC-hDPSC parece ser um assunto ainda sem resposta na literatura e que pode trazer informações importantes a respeito de suas possíveis aplicações na endodontia regenerativa.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da associação de meio condicionado por células-tronco de polpa dentária humana ao MTA ProRoot em relação ao MTA isolado no capeamento pulpar direto em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (CAAE: 89912318.3.0000.007; Anexo A) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOUSP (registros nº014/2018 e nº005/2019, Anexos B e C). Os experimentos foram iniciados apenas após as devidas aprovações.

Toda parte *in vitro* foi realizada no Laboratório de Pesquisas Básicas Prof. Edmir Matson do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Martins Marques.

Os animais utilizados nesse estudo foram aclimatados e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

A metodologia do trabalho foi realizada em duas fases consecutivas, a saber: (1) etapa *in vitro*: obtenção do meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana; (2) estudo *in vivo*.

4.1 FASE 1: ETAPA *IN VITRO*

4.1.1 Cultivo Celular

Células-tronco da polpa dentária humana (hDPCSs, do inglês *human dental pulp stem cells*) obtidas de terceiros molares inclusos de pacientes entre 18 e 45 anos extraídos por razões ortodônticas foram previamente isoladas e caracterizadas imunofenotipicamente (Pedroni et al., 2019). Alíquotas congeladas dessas células (P1; 10^6 células por criotubo) que se encontravam armazenadas no Banco de Células do Laboratório de Pesquisas Básicas Prof. Edmir Matson foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Márcia Martins Marques.

As hDPSCs congeladas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) foram descongeladas em banho de água a 37°C por dois minutos. Essa suspensão foi diluída 10x em tubo de ensaio contendo meio de cultura clonogênico (Mclono) composto por: α -MEM (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com concentrações finais de 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 U/mL de solução de antibióticos (penicilina + estreptomicina; Pen Strep, GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 2mM de L-glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 0,1 mM de solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). Após centrifugação dos tubos de ensaio a 1000RPM por 5 minutos, os sobrenadantes foram ressuspensos em Mclono e transferidos para frascos de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável. As células foram então incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de CO₂.

A monitorização do crescimento celular (Figura 4.1) foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA) e o meio de cultivo foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência (aproximadamente 70-80% do fundo da placa ocupado por células). Para isso, o meio do frasco de cultivo foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salino sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir as células foram destacadas com 2mL de solução de tripsina a 0,25 % (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em estufa a 37°C por 3 a 5 minutos, e então a tripsina foi inativada por meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas 1000 RPM durante 5 minutos, a temperatura ambiente. As células contidas no precipitado foram ressuspensas e plaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. As hDPSCs expandidas até no máximo 4 passagens (P4) foram utilizadas nos experimentos.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil), seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010).

Figura 4.1 – Fotomicrografia de fase de células hDPSCs em P2 (aumento original 100X)

Fonte: O autor

4.1.2 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo

Para verificar se as células mantiveram suas características de células-tronco mesenquimais após o descongelamento, as hDPSCs foram recaracterizadas avaliando seu perfil imunofenotípico através de citometria de fluxo. Todo o protocolo foi realizado a 4°C e as centrifugações a 800 RPM por 5 minutos.

Foi utilizado o seguinte painel de anticorpos, conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou alofococianina (APC), contra moléculas de superfície humanas, a saber:

Marcadores específicos associados a células-tronco mesenquimais: CD105-FITC, CD44-APC (BD Biosciences, CA, EUA) e CD146-PE (Biolegend, CA, EUA).

Marcadores não associados: CD45-APC, CD34-FITC e CD14-FITC (BD Biosciences, CA, EUA).

Células em P4 (1×10^6 células por marcador de superfície) foram lavadas duas vezes com PBSA e mantidas em solução de enzima marinha com atividade collagenolítica e proteolítica (StemPro Accutase, GIBCO) por 10 minutos, sob agitação, para minimizar a internalização de antígenos de superfície. As células foram centrifugadas e fixadas em 10 mL de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% por uma hora. As células foram então novamente lavadas com PBSA e contadas em

câmara de Neubauer. O sobrenadante foi descartado e uma solução de albumina de soro bovino (BSA; do inglês *bovine serum albumine*) a 5% foi adicionada às células por uma hora para bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram ressuspendidas em PBSA (3% BSA) e marcadas com os anticorpos primários (1:200) com uma hora de incubação. Além desse passo, o anticorpo CD105, que não vinha conjugado de fábrica ao fluorocromo, foi incubado por mais uma hora com fluoróforo próprio ao fim (controle isotípico IgG1k-FITC). As suspensões de células marcadas foram então lavadas três vezes com PBSA, filtradas (70 μ m) e transferidas para tubos tipo Eppendorf.

A seguir, as células foram classificadas em um citômetro de fluxo (FACS, Calibur, BD Bioscience) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP). Foram adquiridos 50.000 eventos dentro do *gate*. Os dados foram então analisados usando o software FlowJo versão 9.6.2 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.1.3 Obtenção e concentração do meio condicionado por hDPSCs (MC-hDPSC)

As hDPSCs foram cultivadas (como descrito anteriormente) em frascos de cultura de 75 cm² de área cultivável e cresceram até que pudesse ser observada aproximadamente 70-80% de confluência do fundo do frasco. As células foram lavadas 3 a 5 vezes com PBSA e incubadas com 8 mL meio α -MEM livre de soro fetal bovino e demais suplementações por frasco. Os frascos foram mantidos incubados por 24 horas e então o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos de ensaio de 50 mL, somando um total de 96 mL de MC.

Para concentração do MC, foram utilizados dispositivos de filtração por centrifugação Amicon Ultra-15 com retenção de 10 kDa (Amicon Ultra-15 10K, Millipore, Bedford, MA, EUA) (Figura 4.2). Como recomendado pelo fabricante, uma centrifugação inicial foi realizada com 10 mL de água destilada por dispositivo (Allegra 6KR Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Um volume de 12 mL de MC por dispositivo foi então depositado no compartimento superior de quatro dispositivos de filtração e os mesmos foram levados à centrífuga (4000 RPM durante

15 minutos a 15°C). A maior parte do MC passou pela membrana filtrante para o compartimento inferior, restando um volume de 200 μL de MC concentrado no compartimento superior (volume mínimo pré-estabelecido pelo fabricante). A fim de concentrar ainda mais o MC, mais 12 mL foram adicionados aos 200 μL restantes em cada dispositivo e um novo ciclo de centrifugação foi realizado, restando novamente um volume de 200 μL de MC concentrado por dispositivo. Ao final, foram obtidos 800 μL de MC a partir de um total de 96 mL, resultando em uma concentração de 120 vezes. Todo MC foi coletado delicadamente com pontas de pipeta p200 e filtrado em filtros 0,22 μm (Millipore). Para evitar ciclos de congelamento/descongelamento, o MC foi dividido em alíquotas de 40 μL que foram armazenadas -80°C até o uso (Gama et al., 2018).

Figura 4.2 – Dispositivo de filtração centrífuga Amicon Ultra-15 com retenção de 10kDa. No compartimento superior podemos observar o MC concentrado retido pela membrana filtrante

Fonte: O autor

4.2 FASE 2: ESTUDO *IN VIVO*

4.2.1 Modelo experimental *in vivo* - Delimitação da amostra e Grupos experimentais

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus: var.albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), machos, com três meses de idade e massa corporal média de $303,2 \pm 15,2$ gramas. Os animais, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, em temperatura na faixa de 22°C a 27°C, umidade de 45 a 65% e ambiente organizado e higienizado. Foram alimentados com ração para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram pesados para calcular a dose adequada para sedação, anestesia e analgesia. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory for animals* (*National Research Council*, 1996).

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais e dois tempos experimentais (4 e 8 semanas, 3 animais por grupo em cada tempo experimental). Foram usados os 2 primeiros molares superiores de cada animal ($n=6$ dentes por grupo por tempo experimental). Os grupos foram divididos conforme o material utilizado para o procedimento de capeamento pulpar direto:

CT: sem material capeador, somente selamento coronário / controle negativo

BD: Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France) + selamento coronário / controle positivo

MTA: MTA ProRoot (Dentsply, Tulsa, OK, EUA) + selamento coronário

MC: MC-hDPSC + selamento coronário

MTA+: MTA ProRoot + MC-hDPSC + selamento coronário

O selamento coronário dos grupos CT (controle negativo) e MC (MC-hDPSC) foi realizado com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) estéril sobreposta por

Resina Bulk Fill Surefil SDR Flow (Dentsply). Por ser um material inerte e biocompatível, o PTFE foi utilizado com objetivo de ajudar a promover o isolamento da polpa frente ao material restaurador. Nos demais grupos, o selamento coronário com Resina Bulk Fill foi realizado sobreposto aos materiais capeadores utilizados.

