UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LARISSA MOREIRA SPINOLA DE CASTRO RAUCCI

**EFEITOS DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE CIMENTO DE ALUMINATO DE
CÁLCIO SOBRE CULTURAS DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS E DE CÉLULAS
INDIFERENCIADAS DA POLPA DENTAL**

Versão corrigida

RIBEIRÃO PRETO

2013

LARISSA MOREIRA SPINOLA DE CASTRO RAUCCI

**EFEITOS DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE CIMENTO DE ALUMINATO DE
CÁLCIO SOBRE CULTURAS DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS E DE CÉLULAS
INDIFERENCIADAS DA POLPA DENTAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO

2013

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Castro-Raucci, Larissa Moreira Spinola de

Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental. Ribeirão Preto, 2013.

160 p : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco.

1. Cimento de aluminato de cálcio. 2. Cultura de células.
3. Osteoblastos. 4. Células indiferenciadas da polpa.
5. Radiopacificadores. 6. Cloreto de cálcio

FOLHA DE APROVAÇÃO

Castro-Raucci LMS. **Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Odontopediatria.

Data da aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

LARISSA MOREIRA SPINOLA DE CASTRO RAUCCI

NASCIMENTO

17 de agosto de 1984, em Ribeirão Preto, SP

FILIAÇÃO

Eduardo Augusto Spinola de Castro
Maria da Glória Moreira de Castro

2003-2006

Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Iniciações Científicas:

“Osteogênese *in vitro* sobre titânio: efeito da associação de micro e nanotopografia”, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, com bolsa FAPESP (Processo 2004/13504-8).

“Osteogênese *in vitro* sobre nanotopografia de titânio: adesão, proliferação celular e expressão das proteínas matricelulares sialoproteína óssea e osteopontina”, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, com bolsa FAPESP (Processo 2006/50951-8).

2007-2009

Mestrado em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Programa de Pós Graduação em Biologia Oral.

Dissertação: “Osteogênese *in vitro* sobre vitrocerâmica 100% cristalina e altamente bioativa (Biosilicato®): efeitos do condicionamento de superfície e dos produtos de dissolução iônica”, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, com bolsa FAPESP (Processo 2006/58798-4).

2009-2013

Doutorado em Ciências

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Programa de Pós Graduação em Odontopediatria.

Tese: “Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental”, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, com bolsa FAPESP (Processo 2009/53310-1).

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, e no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2009/53310-1 e 2010/50936-4.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho e colocar em minha vida pessoas maravilhosas e generosas, que me auxiliam a vencer os obstáculos com mais facilidade e determinação.

Ao meu marido, Walter Raucci Neto, por demonstrar seu amor até nas pequenas atitudes, pela paciência e conselhos nos momentos difíceis, pelo companheirismo, carinho e amizade no convívio diário, por seus esforços e dedicação a nossa família. Te amo!

Aos meus pais, Eduardo Augusto Spinola de Castro e Maria da Glória Moreira de Castro, por serem meus grandes mestres na vida, pelo amor e incentivo; por seus sacrifícios para proporcionar sempre o melhor a seus filhos.

Aos meus irmãos, Alessandra, Fabio e Rafaela; aos cunhados Leandro, Thaís e Paulo Vitor, e aos sobrinhos Marina, Beatriz, Miguel e Caio. Pelo companheirismo, palavras de incentivo, amizade e bons momentos compartilhados.

Aos meus avós Pedro (*in memoriam*), Diva e Eduarda, e às tias Sônia, Yvette (*in memoriam*) e Doly (*in memoriam*), por seus exemplos de dedicação e caráter, pela troca de experiências e por todo carinho.

Aos familiares e amigos pelo incentivo para o cumprimento desta etapa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, por todas as oportunidades que me foram proporcionadas durante esses 10 anos de convivência e aprendizado, por ter acreditado sempre em minha capacidade, pela amizade, palavras de incentivo e pelas críticas, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Muito Obrigada!

Ao amigo Lucas Novaes Teixeira, por todos esses anos de amizade sincera, pelos conselhos, risadas, paciência e solidariedade nos momentos difíceis, e por ser exemplo de competência, humildade e generosidade. Muito obrigada!

Ao amigo Roger Rodrigo Fernandes, por sua dedicação aos alunos do Laboratório de Cultura de Células, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e amizade desde o período de iniciação científica. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e também aos Profs. (as): Dr. Paulo Nelson Filho, Dra. Maria Cristina Borsatto, Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Dra. Aldevina Campos de Freitas, Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Dra. Andiará De Rossi, Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Dra. Sada Assed, Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Dr. Adílson Thomazinho, Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva e Dr. Fábio Lourenço Romano. Agradeço por todos os ensinamentos e troca de experiências.

Ao Chefe do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. José Moacir Marin.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, pela amizade e por sua iniciativa e empenho em desenvolver os Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia

Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, em que este trabalho foi desenvolvido.

À Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato-Prado, pela amizade, ensinamentos e pelas importantes contribuições científicas com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pela amizade, solicitude, troca de experiências e por seu exemplo de dedicação à pesquisa.

À Fabíola Singaretti de Oliveira, pela amizade, ensinamentos e contribuições com o desenvolvimento deste trabalho.

À aluna de iniciação científica Gabriela Cerminaro Rodrigues, pela amizade e auxílio.

Ao Dr. Marcos Jacobovitz e à Profa. Ivone Regina de Oliveira, pelo preparo do material utilizado neste estudo e pela solicitude no esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células: Larissa Sverzut Bellesini, Alexander Tadeu Sverzut, Daniela Thomazatti Chimello de Sousa, Maily Rehder Wimmers Ferreira, Olívia Cherubin Alves, Emanuela Prado Ferraz, Patrícia Leite de Godoi Adachi Ricardo, Fernanda Grilo de Azevedo, Gabriela Caroline Alonso, Renan de Barros e Lima Bueno, William Marcatti Amarú Maximiano, Rodrigo Paolo Flores Abuna, Rogério Bentes Kato, Gileade Pereira Freitas, Thiago de Santana Santos, Helena Bacha Lopes, Thiago Pompermaier Garlet, Luciana Prado Maia, Luciana

Bastos Alves, Saida Mayela García Montes, Gabriel Bueno Junqueira, Carolina Scanavez Martins, Carolina de Moraes Rego Mandetta, Mayara Sgarbi Semeghini, Adriel Henrique Peixoto da Silva Geraldo, pelos bons momentos compartilhados e por fazerem do Laboratório um excelente ambiente de trabalho.

