MARIANA DE OLIVEIRA DALTOÉ

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DA MINERALIZAÇÃO NA RESPOSTA
PULPAR, *IN VITRO* E *IN VIVO*, FRENTE À BIODENTINE™
E AO AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Daltoé, Mariana de Oliveira

Expressão de marcadores da mineralização na resposta pulpar, *in vitro* e *in vivo*, frente à Biodentine™ e ao Agregado de Trióxido Mineral. Ribeirão Preto, 2015.

90p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

1. Biodentine. 2. Agregado de Trióxido Mineral. 3. Pulpotomia. 4. Mineralização. 5. Polpa dentária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DALTOÉ, MO. **Expressão de Marcadores da Mineralização na Resposta Pulpar, *in vitro* e *in vivo*, frente à Biodentine™ e ao Agregado de Trióxido Mineral.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

MARIANA DE OLIVEIRA DALTOÉ

Nascimento	8 de maio de 1991 – São José do Rio Preto – SP
Filiação	Cássio Benedito Daltoé Dulcinéia Carvalho de Oliveira Daltoé
2009-2012	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
2013-2014	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
2013-2015	Curso de Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto/SP
2013-2015	Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

“Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la.”

Cícero

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**, por ter me concedido a vida, me permitindo buscar meus objetivos e realizar meus sonhos...

Aos **meus pais**,

Dulcinéia Carvalho de Oliveira Daltoé e **Cássio Benedito Daltoé**, pelo exemplo de caráter, pela educação que me deram e por sempre apoiarem minhas escolhas. Amo vocês!

Aos **meus irmãos**,

Cássio Henrique de Oliveira Daltoé e **Giuliano Cássio de Oliveira Daltoé**, pelo companheirismo e até mesmo pelas brigas. Ser irmão é colaborar com o crescimento do outro, criar responsabilidades e aprender a cuidar. Pra sempre meus irmãozinhos! Amo vocês.

Ao meu **melhor amigo**,

Vinícius Guilherme Leal do Santos, por ficar do meu lado em todas as situações. Você foi essencial para que eu enfrentasse as dificuldades e nunca desistisse dos meus objetivos. Amo você!

A todos aqueles, familiares e amigos, que sempre acreditaram na minha capacidade e sempre mandaram energias positivas para mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, pela oportunidade de realizar este trabalho de mestrado, fornecendo todo o apoio e suporte para que ele fosse realizado. E também por me acalmar nos momentos de aflição. Muito obrigada!

Ao Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, pela orientação durante todo o período de mestrado, contribuindo de forma imensurável para meu aprendizado científico. Obrigada pela disponibilidade e paciência!

À Profª. Dra. Lúcia Helena Faccioli, por permitir que eu usasse o espaço de seu laboratório e por me receber sempre de forma tão educada e com um sorriso no rosto. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual reitor, Prof. Dr. Marco Antonio Zago, e do vice-reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor, Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, e da vice-diretora, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À **Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato e da suplente da coordenação Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

Aos demais professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andara de Rossi, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto e Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní pela convivência, e por todos os ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica.

A todos os **pós-graduandos do Programa de Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por toda a convivência e companheirismo durante o período de mestrado.

Aos funcionários e pós-graduandos do LIIP e LIME da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por me receberem tão bem e serem extremamente prestativos e sempre dispostos a ajudar durante os meus períodos de realização de experimentos no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil: Marília Pacífico Lucisano, Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanela, Filomena Leli Placciti e Rosimeire de Oliveira Urbano, pela amizade, disponibilidade e bom humor, e por alegrar meus dias.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Benedita Viana Rodrigues, Fátima Aparecida Rizoli, José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do Nascimento Scandelai e Karina Dadalt Quaglio pela amizade e atenção a mim dispensada, e pela alegria em ajudar alunos e pacientes nas atividades clínicas.

À Rosemary Alves de Sã, pela formação deste trabalho.

MEUS AGRADECIMENTOS

Aos técnicos de laboratório, **Nilza Letícia Magalhães** e **Marco Antônio dos Santos**, por tornar meus dias muito mais fáceis, sendo sempre muito solícitos e acima de tudo muito amigos. Obrigada pela amizade!

Às minhas colegas de turma de mestrado, **Carolina Maschietto Pucinelli** – por todas as risadas e momentos de confidências, **Claudia María Carpio Bonilla** – por sempre ser tão carinhosa e meiga para tratar as pessoas e compartilhar das minhas aflições no uso do microscópio, **Francine Lorencetti da Silva** – por ser companheira para todas as horas, dupla de clínica e de experimentos, **Juliana Arid** – por tantos bons momentos junto comigo e pelo companheirismo e apoio todos os dias, **Maria Gabriela Flores Bracho** – por ser tão graciosa, delicada e querida comigo, **Marina Moscardini Vilela** – por ser sempre tão animada, **Paula Regina Ávila** – por ser tão bondosa e atenciosa com todos, **Sofia Sampaio Meireles de Sousa** – por ser uma menina tão meiga e sorridente, conseguindo sempre me acalmar com seu jeito pacato e paciente de ser e **Sara Silva de Oliveira** – por ter esse jeito tão único e ser essa pessoa que tive a honra de conhecer, sempre com muitas histórias para contar. Vocês foram companhias maravilhosas e tornaram essa minha jornada melhor!

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, **Daniele Lucca Longo**, **Fernanda Regina Ribeiro Santos**, **Igor Bassi Ferreira Petean**, **Lídia Regina da Costa Hidalgo**, por representarem um grupo tão unido e me acompanharem de perto nessa caminhada, sempre incentivando e apoiando uns aos outros e pela ajuda que me ofereceram na execução dos experimentos. Levarei vocês para sempre!

Ao professor e amigo **Fabício Kitazono de Carvalho**, por todo o apoio durante o mestrado, e por acreditar no meu potencial e nunca deixar de me incentivar. Obrigada pela amizade!

Às minhas queridas amigas da época de graduação, **Talita Caldas Hayaxibara** e **Nathália Mian Cantarella**, por se alegrarem com minhas conquistas e nunca esquecerem de nossa amizade, mesmo na correria do dia-a-dia. Vocês são essenciais na minha vida. Amo vocês, obrigada por tudo!

À minha amiga-irmã **Ana Carolina Bonetti Valente**, por me acompanhar por todos esses anos, sempre apoiando minhas escolhas e me orientando nos momentos de dúvida. Pessoa iluminada, conte sempre comigo. Obrigada por fazer parte da minha vida!

RESUMO

Daltoé, MO. **Expressão de marcadores da mineralização na resposta pulpar, *in vitro* e *in vivo*, frente à Biodentine™ e ao Agregado de Trióxido Mineral**. Ribeirão Preto, 2015. 90p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

A Biodentine™, novo material composto principalmente de silicato tricálcio (Ca_3SiO_5), apresenta vantagens com relação ao MTA, como menor tempo de presa e uso como material restaurador temporário para esmalte e permanente para dentina. As diferenças no mecanismo de ação entre os dois materiais ainda não estão esclarecidas, assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a viabilidade de células extraídas da polpa dental de humanos, bem como a expressão de diferentes marcadores da mineralização após o estímulo com Biodentine™ e MTA. Além disso, foi avaliada *in vivo* a expressão dos marcadores previamente observados após a realização de pulpotomia em dentes de cães. Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas células da polpa dentária obtidas a partir de dentes extraídos por razões ortodônticas ($n=6$). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/poço e expostas aos materiais em diferentes concentrações (1:1, 1:10 e 1:100), por 24 e 48 horas. Ao fim dos períodos, foi realizado o Ensaio Colorimétrico MTT para verificação da viabilidade celular e o qRT-PCR para detecção de RNA mensageiro para osteopontina (*SPP1*), sialoproteína óssea (*BSP*), sialofosfoproteína dentinária (*DSPP*), fosfatase alcalina (*ALP*), proteína da matriz dentinária 1 (*DMP1*) e fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (*RUNX2*). Os dados foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ou Bonferroni ($\alpha = 0,05$). Nos experimentos *in vivo*, foram utilizadas lâminas obtidas do banco de lâminas do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nas quais foi realizada pulpotomia com MTA ($n=35$) e Biodentine™ ($n=52$) em dentes de cães. Foram realizados ensaios de imunoistoquímica para osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP) sendo a intensidade da marcação descrita como suave, moderada e intensa. Além disso, foi realizada imunofluorescência indireta para o fator de transcrição Runx-2, na qual a porcentagem de células positivamente marcadas foi calculada pelo software Image J. Ambas as análises foram realizadas nas regiões de ponte de tecido mineralizado e tecido pulpar. Os grupos foram comparados por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado ou por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). No estudo *in vitro*, após 24 e 48 horas, a diluição 1:100 de ambos os materiais não afetou a viabilidade celular ($p > 0,05$) em relação ao controle. Após 48 horas, MTA e Biodentine™ induziram a expressão gênica de *SPP1*, *ALP* e *RUNX2* em relação ao controle ($p < 0,05$). Já no estudo *in vivo*, na marcação da ponte de tecido mineralizado para OPN, o MTA apresentou marcações suaves em 29% dos casos e a Biodentine™ marcações suaves em

26%, moderadas em 43% e intensas em 22% ($p < 0,0001$). A ALP na ponte de tecido mineralizado mostrou marcações suaves para o MTA em 14% dos casos e para a Biodentine™ em 48% ($p < 0,0001$). A OPN no tecido pulpar radicular para o MTA apresentou 29% de marcação no terço cervical e 29% no médio, sem marcação no apical e para a Biodentine™ apresentou 52% de marcação no cervical, 26% no médio e 26% no apical ($p < 0,0001$). A marcação para ALP no tecido pulpar não apresentou diferença entre os materiais ($p = 0,2$). Não houve diferença no número de células positivamente marcadas pela imunofluorescência para Runx-2, entre os materiais estudados e o controle ($p > 0,05$). A Biodentine™ foi capaz de estimular marcadores da mineralização de forma semelhante ao MTA, porém mais intensamente, com maior formação de pontes de tecido mineralizado, o que poderia ser vantajoso a longo prazo nos casos de tratamentos endodônticos conservadores.

Palavras-chave: Biodentine; Agregado de Trióxido Mineral; Pulpotomia; Mineralização; Polpa dentária.