4.2.2 Procedimentos Experimentais

4.2.2.1 Exposição Pulpar

Após a pesagem, os animais foram submetidos à anestesia geral, por via intramuscular (pata traseira direita), com cloridrato de Ketamina (50mg/kg, i.p; Ketalar, Cristália, Itapira, SP, Brasil), associado ao relaxante muscular Diazepan (5mg/kg, i.p; Valium, Cristália). Em seguida, para a realização dos experimentos, os animais foram posicionados em mesa de trabalho (Figura 4.3) para a desinfecção da cavidade bucal e superfície dental com solução de clorexidina a 0,12% e a 2% para região extrabucal.

Figura 4.3 – Fotografia do animal posicionado em mesa de trabalho. Um afastador de bochecha foi confeccionado para acesso e visualização do primeiro molar superior

Fonte: O autor

Para a realização dos procedimentos, foram utilizados os primeiros molares superiores de ambos os lados. Cavidades classe I oclusal foram realizadas de forma padronizada com a broca carbide CA esférica de $\frac{1}{4}$ (Kavo, São Paulo, SP, Brasil) em baixa rotação com irrigação constante com soro fisiológico estéril. As cavidades tiveram profundidade aproximada ao diâmetro da broca. A seguir, a exposição pulpar foi realizada utilizando uma lima K-File #15 (Dentsply), padronizando o diâmetro da exposição em 0,15 mm (Figura 4.4). A área de exposição pulpar foi então irrigada com 3 mL soro fisiológico estéril e submetida à pressão suave com cones de papel estéril (*Tanari Indústria, Manacapuru, AM, Brasil*) durante 2 minutos para conter o sangramento.

Figura 4.4 – Cavidade Classe I oclusal sendo realizada com broca carbide esférica ¼ em baixa rotação (A). Exposição pulpar em primeiro molar superior direito (B)

Fonte: O autor

4.2.2.2 *Preparo dos materiais capeadores*

Nos grupos MTA e BD, o MTA e o Biodentine foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante, ou seja, foram utilizados pó e líquido próprios do fabricante. O MTA (0,003g) foi espatulado com água destilada (5 µL) em placa de vidro estéril. A cada cápsula do Biodentine, foram adicionadas 5 gotas do líquido e então o conteúdo foi agitado em amalgamador (Ultramat 2, SDI Limited, Victoria, Australia) durante 30 segundos. No grupo MTA+ (MTA ProRoot + MC-hDPSC), a água destilada foi substituída pelo MC e o material foi preparado nas mesmas proporções descritas acima.

Pelo fato de o líquido do Biodentine ser composto por Cloreto de Cálcio Dihidratado, Areo e Água Purificada e não apenas por água destilada, como é o caso do MTA, acreditamos que a não utilização destes componentes pudesse interferir de forma a prejudicar propriedades do material, como sua presa. Desta

forma, Biodentine foi utilizado como controle positivo, espatulado conforme recomendações do fabricante.

4.2.2.3 Capeamento pulpar

Os materiais capeadores foram aplicados sobre a polpa exposta utilizando uma sonda WHO (OMS, Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e adaptados à cavidade calcando cones de papel estéril (Figura 4.5).

Para os grupos CT e MC, onde nenhum material capeador foi aplicado, 10 µL de líquido (soro fisiológico para o grupo controle negativo e MC para o grupo MC-hDPSC) foram ressuspensos com o coágulo e mantidos durante 1 minuto sobre a região da polpa exposta. O excesso de líquido foi absorvido com cones de papel estéril e a membrana de PTFE foi acomodada sobre a cavidade com o auxílio de cones de papel.

Para o selamento com resina, foi aplicado condicionamento com ácido fosfórico a 37% (Dentsply) durante 15 segundos, posteriormente lavado com água destilada pelo mesmo tempo. A cavidade foi gentilmente seca com cones de papel estéril e então foram aplicadas duas camadas de Sistema Adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). O material foi agitado gentilmente na superfície por 15 segundos, suavemente seco para evaporação do solvente e fotopolimerizado por 20 segundos. A Resina Bulk Fill Surefil SDR Flow foi depositada sobre a cavidade, adaptada com auxílio de sonda exploradora (Golgran) e fotopolimerizada por 40 segundos.

Figura 4.5 – Fotografias ilustrativas das etapas do capeamento pulpar e selamento coronário. A: Irrigação com soro fisiológico estéril após exposição pulpar. B: secagem com cones de papel estéril. C: material capeador depositado sobre polpa exposta. D: condicionamento com ácido fosfórico. E: acréscimo da Resina Bulk Fill. F: dente com selamento coronário finalizado

Fonte: O autor

Finalizado o selamento, os animais foram colocados em gaiolas individuais até se recuperarem da anestesia. No pós-operatório, foi utilizado paracetamol ($0,06 \text{ mg g}^{-1} \text{ por dia}^{-1}$) na água por 72 horas. Os animais foram alimentados com ração para roedores triturada e peneirada, para diminuir os riscos de fratura das restaurações.

4.2.2.4 Coleta das amostras

Metade dos animais (n=3 animais por grupo) foi eutanasiada 4 semanas após o procedimento de capeamento e a outra metade após 8 semanas. Para isto, os animais foram pesados e anestesiados como previamente descritos. Para o sacrifício, foi utilizada guilhotina para decaptação. As maxilas foram dissecadas e fixadas após remoção do tecido mole e excesso de tecido duro.

Os espécimes foram fixados em solução de paraformaldeído a 10% tamponado em PBSA (pH 7,2), preparado 30 minutos antes da eutanásia dos animais. A amostra no fixador foi submetida a aquecimento controlado de 37°C em micro-ondas (Pelco 3400, Ted Pella, Redding, CA, USA) durante 3 ciclos de 5 minutos cada. A solução fixadora foi trocada a cada ciclo e, ao final, mantida por um período de 48 horas (Massa; Arana-Chavez, 2000).

4.2.3 Processamento histológico

Após 48 horas da fixação, os espécimes foram lavados com PBSA (6 ciclos de 10 minutos) e o processo de descalcificação foi iniciado em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% (pH 7,8). A solução de EDTA foi mantida sob agitação constante e trocada a cada 2 dias. O processo de descalcificação durou cerca de 70 dias.

Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e posteriormente incluídos em parafina para microtomia (com espessura de 5 µm) e processamento para coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Os cortes foram feitos no sentido sagital em profundidade suficiente para que a área da polpa previamente exposta pudesse ser observada. Foram então divididos aleatoriamente para visualização em microscopia de luz. Para a análise do material foram avaliados os seguintes aspectos: presença ou ausência de inflamação; avaliação do grau de inflamação; identificação e caracterização do tipo de dentina reparadora formada.

4.2.4 Análise histológica

Todas as lâminas contendo os cortes histológicos foram aleatoriamente renomeadas utilizando a fórmula “=ALEATÓRIO” do programa Microsoft Excel 2010. Foram então distribuídas de maneira randomizada e analisadas por um avaliador cego (um patologista experiente). O avaliador observou todas as lâminas e classificou cada uma delas de acordo com os seguintes critérios:

4.2.4.1 Análise da formação de dentina reparadora

Nesta etapa o avaliador definiu se havia ou não formação de ponte de dentina e classificou as amostras em: ausência (-) ou presença de ponte dentinária (+) no local da exposição pulpar.

4.2.4.2 Classificação do grau de cobertura com dentina reparadora formada

As amostras que demonstraram presença de ponte dentinária (+) foram então analisadas quanto ao grau de cobertura do tecido pulpar exposto com dentina reparadora formada. Para isto, a ponte dentinária foi então classificada em: completa (+) ou incompleta (-). Foram consideradas incompletas aquelas amostras em que a ponte dentinária formada não recobria totalmente a área pulpar exposta.

4.2.4.3 Avaliação da vitalidade pulpar em resposta aos materiais capeadores

A condição pulpar em resposta aos materiais capeadores foi avaliada em: presença de vitalidade (+) e não-vitalidade (-). Foram considerados não-vitais as polpas que apresentaram tecido necrótico ou ausência de tecido no interior da

câmara pulpar, enquanto vitais foram as amostras apresentando tecido pulpar representado por tecido conjuntivo vascularizado com ou sem presença de células inflamatórias.

4.2.4.4 Condição do tecido pulpar vital

As amostras que foram classificadas com presença de vitalidade foram então avaliadas quanto à condição do tecido pulpar vital e para isto foram classificadas quanto: presença de sinais de inflamação (+) ou ausência de sinais de inflamação (-). Foram considerados como sinais de inflamação a presença de vasos sanguíneos dilatados, a infiltração de células sanguíneas na polpa dentária, a presença de células inflamatórias (como leucócitos polimorfonucleares e neutrófilos) ou a vasodilatação forte nos vasos que apareceram como um abscesso. As amostras classificadas em ausência de sinais de inflamação foram aquelas em que não foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório e que o tecido pulpar fosse semelhante ao da polpa dentária normal (saudável).