Aos funcionários Milla Tavares, Adriana da Silva e Sebastião Bianco, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, e aos ex-funcionários Samuel Santoro e Christopher Oliveira, do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, pela amizade e pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação: Cesar Penazzo Lepri, Camila Scatena, Cíntia Guimarães de Almeida, Daniel Galafassi, Danielle Torres Azevedo, Luciane Almeida do Carmo, Marcela Martin Del Campo Fierro, Paula Dariana Fernandes Ferreira, Rodrigo Alexandre Valério, Talitha de Siqueira Mellara, Elaine Machado Pinguero, Fernanda Regina Ribeiro Santos, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Iliana Ferraz Sabbatini, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Ligia Maria Napolitano Gonçalves, Carolina Paes Torres Mantovani, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Cristiane Tomaz Rocha, Fabrício Kitazono de Carvalho, Jaciara Miranda Gomes da Silva, Maristela Soares Swerts Pereira, Regina Aparecida Segatto Saiani, Rodrigo Teixeira Macri, Soraya Cheier Dib Gonçalves, Cristina Bueno Brandão, Kleber Cortês Bonifacio, Leonardo Bísaro Pereira, Marcela C. D. Andrucio, Marília Pacífico Lucisano, Marina Fernandes de Sena, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Maya Fernanda Manfrin Arnez e Milena Silva Campos, pela amizade e apoio para o cumprimento desta etapa.

À Clélia Aparecida Celino, secretária do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Lelli Placciti e aos demais funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que contribuíram para realização dos ensaios de quantificação iônica.

À Fabiana Rossetto de Moraes, funcionária da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo auxílio prestado nas leituras em citômetro de fluxo para os ensaios de apoptose.

Às Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato-Prado e à Dra. Larissa Sverzut Bellesini, membros da banca do meu exame de qualificação de doutorado.

Aos Profs. Drs. Paulo Cerri e Oscar Peitl Filho, membros da banca de minha defesa de dissertação de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao trabalho e pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Castro-Raucci LMS. **Efeitos de diferentes preparações de cimento de aluminato de cálcio sobre culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2013. 160p.

O agregado de trióxido mineral (MTA) tem-se demonstrado aplicável em diversas situações que exigem reparação dos tecidos dentais e periapicais. Contudo, desvantagens relacionadas ao seu elevado custo, propriedades físico-químicas e dificuldade de manuseio têm limitado sua utilização. Neste sentido, um novo cimento de aluminato de cálcio e aditivos (CAC+) foi desenvolvido para superar algumas características negativas do MTA, mantendo, no entanto, suas propriedades satisfatórias. O objetivo deste estudo foi avaliar a progressão de culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental (linhagem OD-21) expostas ao CAC+, utilizando MTA como controle, ou a preparações alternativas do CAC+, com maior conteúdo de cloreto de cálcio (CaCl_2) e/ou com substituição do óxido de zinco por óxido de bismuto como radiopacificador. Para isso, células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos ou células da linhagem OD-21 foram crescidas sobre Thermanox® por 24 h e expostas, por períodos de até 14 dias, a amostras dos diferentes materiais, posicionadas sobre Transwell®. Em células osteogênicas, apesar de a proximidade com as amostras de CAC+ e MTA inibir o crescimento celular, nas áreas periféricas das lamínulas, foram observados proliferação, viabilidade celular e expressão de marcadores-chave da diferenciação osteoblástica, que precederam a mineralização da matriz extracelular. Culturas expostas ao CAC+, comparativamente ao MTA, exibiram aumentos na viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina e na expressão de

marcadores de diferenciação, o que não se repetiu para células OD-21. Além disso, demonstrou-se que os efeitos destes cimentos sobre a osteogênese *in vitro* variaram de acordo com o período de exposição das culturas, sendo mais favoráveis durante sua fase proliferativa. Entre as preparações de CAC+, verificou-se que o aumento no teor de CaCl_2 promoveu maior disponibilização de Ca^{2+} no meio de cultura, o que correspondeu a maior diferenciação celular e formação de matriz mineralizada em culturas de células osteogênicas e OD-21, e à redução de efeitos negativos da adição de óxido de bismuto sobre osteoblastos. Conclui-se que o CAC+ favorece o desenvolvimento do fenótipo osteogênico, atuando principalmente em células em estágios iniciais de diferenciação e que a adição de CaCl_2 , independentemente do agente radiopacificador, potencializa os efeitos benéficos sobre células osteogênicas e favorece o desenvolvimento e diferenciação de células indiferenciadas derivadas do tecido pulpar, podendo ser considerado como material alternativo ao MTA.

Palavras chave: cimentos endodônticos, cimento de aluminato de cálcio, agregado trióxido mineral, cultura de células, osteoblastos, células indiferenciadas da polpa, cloreto de cálcio, radiopacificadores.

ABSTRACT

ABSTRACT

Castro-Raucci LMS. **Effects of different preparations of calcium aluminate cement on osteogenic cells and dental pulp-derived undifferentiated cells** [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2013. 160p.

Mineral trioxide aggregate (MTA) has been successfully applied in endodontic procedures in which dental and periapical tissue repair are required. However, some drawbacks of MTA as high cost, physicochemical properties and difficulty in handling have limited its use. In this context, a novel calcium aluminate cement plus additives (CAC+) has been developed to overcome some negative features of MTA. The aim of this study was to evaluate the progression of either osteogenic cell cultures or undifferentiated dental pulp-derived ones (OD-21 cell line) exposed to CAC+ or to alternative formulations of CAC+ with a higher content of calcium chloride (CaCl_2) and/or replacement of zinc oxide by bismuth oxide as radiopacifier agent. Rat calvaria-derived cells or OD-21 cells were grown on Thermanox® coverslips for 24 h and exposed to samples of CAC+ or MTA (control) placed on Transwell® for periods of up to 14 days. In osteogenic cell cultures, the proximity to MTA or CAC+ samples inhibited cell growth, whereas at distance it was observed cell proliferation, cell viability and expression of differentiation markers prior to mineralization of the extracellular matrix. Comparatively to MTA, osteogenic cell cultures exposed to CAC+ exhibited higher cell viability, alkaline phosphatase activity and expression of key osteoblast markers, contrary to what was observed for OD-21 cells. Furthermore, it was demonstrated that the effects of these cements on *in vitro* osteogenesis varied according to the timing of exposure, with a more favorable impact during the proliferative phase of cultures. Among the diverse formulations of CAC+, it was found that the increase in the CaCl_2 content promoted

greater availability of Ca^{2+} in the culture medium, which corresponded to higher cell differentiation and mineralized matrix formation in osteoblastic cell cultures and OD-21 cells, while reducing the negative effects of bismuth oxide on osteoblasts. In conclusion, CAC+ supported the acquisition of the osteogenic cell phenotype, mostly for cells in early stages of differentiation. Additionally, the increase in the CaCl_2 content, regardless of the radiopacifier agent, potentiates the beneficial effects on osteogenic cells and promotes the growth and differentiation of OD-21 cells, rendering CAC+ a potential alternative material to replace MTA in endodontic procedures.