ABSTRACT

Daltoé, MO. **Mineralization Markers Expression in pulp response to Biodentine™ and Mineral Trioxide Aggregate, *in vitro* and *in vivo***. Ribeirão Preto, 2015. 90p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

Biodentine™, a new material composed mainly of tricalcium silicate (Ca_3SiO_5), shows advantages compared to the MTA, as such less setting time and use as temporary restoring material to enamel and permanent to dentine. Differences in action mechanisms between the two materials are not clarified yet, therefore, the aim of this study was to compare the cellular viability of dental pulp cells when in contact with Biodentine™ and MTA in addition to the mineralization markers expression induced by both, *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* experiments, dental pulp cells obtained from teeth extracted for orthodontic reasons (n=6) were used. The cells were plated in a density of 1×10^5 cells/well and exposed to both materials in different concentrations (1:1, 1:10 and 1:100), obtained from serial dilution of an initial extract (1:1), for 24 and 48 hours. At the end of the periods, the Colorimetric MTT Assay was used for cellular viability verification and the qRT-PCR for messenger RNA detection of osteopontin (*SPP1*), bone sialoprotein (*BSP*), dentin sialophosphoprotein (*DSPP*), alkaline phosphatase (*ALP*), dentin matrix protein 1 (*DMP1*) and Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) was performed. Data were compared through analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey's or Bonferroni post-test ($\alpha = 0.05$). For *in vivo* experiments, histological slides derived from teeth of dogs, on which it was performed pulpotomy with MTA (n=35) and Biodentine™ (n=52), were obtained from a slides bank of Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Immunohistochemistry for osteopontin (OPN) and alkaline phosphatase (ALP) were performed and the percentage of positively marked cells for the transcription factor Runx-2 by indirect immunofluorescence was calculated with the assistance of the software Image J. The groups were compared through the exact Fisher's test or chi-square or analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's post-test ($\alpha = 0.05$). After 24 and 48 hours, the dilutions 1:100 of both materials did not affect the viability ($p > 0.05$) in comparison to control group. After 48 hours, MTA and Biodentine™ induced higher gene expression of *SPP1*, *ALP* and *RUNX2* in comparison to control group ($p < 0.05$). In mineralized tissue bridge immunostaining for OPN, MTA showed mild staining in 29% of the cases and Biodentine™ mild staining in 26%, moderate staining in 43% and intense in 22% of the cases ($p < 0.0001$). Mineralized tissue bridge immunostaining for ALP showed mild staining for MTA in 14% of the cases and for Biodentine™ in 48% ($p < 0.0001$). The OPN immunostaining on radicular pulp tissue for MTA showed 29% of staining on cervical third, 29% on the middle third and no staining on the apical third, while Biodentine™ showed 52%

stained on cervical third, 26% on the middle third, and 26% on the apical third ($p < 0.0001$). Immunostaining for ALP on the pulp tissue did not show difference between the two materials ($p = 0.2$). There was no difference in the number of positively marked cells by the immunofluorescence for RUNX-2, between the studied materials and the control group ($p > 0.05$). Biodentine™ was able to stimulate mineralization markers in a similar to MTA manner, but more intense, with greater formation of mineralized tissue bridges. These results indicate that Biodentine™ could be useful in long term in cases of conservative endodontic treatments.

Keywords: Biodentine; Mineral Trioxide Aggregate; Pulpotomy; Mineralization; Dental Pulp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 PROPOSIÇÃO.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4 RESULTADOS.....	47
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Na Endodontia, dentre os materiais disponíveis para a proteção do tecido pulpar após pulpotomia devido a exposição por cárie ou trauma, destaca-se o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), que tem sido referência para tratamentos endodônticos conservadores (Oliveira *et al.*, 2013). Porém, este material apresenta desvantagens, como tempo de presa elevado e possibilidade de causar manchamento dental (Marciano, Duarte e Camilleri, 2015). Recentemente, foi introduzido no mercado o material Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur, France), que foi apresentado como um substituto dentinário bioativo, sendo o pó composto principalmente de silicato tricálcio (Ca_3SiO_5), óxido de zircônio e carbonato de cálcio, e o líquido composto por água, com cloreto de cálcio e um polímero hidrossolúvel (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013).

Assim como o MTA (ProRoot® MTA, Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA), o qual ganhou atenção por ser um material que possui a vantagem de não ter sua presa prejudicada pela presença de água (Chang, 2012), a importância da Biodentine™ está na formação de hidróxido de cálcio (Camilleri, 2013), o qual proporciona propriedades reparadoras e antimicrobianas, além de biocompatibilidade (Wang, Sun e Chang, 2008).

Além de estimular o reparo (Laurent, Camps e About, 2012) e ser antimicrobiana (Wang, Chang e Hu, 2012), a Biodentine™ busca superioridade ao MTA apresentando como vantagem adicional seu possível uso como material restaurador temporário para esmalte e permanente para dentina (Koubi *et al.*, 2013), competindo com várias classes de materiais do mercado odontológico. Além disso, pode ser utilizado em pulpotomias, capeamentos pulparem diretos e indiretos, perfurações de furca e raiz e no tratamento de reabsorções. Esse novo material é indicado para ter contato tanto com o tecido pulpar quanto com tecidos periapicais e sendo assim, a biocompatibilidade se faz fundamental (Yoshino *et al.*, 2013).

Para que um material seja considerado biocompatível, é importante que não cause dano celular. Estudos *in vitro* tem sido realizados para suprir essa necessidade, por serem confiáveis e de rápida execução (Silva *et al.*, 2012). Dentre os métodos para avaliar a viabilidade celular disponíveis, o MTT é um teste colorimétrico quantitativo muito utilizado na literatura, por ser rápido e preciso,

podendo avaliar grande quantidade de amostras de uma única vez (Mosmann, 1983; Silva, Santos e Zaia, 2013).

A citotoxicidade da Biodentine™ foi comparada ao Dycal, ProRoot MTA e MTA-Angelus em linhagem celular odontoblástica proveniente de ratos (Poggio *et al.*, 2014). O MTA e a Biodentine™ demonstraram menor citotoxicidade que o Dycal, o qual apresentou alta citotoxicidade. Os efeitos da Biodentine™ foram avaliados em linhagem celular diferenciada (MDPC-23; odontoblastos-*like*) e em linhagem celular indiferenciada (Od-21) derivadas do tecido pulpar. Comparando a citotoxicidade com o MTA, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois materiais (Perard *et al.*, 2013). Em fibroblastos gengivais humanos, o efeito da Biodentine™ também foi estudado, sendo comparado ao MTA e a um cimento de ionômero de vidro. Não houve diferença entre a viabilidade celular proporcionada pelo MTA e pelo Biodentine™, sendo ambos menos citotóxicos que o cimento de ionômero de vidro (Zhou *et al.*, 2013).

A interação biológica entre osteoblastos e células do ligamento periodontal de humanos foi comparada com relação a materiais endodônticos-restauradores, como MTA, Biodentine™, amálgama de prata e resina composta, durante um período de 20 dias (Jung *et al.*, 2014). A análise morfológica mostrou boa adesão e proliferação celular tanto para o MTA quanto para a Biodentine™. Já a análise da viabilidade celular permitiu evidenciar que a Biodentine™ promoveu maior sobrevivência e proliferação das células provenientes do ligamento periodontal.

A rugosidade superficial, a citotoxicidade e a adesão celular foram comparadas entre a Biodentine™ e o MTA em células semelhantes a osteoblastos (MG63). Não foram encontradas diferenças morfológicas entre as superfícies dos materiais e o teste para citotoxicidade mostrou o mesmo comportamento para ambos os materiais, independentemente do período de incubação. A análise por microscopia eletrônica de varredura confirmou a adesão e proliferação celular na superfície de ambos os materiais, demonstrando que a Biodentine™ tem comportamento similar ao do MTA (Attik *et al.*, 2014).

A polpa dental tem a capacidade de produzir dentina reparadora com a diferenciação de células da polpa em odontoblastos (Okiji e Yoshida, 2009) em resposta a danos, como infecção, trauma ou outros tipos de injúrias como químicas e mecânicas. As células mesenquimais indiferenciadas localizadas no centro da polpa migram para a área danificada e se proliferam em função dos fatores de

crescimento liberados pela matriz dentinária adjacente (Nakashima, 2005). Assim, a cultura de células provenientes do tecido pulpar para estudos de viabilidade celular em contato com materiais endodônticos se faz importante, devido à maior proximidade com a realidade clínica, uma vez que esses materiais ficarão em contato com esse tecido (Yoshino *et al.*, 2013).

O potencial de remineralização da dentina estimulado pela Biodentine™ em comparação com um cimento de ionômero de vidro (Fuji IX) foi avaliado por meio de microscopia de fluorescência de dois fótons, combinada à marcação por tetraciclina (Atmeh *et al.*, 2015). Maior intensidade de fluorescência foi mostrada pela dentina em contato com Biodentine™. As amostras também apresentaram características microscópicas de remineralização, incluindo mineralização intra e intertubular.

Posteriormente a estudos *in vitro*, deve-se realizar avaliações *in vivo* dos materiais, a fim de se confirmar os resultados encontrados previamente. O MTA é um material bastante estudado, com trabalhos realizados em diferentes modelos animais, como ratos (Gomes-Filho *et al.*, 2008) e cães (Tziafas *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2005; Tanomaru-Filho *et al.*, 2006; Bortoluzzi *et al.*, 2008; Tabarsi *et al.*, 2010), todos demonstrando a formação de tecido mineralizado após proteção pulpar direta, pulpotomia e até mesmo como material de preenchimento do canal radicular após tratamento endodôntico. Além disso, este material apresentou resultados satisfatórios em humanos (Hilton, Ferracane e Mancl, 2013; Banava *et al.*, 2015; Olatosi, Sote e Orenuga, 2015).

A Biodentine™ também já foi avaliada na indução da formação de tecido mineralizado *in vivo*, por meio da inserção de tubos de polietileno no subcutâneo de ratos contendo esse material (Mori *et al.*, 2014). O tecido conjuntivo se mostrou moderadamente inflamado aos 7 dias em contato com Biodentine™, sendo esse processo suave ou insignificante aos 14 e aos 30 dias. Desse modo, o material foi considerado biocompatível após o 14º dia.

Na proteção pulpar direta de polpas mecanicamente expostas em dentes de ratos, a Biodentine™ se mostrou comparável ao MTA, criando um ambiente favorável para o reparo pulpar. Além disso, testes imunoistoquímicos mostraram a expressão suave de sialoproteína dentinária associada as fibras colágenas neoformadas após 7 dias e intensa expressão de osteopontina precocemente e associada a feixes de fibras colágenas agrupados de forma semelhante à mineralização (Tran *et al.*, 2012).

A resposta pulpar após proteção pulpar direta e pulpotomia foi avaliada e comparada entre a Biodentine™ e outros materiais, em dentes suínos decíduos. Com relação à pulpotomia, Biodentine™ e MTA foram similares, ambos sendo superiores ao formocresol quanto à resposta celular inflamatória e à formação de tecido mineralizado. Para proteção pulpar direta, houve diferença estatisticamente significativa entre a Biodentine™ e o hidróxido de cálcio, com relação à formação de tecido mineralizado no período de 7 dias (Shayegan *et al.*, 2012). Assim, Biodentine™ e MTA foram considerados materiais aceitáveis e biocompatíveis para capeamento pulpar.

Em cães, a resposta tecidual foi avaliada após pulpotomia realizada com a Biodentine™ e o MTA. A Biodentine™, à semelhança do MTA, apresentou compatibilidade tecidual e permitiu a formação de ponte de tecido mineralizado, com preservação dos tecidos periapicais e da integridade da lâmina dura. Além disso, as pontes formadas no grupo tratado com Biodentine™ foram mais espessas e mais facilmente identificadas radiograficamente (De Rossi *et al.*, 2014).