5 RESULTADOS

5.1 FASE 1: ETAPA *IN VITRO*

5.1.1 Perfil imunofenotípico das células

A recharacterização das hDPSCs, realizada através da detecção de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo, demonstrou que essas células expressaram os níveis típicos esperados desses marcadores. A Figura 5.1 apresenta os histogramas das hDPSCs obtidos pela citometria de fluxo. As culturas de hDPSCs expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais (CD44, CD 105 E CD146), enquanto os marcadores de células hematopoiéticas (CD45 e CD34) e endoteliais (CD14) apresentaram mínima ou nenhuma expressão.

Figura 5.1 – Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs na mesma passagem utilizada para a coleta do MC-hDPSC (P4). Os números dentro dos gráficos indicam a porcentagem (%) de células positivas para o anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os picos localizados à esquerda (azul) representam os controles isotípicos para cada marcador. Os picos à direita (vermelho) representam a população celular marcada com o anticorpo

Fonte: O autor

5.2 FASE 2: ESTUDO *IN VIVO*

Dois animais morreram no pós-operatório, sendo eles um do grupo MC no tempo experimental de 4 semanas e outro do grupo CT no tempo experimental de 8 semanas. Outras 9 lâminas foram perdidas em algumas das etapas do processamento histológico, resultando em um total de 47 lâminas analisadas. Entretanto, em 6 amostras só foi possível observar as características do tecido pulpar, pois o corte histológico não foi capaz de englobar a região da exposição pulpar. A Tabela 5.1 mostra o número de lâminas analisadas para cada grupo nas análises do tecido dentinário ou tecido pulpar.

Tabela 5.1 – Número de amostras analisadas para cada grupo experimental para tecido dentinário (D) ou tecido pulpar (P)

	4 semanas					8 semanas				
	CT	BD	MTA	MC	MTA+	CT	BD	MTA	MC	MTA+
D	3	4	5	3	4	4	3	5	5	5
P	3	5	6	3	5	4	6	5	5	5

Fonte: O autor

5.2.1 Formação de dentina reparadora

O resultado da análise de formação de ponte dentinária [classificadas em ausência (-) ou presença de ponte (+)], para os diferentes materiais capeadores nos tempos experimentais de 4 e 8 semanas está ilustrada graficamente na Figura 5.2 através da representação gráfica da porcentagem de amostras apresentando formação de ponte dentinária.

Em apenas uma amostra do grupo CT foi possível observar sinais de presença de ponte dentinária, tanto no período de 4 semanas (33,3%), quanto no

período de 8 semanas (25%). No grupo MC, onde o meio condicionado foi aplicado isolado sem a presença de um material capeador, a formação de ponte dentinária pode ser observada nas 3 amostras do tempo experimental de 4 semanas (100%) e em 3 de 5 amostras (60%) no tempo experimental de 8 semanas. Tanto os grupos BD quanto MTA+ demonstraram formação de ponte em todas as amostras em ambos os tempos experimentais (100%). O grupo MTA apresentou formação de ponte em 3 de 5 amostras (60%) em 4 semanas e em 4 de 5 amostras (80%) em 8 semanas.

Figura 5.2 – Representação gráfica da formação de ponte dentinária demonstrando a porcentagem (%) de amostras que apresentaram formação de ponte nos diferentes grupos e tempos experimentais

Fonte: O autor

5.2.2 Grau de cobertura do tecido pulpar com dentina reparadora formada

As pontes de dentina formadas nos diversos grupos e tempos experimentais foram avaliadas no seu aspecto de cobertura do tecido pulpar [classificadas em completa (+) ou incompleta (-)]. Os resultados desta avaliação estão ilustrados na Figura 5.3 através da representação gráfica da porcentagem de amostras apresentando pontes dentinárias completas.

O grupo CT não demonstrou formação de pontes dentinárias completas (0%) em nenhum dos tempos experimentais avaliados (Figura 5.4). Das pontes dentinárias formadas no grupo MC, uma delas foi classificada como completa (33.3%) no tempo experimental de 4 semanas e todas as observadas no tempo de 8 semanas foram incompletas (0%). No tempo experimental de 4 semanas, apenas o grupo MTA+ foi capaz de exibir pontes completas em todas as amostras (100%), seguido pelo grupo BD (75%) e MTA (66,6%). No tempo experimental de 8 semanas, todas as pontes dentinárias observadas nos grupos BD e MTA foram classificadas como completas (100%), enquanto uma das amostras do grupo MTA+ demonstrou ponte incompleta (80% das amostras com pontes completas).

Figura 5.3 – Representação gráfica do grau de cobertura do tecido pulpar exposto com dentina reparadora, demonstrando a porcentagem de amostras (%) que apresentaram pontes dentinárias completas nos diferentes grupos e tempos experimentais

Fonte: O autor

Os grupos BD e MTA+ foram os únicos a apresentar, em alguns casos, a formação de uma ponte dentinária com a presença de túbulos dentinários e de células polarizadas subjacentes à ponte dentinária (Figuras 5.5 e 5.6). De maneira geral, esses dois grupos apresentaram pontes de dentina com estrutura morfológica mais organizada. O grupo MTA, por sua vez, teve uma tendência a apresentar dentina irregular e não homogênea, com restos pulpares aprisionados em seu interior. Ainda, foram observados alguns casos com calcificação na região de teto e assoalho da câmara pulpar, aproximando essas duas paredes (Figura 5.7).

Figura 5.4 – Fotomicrografia de cortes sagitais dos primeiros molares superiores corados em HE. A: Grupo CT, podemos observar a ausência completa de ponte dentinária na região da exposição pulpar com necrose do tecido pulpar adjacente. B: Grupo MC, formação inicial de ponte dentinária

Fonte: O autor

Figura 5.5 – Fotomicrografia de cortes sagitais dos primeiros molares superiores corados em HE. A: Grupo BD. B: Grupo MTA+. Podemos observar em ambos os grupos a formação de uma barreira completa de dentina (setas) sobre a área da exposição pulpar

Fonte: O autor

Figurara 5.6 – Fotomicrografia de cortes sagitais dos primeiros molares superiores corados em HE mostrando a presença de túbulos dentinários (setas) em A: Grupo BD e B: Grupo MTA+

Fonte: O autor

Figura 5.7 – Fotomicrografia de cortes sagitais dos primeiros molares superiores corados em HE do Grupo MTA. A: Tecido dentinário irregular, contendo restos de tecido pulpar em seu interior. B: Calcificação do teto e assoalho (seta) aproximando essas duas paredes

Fonte: O autor.

5.2.3 Vitalidade do tecido pulpar em resposta aos materiais capeadores

O resultado da análise da vitalidade do tecido pulpar [classificada em vital (+) ou não vital (-)] das amostras submetidas aos diferentes materiais capeadores nos tempos experimentais de 4 e 8 semanas está ilustrado na Figura 5.8 através da representação gráfica da porcentagem de amostras apresentando vitalidade pulpar.

O grupo CT só apresentou vitalidade pulpar em uma amostra (33,3%) no tempo experimental de 4 semanas e em nenhuma das amostras do tempo de 8 semanas (0%). O grupo MC apresentou vitalidade em todas as amostras do tempo experimental de 4 semanas (100%) e necrose em todas, exceto uma, as amostras do tempo de 8 semanas (20%). O grupo BD, por sua vez, apresentou vitalidade em todas as amostras (100%) nos dois tempos experimentais, enquanto os grupos MTA e MTA+ apresentaram 100% de amostras vitais em 4 semanas e 80% em 8 semanas. O tecido necrótico, quando presente, muitas vezes era acompanhado pela presença de resquícios da ração fornecida aos animais dentro da região da exposição pulpar (Figura 5.4).

Figura 5.8 – Representação gráfica da condição do tecido pulpar em resposta aos materiais capeadores, demonstrando a porcentagem de amostras (%) que apresentaram vitalidade pulpar nos diferentes grupos e tempos experimentais

Fonte: O autor

Figura 5.9 – Fotomicrografia de cortes sagitais dos primeiros molares superiores corados em HE. A: Grupo CT mostrando necrose do tecido pulpar. B: Grupo MTA+ mostrando tecido pulpar vital

Fonte: O autor.

5.2.4 Condição do tecido pulpar vital

O resultado da análise da condição do tecido pulpar das amostras que apresentaram vitalidade [classificadas em presença (+) ou ausência de sinais de inflamação (-)] está ilustrada na Figura 5.10 através da representação gráfica da porcentagem de amostras que demonstraram ausência de sinais de inflamação para os diferentes grupos e tempos experimentais.

Nenhuma amostra do grupo CT apresentou tecido pulpar ausente de sinais de inflamação nos dois tempos experimentais (0%). Em 4 semanas, os grupos BD (40%), MTA (16,6%) e MTA+ (40%) apresentaram menores porcentagens de tecido pulpar livre de sinais inflamatórios do que no tempo experimental de 8 semanas: BD (66,6%), MTA (25%) e MTA+ (75%). O grupo MC apresentou uma amostra sem sinais de inflamação no tempo de 4 semanas (33.3%) e nenhuma no tempo de 8 semanas (0%).