Key-words: endodontic materials, calcium aluminate cement, mineral trioxide aggregate, cell culture, osteoblast, undifferentiated pulp cells, calcium chloride, radiopacifiers.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração (em ppm) dos elementos cálcio (A), alumínio (B) e fósforo (C) nos meios de cultura Controle e expostos, por 48 h, a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....68

Figura 2. Apoptose celular em culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a amostras de MTA ou CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....69

Figura 3. Epifluorescência em 1 (A-C), 3 (D-F) e 7 dias (G-I) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] (A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Citoesqueleto de actina marcado em verde e, em azul, núcleos celulares. Asteriscos em H e I indicam área destituída de células, localizada no centro da lamínula e correspondente com região de maior proximidade com as amostras dos cimentos. Barra de escala = 50 μ m (A-C), 100 μ m (D-F) e 200 μ m (G-I).....70

Figura 4. Viabilidade celular em 1, 3 e 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....71

Figura 5. Índice de proliferação celular aos 3 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....71

Figura 6. Número total de células aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....72

Figura 7. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D), OPN (D) e OC (E) aos 4, 7, 10 e 12 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....73

Figura 8. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.....74

Figura 9. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas ao MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....74

Figura 10. Atividade de ALP em 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....75

Figura 11. Epifluorescência aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (Controle; A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de FN (A-C) ou BSP (D-F). Imunomarcação para OPN em fluorescência verde (G-I).

Citoesqueleto de actina marcado em cinza (D-F) e núcleos celulares em fluorescência azul (A-I). Barra de escala = 100 μ m.....76

Figura 12. Epifluorescência em 10 (A-F) e 14 dias (G-I) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] (Controle; A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP (A-C) ou marcação por ARS (G-I). Em verde, OPN (D-F) ou BSP (G-I). Núcleos celulares em azul. Barra de escala = 200 μ m.....77

Figura 13. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.....78

Figura 14. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....78

Figura 15. Apoptose celular aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....80

Figura 16. Viabilidade celular aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....81

Figura 17. Número total de células aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....81

Figura 18. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2, OSX, ALP, BSP, OPN e OC aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....82

Figura 19. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B e D) ou CAC+ (C e E) em diferentes períodos da cultura. Barra de escala = 3 mm.....83

Figura 20. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....83

Figura 21. Atividade de ALP aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....84

Figura 22. Epifluorescência aos 10 (A, C, E, G, I) e 14 dias (B, D, F, H, J) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A-B) e expostas a amostras

de MTA (C, D, G, H) ou CAC+ (E, F, I, J) pelo período de 2-5 dias (C-F) ou de 7-10 dias (G-J). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP (A, C, E, G, I) ou marcação para ARS (B, D, F, H, J). Fluorescência verde indica imunolocalização de BSP (B, D, F, H, J). A cor amarela indica sobreposição de BSP com ARS. Núcleos celulares em azul. Barra de escala = 400 μ m (A, C, E, G, I) ou 200 μ m (B, D, F, H, J).....85

Figura 23. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos (B-E). Barra de escala = 3 mm.....86

Figura 24. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....86

Figura 25. Concentração (em ppm) dos elementos cálcio (A), alumínio (B) e fósforo (C) presente no meio de cultura Controle e exposto, por 48 h, a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....88

Figura 26. Apoptose celular em culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....89

Figura 27. Epifluorescência em 1 (A-E), 3 (F-J) e 7 dias (K-O) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A, F, K) e expostas a amostras de CAC+

(B, G, L), CAC+Ca (C, H, M), CA+Bi (D, I, N) ou CAC+CaBi (E, J, O). Fluorescência verde indica marcação para o citoesqueleto de actina e, azul, núcleos celulares. Barra de escala = 100 μm (A-D), 200 μm (F-J) e 800 μm (K-O).....90

Figura 28. Viabilidade celular em 1, 3 e 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores em média $\pm$ desvio padrão.....91

Figura 29. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.....91

Figura 30. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....92

Figura 31. Atividade de ALP aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....92

Figura 32. Expressão relativa de RNAm para Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D), OPN (E) e OC (F) aos 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....93

Figura 33. Epifluorescência aos 7 (A, D, G, J, M), 10 (B, E, H, K, N) e 14 dias (C, F, I, L, O) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A-C) e expostas a preparações de CAC+ (D-O). Fluorescência verde indica BSP em 7 e 14 dias, vermelha, OPN em 10 dias ou ARS em 14 dias, e azul, núcleos celulares. Barra de escala = 200 µm.....94

Figura 34. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.....95

Figura 35. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre lamínulas de Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....95

Figura 36. Apoptose celular em culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....97

Figura 37. Epifluorescência em 1 (A-C), 3 (D-F), 7 (G-I), 10 (J-L) e 14 dias (M-O) de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A, D, G, J, M) e expostas a MTA (B, E, H, K, N) ou CAC+ (C, F, I, L, O). Fluorescência verde para actina (A-L) ou BSP (M-O), vermelha para ARS (M-O) e azul para núcleos celulares. Barra de escala = 50 µm (A-C), 100 µm (D-F), 800 µm (G-I) ou 400 (J-O).....98

Figura 38. Viabilidade celular em 1, 3, 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....99

Figura 39. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D) e DMP-1 (E) aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....100

Figura 40. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.....101

Figura 41. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....101

Figura 42. Atividade de ALP aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....102

Figura 43. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.....102

Figura 44. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....103

Figura 45. Apoptose celular em culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....105

Figura 46. Epifluorescência em 1 (A-E), 3 (F-J), 7 (K-O) e 14 dias (P-T) de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A, F, K, P) e expostas a CAC+ (B, G, L, Q), CAC+Ca (C, H, M, R), CA+Bi (D, I, N, S) ou CAC+CaBi (E, J, O, T). Fluorescência verde para actina (A-O) ou BSP (P-T) e azul para núcleos celulares. Barra de escala = 100 μ m (A-E), 800 μ m (F-O) ou 400 μ m (P-T).....107