Casos clínicos realizados em humanos utilizando a Biodentine™ em tratamentos endodônticos conservadores ou radicais, mostraram resultados satisfatórios com relação à mineralização (Bachoo, Seymour e Brunton, 2013; Pawar, Kokate e Shah, 2013; Villat *et al.*, 2013; Bhat *et al.*, 2014; Nayak e Hasan, 2014; Sinha, Singh e Patil, 2014; Borkar e de Noronha de Ataíde, 2015). No entanto, no que diz respeito ao mecanismo de ação para bioestimulação, a Biodentine™ ainda carece de investigações *in vivo*, uma vez que *in vitro* podem ser identificadas diferenças comparativamente ao MTA.

Para investigação dos mecanismos de mineralização, alguns marcadores são bem conhecidos e estudados na literatura. A osteopontina (OPN), a fosfatase alcalina (ALP), a sialoproteína óssea (BSP) e a sialofosfoproteína dentinária (DSPP) tem sido utilizadas como marcadores da mineralização quando da diferenciação em osteoblastos e odontoblastos (Lee *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011).

A enzima fosfatase alcalina (ALP) está presente nos estágios iniciais de diferenciação dos osteoblastos e odontoblastos, sendo responsável por fornecer fosfato inorgânico para formação de hidroxiapatita, ou seja, pelo início da mineralização (Schouten *et al.*, 2009). Sua atividade tem sido mensurada e utilizada para avaliar a bioatividade de materiais (Salles *et al.*, 2012).

A sialofosfoproteína dentinária (DSPP) apresenta um papel regulatório na mineralização, sendo um marcador específico para odontoblastos (Chen *et al.*, 2005). A sialoproteína óssea (BSP) e a osteopontina (OPN) também estão envolvidas no controle do processo de mineralização (Goldberg *et al.*, 1995). Essas proteínas não colágenas também podem estar associadas à formação da camada calcificada inicial sob a área de necrose superficial (Okiji e Yoshida, 2009).

A proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1) é essencial para a mineralização, assim como para a maturação de odontoblastos e osteoblastos. Esta proteína é expressa em células da polpa dental e odontoblastos, além dos tecidos pré-dentina, dentina e cemento (Qin, D'Souza e Feng, 2007). O fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2) está envolvido nos processos de mineralização, óssea e dental, sendo o principal regulador da diferenciação dos osteoblastos. Os achados na literatura demonstram que este fator de transcrição tem um importante papel na formação e homeostase dos tecidos mineralizados (Gaikwad, Cavender e D'Souza, 2001; Fisher e Franz-Odenaal, 2012).

A Biodentine™ induz a diferenciação de células da polpa em odontoblastos *like* (Zanini *et al.*, 2012) e estimula a mineralização (Han e Okiji, 2011; Laurent, Camps e About, 2012; Nowicka *et al.*, 2013), mas os mecanismos envolvidos na diferenciação celular não estão completamente elucidados, assim como as possíveis diferenças na resposta entre esse material e o MTA, material mais utilizado atualmente (Hilton, Ferracane e Mancl, 2013).

P_{ROPOSIÇÃO}

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

Avaliar a viabilidade celular e a expressão de marcadores de mineralização *in vitro* após o estímulo com Biodentine™ e MTA. Além disso, avaliar *in vivo* a expressão de marcadores da mineralização após pulpotomia.

Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade de células provenientes do tecido pulpar de dentes humanos após o contato com extratos em diferentes concentrações de Biodentine™ e MTA, por meio do teste MTT.
- Avaliar a expressão gênica de osteopontina, sialoproteína óssea, sialofosfoproteína dentinária, fosfatase alcalina, do fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (*Runx-2*) e proteína da matriz dentinária-1 em cultura de células da polpa dentária de humanos após contato com extratos de Biodentine™ e MTA, por meio de qRT-PCR.
- Avaliar a presença de ponte de tecido mineralizado em dentes de cães nos quais foi realizada pulpotomia com Biodentine™ e MTA.
- Avaliar a expressão de proteínas (osteopontina e fosfatase alcalina) e do fator de transcrição (*Runx-2*), por meio de imunoistoquímica e imunofluorescência indireta nos tecidos, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Parte 1: Estudo *in vitro* em células da polpa dentária

Obtenção da cultura de células pelo método do explante

As células da polpa dentária humana foram isoladas pelo método de explante, conforme descrito previamente (Paula-Silva *et al.*, 2009), a partir de 6 dentes permanentes hígidos extraídos por razões ortodônticas. Inicialmente, esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da FORP-USP (Processo nº 25315013.0.0000.5419). Foi utilizado um *pool* de 3 dentes para cada experimento, sendo que foram realizados 2 experimentos independentes.

Os dentes foram colocados imediatamente após a exodontia em tubo falcon contendo meio Dulbecco Modified Eagle (DMEM, Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 1% de Penicilina/Estreptomicina, 1% de fungicida (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e mantidos em gelo para serem transportados até o laboratório. Em ambiente livre de contaminação, os dentes foram cortados na junção cimento-esmalte, com auxílio de broca esférica esterilizada em alta rotação, até a separação da coroa e das raízes. Em seguida, o tecido pulpar dos canais radiculares foi coletado com auxílio de cureta e limas tipo K esterilizadas, e depositado em eppendorfs contendo meio DMEM completo (DMEM-c), também mantidos em gelo. A seguir, o material coletado foi transportado para o fluxo laminar, onde foi transferido dos eppendorfs para placas de cultura de 6 poços (Cell Wells, Corning Glass Workers, Corning, NY, EUA), com auxílio de instrumental esterilizado, sendo dividido em pequenas porções em cada poço. Vaselina esterilizada foi depositada em pequenas porções ao redor do tecido de cada poço e este conjunto foi coberto com lamínulas redondas esterilizadas, com intuito de promover a adesão dos tecidos. Os poços foram preenchidos com 3 mL de meio DMEM-c e as placas armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Em intervalos de 48h, as placas foram observadas em microscópio invertido (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) para verificação da presença ou não de células provenientes dos tecidos e troca do meio de cultura, sendo os poços lavados com solução PBS esterilizada (0,01 mol/L, pH 7.4) antes da colocação de meio de cultura novo.

No momento em que os poços se encontravam totalmente preenchidos pelas células que se destacaram dos tecidos (confluência), os mesmos foram tripsinizados (tripsina a 0,2% e ácido etilenodiaminotetracético a 0,02%, Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e seu conteúdo transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm² (Falcon™, Corning, NY, EUA). Posteriormente, as células foram subcultivadas em meio DMEM contendo 10% de FBS e, para os experimentos, foram utilizadas células da terceira à quinta passagem.

Preparo das amostras

O presente estudo foi realizado em conformidade com as normas da *International Organization for Standardization* (ISO) nº 10993-5:2009 (ISO, 2009). Para colocação dos materiais a serem testados (Tabela 1) em contato com as células, optou-se pela realização do método de extração.

Foram confeccionadas duas matrizes cilíndricas, com 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura, a partir de tiras de matriz para amálgama soldadas. Os materiais foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes, em fluxo laminar, e inseridos nas matrizes previamente esterilizadas apoiadas em placa de vidro e com instrumental esterilizados, um em cada matriz, gerando cilindros com volume de 47,5 mm³.

Tabela 1. Materiais utilizados, composição e fabricante (cidade e país)

Material	Composição de acordo com o fabricante	Fabricante
Biodentine™	<i>Pó:</i> silicato tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro, óxido de zircônio	Septodont (Saint Maurdes Fosses, França)
	<i>Líquido:</i> cloreto de cálcio, polímero hidrossolúvel	
ProRoot MTA White	<i>Pó:</i> cimento Portland (75%), óxido de bismuto (20%), sulfato de cálcio dihidratado (5%), silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminato férrico tetracálcico <i>Líquido:</i> água	Dentsply Tulsa Dental (Johnson City, EUA)

Os cilindros formados pelos materiais a serem testados foram mantidos no fluxo sob luz ultravioleta (UV) para obtenção da presa inicial e eliminação de possíveis contaminações, durante 1 hora. Em seguida, os mesmos foram colocados separadamente em tubo falcon contendo 5 mL de meio DMEM incompleto (DMEM-i), os quais foram mantidos sob refrigeração durante 72 horas antes do experimento.

O extrato foi filtrado, os cilindros dos materiais descartados e a partir do extrato inicial dos materiais (1:1), foram obtidas diluições seriadas 1:10 e 1:100 para realização dos experimentos. As soluções 1:1, 1:10 e 1:100 foram armazenadas sob refrigeração até o uso.

Preparo da cultura de células para os experimentos

Para os ensaios de *in vitro*, as células foram expandidas em frascos de cultura celular de 750 cm², mantidas em incubadora com controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂. Após as células atingirem confluência, o meio DMEM completo (DMEM-c) das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 30 mL de solução de salina fosfatada tamponada (PBS), a fim de remover debris e células mortas. Em seguida, foram adicionados 30 mL de DMEM-c e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com rodos esterilizados (Cell Scraper, Corning Glass Workers, NY, EUA). O meio contendo as células foi então retirado e pipetado em tubo falcon esterilizado de 50 mL. O frasco foi centrifugado, a 1.200 rpm, à 4°C, durante 10 minutos, para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10ml de DMEM-c foi adicionado ao tubo contendo o *pellet*.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer (BOECO Germany, Hamburg, Alemanha) partindo-se da suspensão de 10 µL diluída 10 vezes em solução de azul de Trypan (Gibco, NY, EUA) para a contagem total do número de células viáveis. As células foram então transferidas para placas de cultura de 96 poços (Cell Wells, 25820, Corning Glass Workers, NY, EUA), na densidade de 1x10⁵ células/poço e incubadas até os experimentos em DMEM-c a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

Ensaio MTT – Viabilidade celular

Uma suspensão de células da polpa dentária obtidas a partir da cultura primária foi ajustada para 1×10^5 células/poço em 200 μ L de meio de cultura DMEM-i. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 12 horas para adesão. Após este período, 200 μ L dos extratos dos materiais MTA e Biodentine™ nas concentrações 1:1, 1:10 e 1:100 foram adicionados nos poços contendo as células. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas e o meio de cultura substituído por RPMI (*Roswell Park Memorial Institut*) incolor (RPMI-I, cat. 11835030, 500 mL) (Gibco, EUA) contendo o corante MTT – Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio a 0,5 mg/mL (Ensaio Colorimétrico MTT Sigma M-5655, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, as quais são ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Assim, as células foram incubadas nas mesmas condições por 3 horas. Após esse período, foi adicionado 40 μ L de SDS (*Dodecil sulfato de sódio*) 20% em 0,01N de HCl em cada poço e mantido a temperatura ambiente para solubilização completa do precipitado formado, para a posterior medição colorimétrica, em espectrofotômetro. A absorbância referente a cada poço foi determinada no comprimento de onda de 570 nm (μ Quant, Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A viabilidade celular nos grupos foi expressa em porcentagem e comparada ao controle (meio de cultura), o qual teve a absorbância obtida ajustada para 100% de viabilidade. Os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – Expressão de genes relacionados à mineralização