Figura 5.10 – Representação gráfica da condição do tecido pulpar vital em resposta aos materiais capeadores, demonstrando a porcentagem de amostras (%) que apresentaram tecido pulpar ausente de sinais inflamatórios nos diferentes grupos e tempos experimentais

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

O complexo dentina-polpa é uma unidade biológica cujas repercussões e mecanismos de resposta tecidual agem de forma integrada. Em condições saudáveis e de vitalidade, ele é capaz de garantir a adequada funcionalidade do elemento ao longo da vida do indivíduo. Quando agredido por lesões e estímulos nocivos, como por exemplo, as lesões cariosas, o tecido pulpar tende a responder buscando diminuir a permeabilidade dentinária através da formação de dentina terciária ou reparadora, como um mecanismo de defesa (Pashley, 1996; Smith, 2002; Goldberg et al., 2011; Smith et al., 2012; Machado, 2017). Entretanto, sempre que o tecido pulpar é exposto, a manutenção da vitalidade do complexo dentina-polpa é colocada em risco. Dentre as opções de tratamento, o capeamento pulpar direto é considerado uma terapia minimamente invasiva para a polpa vital exposta, onde um material dentário é colocado diretamente sobre a área pulpar a fim de facilitar a formação de uma barreira protetora e de manter a vitalidade do dente (Couve, 1986; Zander; Glass, 2005; Bergenholtz, 2005; Aguilar; Linsuwanont, 2011).

Diversos materiais já foram empregados para esta finalidade: Hidróxido de cálcio (Holland et al., 1979), cimentos de óxido de zinco e eugenol (Holland et al., 1981), ionômero de vidro fotoativado (Felton et al., 1991) e, mais recentemente, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) (Parirokh; Torabinejad, 2010a) e Material à base de Silicato Tricálcico (Biodentine) (Malkondu et al., 2014). Contudo, os resultados encontrados ao longo da história nem sempre foram promissores, resultando muitas vezes em inflamação crônica da polpa, falta de reparo do tecido pulpar, ausência de formação de ponte dentinária (Holland et al., 1979; Komabayashi et al., 2016; Holland et al., 1981) e, mesmo quando há a formação de ponte dentinária, este tecido vem sido descrito por alguns autores como atubular, distrófico, não homogêneo, com restos pulpares aprisionados e sem a presença de células semelhantes a odontoblastos (Damaschke et al., 2019; Ricucci et al., 2014). Assim, a ponte dentinária formada frente aos materiais capeadores empregados até o momento não pode ser considerada como um processo regenerativo, uma vez que o tecido duro formado não possui todas as características da dentina genuína.

A terapia celular e a engenharia tecidual são técnicas que também tem sido propostas para melhorar o reparo dos tecidos pulpare. A engenharia tecidual, baseada na tríade células-tronco, arcabouços (scaffolds) e fatores de crescimento tem tido interesse crescente em pesquisas na odontologia (Skalak; Fox, 1988; Langer; Vacanti, 1993; Morotomi et al, 2019). Diversos estudos vêm mostrando que as células-tronco causam reparação tecidual devido à sua capacidade de secretar fatores tróficos que exercem impacto benéfico sobre tecidos danificados (Yang et al. 2013) e que estes fatores sozinhos, sem o uso das próprias células-tronco, podem causar reparação tecidual em diversas condições de lesões tanto em tecidos, quanto em órgãos. Estes fatores estão presentes no meio em que células-tronco são cultivadas e o meio é então denominado MC (Kim et al., 2013; Pawitan, 2014). A revisão de literatura de Kichenbrand et al. (2019) apresentou aplicações com resultados benéficos do MC por hDPSCs na promoção de angiogênese, neurogênese, reparação de tecidos dentários, doenças cardiovasculares, insuficiências de órgãos, entre outras. Concluíram que o MC-hDPSC é uma substância atraente e promissora para as terapias regenerativas, uma vez que é pode ser utilizado numa técnica não invasiva e acelular, com excelentes resultados na engenharia tecidual.

Diante do exposto, a hipótese deste estudo foi que polpas expostas responderiam melhor às terapias de capeamento pulpar direto se os biomateriais tradicionalmente utilizados fossem associados a fatores de crescimento de meios condicionados por células-tronco, remetendo às técnicas de engenharia tecidual num procedimento de capeamento pulpar alternativo. Seria de grande interesse se os resultados encontrados frente ao capeamento direto tivessem uma maior proximidade com a regeneração do tecido pulpar e não apenas uma resposta de cicatrização, com a probabilidade de que o prognóstico em longo prazo teria maior previsibilidade do que os resultados encontrados atualmente na literatura. Para testar esta hipótese, o presente estudo avaliou o efeito do MC-hDPSC associado ao MTA no tratamento de polpas dentárias expostas. Os resultados mostraram que o MC-hDPSC foi capaz de melhorar o desempenho do MTA na capacidade de formação de pontes dentinárias, na organização deste tecido duro neoformado e modulação da resposta inflamatória.

Baseado na literatura compulsada este é o primeiro estudo a avaliar a influência de um meio condicionado por células-tronco após exposição pulpar e

capeamento pulpar direto. Antes disso, o MC por células-tronco de polpa dentária humana já havia sido utilizado em modelos *in vivo* em ratos em terapias de regeneração pulpar (Murakami et al., 2015; De Cara et al., 2019) e de reimplante dentário (Al-Sharabi et al., 2017) demonstrando resultados favoráveis que indicaram seu potencial promissor sobre os tecidos dentários. Todos estes estudos trabalharam com células-tronco humanas para condicionar o meio.

Mesmo utilizando MC de células-tronco humanas em ratos, que eventualmente poderiam não exibir receptores para fatores de crescimento presentes neste meio, ou pelo menos apresentar uma menor quantidade de receptores, foi possível verificar o efeito positivo do MC quando associado ao MTA, se comparado ao grupo MTA utilizado isoladamente ou até mesmo do MC utilizado isoladamente, se comparado ao grupo CT. Se em outros estudos o MC por células-tronco de ratos for utilizado, pode ser que resultados ainda melhores sejam encontrados.

A natureza das células que foram cultivadas em contato com o meio para sua futura coleta e concentração é de grande relevância para este estudo. Neste sentido, células que já haviam sido caracterizadas como células-tronco da polpa dentária humana foram descongeladas e recharacterizadas. A recharacterização demonstrou que as células, mesmo após processos de congelamento e descongelamento, não tiveram alteração de sua natureza. Na verdade, elas foram capazes de expressar marcadores de superfície celular característicos de células-tronco mesenquimais (CD146, CD105 e CD44) e não expressaram os marcadores não associados (CD45, CD14 e CD34). Esse experimento foi de grande importância para que pudéssemos ter certeza de que estaríamos trabalhando com células-tronco e, portanto, estas poderiam ser utilizadas para condicionar o meio através da liberação de fatores tróficos a serem utilizados nos procedimentos de capeamento pulpar propostos.

O MC-hDPSC foi obtido através do cultivo de meio sem suplementação juntamente com hDPSCs em P4 por 24 horas e concentrado utilizando dispositivos Amicon Ultra-15 com retenção de 10 kDa. Este parâmetros foram baseados no estudo de Gama et al. (2018) e parecem ser convenientes em relação ao tempo de cultivo suficiente para permitir que as células liberem para o meio seus fatores tróficos e tamanho de poro do dispositivo adequado para que estes fatores sejam retidos pela membrana filtrante. Como a quantidade de MC possível de ser utilizada para o procedimento de capeamento foi bastante limitada (apenas 5 ou 10 μ L),

acreditamos que a concentração em 120 vezes do volume inicial do MC-hDPSC obtido é de essencial importância para que esses fatores realmente possam exercer alguma resposta sobre o tecido pulpar.

O MC-hDPSC foi então utilizado isoladamente (10 μ L ressuspensos juntamente com o coágulo e mantido em contato durante 1 minuto) ou espatulado (5 μ L) com o MTA ProRoot, seguindo as mesmas proporções de pó e líquido recomendadas pelo fabricante. Acreditamos que essa associação não interferiria negativamente com as propriedades do material, pelo fato de que a presa se dá através do contato do MTA com umidade (água destilada) e o meio de cultivo obtido também ser rico em água. Desta forma, não fizemos essa mesma associação com o Biodentine, uma vez que este material possui outros componentes na formulação do líquido que, se ausentes, poderiam prejudicar as propriedades do material.

O modelo metodológico animal utilizado foi primeiramente descrito por Simon et al. (2008), que utilizou murinos para a avaliação *in vivo* do reparo pulpar após exposição da polpa com o uso de uma lima de 0.15 mm e capeamento com MTA ProRoot. Diferentemente do presente estudo, Simon et al. (2008) realizou a exposição no centro da face palatina de primeiros molares inferiores. Contudo, o estudo de Trongkij et al. (2018) demonstrou que, apesar das exposições mesiais serem realizadas mais facilmente do que as oclusais, o local da exposição não tem efeito no reparo pulpar de ratos.