Figura 47. Viabilidade celular em 1, 3, 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....108

Figura 48. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.....108

Figura 49. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....109

Figura 50. Atividade de ALP em 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....109

Figura 51. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D) e DMP-1 (E) aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....111

Figura 52. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.....112

Figura 53. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....112

Figura 54. Ensaio de integridade de RNAr extraído aos 4, 7, 10 e 12 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+.....150

Figura 55. Ensaio de integridade de RNAr extraído aos 10 dias, de culturas de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos, crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura.....151

Figura 56. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+.....151

Figura 57. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+.....152

Figura 58. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+.....152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparações múltiplas entre as amostras, pós-teste de Student-Newman-Keuls (para os parâmetros apoptose celular, índice de proliferação, número total de células e atividade de ALP in situ) ou Hölm-Sidak (para os parâmetros viabilidade celular, atividade de ALP e mineralização).....	79
Tabela 2. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	79
Tabela 3. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	87
Tabela 4. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	87
Tabela 5. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	96
Tabela 6. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	96
Tabela 7. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newmn-Keuls.....	103

Tabela 8. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newmn-Keuls.....	104
---	-----

Tabela 9. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	113
--	-----

Tabela 10. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.....	113
---	-----

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxii
LISTA DE TABELAS	xxxiv
1 INTRODUÇÃO	41
2 PROPOSIÇÃO	48
2.1 Objetivo Geral.....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Preparação das amostras de CAC+ e MTA.....	51
3.1.1 Experimento 1	51
3.1.2 Experimento 2	52
3.1.3 Experimento 3	52
3.1.4 Experimento 4	53
3.1.5 Experimento 5	53
3.2 Obtenção das culturas celulares.....	54
3.2.1 Isolamento das células e cultura primária de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos.....	54
3.2.2 Cultura de células da linhagem OD-21.....	55
3.3 Análise da dissolução dos elementos cálcio, alumínio e fósforo	56

3.4 Ensaios para avaliação do crescimento e diferenciação celulares	56
3.4.1 Morfologia celular	56
3.4.2 Ensaio para detecção de células em apoptose	57
3.4.3 Determinação da viabilidade celular, do índice de proliferação e do número total de células	57
3.4.4 Imunolocalização de proteínas da matriz extracelular.....	59
3.4.5 Análise da diferenciação celular por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR)	60
3.4.6 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	63
3.4.7 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	64
3.5 Análise estatística	65
4 RESULTADOS.....	66
4.1 Culturas primárias osteogênicas derivadas de calvária de ratos	67
4.1.1 Experimento 1	67
4.1.2 Experimento 2	80
4.1.3 Experimento 3	88
4.2 Cultura de células indiferenciadas da polpa dental de camundongos	97
4.2.1 Experimento 4	97
4.2.2 Experimento 5	105
5 DISCUSSÃO	114
6 CONCLUSÃO	125
7 REFERÊNCIAS.....	127

8 APÊNDICE.....	149
8.1 Integridade do RNA	150
8.1.1 Experimento 1	150
8.1.2 Experimento 2	151
8.1.3 Experimento 3	151
8.1.4 Experimento 4	152
8.1.5 Experimento 5	152
8.2 Estudo preliminar da resposta de culturas osteogênicas ao cimento CAC+..	153
9 ANEXO.....	159
9.1 Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA)	160

1 INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica consiste em um conjunto de procedimentos, conservadores ou radicais, que visa a eliminar processos inflamatórios e/ou infecciosos e favorecer o reparo das estruturas teciduais, promovendo a manutenção do dente em seu processo alveolar, sua função e estética (Assed, 2005; Grotra, Subbarao, 2012). Os cimentos endodônticos utilizados para este fim devem apresentar características físico-químicas adequadas, como capacidade de selamento, radiopacidade, baixa solubilidade no meio bucal, resistência mecânica, fácil manuseio e boa adaptação às paredes da cavidade (Gartner, Dorn, 1992; Asgary et al., 2008; Parirokh; Torabinejad, 2010). Além dessas características, é desejável que estes materiais exibam atividade antibacteriana, bom custo-benefício, não sejam tóxicos e favoreçam o reparo quando colocados em contato com os tecidos dentais e periapicais (Menezes et al., 2004; Unal et al., 2010; Nakayama et al., 2005; Perinpanayagam, 2009). Apesar da evolução técnico-científica alcançada nessa área, ainda não se tem um material que preencha todos estes requisitos (Gandolfi et al., 2008), fazendo com que muitas pesquisas sejam direcionadas para o desenvolvimento e ou aprimoramento de materiais, com o intuito de se atingirem melhores resultados terapêuticos.

Entre os materiais utilizados atualmente, destaca-se o agregado de trióxido mineral (MTA), um pó constituído de partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato, que mais tarde foi demonstrado exibir a mesma composição do cimento Portland, acrescida de óxido de bismuto para lhe conferir radiopacidade (Camilleri, 2008; Viola et al., 2011). Quando hidratado, este pó resulta em um gel coloidal que se solidifica em

aproximadamente 3 h (Schwartz et al., 1999). O MTA foi desenvolvido no início da década de 90, com o intuito de selar as comunicações entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente (Torabinejad, Chivian, 1999; Moretti, 2008). Contudo, sua coloração acinzentada limitava sua aplicação em regiões em que poderia ocorrer comprometimento estético (Glickman, Koch, 2000). Assim, foi introduzido o MTA branco, de composição semelhante ao MTA original, porém com menores concentrações de ferro, magnésio e alumínio (Asgary et al., 2005; Parirokh, Torabinejad, 2010). Resultados de estudos comparativos de biocompatibilidade entre MTA cinza e branco são controvertidos (revisado por Torabinejad, Parirokh, 2010).