A partir dos resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular, foi selecionada a melhor diluição dentre todas avaliadas para o estudo de qRT-PCR, o qual foi realizado para detecção de RNA mensageiro para *SPP1*, *BSP*, *DSPP*, *ALP*, *DMP-1* e *RUNX2*, por meio de marcadores fluorescentes. Após 24 horas e 48 horas, as células foram coletadas para extração do RNA total pelo método de colunas, utilizando o método à base de tiocianato de guanidina (RNEasy, Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). Os poços utilizados nos experimentos foram preenchidos com 350 μ L de tampão RLT, sendo este conteúdo homogeneizado e transferido por

completo para eppendorf contendo 350 µL de etanol 70% preparado com água livre de RNase, com a finalidade de fornecer condição apropriada para ligação do RNA à coluna de purificação. A seguir, o conteúdo do eppendorf de mistura foi transferido para coluna com tubo coletor acoplado. Os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Microcentrífuga modelo 5417R; Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), a 10.000 rpm, por 15 segundos. O filtrado foi descartado e 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Novamente o filtrado foi descartado e 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Posteriormente, 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Novamente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 2 minutos. Com a finalidade de eliminar a possibilidade de carregar remanescentes de solução tampão RPE contendo etanol para as etapas seguintes, o tubo coletor foi descartado, um novo tubo coletor foi inserido na coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado, um tubo de 1,5 ml foi acoplado à coluna e o RNA presente na membrana foi eluído em 40 µL de água livre de RNase. O RNA obtido foi estimado com auxílio do equipamento Nanodrop (Wilmington, DE, EUA) a partir de 2 µL de cada amostra.

Em seguida foi realizada a transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) e a reação em cadeia da polimerase, a partir de 500 ng de RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Em um tubo de 0,2 ml (Axygen Inc.), o RNA foi incubado com 2,0 µL de solução tampão 10x, 0,8 µL de dNTP *mixture* 25x (100mM), 2,0 µL de *random primers* 10x, 1,0 µL da enzima *Multiscribe*TM *Reverse Transcriptase* (50 U/ µL), 1,0 µL de inibidor de RNase e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37°C por 2 horas para transcrição reversa e posterior incubação a 85°C por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo. O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de qRT-PCR, alíquotas de 2 µl (50 ng) de cDNA foram adicionadas a 10,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 1,0 µL de TaqMan

Gene Expression Assay 20× (par de *primers* + sonda) e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL / poço. *Primers* e sondas para *OPN* (Hs00959010_m1), *IBSP* (Hs00173720_m1), *DSPP* (Hs00171962_m1), *ALP* (Hs01029144_m1), *RUNX2* (Hs00231692_m1) e *DMP1* (Hs01009391_g1) foram obtidos comercialmente e por serem de propriedades privadas suas sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*; Hs 02758991_g1) e beta-actina (*ACTB*; Hs 01060665_g1) foram utilizados como referência. As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata, utilizando o aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 segundo para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para anelamento do *primer* e polimerização. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cicle threshold*). Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados. Para cada gene, o cálculo da expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔC_t das amostras e o ΔC_t apresentado pelo controle ($\Delta\Delta C_t$), com base na equação: $Expressão\ relativa = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Os valores de expressão relativa de cada RNAm, para cada grupo, foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Parte 2: Estudo *in vivo* em modelo animal

Obtenção das amostras

Inicialmente, lâminas foram obtidas a partir de um banco de lâminas do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, sob responsabilidade da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva. Foram avaliadas lâminas (n=87) de 2^{os} e 3^{os} pré-molares superiores e os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pré-molares inferiores de 3 cães da raça Beagle, provenientes de uma mesma ninhada, de ambos os gêneros, com 12 meses de idade e pesando, em média, 20 quilogramas (kg), nos quais foi realizada pulpotomia com MTA (n=35) e Biodentine™ (n=52). A eutanásia dos animais foi realizada após 120 dias do início do experimento. O estudo foi embasado nas normas da *International Organization for Standardization* (ISO) nº 7405:2008 (ISO, 2008) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São

Paulo (Processo nº 2013.1.643.58.5).

Análise microscópica – Presença de ponte de tecido mineralizado

Por meio de microscopia óptica, as lâminas utilizadas na imunoistoquímica foram avaliadas quanto à presença ou ausência de formação de ponte de tecido mineralizado. A análise foi realizada por um único observador experiente e calibrado, sem conhecimento prévio sobre qual grupo pertencia o espécime. Os dados obtidos para cada grupo de materiais foram transformados em porcentagem e analisados por meio do teste exato de Fisher ($\alpha = 0,05$).

Imunoistoquímica – Análise da marcação para Osteopontina e Fosfatase Alcalina

A partir dos resultados obtidos no estudo *in vitro*, foram realizados ensaios de imunoistoquímica para os marcadores de mineralização relacionados a neoformação dentinária: osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP).

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). A seguir, foram submetidas à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), aquecido em forno micro-ondas, por meio de 7 disparos de 12 segundos, com intervalos de 2 minutos entre cada disparo. Após estabilização da temperatura, foram realizadas lavagens em PBS por 5 minutos (3x) e a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3 % por 40 minutos. Após, foram lavadas em PBS por 5 minutos (3x) e os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 5% por 60 minutos. A seguir, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários para osteopontina (ab8448, policlonal produzido em coelhos, Abcam, Cambridge, MA, EUA) e fosfatase alcalina (ab54778, monoclonal produzido em camundongos, Abcam, Cambridge, MA, EUA) a 4°C, *overnight*. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários biotinilados por 1 hora (anti-camundongo ou anti-coelho), lavadas em PBS, e incubadas com estreptavidina conjugada à *horseradish* peroxidase (HRP) por 20 minutos. 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como substrato enzimático por 5 minutos; as lâminas foram lavadas em PBS, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavadas com água destilada,

desidratadas em concentrações crescentes de álcool e montadas em Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcção nas quais foi omitido o anticorpo primário e as lâminas foram incubadas com PBS.

A marcação positiva para OPN ou ALP foi avaliada por meio de escores – suave (1), moderada (2) ou intensa (3) - na região da ponte de tecido mineralizado e no tecido pulpar nos terços apical, médio e cervical do canal radicular. Os dados foram transformados em porcentagem e os grupos foram comparados entre si por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

Imunofluorescência indireta - Análise das células positivamente marcadas para o fator de transcrição Runx-2

Com o objetivo de avaliar a expressão de Runx-2 como um possível fator de transcrição para a síntese de proteínas de mineralização e, portanto, indicador da diferenciação celular, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta para identificação do fator de transcrição.

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). Os tecidos foram submetidos à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), aquecido em forno micro-ondas, por meio de 7 disparos de 12 segundos, com intervalos de 2 minutos entre cada disparo. A seguir foram lavadas em PBS por 5 minutos (3x) e em solução de borohidreto de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 1 mg / mL por 15 minutos (3x). Os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma) a 5% por 60 minutos. A imunomarcção foi realizada utilizando anticorpo primário para Runx-2 (ab23981, anticorpo policlonal produzido em coelhos, Abcam, Cambridge, MA, EUA) à 4°C, *overnight*. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS (3x) e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelhos conjugado ao fluoróforo fluoresceína), por 1 hora, em câmara escura. As lâminas foram lavadas em PBS (3x) novamente e os núcleos foram marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,5 µg / ml) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA) por 5 minutos. As lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Molecular Probes Inc., Eugene, EUA). Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcção, nas quais o anticorpo primário foi omitido e as lâminas incubadas com PBS.

A porcentagem de células positivamente marcadas foi avaliada na camada adjacente ao tecido mineralizado neoformado, caso estivesse presente, na camada odontoblástica íntegra do tecido pulpar radicular e também as células do interior deste tecido, na região central. Primeiramente, as regiões foram fotografadas em microscopia de fluorescência em aumento de 20x, utilizando os filtros DAPI e Alexa Fluor. Posteriormente, as imagens foram analisadas por meio do programa Image J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para obtenção da contagem de células positivamente marcadas, ajustando-se o “threshold” e com utilização da ferramenta “*analyze particles*”, sendo que o valor do tamanho de partícula usado foi o tamanho médio do núcleo celular calculado previamente. Dessa forma, a contagem total de células e a contagem de células marcadas foi realizada e os valores obtidos foram transformados em porcentagem. Os grupos foram comparados entre si e com o tecido pulpar normal, ou seja, de um dente hígido (controle), por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Análise Estatística

Todas as análises descritas neste trabalho, incluindo os gráficos apresentados, foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Parte 1: Estudo *in vitro* em células da polpa dentária

Ensaio MTT – Viabilidade celular

Em ambos os períodos experimentais, 24 e 48 horas, as diluições 1:1 e 1:10 de MTA e Biodentine™ apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$), com menor quantidade de células viáveis [24 horas: controle (100%), Biodentine™ 1:1 (32,2%), Biodentine™ 1:10 (65%), MTA 1:1 (14,3%), MTA 1:10 (65,4%); 48 horas: controle (100%), Biodentine™ 1:1 (12,4%), Biodentine™ 1:10 (50,6%), MTA 1:1 (20,5%), MTA 1:10 (48,8%)]. Por outro lado, a diluição 1:100 de ambos os materiais não afetou a viabilidade celular ($p > 0,05$), sem diferença estatisticamente significativa em relação ao controle em ambos os períodos experimentais [24 horas: controle (100%), Biodentine™ 1:100 (97,3%), MTA 1:100 (97,3%); 48 horas: controle (100%), Biodentine™ 1:100 (104%), MTA 1:100 (103,3%)] (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Efeito das diferentes concentrações dos materiais (MTA e Biodentine™) na viabilidade celular em cultura primária de células da polpa dental, avaliada por meio do teste MTT, após 24 horas de exposição. Diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (células incubadas somente em meio de cultura) foram marcadas por meio de *. Experimento realizado em triplicata (n= 2 experimentos independentes).

Figura 2. Efeito das diferentes concentrações dos materiais (MTA e Biodentine™) na viabilidade celular em cultura primária de células da polpa dental, avaliada por meio do teste MTT, após 48 horas de exposição. Diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (células incubadas somente em meio de cultura) foram marcadas por meio de *. Experimento realizado em triplicata (n= 2 experimentos independentes).

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - Expressão de genes relacionados à mineralização

Tendo em vista que a diluição 1:100 a partir da extração dos cilindros formados pelos materiais não afetou a viabilidade celular, esta concentração foi utilizada para o experimento qRT-PCR.

A expressão de diferentes genes relacionados à mineralização foi avaliada, porém não foi detectada expressão de *IBSP*, *DSPP* e *DMP1* em nenhum dos períodos experimentais.