Os tempos experimentais utilizados para análise da formação de dentina reparadora variam muito na literatura. A grande maioria dos estudos costuma fazer as análises após 4 semanas do procedimento de capeamento pulpar (Khalil et al., 2013; Liu et al., 2015; Chang et al., 2016; Kim et al., 2016; Liu et al., 2017; Long et al., 2017; Okamoto et al., 2018; Yaemkleebbua et al., 2019). Entretanto, pouquíssimos estudos avaliaram os efeitos de materiais capeadores como MTA e Biodentine após períodos mais longos do que esse. Simon et al. (2008) foi um dos únicos autores que acompanhou a formação de ponte dentinária após capeamento com MTA até 11 semanas depois. Contudo, sua análise não avaliou o grupo Biodentine. Sendo assim, o real efeito dos materiais presentes até o momento durante períodos mais longos ainda é bastante obscuro na literatura. Desta forma, optamos por utilizar o tempo experimental de 4 semanas (já bem estabelecido na literatura) e compará-lo com um período mais longo, como o de 8 semanas, com a hipótese de que o MC-hDPSC tivesse a capacidade de influenciar positivamente na

resposta do tecido pulpar, a fim de causar efeitos benéficos que pudessem prevenir resultados indesejados em longo prazo.

Neste estudo, utilizamos a avaliação histológica para analisar os resultados referentes à análise da formação de dentina reparadora, classificação do grau de cobertura com dentina reparadora formada, avaliação da vitalidade pulpar em resposta aos materiais capeadores e condição do tecido pulpar vital. Essa classificação foi baseada inicialmente no método proposto por Koike et al. (2014), com algumas modificações. Outros trabalhos (Moazzami et al., 2014; Chang et al., 2016; Long et al., 2017; Liu et al., 2017; Okamoto et al., 2018; Trongkji et al., 2018; Yaemkleebbua et al., 2019) também se basearam em classificações qualitativas para análise destas variáveis. Para minimizar os vieses inerentes a análises qualitativas, as lâminas foram avaliadas por um patologista experiente na área e todas as amostras foram randomizadas e cegadas para o avaliador em questão.

Dois animais morreram no pós operatório e algumas lâminas foram perdidas durante etapas do processamento histológico, reduzindo o número de amostras a serem avaliadas de 60 para 47. Em 6 dessas amostras, somente foi possível a avaliação histológica do tecido pulpar, pois o corte histológico não englobou a região da exposição e, portanto, a análise da formação de tecido dentinário foi impossibilitada.

A análise da formação de dentina reparadora demonstrou que em apenas uma amostra do grupo CT foi possível observar algum sinal da presença de ponte nos tempos de 4 (33,3%) e 8 semanas (25%). Em relação ao grau de cobertura, as pontes dentinárias formadas nessas duas únicas amostras foram classificadas como pontes incompletas. Ainda, o tecido pulpar se demonstrou necrótico em praticamente todas, exceto uma, das amostras avaliadas quando somado os dois tempos experimentais. Esta amostra, entretanto, apresentou extensa inflamação pulpar. Estes resultados vão de acordo com o encontrado em outros estudos (Long et al., 2017; Yaemkleebbua et al., 2019) e com o esperado pelo grupo, uma vez que nenhum material adequado para o capeamento pulpar foi utilizado. Desta forma, provavelmente o tecido pulpar não foi capaz de controlar sozinho as injúrias causadas pela agressão da exposição e não conseguiu reagir de forma a secretar uma matriz a ser mineralizada formando uma ponte dentinária capaz funcionar como proteção ao tecido pulpar exposto.

Tanto para o grupo MC quanto para o grupo CT nenhum material capeador foi utilizado. A diferença entre esses dois grupos esteve no líquido aplicado antes do selamento coronário: enquanto para o grupo CT 10 µL de soro fisiológico estéril foram ressuspensos com o coágulo e mantido por 1 minuto, para o grupo MC 10 µL do meio condicionado foram utilizados. Os resultados, entretanto, demonstraram que todas as amostras do grupo MC foram capazes de mostrar algum sinal de formação de ponte dentinária em 4 semanas (100%) e 3 de 5 amostras no tempo de 8 semanas (60%), demonstrando que o MC-hDPSC foi capaz de agir de alguma forma sobre o tecido pulpar exposto, permitindo a formação inicial de uma barreira mineralizada. Entretanto, a maioria das pontes dentinárias observadas não foram pontes completas.

Ainda, a classificação do tecido pulpar também demonstrou resultados interessantes. No período de 4 semanas houve vitalidade pulpar em 100% das amostras do grupo MC. Já no segundo período avaliado, quase todas as amostras (80%) apresentaram necrose do tecido. Esse resultado pode ser decorrente do fato de que o selamento coronário dos grupos MC e CT foi feito apenas por meio da interposição de membrana de PTFE (considerado um material inerte e biocompatível) entre o tecido pulpar e a restauração com resina Bulk Fill, a fim de diminuir os estímulos nocivos do condicionamento ácido, sistema adesivo e da própria resina. Entretanto, como nenhum material capeador foi colocado diretamente como base nesse selamento, provavelmente a restauração com resina cedeu e expôs novamente a polpa ao meio externo, gerando muitas vezes contaminação e necrose. Essa justificativa parece fazer sentido uma vez que, em diversas amostras, o tecido necrótico estava composto juntamente com restos de células vegetais oriundas, provavelmente, da ração fornecida para os animais.

Assim, foi possível notar que, quando comparado com o grupo CT, o MC foi capaz de gerar uma resposta inicial no tecido pulpar que resultou em formação de pontes dentinárias incompletas. Entretanto, em um segundo momento, a ausência de um material capeador funcionando como base do selamento coronário pode ter levado a falhas na restauração resultando em contaminação, necrose e interrupção do processo de reparo.

Tanto os grupos BD quanto MTA+ demonstraram presença de ponte dentinária em todas as amostras (100%) nos dois tempos experimentais. Já grupo MTA, por sua vez, apresentou 40% de falha na formação de ponte em 4 semanas e 20% de

falha em 8 semanas. Assim, o MC-hDPSC associado ao MTA, quando comparado ao grupo que utilizou o MTA isoladamente, parece influenciar de forma positiva na resposta de reparo, levando a melhorias na taxa de formação de dentina reparadora.

As pontes formadas foram completas em 100% das amostras do grupo MTA+ no período de 4 semanas e em 75% e 66,6% nos grupos BD e MTA, respectivamente. Entretanto, em 8 semanas, os grupos BD e MTA demonstraram 100% das pontes com cobertura completa, enquanto o grupo MTA+ apresentou 80%. Ainda, quando esta ponte era analisada morfológicamente, somente os grupos BD e MTA+ apresentaram um tecido com formação de túbulos dentinários em alguns poucos casos. O grupo MTA, por sua vez, demonstrou uma estrutura mais desorganizada do que a encontrada nos outros dois grupos, com ausência de túbulos em todas as amostras, presença de tecido pulpar aprisionado no interior da ponte e uma tendência à calcificação na região de assoalho e teto, aproximando essas duas paredes. Esses resultados vão de encontro com aqueles relatados em outros estudos (Simon et al., 2008; Ricucci et al., 2014; Dammaschke et al. 2019).

Quanto à condição do tecido pulpar, foi possível observar que a grande maioria das amostras desses três grupos (BD, MTA e MTA+) mantiveram a vitalidade da polpa nos dois tempos experimentais. Entretanto, quando os tecidos pulpares vitais eram analisados quanto a presença ou ausência de sinais de inflamação, foi possível perceber que a porcentagem de amostras com ausência de sinais inflamatórios foi maior no tempo de 8 semanas para os três grupos. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que o processo de reparo é uma resposta direta ao processo inflamatório. Esses dois processos, entretanto, precisam se manter em equilíbrio (Goldberg et al., 2008; Cooper et al., 2010; Komabayashi; Zhu, 2010). Desta forma, a resposta inflamatória mais acentuada no tempo experimental de 4 semanas é esperada e está diretamente relacionada à resposta de reparo, resultando na formação das pontes dentinárias.

Entretanto, a inflamação precisa ser controlada para que o tecido pulpar seja capaz de reestabelecer sua condição de normalidade. Se a inflamação for demasiadamente acentuada, ou permanecer por períodos mais longos do que o desejável, o tecido pulpar pode ser comprometido. A associação do MC-hDPSC com MTA demonstrou uma maior porcentagem de amostras com tecido pulpar ausente de sinais inflamatórios. Em 4 semanas, essa porcentagem foi de 40% no grupo MTA+ e de 16,6% no grupo MTA. No período de 8 semanas, 75% das amostras do

grupo MTA+ já demonstravam tecido pulpar livre de inflamação, enquanto no grupo MTA essa porcentagem ainda era de 25%. Assim, a presença do MC-hDPSC parece ter influenciado de forma a modular a inflamação do tecido pulpar, se comparado a resposta do MTA utilizado isoladamente. As propriedades antiinflamatórias do MC-hDPSC sobre o tecido pulpar já foram previamente descritas por outros autores (Al-Sharabi et al., 2017) e representam uma vantagem de grande interesse em procedimentos como o capeamento pulpar direto.