O desenvolvimento do MTA branco permitiu a ampliação de suas aplicações, sendo que, atualmente, o MTA é utilizado com sucesso em diversas situações na Endodontia, como capeamento pulpar direto (Assed, 2005; Paranjpe et al., 2011; Obeid et al., 2013), pulpotomia (Menezes et al., 2004; Subay et al., 2013), perfurações radiculares (Unal et al., 2010), preenchimento de áreas com reabsorção interna e externa (Schwartz et al., 1999), tampão em dentes com rizogênese incompleta (Torabinejad, Chivian, 1999; Simon et al., 2007), fraturas radiculares (Belobrov et al., 2008) e técnicas de regeneração endodôntica (Garcia-Godoy, Murray, 2012; Nosrat et al., 2012). Além disso, vem sendo testado como material para potencial aplicação no tecido ósseo (White, Bryant, 2002; Saidon et al., 2003; Do Nascimento et al., 2008; Higueta-Castro et al., 2012).

Os efeitos do MTA sobre as respostas celular e tecidual estão bem estabelecidos na literatura, com diversos estudos *in vitro* e *in vivo* ratificando sua biocompatibilidade (Koh et al., 1997; Koh et al., 1998; Mitchell et al., 1999; Zhu et al., 2000; Abdullah et al., 2002; Al-Rabeah et al., 2006; Torabinejad, Parirokh, 2010). Em

modelos *in vitro*, a exposição de células derivadas da polpa dental a preparações de MTA induz a proliferação celular, mas não a apoptose (Moghaddame-Jafari et al., 2005), e permite a expressão de genes associados ao processo de mineralização da matriz extracelular (Min et al., 2007a; Zhao et al., 2012). Em células do tecido ósseo, a exposição ao MTA resulta em estímulo à diferenciação osteoblástica (Perinpanayagam, 2009; Matsumoto et al., 2013), altera a expressão de citocinas inflamatórias (Deller-Quinn, Perinpanayagam, 2009) e inibe a reabsorção óssea por meio da indução de apoptose em osteoclastos (Hashiguchi et al., 2011). Nos tecidos conjuntivos, o MTA favorece o acúmulo de fibronectina, uma proteína da matriz extracelular associada aos processos de adesão e diferenciação celulares, e de granulações de calcita (Holland et al., 1999) e hidroxiapatita (Sarkar et al., 2005), o que resulta na formação de pontes de tecido mineralizado (Seux et al., 1991; Queiroz et al., 2005; Shahravan et al., 2011). Quando implantado em defeitos ósseos artificiais e nos tecidos periodontais, estimula a neoformação óssea e de cimento (Holland et al., 1999; Shabahang et al., 1999; Moretton et al., 2000; Regan et al., 2002; Economides et al., 2003; Katsamakis et al., 2013). Esses resultados favoráveis do MTA têm sido atribuídos à liberação de hidróxido de cálcio, cuja dissociação resulta em alcalinização do meio, inibindo o crescimento bacteriano e favorecendo a deposição mineral (Estrela et al., 1995; Siqueira; Lopes, 1999), e em aumento dos níveis extracelulares de Ca^{2+} , íon que induz a quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (Dvorak et al., 2004; Matsumoto et al., 2013). Efeitos semelhantes são obtidos em reposta ao uso de pastas à base de hidróxido de cálcio (Leornado et al., 2006).

Apesar de seus efeitos benéficos, o MTA apresenta algumas características negativas, como difícil manuseio, devido à sua consistência arenosa (Lee et al.,

2004); baixa dispersão; alta porosidade (Pandolfelli et al., 2007); tempo de presa longo, que pode favorecer sua solubilidade e deslocamento do local de aplicação (Kogan et al., 2006); escurecimento do dente e da gengiva circunjacente (Bortoluzzi et al., 2007; Belobrov, Parashos, 2011); além de elevado custo (Saidon et al., 2003; Menezes et al., 2004). Assim, alterações na composição/formulação de agregados minerais têm sido propostas com o intuito de aprimorar as características físico-químicas dessa classe de materiais e, conseqüentemente, seu desempenho nas diferentes aplicações clínicas (Bortoluzzi et al., 2007; Asgary et al., 2008; Parirokh, Torabinejad, 2010; Dantas et al., 2012).

Neste contexto, um novo cimento de aluminato de cálcio com aditivos (CAC+), composto por Al_2O_3 ($\leq 68,5\%$ em peso; %p), CaO ($\leq 31,0\%$ p), SiO_2 ($\leq 0,3-0,8\%$ p), MgO ($\leq 0,4-0,5\%$ p), e Fe_2O_3 ($< 0,3\%$ p), foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar (Patente PI0704502-6; Pandolfelli et al., 2007), visando a contornar algumas características negativas do MTA (Jacobovitz et al., 2009). Os aditivos utilizados para esta formulação de CAC+ compreendem: 0,6%p de um dispersante polimérico da família poliglicol; 2,8%p de cloreto de cálcio (CaCl_2), para induzir plasticidade, e 20%p óxido de zinco, que confere radiopacidade ao cimento (Oliveira et al., 2010). Estudos sobre as propriedades físico-químicas demonstraram que o CAC+, comparativamente ao MTA, exibe tempo de presa, porosidade e tamanho de poros menores, melhores propriedades mecânicas sob cargas compressivas e escoabilidade, além de reduzido manchamento (Pandolfelli et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Garcia et al., 2012). Além desses aspectos positivos, os autores demonstraram que o CAC+ apresenta as mesmas propriedades satisfatórias que permitem ao MTA a aplicação em diferentes procedimentos da terapia endodôntica (Torabinejad, Chivian, 1999;

Oliveira et al., 2010). Com efeito, Jacobovitz et al. (2009) relataram a capacidade de esse novo cimento formar uma barreira físico-química contra a microinfiltração bacteriana.

Estudos iniciais demonstraram que o CAC+ não apresenta citotoxicidade em culturas de fibroblastos e não interfere na expressão de metaloproteinase 2, enzima que desempenha papel importante nas alterações teciduais que ocorrem em processos inflamatórios crônicos da polpa e dos tecidos periapicais (Silva et al., 2012). Além disso, este cimento produziu menor reação inflamatória do que o MTA e se apresentou biocompatível quando aplicado em tecido subcutâneo de ratos (Aguilar et al., 2012). Em culturas de células osteogênicas, a exposição ao CAC+ resultou em maiores valores de número total de células, viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina, quando comparados aos observados após exposição ao MTA (Castro-Raucci et al., 2011). Esses resultados podem estar relacionados a diferenças na dissolução dos cimentos e, conseqüentemente, nos níveis de hidróxido de cálcio liberados para o meio de cultura, os quais são descritos como inferiores para o CAC+ (Pandolfelli et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Com base nesse aspecto, formulações alternativas do CAC+ poderiam ser desenvolvidas visando a maior liberação de hidróxido de cálcio, com potenciais benefícios a sua atividade antibacteriana, pela maior alcalinização do meio (Faria-Júnior et al., 2013), e a seus efeitos sobre o reparo de tecidos mineralizados, pela maior liberação de Ca^{2+} (Matsumoto et al., 2013). De fato, a adição de 10% de cloreto de cálcio (CaCl_2) a preparações de cimento Portland e MTA, aditivo utilizado para acelerar o processo de presa desses materiais (Kogan et al., 2006; Bortoluzzi et al., 2006; 2009), tem sido relacionada a um aumento na liberação de íons OH^- e Ca^{2+} nas primeiras 24 h (Bortoluzzi et al., 2006; Wiltbank et al., 2007; Bortoluzzi et al., 2009), assim como à

redução da solubilidade (Bortoluzzi et al., 2009) e aumento da capacidade seladora desses cimentos (Bortoluzzi et al., 2006; Reyes-Carmona et al., 2010).