Após 24 horas de estímulo com os materiais, MTA e Biodentine™ não modularam *SPP1*, *ALP* e *RUNX2* em relação ao controle, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) (Figura 3). Já no período experimental de 48 horas, MTA e Biodentine™ induziram maior expressão gênica de *SPP1*, *ALP* e *RUNX2* em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 3. Expressão gênica em relação ao grupo controle no período de 24 horas para osteopontina (*SPP1*), fosfatase alcalina (*ALPL*) e fator de transcrição RUNX2 (*RUNX2*). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Experimento realizado em triplicata (n= 2 experimentos independentes).

Figura 4. Expressão gênica em relação ao grupo controle no período de 48 horas para osteopontina (*SPP1*), fosfatase alcalina (*ALPL*) e fator de transcrição RUNX2 (*RUNX2*). Diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (células incubadas somente em meio de cultura) foram marcadas por meio de *. Experimento realizado em triplicata (n= 2 experimentos independentes).

Parte 2: Estudo *in vivo* em modelo animal

Análise Microscópica - Presença de ponte de tecido mineralizado

A Biodentine™ induziu formação de ponte de tecido mineralizado em 96% dos casos, enquanto o MTA promoveu essa indução em 57%, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 5).

Figura 5. Porcentagem de espécimes de Biodentine™ (n=23) e de MTA (n=15) que apresentaram formação de ponte de tecido mineralizado. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

Imunoistoquímica – Análise da marcação para Osteopontina e Fosfatase Alcalina

A marcação da ponte de tecido mineralizado e seus arredores para osteopontina (OPN) foi estatisticamente diferente entre Biodentine™ e MTA ($p < 0,0001$). O MTA apresentou marcações suaves em 29% dos casos e a Biodentine™ apresentou marcações suaves em 26%, moderadas em 43% e intensas em 22% dos casos (Figura 6).

Figura 6. Porcentagem de marcação na ponte de tecido mineralizado para osteopontina após pulpotomia com Biodentine™ (n=23) e MTA (n=7). * indica diferença estatisticamente significativa entre os materiais ($p < 0,0001$).

A marcação para fosfatase alcalina (ALP) na ponte de tecido mineralizado mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os materiais. Marcações suaves para o MTA foram encontradas em 14% dos casos e para a Biodentine™ em 48% dos casos (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de marcação na ponte de tecido mineralizado para fosfatase alcalina após pulpotomia com Biodentine™ (n=23) e MTA (n=7). * indica diferença estatisticamente significativa entre os materiais ($p < 0,0001$).

Também foi analisada a marcação de osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP) no tecido pulpar radicular, dividida em terços: apical, médio e cervical. Quando avaliada a marcação para OPN, ocorreu diferença estatística entre os materiais ($p < 0,0001$), estando esta concentrada mais próxima ao terço cervical para ambos os materiais. Após o uso do MTA não foi observada marcação em 57% dos casos, sendo 29% marcados no terço cervical e 29% no médio, sem nenhuma marcação para o apical. A Biodentine™ apresentou 52% de marcação no terço cervical, 26% no médio e 26% no apical, sendo que 39% não apresentaram marcação (Figura 8).

A marcação para ALP no tecido pulpar não apresentou diferença estatística entre os materiais ($p = 0,2$). Todos os terços encontravam-se bem marcados para ambos os materiais, sendo que o MTA apresentou marcação em 100% dos casos nos terços cervical e médio e 86% no apical, e a Biodentine™ apresentou 96% no terço cervical e 91% nos terços médio e apical (Figura 9).

Figura 8. Porcentagem de marcação ao longo tecido pulpar para osteopontina após pulpotomia com Biodentine™ (n=23) e MTA (n=7). Os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa estão marcados com * ($p < 0,0001$).

Figura 9. Porcentagem de marcação ao longo do tecido pulpar para fosfatase alcalina após pulpotomia com Biodentine™ (n=23) e MTA (n=7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais ($p = 0,2$).

Fotomicrografias representativas da marcação por osteopontina nos terços pulpare e na região de tecido mineralizado podem ser observadas nas figuras 11 e 12, respectivamente. Fotomicrografias representativas da marcação por fosfatase alcalina nos terços pulpare e na região de tecido mineralizado podem ser observadas nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Imunofluorescência indireta - Análise das células positivamente marcadas para o fator de transcrição Runx-2

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de células positivamente marcadas pela fluorescência, para as regiões da camada odontoblástica do tecido pulpar íntegro e para região central do tecido pulpar, entre os materiais estudados e o controle ($p > 0,05$). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais estudados no número de células positivamente marcadas para a região adjacente ao tecido mineralizado neoformado ($p > 0,05$) (Figura 10). As fotomicrografias representativas destas marcações por imunofluorescência podem ser observadas na figura 15.

Figura 10. Porcentagem de células positivamente marcadas para Runx2 nas regiões da camada odontoblástica do tecido pulpar íntegro, central da polpa e adjacente ao tecido mineralizado neoformado nos tratamentos com Biodentine™ (n=6) e MTA (n=6). Não houve diferença estatística entre os materiais e o controle ou dos materiais entre si ($p > 0,05$).

Figura 11. Fotomicrografias obtidas após imunomarcção para osteopontina nos grupos tratados com Biodentine™ (A, C e E) e MTA (B, D e F). Marcação nos terços cervical, médio e apical, sendo mais intensa e estendida até o terço apical para Biodentine™. Aumento de 10x (A, B, E e F) e 40x (C e D).

Figura 12. Fotomicrografias obtidas após imunomarcção para osteopontina nos grupos tratados com Biodentine™ (**A** e **C**) e MTA (**B** e **D**). Marcação na ponte de tecido mineralizado e adjacências. Maior aumento mostrando as células adjacentes ao tecido neoformado. Controles negativos da imunoistoquímica para Biodentine™ (**E**) e MTA (**F**). Aumento de 10x (**A** e **B**), 20x (**E** e **F**) e 40x (**C** e **D**).

Figura 13. Fotomicrografias obtidas após imunomarcção para fosfatase alcalina nos grupos tratados com Biodentine™ (**A, C e E**) e MTA (**B, D e F**). Marcação presente nos terços cervical, médio e apical para ambos os materiais. Aumento de 10x (**A, B, E e F**) e 20x (**C e D**).

Figura 14. Fotomicrografias obtidas após imunomarcção para fosfatase alcalina nos grupos tratados com Biodentine™ (**A** e **C**) e MTA (**B** e **D**). Marcação na ponte de tecido mineralizado mais intensa para Biodentine™. Maior aumento mostrando as células adjacentes ao tecido neoformado. Controles negativos da imunoistoquímica para Biodentine™ (**E**) e MTA (**F**). Aumento de 10x (**B** e **F**), 20x (**A** e **E**) e 40x (**C** e **D**).

Figura 15. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência após marcação para Runx-2 nos grupos tratados com Biodentine™ (**B, D, G, H, K e L**) e MTA (**A, C, E, F, I e J**), nos filtros Alexa flúor e DAPI. Marcação similar para ambos os materiais na região da ponte de tecido mineralizado (**A, B, C e D**), centro da polpa (**E, F, G e H**) e camada odontoblástica (**I, J, K e L**). Controle negativo da técnica de imunofluorescência (**M e N**). Aumento de 10x (**A-D**), 20 (**M e N**) e 40x (**E-L**).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A Biodentine™, novo material indicado como substituto dentinário em contato com a polpa ou com os tecidos periapicais, surgiu com uma nova geração de materiais subsequente ao MTA. Suas principais vantagens são menor tempo de presa (Setbon *et al.*, 2014) e possibilidade de uso como material restaurador temporário para esmalte e permanente para dentina (Koubi *et al.*, 2013), diminuindo a aplicação de camadas de diferentes materiais após o tratamento endodôntico conservador. Por outro lado, seu custo é elevado com relação aos outros materiais e os estudos científicos ainda são escassos quando comparamos com a literatura científica referente ao MTA.

Dentre esses estudos, a avaliação *in vitro* em cultura de células é um modelo experimental muito utilizado para testes de viabilidade celular em contato com materiais, pois é de execução rápida, de baixo custo, permite o controle das condições ambientais e possui menos limitações do ponto de vista ético (Hanks, Wataha e Sun, 1996; Wataha, 2012). No caso da cultura primária, a vantagem é a utilização de células humanas, que são obtidas dos tecidos a partir de explantes ou digestão enzimática, oferecendo testes mais sensíveis do que aqueles que utilizam linhagens celulares (Cortes *et al.*, 2006). Por esta razão, o presente trabalho utilizou células provenientes da cultura primária da polpa dentária humana obtidas pelo método de explante.

Estudos prévios investigaram a citotoxicidade da Biodentine™ comparativamente ao MTA e os resultados demonstraram similaridade deste novo material ao MTA (Perard *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Attik *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2014; Khedmat *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014; Poggio *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Tais resultados são concordantes com os do presente estudo, que mostraram influência similar da Biodentine™ e do MTA sobre a viabilidade celular.

Além da manutenção da viabilidade celular, para que um material possa estar em contato com o tecido pulpar em procedimentos como capeamentos pulpares e pulpotomias, deve apresentar propriedade indutora da formação de tecido mineralizado. Assim, estudos avaliando o processo de mineralização estimulado por diferentes materiais como a Biodentine™ e o MTA tornam-se necessários. No presente estudo, os marcadores de mineralização dentinária, como IBSP, DSPP e DMP1, não apresentaram expressão detectável nos experimentos de PCR, por isso,

as análises deste trabalho tiveram seu foco nos marcadores detectados *in vitro*. Essa diferença na detecção pode ser devido ao tempo do experimento *in vitro*, pois estudos mostram o aparecimento mais tardio desses marcadores, com expressão gênica a longo prazo (Peng *et al.*, 2011). Outro trabalho avaliou a expressão gênica após 7 e 14 dias, também a longo prazo, e verificou a presença de marcadores da mineralização, como DMP-1, DSPP, BSP, os quais não tiveram expressão detectada no nosso trabalho, mas detectaram a presença de OPN e Runx2 (Chang *et al.*, 2014), que também foram expressos no presente trabalho, o que pode significar o papel mais precoce destes genes na mineralização, e sua manutenção no processo a longo prazo.

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida por vários órgãos e tecidos do organismo e estudos demonstraram que a sua atividade enzimática é necessária para mineralização osteoblástica (Sugawara *et al.*, 2002). A deposição de mineral na matriz colágena dentinária só é possível na presença dessa enzima, a qual se liga covalentemente à dentina e ativa a incorporação de íons (Beertsen e van den Bos, 1992). Assim, a ALP tem um importante papel na inicialização da mineralização, mas não é essencial para sua progressão (Bellows, Aubin e Heersche, 1991). A marcação imunoistoquímica para ALP foi avaliada em tecidos pulparem sadios e tecidos pulparem provenientes de dentes com pulpite reversível e irreversível, e os resultados mostraram que na polpa sadia havia pouca atividade de ALP, localizada na região da pré-dentina, enquanto na pulpite reversível a atividade era difusa e extracelular e na pulpite irreversível a atividade estava localizada nas células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, indicando papel da ALP na resposta inicial da polpa frente à agressões (Spoto *et al.*, 2001). No presente estudo, a marcação foi difusa e extracelular concordando com os achados anteriores de que a ALP tem atividade logo após o estímulo, participando na reação do organismo. Os achados aqui apresentados também concordam com estudos prévios, que detectaram o aumento da expressão gênica de *ALPL* *in vitro* após o estímulo celular com materiais como MTA e Biodentine™ (Peng *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Por outro lado, a literatura mostra que há um declínio na expressão de fosfatase alcalina, coincidente com a diminuição de sua atividade após 11 dias de cultura celular, fato que poderia indicar a maturação dos odontoblastos, corroborando com a indicação da participação desse marcador para a mineralização inicial (Zanini *et al.*, 2012).