No entanto, deve-se levar em consideração as limitações deste estudo, no sentido da quantidade de dentes capeados, bem como da utilização de meio condicionado por células-tronco humanas aplicado em ratos. Assim, seria de relevância que novos estudos fossem realizados com maior número amostral para poder confirmar ou mesmo expandir os resultados aqui apresentados.

Sendo assim, a presença do MC-hDPSC frente aos procedimentos de capeamento pulpar direto parece ser uma abordagem promissora e que merece maior complexidade de estudos para investigar com maior clareza os reais benefícios de seu uso. Quando usado isolado, o grupo MC induziu resposta do tecido pulpar, sendo capaz de gerar uma reação inicial de formação de dentina reparadora nos primeiros momentos do estudo, que não foi encontrado no grupo CT. Ainda, quando associamos o MC-hDPSC com o MTA, o grupo MTA+ pareceu demonstrar certo grau de superioridade na capacidade de formar ponte dentinária, de apresentar um maior grau de organização do tecido neoformado, e de diminuir a inflamação do tecido pulpar vital se comparado ao MTA isolado.

7 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais desse estudo, a associação de meio condicionado por células-tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot mostrou efeitos benéficos no capeamento pulpar direto em ratos, superior àqueles do MTA isolado. Houve melhoria na porcentagem de formação de dentina reparadora, na qualidade destas pontes e no controle de inflamação do tecido pulpar.

REFERÊNCIAS¹

Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*. 2011 May;37(5):581-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.12.004.

Al-Sharabi N, Mustafa M, Ueda M, Xue Y, Mustafa K, Fristad I. Conditioned medium from human bone marrow stromal cells attenuates initial inflammatory reactions in dental pulp tissue. *Dent Traumatol*. 2017 Feb;33(1):19-26. doi:10.1111/edt.12277.

Al-Sharabi N, Xue Y, Fujio M, Ueda M, Gjerde C, Mustafa K, Fristad I. Bone marrow stromal cell paracrine factors direct osteo/odontogenic differentiation of dental pulp cells. *Tissue Eng Part A*. 2014 Nov;20(21-22):3063-72. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0718.

Alex G. Direct and Indirect Pulp Capping: A Brief History, Material Innovations, and Clinical Case Report. *Compend Contin Educ Dent*. 2018 Mar;39(3):182-189.

Ali M, Okamoto M, Komichi S, Watanabe M, Huang H, Takahashi Y, Hayashi M. Lithium-containing surface pre-reacted glass fillers enhance hDPSC functions and induce reparative dentin formation in a rat pulp capping model through activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Acta Biomater*. 2019 Sep 15;96:594-604. doi:10.1016/j.actbio.2019.06.016.

Awawdeh L, Al-Qudah A, Hamouri H, Chakra RJ. Outcomes of Vital Pulp Therapy Using Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2018 Nov;44(11):1603-1609. doi: 10.1016/j.joen.2018.08.004.

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J*. 1997 May;30(3):155-9.

Baume LJ, Holz J. Long term clinical assessment of direct pulp capping. *Int Dent J*. 1981 Dec;31(4):251-60.

Bergenholtz G. Advances since the paper by Zander and Glass (1949) on the pursuit of healing methods for pulpal exposures: historical perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Aug;100(2 Suppl):S102-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bergenholtz G, Mjör IA, Cotton WR, Hanks CT, Kim S, Torneck CD, Trowbridge HO. The biology of dentin and pulp. Consensus report. J Dent Res. 1985 Apr;64 Spec No:631-3.

Bjørndal L. The caries process and its effect on the pulp: the science is changing and so is our understanding. J Endod. 2008 Jul;34(7 Suppl):S2-5. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.037.

Bjørndal L, Darvann T. A light microscopic study of odontoblastic and non-odontoblastic cells involved in tertiary dentinogenesis in well-defined cavitated carious lesions. Caries Res. 1999;33(1):50-60.

Bjørndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF. Management of deep caries and the exposed pulp. Int Endod J. 2019 Jul;52(7):949-973. doi: 10.1111/iej.13128.

Bleicher F. Odontoblast physiology. Exp Cell Res. 2014 Jul 15;325(2):65-71. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.012.

Brignardello-Petersen R. Mineral trioxide aggregate may be superior to calcium hydroxide for histologic dentin bridge formation after pulp capping. J Am Dent Assoc. 2019 Mar;150(3):e29. doi: 10.1016/j.adaj.2018.09.016.

Brizuela C, Ormeño A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramírez V, Mercade M. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. J Endod. 2017 Nov;43(11):1776-1780. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.031.

Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. J Conserv Dent. 2008 Oct;11(4):141-3. doi: 10.4103/0972-0707.48834.

Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. Dent Mater. 2005 Apr;21(4):297-303.

Caron G, Azérad J, Faure MO, Machtou P, Boucher Y. Use of a new retrograde filling material (Biodentine) for endodontic surgery: two case reports. Int J Oral Sci. 2014 Dec;6(4):250-3. doi: 10.1038/ijos.2014.25.

Chang SW, Kim JY, Kim MJ, Kim GH, Yi JK, Lee DW, Kum KY, Kim EC. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(4):298-306. doi: 10.3109/00016357.2015.1120882.

Chiang TY, Ding SJ. Comparative physicochemical and biocompatible properties of radiopaque dicalcium silicate cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2010 Oct;36(10):1683-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.07.003.

Cho SY, Seo DG, Lee SJ, Lee J, Lee SJ, Jung IY. Prognostic factors for clinical outcomes according to time after direct pulp capping. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):327-31. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.034.

Chogle SM, Goodis HE, Kinaia BM. Pulpal and periradicular response to caries: current management and regenerative options. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):521-36. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.003.

Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. *Dent Clin North Am*. 2013 Jan;57(1):59-73. doi: 10.1016/j.cden.2012.09.004.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010 Sep;38(9):687-97. doi: 10.1016/j.jdent.2010.05.016.

Couve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*. 1986;31(10):643-51.

Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*. 1996 Jan-Feb;21(1):4-11.

Cox CF, Tarim B, Kopel H, Gürel G, Hafez A. Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:85-90.

Cristaldi M, Mauceri R, Tomasello L, Pizzo G, Pizzolanti G, Giordano C, Campisi G. Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: a review of the current literature and a look to the future. *Regen Med*. 2018 Mar 19. doi: 10.2217/rme-2017-0112.

D'Alimonte I, Mastrangelo F, Giuliani P, Pierdomenico L, Marchisio M, Zuccarini M, Di Iorio P, Quaresima R, Caciagli F, Ciccarelli R. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells: A Comparative Analysis Between Human Subcutaneous Adipose Tissue and Dental Pulp. *Stem Cells Dev.* 2017 Jun 1;26(11):843-855. doi: 10.1089/scd.2016.0190.

Dammaschke T, Nowicka A, Lipski M, Ricucci D. Histological evaluation of hard tissue formation after direct pulp capping with a fast-setting mineral trioxide aggregate (RetroMTA) in humans. *Clin Oral Investig.* 2019 Mar 12. doi:10.1007/s00784-019-02876-2.

Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *J Hist Dent.* 2008 Spring;56(1):9-23.

de Cara SPHM, Origassa CST, de Sá Silva F, Moreira MSNA, de Almeida DC, Pedroni ACF, Carvalho GL, Cury DP, Câmara NOS, Marques MM. Angiogenic properties of dental pulp stem cells conditioned medium on endothelial cells in vitro and in rodent orthotopic dental pulp regeneration. *Heliyon.* 2019 Apr 28;5(4):e01560. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01560.

Denham M, Conley B, Olsson F, Cole TJ, Mollard R. Stem cells: an overview. *Curr Protoc Cell Biol.* 2005 Oct;Chapter 23:Unit 23.1. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28.

Dianat O, Mashhadiabbas F, Ahangari Z, Saedi S, Motamedian SR. Histologic comparison of direct pulp capping of rat molars with MTA and different concentrations of simvastatin gel. *J Oral Sci.* 2018 Mar 24;60(1):57-63. doi: 10.2334/josnusd.16-0690.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol.* 2018 Jun;233(6):4907-4918. doi: 10.1002/jcp.26309.

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

Felton DA, Cox CF, Odom M, Kanoy BE. Pulpal response to chemically cured and experimental light-cured glass ionomer cavity liners. *J Prosthet Dent.* 1991 May;65(5):704-12.

Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010 Feb;98(1):2-14. doi: 10.1007/s10266-009-0116-5.

Freshney R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. United States of America: Wiley-Blackwell; 2010.

Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod*. 2003 Dec;29(12):814-7

Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*. 1971 Aug;12(2):99-108.

Gama KB, Santos DS, Evangelista AF, Silva DN, de Alcântara AC, Dos Santos RR, Soares MBP, Villarreal CF. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. *Stem Cells Int*. 2018 Jan 30;2018:8179013. doi: 10.1155/2018/8179013.

Garcia A, Machado MEL, Britto MLB, Nabeshima CK, Massaro H. Comparação qualitativa da constituição do cimento de Portland e MTA-Angelus® através de difração de raios X. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde (UNIP)*. 2011; 29:89-91.

Gharaei MA, Xue Y, Mustafa K, Lie SA, Fristad I. Human dental pulp stromal cell conditioned medium alters endothelial cell behavior. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Mar 21;9(1):69. doi: 10.1186/s13287-018-0815-3.

Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008 Aug;58(2):137-47. doi: 10.1016/j.phrs.2008.05.013.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:711-35.

Górski B. Gingiva as a new and the most accessible source of mesenchymal stem cells from the oral cavity to be used in regenerative therapies. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016 Aug 17;70(0):858-71.

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

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21. doi: 10.1038/nature07039.
Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*. 2013 Mar;39(3 Suppl):S30-43. doi:10.1016/j.joen.2012.11.025.

Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent*. 2009 Sep-Oct;34(5):615-25. doi: 10.2341/09-132-0.

Holland R, de Souza V, de Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. *J Am Dent Assoc*. 1979 Sep;99(3):472-5.

Holland R, Mello W, Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. The influence of the sealing material in the healing process of inflamed pulps capped with calcium hydroxide or zinc oxide-eugenol cement. *Acta Odontol Pediatr*. 1981 Jun;2(1):5-9.

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 Sep;88(9):792-806. doi: 10.1177/0022034509340867.

Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:788-800.

Imura K, Hashimoto Y, Okada M, Yoshikawa K, Yamamoto K. Application of hydroxyapatite nanoparticle-assembled powder using basic fibroblast growth factor as a pulp-capping agent. *Dent Mater J*. 2019 Oct 2;38(5):713-720. doi: 10.4012/dmj.2018-198.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004 Aug;83(8):590-5.

Katge FA, Patil DP. Comparative Analysis of 2 Calcium Silicate-based Cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as Direct Pulp-capping Agent in Young Permanent Molars: A Split Mouth Study. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):507-513. doi:10.1016/j.joen.2016.11.026.

Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res.* 2017 Aug;11(8):ZG01-ZG05. doi: 10.7860/JCDR/2017/25840.10374.

Khalil IT, Sarkis T, Naaman A. MM-MTA for direct pulp capping: a histologic comparison with ProRoot MTA in rat molars. *J Contemp Dent Pract.* 2013 Nov 1;14(6):1019-23.

Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019 Feb;25(1):78-88. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0168.

Kim HO, Choi S-M, Kim H-S. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med.* 2013;10:93–101.

Kim J, Song YS, Min KS, Kim SH, Koh JT, Lee BN, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, Hwang YC. Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. *Restor Dent Endod.* 2016 Feb;41(1):29-36. doi: 10.5395/rde.2016.41.1.29.

Kitasako Y, Ikeda M, Tagami J. Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. *Dent Traumatol.* 2008 Apr;24(2):201-6. doi:10.1111/j.1600-9657.2007.00517.x.

Koike T, Polan MA, Izumikawa M, Saito T. Induction of reparative dentin formation on exposed dental pulp by dentin phosphophoryn/collagen composite. *Biomed Res Int.* 2014;2014:745139. doi: 10.1155/2014/745139.

Komabayashi T, Zhu Q, Eberhart R, Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J.* 2016;35(1):1-12. doi:10.4012/dmj.2015-013.

Komabayashi T, Zhu Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):e75-81. doi:10.1016/j.tripleo.2009.12.034.

Kuttler Y. Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1959 Aug;12(8):996-9.

Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*.1993;(260):920.

Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1412-7. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.012.

Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 Jul 26;6(3):288-95. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.288.

Lipski M, Nowicka A, Kot K, Postek-Stefańska L, Wysoczańska-Jankowicz I, Borkowski L, Andersz P, Jarząbek A, Grocholewicz K, Sobolewska E, Woźniak K, Drożdżik A. Factors affecting the outcomes of direct pulp capping using Biodentine. *Clin Oral Investig*. 2018 Jun;22(5):2021-9. doi:10.1007/s00784-017-2296-7.

Liu Q, Ma Y, Wang J, Zhu X, Yang Y, Mei Y. Demineralized bone matrix used for direct pulp capping in rats. *PLoS One*. 2017 Mar 2;12(3):e0172693. doi: 10.1371/journal.pone.0172693.

Liu S, Wang S, Dong Y. Evaluation of a bioceramic as a pulp capping agent in vitro and in vivo. *J Endod*. 2015 May;41(5):652-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.009.

Long Y, Liu S, Zhu L, Liang Q, Chen X, Dong Y. Evaluation of Pulp Response to Novel Bioactive Glass Pulp Capping Materials. *J Endod*. 2017 Oct;43(10):1647-50. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.011.

Machado MEL. *Endodontia Ciência e Tecnologia*. São Paulo: Quitessence Publishing Brasil; 2017.

Mahmoud SH, El-Negoly SA, Zaen El-Din AM, El-Zekrid MH, Grawish LM, Grawish HM, Grawish ME. Biodentine versus mineral trioxide aggregate as a direct pulp capping material for human mature permanent teeth - A systematic review. *J Conserv Dent*. 2018 Sep-Oct;21(5):466-73. doi: 10.4103/JCD.JCD_198_18.

Malkondu Ö, Karapinar Kazandağ M, Kazazoğlu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*. 2014;2014:160951. doi: 10.1155/2014/160951.

Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int J Biol Sci*. 2013 Nov 16;9(10):1070-8. doi: 10.7150/ijbs.6662.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci*. 2000 Feb;108(1):74-7.

Matsubara K, Matsushita Y, Sakai K, Kano F, Kondo M, Noda M, Hashimoto N, Imagama S, Ishiguro N, Suzumura A, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci*. 2015 Feb 11;35(6):2452-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4088-14.2015.

Matsuura T, K S Kawata-Matsuura V, Yamada S. Long-term clinical and radiographic evaluation of the effectiveness of direct pulp-capping materials. *J Oral Sci*. 2019 Mar 28;61(1):1-12. doi: 10.2334/josnurd.18-0125.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Moazzami F, Ghahramani Y, Tamaddon AM, Dehghani Nazhavani A, Adl A. A histological comparison of a new pulp capping material and mineral trioxide aggregate in rat molars. *Iran Endod J*. 2014 Winter;9(1):50-5.

Modena KC, Casas-Apayaco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro MF, Santos CF. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec; 17 (6):544-54.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697-730. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x

Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019 Nov;55(1):5-11. doi: 10.1016/j.jdsr.2018.09.001.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005 Apr;24(2):155-65.

Możyńska J, Metlerski M, Lipski M, Nowicka A. Tooth Discoloration Induced by Different Calcium Silicate-based Cements: A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod*. 2017 Oct;43(10):1593-1601. doi: 10.1016/j.joen.2017.04.002.

Murakami M, Hayashi Y, Iohara K, Osako Y, Hirose Y, Nakashima M. Trophic Effects and Regenerative Potential of Mobilized Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow and Adipose Tissue as Alternative Cell Sources for Pulp/Dentin Regeneration. *Cell Transplant*. 2015;24(9):1753-65. doi: 10.3727/096368914X683502.

Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J*. 2009 May;42(5):422-44. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01558.x.

Nowicka A, Wilk G, Lipski M, KołECKI J, Buczkowska-Radlińska J. Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1234-40. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.017.

Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Yoneda N, Ishimoto T, Nakano T, Hayashi M. Novel evaluation method of dentin repair by direct pulp capping using high-resolution micro-computed tomography. *Clin Oral Investig*. 2018 Nov;22(8):2879-2887. doi: 10.1007/s00784-018-2374-5.

Orchardson R, Cadden SW. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update*. 2001 May;28(4):200-6, 208-9.

Pallotta RC, Machado MEL, Reis NS, Martins GHR, Nabeshima CK. Tissue Inflammatory Response to the implantation of Calcium Hydroxide and Iodoform in the Back of Rats. *Revista Odonto Ciência*. 2010;25:59-64.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):104-33.

Parinyaprom N, Nirunsittirat A, Chuveera P, Na Lampang S, Srisuwan T, Sastraruji T, Bua-On P, Simprasert S, Khoipanich I, Sutharaphan T, Theppimarn S, Ue-Srichai N, Tangtrakooljaroen W, Chompu-Inwai P. Outcomes of Direct Pulp Capping by Using Either ProRoot Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine in Permanent Teeth with Carious Pulp Exposure in 6- to 18-Year-Old Patients: A Randomized Controlled Trial. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):341-8. doi: 10.1016/j.joen.2017.10.012.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010a Jan;36(1):16-27. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.006.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010b Mar;36(3):400-13. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.009.

Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Direct Pulp Capping: What is the Most Effective Therapy?-Systematic Review and Meta-Analysis. *J Evid Based Dent Pract.* 2018 Dec;18(4):298-314. doi: 10.1016/j.jebdp.2018.02.002.

Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014;2014:965849. doi: 10.1155/2014/965849.

Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, Moreira MS, Deboni MCZ, Marques MM. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clin Oral Investig.* 2019 Jun;23(6):2713-21. doi:10.1007/s00784-018-2630-8.

Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, Tunaitis V, Aldonyte R, Jarmalaviciuūte A, Suriakaite K, Liutkevicius E, Venalis A, Navakauskas D, Navakauskiene R, Magnusson KE. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev.* 2010 Jul;19(7):1081-93. doi:10.1089/scd.2009.0315.

Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGE, Anthonappa RP, Verbeeck RMH. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a 3 year literature review and update. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2018 Feb;19(1):1-22. doi:10.1007/s40368-018-0328-x.

Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spångberg LS, Tay FR. Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *J Dent.* 2014 Sep;42(9):1156-70. doi:10.1016/j.jdent.2014.06.012.

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

Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials (Basel).* 2019 Mar 27;12(7). pii: E1015. doi: 10.3390/ma12071015.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulpcapping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64: 541-8.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ili CN, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J*. 2008 Sep;41(9):781-90. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01433.x.

Skalak R, Fox CF. Tissue engineering: Proceedings of a workshop, held at Granlibakken. Lake Tahoe, California, February 26–29, 1988. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, 107, New York, NY: Liss.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007 Mar;13(2):151-7.

Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*. 2002 Jul-Aug;36(4):223-32.

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

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):47-56. doi: 10.1016/j.joen.2015.10.019.

Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):589-601. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.011.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):166-71. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021.

Stanko P, Altanerova U, Jakubecova J, Repiska V, Altaner C. Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Exosomes. *Stem Cells Int*. 2018 Apr 15;2018:8973613. doi: 10.1155/2018/8973613.

Tawil PZ, Duggan DJ, Galicia JC. Mineral trioxide aggregate (MTA): its history, composition, and clinical applications. *Compend Contin Educ Dent*. 2015 Apr;36(4):247-52; quiz 254, 264.

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

Tjäderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod J*. 2002 Aug;28(2):68-74.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):190-202. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.010.

Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C, Boukpepsi T. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1166-71. doi:10.1177/0022034512460833.

Tran XV, Salehi H, Truong MT, Sandra M, Sadoine J, Jacquot B, Cuisinier F, Chaussain C, Boukpepsi T. Reparative Mineralized Tissue Characterization after Direct Pulp Capping with Calcium-Silicate-Based Cements. *Materials (Basel)*. 2019 Jun 29;12(13). pii: E2102. doi: 10.3390/ma12132102.

Trongkij P, Sutimuntanakul S, Lapthanasupkul P, Chaimanakarn C, Wong R, Banomyong D. Effects of the exposure site on histological pulpal responses after direct capping with 2 calcium-silicate based cements in a rat model. *Restor Dent Endod*. 2018 Aug 22;43(4):e36. doi: 10.5395/rde.2018.43.e36.

Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010 May;36(5):781-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.006.

Vackovcá I, Kubinová S. Stem cell conditioned medium for cell-free therapies. *Cesk Fysiol*. 2016 Oct;65(1):25-31.

Wei X, Ling JQ. [Contemporary concept and clinical perspective of direct pulp capping therapy]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2019 Sep 9;54(9):577-583. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2019.09.001.

Wu J, Wang Q, Han Q, Zhu H, Li M, Fang Y, Wang X. Effects of Nel-like molecule-1 and bone morphogenetic protein 2 combination on rat pulp repair. *J Mol Histol*. 2019 Jun;50(3):253-61. doi: 10.1007/s10735-019-09822-2.

Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, Guo Y, Xia X, Wang Y, Wang H, Wang WE, Zeng C. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One*. 2013;8(3):e59020. doi: 10.1371/journal.pone.0059020.

Yaemkleebbua K, Osathanon T, Nowwarote N, Limjeerajarus CN, Sukarawan W. Analysis of hard tissue regeneration and Wnt signalling in dental pulp tissues after direct pulp capping with different materials. *Int Endod J*. 2019 Nov;52(11):1605-1616. doi: 10.1111/iej.13162.

Zander HA, Glass RL. The healing of phenolized pulp exposures. 1949. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Aug;100(2 Suppl):S97-101.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos.

Pesquisador: Giovanna Sarra

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89912318.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.701.783

Apresentação do Projeto:

Células-tronco são capazes de secretar fatores tróficos para a regeneração tecidual. Alguns estudos já revelaram que o meio condicionado (MC) por células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) pode desencadear respostas angiogênicas pronunciadas, que podem ser importantes no processo de reparo. O objetivo deste projeto será avaliar o efeito da associação do meio condicionado pelas hDPSCs (hDPSCs-MC) e do MTA ProRoot no capeamento pulpar direto em ratos. Para isto, serão utilizados ratos da linhagem Wistar (n=24) divididos em 4 grupos experimentais: G1: controle negativo sem material capeador; G2: MTA ProRoot; G3: hDPSC-MC e G4: MTA ProRoot + hDPSC-MC. As hDPSCs serão cultivadas até que a subconfluência seja observada e então serão lavadas com tampão fosfato-salino e incubadas com meio clonogênico fresco livre de soro fetal bovino. Após 24h, esse meio será coletado e centrifugado para obtenção do hDPSCs-MC concentrado. Cavidades classe I serão preparadas nos dois primeiros molares superiores de cada animal e uma pequena exposição pulpar padronizada será realizada. O capeamento pulpar será realizado de acordo com cada grupo e as cavidades serão seladas com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) e Cimento de Ionômero de Vidro. Os animais serão sacrificados após 90 dias e as peças serão preparadas para que a produção de dentina seja analisada através da Microtomografia Computadorizada e da avaliação histológica (H&E). As reações do tecido pulpar frente aos materiais utilizados para o capeamento também serão comparadas histologicamente. Os resultados serão comparados com nível de confiança de 95%.

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.701.783

Objetivo da Pesquisa:

O meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana pode melhorar os resultados do tratamento de capeamento pulpar direto em polpas expostas de ratos?

Objetivo Primário: avaliar o efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no capeamento pulpar direto em ratos.

Objetivo Secundário: 1. Analisar a produção de dentina reparadora através da Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) e da avaliação histológica. 2. Comparar histologicamente as reações do tecido pulpar frente aos materiais utilizados para o capeamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa apresenta risco mínimo, pois serão utilizadas células congeladas e mantidas em nitrogênio líquido. Todas as medidas de segurança para utilização do laboratório seguirão protocolo interno bem estabelecido.

Não existirão benefícios diretos aos sujeitos que forneceram as células para as pesquisas, mas a pesquisa poderá trazer informações importantes quanto ao uso do meio condicionado por células-tronco da polpa dentária humana em procedimentos de capeamento pulpar direto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com objetivos e metodologia bem delineada e explicitada, devendo levar a importantes resultados para a área de conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Autorização do BIOBANCO da FOU SP - estudo será realizado com células-tronco da polpa dentária humana congeladas e armazenadas no Banco de Células do Laboratório de Pesquisas Básicas Prof. Edmir Matson do Departamento de Dentística da FOU SP. No projeto original, a partir do qual foram obtidas as células, existe autorização dos doadores para sua utilização em novos experimentos sem necessidade de novo contato e consentimento.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOU SP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.701.783

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1128057.pdf	17/05/2018 16:51:54		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	17/05/2018 16:47:55	Giovanna Sarra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado.pdf	16/05/2018 07:38:52	Giovanna Sarra	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao_biobanco.jpg	15/05/2018 19:56:02	Giovanna Sarra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(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

ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (2018)

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no repar de polpas expostas de ratos" registrada com o nº 014/2018, sob a responsabilidade de Manoel Eduardo de Lima Machado, Giovanna Sarra, Márcia Martins Marques, Hector Valentin Caballero Flores, Cleber Keiti Nabeshima e Ana Clara Fagundes Pedroni que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 11/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/06/2018 A 11/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	24
Peso/Idade	300g / 3 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB - USP

São Paulo, 12 de junho de 2018.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

Scanned with
CamScanner

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – São Paulo, SP – Cep 05508-000
www.fo.usp.br

ANEXO C – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (2019)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceufo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada : "Efeito da associação de meio condicionado por células tronco de polpa dentária humana e MTA ProRoot no reparo de polpas expostas de ratos" registrada com o nº 005/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 18/03/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/07/2018 a 15/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	301,4 +-14,3
Sexo	masculino
Origem	Biotério do ICB-USP

São Paulo, 19 de março de 2019.

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço
 Coordenadora do CEUA-FOUSP

Scanned with
 CamScanner