Em estudo recente, Aguilar et al. (2011), comparando a radiopacidade conferida pela associação do CAC+ a diferentes óxidos (de zinco, bismuto ou zircônia), concluíram que apenas a associação ao óxido de bismuto conferiu ao CAC+ valores de radiopacidade adequados e semelhantes aos observados para o MTA. Ainda, outros trabalhos mostraram que a introdução deste aditivo melhora a ação antibacteriana do CAC+ (Aguilar, 2012), mantendo suas propriedades mecânicas (Garcia et al., 2011), biocompatibilidade (Aguilar et al., 2012) e níveis de pH e de liberação de Ca^{2+} (Aguilar, 2012). Considerando que cimentos endodônticos podem ser aplicados em íntimo contato com tecidos dentais e periapicais, seria interessante avaliar os efeitos do CAC+ com diferentes aditivos sobre a aquisição dos fenótipos celulares associados ao desenvolvimento e formação de tecidos mineralizados.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do CAC+ sobre a progressão de culturas de células derivadas dos tecidos pulpar e ósseo.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar os efeitos da exposição a amostras recém manipuladas de CAC+, comparativamente ao MTA, sobre importantes parâmetros da progressão de culturas de células osteogênicas e de linhagem de células indiferenciadas da polpa dental;
- 2) Avaliar o desenvolvimento do fenótipo osteogênico em culturas de células osteoblásticas expostas, por diferentes períodos, a amostras recém manipuladas de CAC+ e MTA;
- 3) Avaliar os efeitos de modificações na formulação original do CAC+, em relação ao conteúdo de CaCl_2 e ao agente radiopacificador, sobre a progressão de culturas de células osteogênicas e de células indiferenciadas da polpa dental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Preparação das amostras de CAC+ e MTA*

Foram utilizados os seguintes cimentos: MTA branco (Angelus, Londrina-PR), CAC+ em formulação original (UFSCar, São Carlos-SP) e outras três preparações deste material, com modificações no conteúdo de CaCl_2 e/ou no agente radiopacificador (detalhadas no item 3.1.3). O MTA foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante e as preparações de CAC+ foram manipuladas, após esterilização em calor seco a 180 °C por 2 h, com água bidestilada em uma proporção pó/água de 3:1 em volume (Oliveira et al., 2010). Após a manipulação, os cimentos foram colocados em moldes de silicone (Silatec, Dental Milestones Guaranteed-DMG, Hamburgo, Alemanha) e mantidos por 4 h em atmosfera úmida para a obtenção de amostras cilíndricas com dimensões de 4 mm de diâmetro e 2 mm de altura (aproximadamente 40 mg). Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar com instrumental esterilizado para evitar a contaminação das amostras. A razão entre a área da amostra e o volume do meio de cultura utilizada neste estudo foi de 50,24 mm²/mL.

Para a realização das análises propostas, foram delineadas as seguintes estratégias:

3.1.1 Experimento 1: culturas de células osteogênicas crescidas por 24 h sobre lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc., Rochester, NY, EUA) foram expostas, durante todo o período de cultivo, a amostras de MTA e CAC+ em formulação original, posicionadas sobre membranas de Transwell® (poro de 3 µm, Corning Inc., NY, EUA).

Grupos experimentais:

- a) CAC+;
- b) MTA;
- c) Controle: ausência de cimentos.

3.1.2 Experimento 2: culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox[®] (Nunc Inc.) foram expostas a amostras de MTA e CAC+ em formulação original, posicionadas sobre Transwell[®] (Corning Inc.), em períodos distintos de progressão das culturas: fase proliferativa (2 a 5 dias) e fase de diferenciação (7 a 10 dias).

Grupos experimentais:

- a) CAC+ (2-5 dias): culturas expostas a amostras de CAC+ entre o 2º e o 5º dia;
- b) MTA (2-5 dias): culturas expostas a amostras de MTA entre o 2º e o 5º dia;
- c) CAC+ (7-10 dias): culturas expostas a amostras de CAC+ entre o 7º e o 10º dia;
- d) MTA (7-10 dias): culturas expostas a amostras de MTA entre o 7º e o 10º dia; e
- e) Controle: ausência de cimentos.

3.1.3 Experimento 3: culturas de células osteogênicas crescidas por 24 h sobre Thermanox[®] (Nunc Inc.) foram expostas, durante todo o período de cultivo, a amostras de quatro diferentes formulações do CAC+, posicionadas sobre Transwell[®] (Corning Inc.). As formulações apresentaram variação na concentração de CaCl₂, de 2,8 ou 10%p, e/ou no radiopacificador, óxido de zinco ou óxido de bismuto.

Grupos experimentais:

- a) CAC+, composto por amostras com a formulação original (2,8%p de CaCl₂ e 20%p de óxido de zinco);

- b) CAC+Ca, composto por amostras de CAC+, modificado pelo aumento na proporção de CaCl_2 , que passa a ser 10%p, mantendo 20%p de óxido de zinco como agente radiopacificador;
- c) CAC+Bi, composto por amostras de CAC+, mantendo 2,8%p de CaCl_2 e substituindo o agente radiopacificador por 20%p de óxido de bismuto;
- d) CAC+CaBi, composto por amostras de CAC+, modificado tanto pelo aumento na proporção de CaCl_2 , que passa a ser 10%p, como pela substituição do agente radiopacificador por 20%p de óxido de bismuto;
- e) Controle: ausência de cimentos.