A osteopontina é uma glicoproteína ácida do grupo das proteínas da matriz extracelular que está envolvida em diversos eventos fisiológicos e patológicos, incluindo a manutenção ou a recuperação da integridade tecidual durante processos inflamatórios (Denhardt *et al.*, 2001). Por possuir um papel no recrutamento de macrófagos na resposta imune inata (Giachelli *et al.*, 1998), essa proteína já foi relacionada com a presença de quadros inflamatórios (Scatena, Liaw e Giachelli, 2007; Uede, 2011) e com a reabsorção óssea (Reinholt *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2013), mas há evidências na literatura de que esta tenha um papel protetor na infecção endodôntica, pois na ausência de OPN, a resposta inflamatória e a perda óssea decorrentes dessa infecção foram muito mais severas em camundongos (Rittling *et al.*, 2010). Outros trabalhos também detectaram aumento deste marcador juntamente com mudanças ósseas em resposta à infecção sistêmica e inflamação devido a administração de LPS, porém a relação entre esses achados ainda não foi esclarecida (Grimm *et al.*, 2010). O aumento da expressão gênica de osteopontina também foi demonstrado *in vitro* após o estímulo com a Biodentine™ e o MTA, sem diferença entre os materiais (Chang *et al.*, 2014), o que concorda com os resultados do presente estudo. A presença de osteopontina também já foi investigada por imunistoquímica em um estudo que realizou capeamento pulpar com hidróxido de cálcio, MTA e Biodentine™ em ratos. Os resultados mostraram que a ponte de tecido mineralizado estava marcada para todas as amostras, enquanto as células adjacentes a ela apresentaram marcação fraca para o grupo do hidróxido de cálcio e marcação mais intensa para os grupos do MTA e da Biodentine™ (Tran *et al.*, 2012). Estes achados concordam com os nossos no que diz respeito à presença de marcação para osteopontina, porém no presente estudo, a Biodentine™ apresentou marcação mais intensa e em mais áreas.

O fator de transcrição RUNX2 é específico de osteoblastos e necessário para diferenciação de células mesenquimais pluripotentes (Camilleri e McDonald, 2006). Foi demonstrado que este fator é essencial para formação óssea normal (Komori *et al.*, 1997). O gene *Runx2* coordena múltiplas vias de sinalização relacionadas à diferenciação osteoblástica (Komori, 2010), diferenciação odontoblástica (Yang *et al.*, 2014) e formação dentária (D'Souza *et al.*, 1999). Embora os osteoblastos e odontoblastos sejam células que possuem similaridades, inclusive na expressão gênica, ao contrário do que ocorre nos osteoblastos, a expressão de Runx-2 é baixa ou não é detectada em odontoblastos diferenciados (Yamashiro *et al.*, 2002;

Miyazaki *et al.*, 2008). Os resultados referentes ao presente estudo *in vitro* demonstraram o aumento da expressão gênica de *RUNX2*, sendo concordantes com alguns resultados prévios (Chang *et al.*, 2014) e discordantes de outros (Perard *et al.*, 2013), nos quais a expressão foi similar ao grupo controle, após períodos experimentais mais longos. Nosso trabalho identificou a expressão do fator de transcrição *RUNX2 in vivo* por meio de imunofluorescência, mas não detectou diferença entre os materiais estudados e o controle. Não há na literatura trabalhos que tenham realizado investigação semelhante, mas apesar dos modelos escolhidos para os experimentos do presente estudo terem sido selecionados com o intuito de se aproximarem da realidade clínica, algumas limitações são inerentes. O modelo experimental de cães possui similaridades com a resposta biológica humana, conforme resultados prévios (Pitt Ford, 1985; Holland *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2009). Além disso, o cão apresenta taxa de crescimento rápida, o que permite a observação de resultados em períodos menores de tempo, além de serem animais de fácil anestesia e manipulação (Rowe, 1980). Quanto aos resultados semelhantes encontrados *in vivo* no presente estudo em relação à marcação de Runx-2, pode-se hipotetizar que foi devido ao período tardio de análise do processo de mineralização, uma vez que é sabido do pico de expressão inicial deste marcador, seguido de estabilização e declínio em períodos mais tardios (Miyazaki *et al.*, 2008).

Com relação à formação de ponte de tecido mineralizado, nossos resultados mostraram maior presença desta para o grupo tratado com Biodentine™, diferença que não foi encontrada em outros estudos (Shayegan *et al.*, 2012). Estudos prévios mostraram uma maior eficiência clínica do MTA com relação ao Biodentine™, embora os resultados não tenham apresentado diferença estatística, sendo ambos considerados pelos autores aplicáveis para pulpotomia (Niranjani *et al.*, 2015). Além disso, as pontes de tecido mineralizado formadas pela Biodentine™ têm se mostrado mais espessas (De Rossi *et al.*, 2014; Tziafa *et al.*, 2014), o que poderia explicar a diferença encontrada em relação ao MTA, já que quanto maiores as dimensões da ponte, maior a chance de ser mais visível em maior número de cortes histológicos. Quando as pontes induzidas por Biodentine™, MTA, hidróxido de cálcio e adesivo dentinário foram avaliadas por tomografia computadorizada, a Biodentine™ apresentou os maiores volumes médios e máximos das mesmas (Nowicka *et al.*, 2015). Essa maior espessura apresentada pela ponte do grupo Biodentine™, também observada no presente estudo, poderia apresentar benefícios

na manutenção da vitalidade da polpa remanescente a longo prazo (Zarrabi *et al.*, 2010).

Um estudo que avaliou as respostas pulparem após proteção pulpar direta em dentes mecanicamente expostos de mini-porcos, comparando os materiais Biodentine™ e MTA Angelus, demonstrou a formação de ponte de tecido mineralizado para ambos os materiais (Tziafa *et al.*, 2014). Similarmente ao presente estudo, a Biodentine™ apresentou maior atividade estimulatória das células da polpa quando comparada ao MTA, resultando em pontes de dentina mais espessas nos dentes completamente formados e além disso, maior incidência de calcificação pulpar ectópica nos dentes em desenvolvimento. Este achado incomum de calcificação pulpar poderia estar relacionado com os achados deste estudo, no qual os dentes tratados com Biodentine™ mostraram uma resposta mais intensa na polpa, com uma marcação em maior extensão no sentido apical dos marcadores de mineralização, principalmente para a osteopontina.

Os resultados aqui expostos mostraram algumas diferenças entre os materiais testados, que podem ser devido a diferenças em sua composição ou em seu mecanismo de ação. O pó do MTA branco é composto majoritariamente por silicato tricálcio, silicato dicálcio e óxido de bismuto e na presença de água seus compostos reagem para formar um gel hidratado de silicato de cálcio, fazendo com que o MTA endurecido seja composto de hidróxido de cálcio contido em uma matriz de silicato (Camilleri *et al.*, 2005; Camilleri, 2007). A presença de hidróxido de cálcio é o que torna o material altamente alcalino (pH = 12,5) (Torabinejad *et al.*, 1995). O processo de biomineralização ocorre simultaneamente com a resposta inflamatória aguda, pois quando o MTA é colocado em contato com os tecidos, uma série de eventos celulares e teciduais são ativados, culminando com a formação de uma camada de apatita entre o biomaterial e os tecidos (Reyes-Carmona *et al.*, 2010). Inicialmente, uma fase de fosfato de cálcio amorfo é precipitada, que atua como precursora para a fase secundária na qual é formada apatita carbonatada (Reyes-Carmona, Felipe e Felipe, 2009). De todos os íons liberados pelo MTA, o predominante é o cálcio (Ca^{2+}), e como este é pouco solúvel nos fluidos biológicos, leva a uma precipitação de hidroxiapatita (Sarkar *et al.*, 2005). A Biodentine™ é composta principalmente por silicato tricálcio e óxido de zircônio, sendo que o silicato tricálcio refinado por aditivos melhorou as propriedades do material. Em comparação com uma mistura contendo 80% de silicato tricálcio e 20% de óxido de zircônio, a Biodentine™ hidratou mais rapidamente e sua microestrutura foi mais

densa, levando a um maior desempenho mecânico em potencial e propriedades de liberação de substâncias reduzidas (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). Quando hidratada, a Biodentine™ produz silicato de cálcio hidratado e libera hidróxido de cálcio, mas este material não estimula a deposição de cristais, o que indica que embora o hidróxido de cálcio seja produzido em grande quantidade, ele não é depositado na superfície do material (Camilleri, 2014). Essa característica provavelmente está relacionada à porosidade do material, uma vez que a Biodentine™ é menos porosa do que outros materiais similares (Camilleri *et al.*, 2014). A baixa porosidade se dá pela adição de um agente redutor de água no líquido de mistura do material (Camilleri *et al.*, 2012). Assim, o fluxo de material é aumentado e menos água é requerida para a funcionalidade do mesmo. A redução da quantidade de água reduz a porosidade do material, a qual não incentiva a deposição e fixação de cristais. A liberação de íons cálcio pela Biodentine™ foi verificada por cromatografia de íons e se mostrou elevada (Camilleri, 2014). Esta concentração de íons cálcio liberada se mostrou maior quando comparada com o MTA branco (Han e Okiji, 2013). A cinética de hidratação dos cimentos à base de silicato tricálcio é diferente de cimentos à base de MTA, pois nos primeiros a taxa de reação é melhorada (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013).