3.1.4 Experimento 4: culturas de células indiferenciadas da polpa dental (linhagem OD-21) crescidas por 24 h sobre Thermanox® (Nunc Inc.) foram expostas, durante todo o período de cultivo, a amostras de MTA e CAC+ em formulação original, posicionadas sobre Transwell® (Corning Inc.).

Grupos experimentais:

- a) CAC+;
- b) MTA;
- c) Controle: ausência de cimentos.

3.1.5 Experimento 5: culturas de células indiferenciadas da polpa dental (linhagem OD-21) crescidas por 24 h sobre Thermanox® (Nunc Inc.) foram expostas, durante todo o período de cultivo, a amostras de quatro diferentes formulações do CAC+, com as mesmas modificações descritas no item 3.1.3, posicionadas sobre Transwell® (Corning Inc.).

Grupos experimentais:

- a) CAC+
- b) CAC+Ca;
- c) CAC+Bi;
- d) CAC+CaBi;
- e) Controle: ausência de cimentos.

3.2 Obtenção das culturas celulares

3.2.1 Isolamento das células e cultura primária de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos: as células foram isoladas por digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina e collagenase, de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos, de 2-4 dias (Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998; De Oliveira et al., 2003; De Oliveira; Nanci, 2004; De Oliveira et al., 2007; Schwartz Fo et al., 2007). Todos os procedimentos com animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da USP (Processo CEUA n. 09.1.1063.53.7, cujo Certificado de Aprovação encontra-se no item 9, como Anexo). No total, foram utilizados 100 animais (10 por cultura primária). As células foram plaqueadas sobre lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc.) contidas em placas de 24 poços (Corning Inc.) na densidade de 2×10^4 células/poço, deixadas aderir por 24 h e expostas aos diferentes materiais por períodos de até 14 dias. As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo, modificação α , com L-glutamina (α -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis, MO, EUA), 50 μ g/mL de gentamicina (Invitrogen), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) a 37 °C em atmosfera

úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão das culturas, avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

3.2.2 Cultura de células da linhagem OD-21: células indiferenciadas da polpa, derivadas da papila dentária de primeiros molares de fetos de camundongos (linhagem OD-21; Hanks et al., 1998), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, professor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, EUA. Essas células encontram-se armazenadas em nosso laboratório, conservadas em tubos criogênicos de 2 mL em tanques de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção das culturas. Para o presente estudo, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning Inc.) com 10 mL de meio de cultura D-MEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 5 µg/mL de Plasmocin™ (Invivogen, San Diego, CA, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL penicilina (Gibco, Gran Island, NY, EUA). Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco), plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/poço sobre lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc.) contidas em placas de 24 poços (Corning Inc.). As células foram cultivadas em meio suplementado com 2 mM de β-glicerofosfato (Sigma) e 50 µg de ácido ascórbico (Sigma), de acordo com Semeghini et al., 2012. As culturas foram deixadas aderir por 24 h e expostas aos diferentes materiais por períodos de até 14 dias. Durante o período de cultura, as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio foi trocado a cada 2-3 dias.

3.3 Análise da dissolução dos elementos cálcio, alumínio e fósforo

O conteúdo de cálcio, alumínio e fósforo presente no meio de cultura exposto aos diferentes cimentos por 48 h foi determinado pelo método de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES; Arcos, Spectro, Kleve, Alemanha) (Montaser, Golightly, 1992). Para esse ensaio, amostras de MTA e das diferentes preparações de CAC+ foram obtidas como descrito no item 3.1, expostas, individualmente, a 1 mL de meio de cultura osteogênico, contido em placas de 24 poços e mantidas nas condições de cultivo, na ausência de células, por 48 h. A análise das concentrações destes elementos foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Para calibração do ICP-OES, foi utilizada solução analítica preparada a partir de soluções estoque de 1000 mg/L de cálcio, alumínio ou fósforo, em meio aquoso. Amostra de meio de cultura não exposto aos cimentos foi utilizada como controle. Os resultados foram expressos em ppm.

3.4 Ensaios para avaliação do crescimento e diferenciação celulares

3.4.1 Morfologia celular: em 1, 3, 7 e 10 dias, as células foram fixadas por 10 min à temperatura ambiente (TA) em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB). Após lavagem em PB, as culturas foram processadas para marcação por fluorescência direta (De Oliveira; Nanci, 2004; Castro-Raucci et al., 2011). As culturas foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min e incubadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 50 min à TA em ambiente úmido,

para marcação do citoesqueleto de actina (De Oliveira; Nanci, 2004). Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água bidestilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. As lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc.) foram fixadas em lâminas de vidro e, após a montagem de lamínula de vidro (12 mm; Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) com meio de montagem anti-fade (Vectashield, Vector Labs, EUA) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio de fluorescência Zeiss modelo AxioImager M2 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha), acoplado a uma câmara digital AxioCam MRm (Carl Zeiss Inc.). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

3.4.2 Ensaio para detecção de células em apoptose: a proporção de células que exibem alterações na membrana citoplasmática, típicas em eventos iniciais do processo de morte celular programada, foi determinada por citometria de fluxo em 1 ou 10 dias. Para isso, as células foram tripsinizadas, lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco) e marcadas com anexina V e iodeto de propídeo, utilizando o kit Apoptest-FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca). As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, BD, San Jose, CA, EUA), utilizando o programa FACSDiva (BD).

3.4.3 Determinação da viabilidade celular, do índice de proliferação e do número total de células: em 1, 3, 7 e 10 dias, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}

(Sigma), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS (Gibco) foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 h a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm; µQuanti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Em 3 dias, foi determinada a proporção de células no ciclo celular por imunomarcção ao antígeno nuclear Ki-67, expresso apenas por células durante o ciclo celular e não por células em G0 (Scholzen, Gerdes, 2000). Foi utilizado anticorpo primário anti-Ki-67 (1:70; Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, EUA) e método de imunofluorescência indireta, descrito detalhadamente no item 3.4.4. Foram avaliados, por epifluorescência, três espécimes de cada grupo experimental, em objetiva de 40 X, determinando-se a proporção de células Ki-67 positivas de um total de células aderidas e espiadas não inferior a 100 (3 a 5 campos microscópicos), quantificadas pela marcação do DNA nuclear por DAPI (De Oliva et al., 2009). Aos 7 dias, foi determinado o número total de células. O meio de cultura foi aspirado e os poços, lavados três vezes com PBS a 37 °C, para remoção de células não aderidas. Em seguida, os poços foram preenchidos com solução de 1,5 mL de EDTA a 1 mM, 1,3 mg/mL de colagenase e tripsina a 0,25% em PBS, para remoção das células aderidas. Essa etapa foi monitorada pela observação em microscópio de fase invertido. Amostras da suspensão de células em solução

enzimática foram utilizadas para contagem do número de células por meio de hemocítômetro. O resultado foi expresso como o número total de células por poço.