O presente estudo demonstrou que a Biodentine™ é capaz de cumprir satisfatoriamente as funções para qual o MTA é indicado, estimulando marcadores semelhantes, mas de forma mais intensa, além da formação de pontes de tecido mineralizado mais espessas, o que poderia ser vantajoso a longo prazo nos casos de tratamentos endodônticos conservadores, compensando o custo elevado do material. Contudo, estudos adicionais são necessários para que o papel exato de cada proteína apresentada na mineralização seja esclarecido, assim como a função da inflamação na formação de tecido mineralizado induzida pela Biodentine™ e as vias de sinalização que são ativadas para desencadear a mineralização.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho e considerando as limitações inerentes aos modelos experimentais utilizados, podemos concluir que:

- Os materiais testados não afetaram a viabilidade celular, sendo que a Biodentine™ manteve uma viabilidade celular similar àquela mantida pelo MTA.
- Não foi detectada expressão gênica para sialoproteína óssea, sialofosfoproteína dentinária e proteína da matriz dentinária-1 em nenhum dos períodos experimentais. Entretanto, a expressão de osteopontina, de fosfatase alcalina e do fator de transcrição *Runx-2* foi aumentada em relação ao controle no período de 48 horas.
- A presença de pontes de tecido mineralizado após pulpotomia foi maior para o grupo tratado com Biodentine™, com maior espessura das mesmas em comparação ao grupo do MTA.
- A marcação imunoistoquímica nos arredores da ponte de tecido mineralizado para osteopontina e fosfatase alcalina foi maior para o grupo tratado com Biodentine™. A marcação no tecido pulpar para osteopontina também foi maior para o grupo Biodentine™ e essa marcação se estendia ao terço apical da polpa, enquanto a marcação no tecido pulpar para fosfatase alcalina não apresentou diferença entre os materiais. A imunofluorescência para *Runx-2* não apresentou diferença no número de células positivamente marcadas quando Biodentine™ e MTA foram comparados e nem quando ambos foram comparados ao controle.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Atmeh, A. R. et al. Calcium silicate cement-induced remineralisation of totally demineralised dentine in comparison with glass ionomer cement: tetracycline labelling and two-photon fluorescence microscopy. **J Microsc**, v. 257, n. 2, p. 151-60, Feb 2015. ISSN 1365-2818 (Electronic) 0022-2720 (Linking).

Attik, G. N. et al. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA((R)). **Int Endod J**, v. 47, n. 12, p. 1133-41, Dec 2014. ISSN 1365-2591 (Electronic) 0143-2885 (Linking).

Bachoo, I. K.; Seymour, D.; Brunton, P. Clinical case reports using a novel calcium-based cement. In: (Ed.). **Br Dent J**. England, v.214, 2013. p.61-4. ISBN 1476-5373 (Electronic) 0007-0610 (Linking).

Banava, S. et al. Histological Evaluation of Single and Double-visit Direct Pulp Capping with Different Materials on Sound Human Premolars: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Iran Endod J**, v. 10, n. 2, p. 82-8, 2015. ISSN 1735-7497 (Print) 1735-7497.

Beertsen, W.; van den Bos, T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. **J Clin Invest**, v. 89, n. 6, p. 1974-80, Jun 1992. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

Bellows, C. G.; Aubin, J. E.; Heersche, J. N. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. **Bone Miner**, v. 14, n. 1, p. 27-40, Jul 1991. ISSN 0169-6009 (Print) 0169-6009.

Bhat, S. S. et al. Direct pulp capping in an immature incisor using a new bioactive material. In: (Ed.). **Contemp Clin Dent**. India, v.5, 2014. p.393-6. ISBN 0976-237X (Print) 0976-2361 (Linking).

Borkar, S.; de Noronha de Ataíde, I. Management of a Massive Resorptive Lesion with Multiple Perforations in a Molar: Case Report. **J Endod**, Feb 26 2015. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking).

Bortoluzzi, E. A. et al. Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. In: (Ed.). **J Endod**. United States, v.34, 2008. p.172-5. ISBN 0099-2399 (Print) 0099-2399 (Linking).

Camilleri, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. **Int Endod J**, v. 40, n. 6, p. 462-70, Jun 2007. ISSN 0143-2885 (Print) 0143-2885.

_____. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 7, p. 600-610, 07// 2013. ISSN 03005712. Disponível em: < [http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=88796293\(=pt-br&site=ehost-live](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=88796293(=pt-br&site=ehost-live) >.

_____. Hydration characteristics of Biodentine and Theracal used as pulp capping materials. **Dent Mater**, v. 30, n. 7, p. 709-15, Jul 2014. ISSN 0109-5641.

Camilleri, J. et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 5, p. 1437-46, Jun 2014. ISSN 1432-6981.

_____. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. **Int Endod J**, v. 45, n. 8, p. 737-43, Aug 2012. ISSN 0143-2885.

_____. The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dent Mater**, v. 21, n. 4, p. 297-303, Apr 2005. ISSN 0109-5641 (Print) 0109-5641.

Camilleri, J.; Sorrentino, F.; Damidot, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. **Dent Mater**, v. 29, n. 5, p. 580-93, May 2013. ISSN 1879-0097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537569> >.

Camilleri, S.; McDonald, F. Runx2 and dental development. **Eur J Oral Sci**, v. 114, n. 5, p. 361-73, Oct 2006. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836.

Chang, S. W. Chemical characteristics of mineral trioxide aggregate and its hydration reaction. **Restor Dent Endod**, v. 37, n. 4, p. 188-93, Nov 2012. ISSN 2234-7658 (Print) 2234-7658.

Chang, S. W. et al. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. **J Endod**, v. 40, n. 8, p. 1194-200, Aug 2014. ISSN 0099-2399.

Chen, S. et al. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 33, p. 29717-27, Aug 19 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

Cho, E. H. et al. High serum osteopontin levels are associated with low bone mineral density in postmenopausal women. **J Korean Med Sci**, v. 28, n. 10, p. 1496-9, Oct 2013. ISSN 1011-8934.

Cortes, O. et al. Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 7, n. 2, p. 96-9, Jun 2006. ISSN 1818-6300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140535> >.

D'Souza, R. N. et al. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. **Development**, v. 126, n. 13, p. 2911-20, Jul 1999. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991.

da Silva, L. A. et al. Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopathologic evaluation in dogs' teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 1, p. e34-40, Jul 2009. ISSN 1079-2104.

De Rossi, A. et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. **J Endod**, v. 40, n. 9, p. 1362-9, Sep 2014. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking).

Denhardt, D. T. et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J Clin Invest**, v. 107, n. 9, p. 1055-61, May 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

Fisher, S.; Franz-Odenaal, T. Evolution of the bone gene regulatory network. In: (Ed.). **Curr Opin Genet Dev**. England: 2012 Elsevier Ltd, v.22, 2012. p.390-7. ISBN 1879-0380 (Electronic) 0959-437X (Linking).

Gaikwad, J. S.; Cavender, A.; D'Souza, R. N. Identification of tooth-specific downstream targets of Runx2. In: (Ed.). **Gene**. Netherlands, v.279, 2001. p.91-7. ISBN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking).

Giachelli, C. M. et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. **Am J Pathol**, v. 152, n. 2, p. 353-8, Feb 1998. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

Goldberg, M. et al. Dental mineralization. **Int J Dev Biol**, v. 39, n. 1, p. 93-110, Feb 1995. ISSN 0214-6282 (Print) 0214-6282.

Gomes-Filho, J. E. et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. In: (Ed.). **J Endod**. United States, v.34, 2008. p.62-5. ISBN 0099-2399 (Print) 0099-2399 (Linking).

Grimm, G. et al. Changes in osteopontin and in biomarkers of bone turnover during human endotoxemia. **Bone**, v. 47, n. 2, p. 388-91, Aug 2010. ISSN 1873-2763.

Han, L.; Okiji, T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. **Int Endod J**, v. 44, n. 12, p. 1081-7, Dec 2011. ISSN 0143-2885.

_____. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. **Int Endod J**, v. 46, n. 9, p. 808-14, Sep 2013. ISSN 0143-2885.

Hanks, C. T.; Wataha, J. C.; Sun, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent Mater**, v. 12, n. 3, p. 186-93, May 1996. ISSN 0109-5641 (Print) 0109-5641.

Hilton, T. J.; Ferracane, J. L.; Mancl, L. Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. **J Dent Res**, v. 92, n. 7 Suppl, p. 16s-22s, Jul 2013. ISSN 0022-0345.

Holland, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. **Braz Dent J**, v. 12, n. 2, p. 109-13, 2001. ISSN 0103-6440 (Print) 0103-6440.

ISO. **Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry**. Switzerland 2008.

_____. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.** Switzerland 2009.

Jung, S. et al. Human oral cells inverted question mark response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. In: (Ed.). **Head Face Med**, v.10, 2014. p.55. ISBN 1746-160X (Electronic) 1746-160X (Linking).

Khedmat, S. et al. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. **Restor Dent Endod**, v. 39, n. 3, p. 149-54, Aug 2014. ISSN 2234-7658 (Print) 2234-7658.

Komori, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 189-95, Jan 2010. ISSN 0302-766x.

Komori, T. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-64, May 30 1997. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

Koubi, G. et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. **Clin Oral Investig**, v. 17, n. 1, p. 243-9, Jan 2013. ISSN 1432-6981.

Laurent, P.; Camps, J.; About, I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **Int Endod J**, v. 45, n. 5, p. 439-48, May 2012. ISSN 0143-2885.

Lee, S. K. et al. Mechanical stress promotes odontoblastic differentiation via the heme oxygenase-1 pathway in human dental pulp cell line. **Life Sci**, v. 86, n. 3-4, p. 107-14, Jan 16 2010. ISSN 0024-3205.

Luo, Z. et al. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. **J Dent**, v. 42, n. 4, p. 490-7, Apr 2014. ISSN 0300-5712.

Marciano, M. A.; Duarte, M. A.; Camilleri, J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. **Clin Oral Investig**, Apr 30 2015. ISSN 1432-6981.

Miyazaki, T. et al. Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. **Arch Histol Cytol**, v. 71, n. 2, p. 131-46, Sep 2008. ISSN 0914-9465 (Print) 0914-9465.

Mori, G. G. et al. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. **J Endod**, v. 40, n. 9, p. 1485-8, Sep 2014. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking).

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759.

Nakashima, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 3, p. 369-76, Jun 2005. ISSN 1359-6101 (Print) 1359-6101.

Nayak, G.; Hasan, M. F. Biodentine-a novel dentinal substitute for single visit apexification. **Restor Dent Endod**, v. 39, n. 2, p. 120-5, May 2014. ISSN 2234-7658 (Print) 2234-7658 (Linking).

Niranjani, K. et al. Clinical Evaluation of Success of Primary Teeth Pulpotomy Using Mineral Trioxide Aggregate((R)), Laser and Biodentine(TM)- an In Vivo Study. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 4, p. Zc35-7, Apr 2015. ISSN 2249-782X (Print) 0973-709x.

Nowicka, A. et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 39, n. 6, p. 743-7, Jun 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683272> >.

_____. Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH), MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. **J Endod**, May 29 2015. ISSN 0099-2399.

Okiji, T.; Yoshiba, K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. **Int J Dent**, v. 2009, p. 464280, 2009. ISSN 1687-8728.

Olatosi, O. O.; Sote, E. O.; Orenuga, O. O. Effect of mineral trioxide aggregate and formocresol pulpotomy on vital primary teeth: a clinical and radiographic study. **Niger J Clin Pract**, v. 18, n. 2, p. 292-6, Mar-Apr 2015. ISSN 1119-3077 (Print).

Oliveira, T. M. et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 14, n. 2, p. 65-71, Apr 2013. ISSN 1818-6300 (Print) 1818-6300.

Paula-Silva, F. W. et al. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. **J Dent Res**, v. 88, n. 4, p. 339-44, Apr 2009. ISSN 0022-0345.

Pawar, A. M.; Kokate, S. R.; Shah, R. A. Management of a large periapical lesion using Biodentine() as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. In: (Ed.). **J Conserv Dent**. India, v.16, 2013. p.573-5. ISBN 0972-0707 (Print) 0972-0707 (Linking).

Peng, W. et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **J Endod**, v. 37, n. 9, p. 1240-6, Sep 2011. ISSN 0099-2399.

Perard, M. et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. **J Mater Sci Mater Med**, v. 24, n. 6, p. 1527-34, Jun 2013. ISSN 1573-4838 (Electronic) 0957-4530 (Linking).

Pitt Ford, T. R. Pulpal response to a calcium hydroxide material for capping exposures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 59, n. 2, p. 194-7, Feb 1985. ISSN 0030-4220 (Print) 0030-4220.

Poggio, C. et al. Biocompatibility of a new pulp capping cement. **Ann Stomatol (Roma)**, v. 5, n. 2, p. 69-76, Apr 2014. ISSN 1824-0852 (Print) 1824-0852 (Linking).

Qin, C.; D'Souza, R.; Feng, J. Q. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. **J Dent Res**, v. 86, n. 12, p. 1134-41, Dec 2007. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

Queiroz, A. M. et al. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 2, p. 126-30, Jun 2005. ISSN 1678-7757 (Print) 1678-7757 (Linking).

Reinholt, F. P. et al. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 12, p. 4473-5, Jun 1990. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

Reyes-Carmona, J. F.; Felipe, M. S.; Felipe, W. T. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 731-6, May 2009. ISSN 0099-2399.

Reyes-Carmona, J. F. et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. **J Endod**, v. 36, n. 8, p. 1347-53, Aug 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647094> >.

Rittling, S. R. et al. Protective role of osteopontin in endodontic infection. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 105-14, Jan 2010. ISSN 0019-2805.

Rowe, A. H. Problems of intra-canal testing of endodontic materials. **Int Endod J**, v. 13, n. 2, p. 96-103, May 1980. ISSN 0143-2885 (Print) 0143-2885.

Salles, L. P. et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. **J Endod**, v. 38, n. 7, p. 971-6, Jul 2012. ISSN 0099-2399.

Sarkar, N. K. et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 31, n. 2, p. 97-100, Feb 2005. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399.

Scatena, M.; Liaw, L.; Giachelli, C. M. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 11, p. 2302-9, Nov 2007. ISSN 1079-5642.

Schouten, C. et al. The effect of alkaline phosphatase coated onto titanium alloys on bone responses in rats. **Biomaterials**, v. 30, n. 32, p. 6407-17, Nov 2009. ISSN 0142-9612.

Setbon, H. M. et al. Influence of composition on setting kinetics of new injectable and/or fast setting tricalcium silicate cements. **Dent Mater**, v. 30, n. 12, p. 1291-303, Dec 2014. ISSN 0109-5641.

Shayegan, A. et al. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. **Pediatr Dent**, v. 34, n. 7, p. e202-8, Nov-Dec 2012. ISSN 1942-5473 (Electronic) 0164-1263 (Linking).

Silva, E. J. et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. **Int Endod J**, v. 45, n. 1, p. 49-56, Jan 2012. ISSN 0143-2885.

Silva, E. J.; Santos, C. C.; Zaia, A. A. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 1, p. 43-7, Jan-Feb 2013. ISSN 1678-7757.

Silva, E. J. et al. Cytotocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. **Int Endod J**, Jun 22 2015. ISSN 0143-2885.

Sinha, N.; Singh, B.; Patil, S. Cone beam-computed topographic evaluation of a central incisor with an open apex and a failed root canal treatment using one-step apexification with Biodentine: A case report. In: (Ed.). **J Conserv Dent**. India, v.17, 2014. p.285-9. ISBN 0972-0707 (Print) 0972-0707 (Linking).

Spoto, G. et al. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. **J Endod**, v. 27, n. 3, p. 180-2, Mar 2001. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399.

Sugawara, Y. et al. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. **Jpn J Pharmacol**, v. 88, n. 3, p. 262-9, Mar 2002. ISSN 0021-5198 (Print) 0021-5198.

Tabarsi, B. et al. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. In: (Ed.). **Int Endod J**. England, v.43, 2010. p.565-71. ISBN 1365-2591 (Electronic) 0143-2885 (Linking).

Tanomaru-Filho, M. et al. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. In: (Ed.). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. United States, v.102, 2006. p.127-32. ISBN 1528-395X (Electronic) 1079-2104 (Linking).

Torabinejad, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v. 21, n. 7, p. 349-53, Jul 1995. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399.

Tran, X. V. et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. In: (Ed.). **J Dent Res**. United States, v.91, 2012. p.1166-71. ISBN 1544-0591 (Electronic) 0022-0345 (Linking).

Tziafa, C. et al. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 1967-71, Dec 2014. ISSN 0099-2399.

Tziafas, D. et al. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. In: (Ed.). **Int Endod J**. England, v.35, 2002. p.245-54. ISBN 0143-2885 (Print) 0143-2885 (Linking).

Uede, T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. **Pathol Int**, v. 61, n. 5, p. 265-80, May 2011. ISSN 1320-5463.

Villat, C. et al. Conservative approach of a symptomatic carious immature permanent tooth using a tricalcium silicate cement (Biodentine): a case report. **Restor Dent Endod**, v. 38, n. 4, p. 258-62, Nov 2013. ISSN 2234-7658 (Print) 2234-7658 (Linking).

Wang, X.; Chang, J.; Hu, S. A study on the sealing ability and antibacterial activity of Ca₃SiO₅/CaCl₂ composite cement for dental applications. **Dent Mater J**, v. 31, n. 4, p. 617-22, 2012. ISSN 0287-4547.

Wang, X.; Sun, H.; Chang, J. Characterization of Ca₃SiO₅/CaCl₂ composite cement for dental application. **Dent Mater**, v. 24, n. 1, p. 74-82, Jan 2008. ISSN 0109-5641 (Print) 0109-5641.

Wang, Y. et al. Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF-kappaB pathway. **Oral Dis**, v. 20, n. 7, p. 650-8, Oct 2014. ISSN 1354-523x.

Wataha, J. C. Predicting clinical biological responses to dental materials. **Dent Mater**, v. 28, n. 1, p. 23-40, Jan 2012. ISSN 0109-5641.

Yamashiro, T. et al. Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. **Mech Dev**, v. 119 Suppl 1, p. S107-10, Dec 2002. ISSN 0925-4773 (Print) 0925-4773.

Yang, F. et al. A feedback loop between RUNX2 and the E3 ligase SMURF1 in regulation of differentiation of human dental pulp stem cells. **J Endod**, v. 40, n. 10, p. 1579-86, Oct 2014. ISSN 0099-2399.

Yoshino, P. et al. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex(R) and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. **Braz Dent J**, v. 24, n. 2, p. 111-6, 2013. ISSN 0103-6440.

Zanini, M. et al. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1220-6, Sep 2012. ISSN 0099-2399.

Zarrabi, M. H. et al. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. **J Endod**, v. 36, n. 11, p. 1778-81, Nov 2010. ISSN 0099-2399.

Zhao, X. et al. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 1, p. 215-20, Jan 2012. ISSN 0301-4851.

Zhou, H. M. et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. **J Endod**, v. 39, n. 4, p. 478-83, Apr 2013. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking).

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2013.1.643.58.5 sobre a pesquisa intitulada **“Resposta Pulpar e Periapical de dentes de cães após pulpotomia e utilização de Biodentine – Estudo Radiográfico e Histopatológico”**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 26/06/2013 (totalizando 3 animais).

We certify that the protocol nº 2013.1.643.58.5 about the research entitled **“Pulpal and Periapical response of dog’s teeth after pulpotomy and use of Biodentine – Histopathologic and Radiografic Study”**, under responsibility of Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Ethical Comission for Animals Use of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil was approved in 26/06/2013 (totalizing 3 animals).

Ribeirão Preto, 26 de junho de 2013

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Vice-Coordenador da CEUA – FORP/USP

ANEXO B

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Citotoxicidade e Expressão de Marcadores da Mineralização em Células da Polpa Dental Estimuladas pelo Biodentine e pelo MTA

Pesquisador: Mariana de Oliveira Daltoé

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25315013.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 514.514

Data da Relatoria: 17/12/2013

Apresentação do Projeto:

A Biodentine (Septodont, Saint-Maur, France) foi introduzida no mercado especializado e é uma evolução dos materiais existentes e um substituto dentinário bioativo. Assim como o MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA), sua importância está nas suas propriedades reparadoras. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FORP-USP, células da polpa de dentes permanentes extraídos por razões ortodônticas serão isoladas e cultivadas. As células serão expostas a diferentes concentrações dos materiais Biodentine e MTA pelo método de contato direto. A viabilidade celular será avaliada pelo teste MTT (Ensaio Colorimétrico MTT). Será avaliada a atividade da fosfatase alcalina por meio da mensuração de timolftaleína a partir de timolftaleína monofosfato usando um kit comercial. Será realizado RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção de RNAm para osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), sialofosfoproteína dentinária (DSPP), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1) e fosfatase alcalina (ALP) em tempo real. Além disso, será verificada a formação de nódulos de mineralização pela evidênciação com a solução von Kossa de nitrato de prata a 5% e exposição a luz brilhante. Os dados numéricos serão analisados estatisticamente de acordo com a sua natureza e distribuição.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 514.514

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho será avaliar a viabilidade de células expostas ao Biodentine e ao MTA, a expressão de genes relacionados à mineralização (OPN, BSP, DSPP, ALP e DMP-1) induzida por esses materiais, assim como a formação de nódulos de mineralização e a atividade da fosfatase alcalina (ALP), por células da polpa dental extraídas de dentes de humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos (a pesquisa será realizada com dentes doados pelo Banco de Dentes da FORP/USP).

Benefícios:

Os resultados permitirão avaliar se um dos materiais envolvidos apresenta um melhor desempenho clínico de estímulo das células da polpa dental para mineralização.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa laboratorial visando obtenção de resultados que sugiram desempenho clínico melhorado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Termo de Assentimento do Banco de Dentes, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Declaração do Banco de Dentes sobre a disponibilidade dos dentes a serem utilizados na pesquisa.

Considerações: Sendo os dentes cedidos pelo Banco de dentes da FORP ao pesquisador responsável, o termo de apresentação obrigatória é a Declaração do Banco de Dentes.

Recomendações:

O pesquisador responsável não deverá aplicar o TCLE (assinado pelos pesquisadores) nem o Termo de Assentimento, uma vez que não estão redigidos adequadamente. Não é necessária a correção desses documentos, uma vez que o único documento que deverá ser, de fato, aplicado é o TCLE do Biobanco de Dentes Humanos da FORP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção 'Enviar Notificação' (descrita no Manual 'Submeter Notificação', disponível na Central de Suporte - canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 514.514

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 156ª R.O. do CEP.

RIBEIRAO PRETO, 23 de Janeiro de 2014

Assinador por:
JOSÉ TARCÍSIO LIMA FERREIRA
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br