3.4.4 Imunolocalização de proteínas da matriz extracelular: em 7 e 10 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PB, por 10 min à TA. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (De Oliveira; Nanci, 2004; Schwartz Fo et al., 2007). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Anticorpos primários para sialoproteína óssea (1:200, WV1D1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank – DSHB, Iowa City, IA, EUA), fibronectina (1:100, clone IST-3, Sigma) e osteopontina (1:800, MPIIB10-1, DSHB), foram utilizados, seguidos de anticorpos secundários conjugados com fluoróforo Alexa Fluor 594 ou 488 (fluorescência vermelha ou verde, respectivamente; 1:200, Molecular Probes). Eventualmente, foi utilizada faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para visualização do citoesqueleto de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min em TA. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. As lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc.) foram fixadas em lâminas de vidro e, após a montagem de lamínula de vidro (Fisher Scientific) com meio de montagem anti-fade (Vectashield) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio de fluorescência Zeiss modelo Axiomager M2 (Carl Zeiss Inc.), acoplado a uma câmara digital AxioCam MRm (Carl Zeiss Inc.). As imagens

adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc.).

3.4.5 Análise da diferenciação celular por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR): em 4, 7, 10 e 12 dias, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à TA, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA) e sua integridade avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). Para o preparo da água, foi adicionado 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada à TA por 24 h e autoclavada por 30 min. O gel foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco) em 144 mL de água DEPC. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65 °C e, então, foram adicionados 36 mL de formaldeído a 12,3 M (Merck), 7 µL de GelRed (Biotium, Inc, Hayward, CA, EUA) e 20 mL de tampão de corrida, constituído de 50 mM acetato de sódio (Merck, HE, Alemanha), 5 mM EDTA (Merck) e 100 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS, Sigma). A mistura foi despejada em fôrmas adequadas para moldagem do gel. Para o preparo das amostras, foram adicionados 3 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida, 4 µL de formaldeído a 12,3 M e 10 µL de formamida (Merck). Esta mistura foi aquecida a 85 °C por 10 min e, posteriormente, submetida a resfriamento a 4 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionado o tampão de amostra, composto por 50% de glicerol (v/v), 0,25% de azul de bromofenol (m/v), 0,25% de

xileno cianol (m/v) e 10 nM de EDTA em água DEPC. A eletroforese foi conduzida a 60 V durante 1 a 3 h, utilizando-se tampão de corrida. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta (UV) a 300 nm. A integridade do RNA foi verificada pela visualização de duas subunidades (18S e 28S) do RNA ribossômico presentes em organismos eucariotos (Consulte o item 8.1 do Apêndice). Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para a reação de Real-time PCR, foram utilizadas sondas TaqMan® (Applied Biosystems) para genes-alvo sendo as reações feitas em aparelho CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata, utilizando: 5 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix (Sondas + Primers) e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistem em 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A expressão do controle endógeno foi utilizada para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda Taqman® utilizada. O método

comparativo de 2^{-ddCt} (Livak, Schmittgen, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das culturas dos diferentes grupos experimentais. O desenvolvimento do fenótipo osteogênico de células derivadas de calvária de ratos foi avaliado pela expressão gênica de: 1) Runx2, fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica (Marie et al., 2008), 2) Osterix (OSX), fator de transcrição essencial para diferenciação terminal de osteoblastos e formação óssea (Nakashima et al., 2002); 3) fosfatase alcalina (ALP), enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular (Hamade et al., 2003); 4) osteopontina (OPN), proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização (Goldberg, Hunter, 1995); 5) sialoproteína óssea (BSP), proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita (Hunter, Goldberg, 1993); e 6) osteocalcina (OC), proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros (Ducy et al., 1996). A diferenciação de células da linhagem OD-21 foi avaliada pela expressão gênica para: 1) Runx2, considerado também essencial para o comprometimento das células ectomesenquimais com a linhagem odontoblástica, mas de expressão reduzida em odontoblastos maduros (Chen et al., 2005); 2) OSX, cuja expressão é observada primeiramente na camada pré-odontoblástica e aumenta em odontoblastos terminalmente diferenciados (Zheng et al., 2007); 3) gene sialofosfoproteína da matriz dentinária (DSPP), considerado marcador específico da diferenciação odontoblástica, codifica as duas principais proteínas não-colágenas da matriz dentinária, porém, tem expressão mais importante durante a formação da dentina primária (Moses et al., 2006; Suzuki et al., 2012); 4) ALP, também utilizado como

marcador da diferenciação odontoblástica (Wang et al., 2010); e as proteínas não-colágenas matricelulares 5) BSP, observada principalmente em dentina terciária (Moses et al., 2006) e 6) proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1), importante para o desenvolvimento de tecidos mineralizados, é expressa tanto em células indiferenciadas da polpa quanto em odontoblastos maduros (Lu et al., 2007).

3.4.6 Atividade de fosfatase alcalina (ALP): aos 7 e 10 dias, foi avaliada a atividade de ALP por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Inicialmente, as proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma) por 30 min. Em todos os tubos foram adicionados 50 μ L de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. No tubo padrão foi acrescentado 50 μ L da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 2 min. Em seguida, foram adicionados, em cada tubo teste, 50 μ L de lisado de células de cada poço. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 10 min. Após esse período, 2 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 a 0,09 μ mol/mL e NaOH a 0,25 μ mol/mL) foram adicionados em todos os tubos (branco, padrão e testes) e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (590 nm; μ Quant, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A atividade de ALP, em μ mol de timoftaleína/h/mL, foi calculada a partir da medida do tubo padrão e foi normalizada pelo conteúdo de proteína total, que foi determinado pelo método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951). Para isso, as proteínas extraídas com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma) foram misturadas com solução de Lowry (Sigma), na proporção 1:1, por 20 min em TA. O extrato foi diluído

em reagente de fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma) por 30 min à TA. A absorbância foi avaliada a 680 nm utilizando espectrofotômetro (μ Quanti). O conteúdo de proteína total foi então calculado por meio de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em μ g/mL. No período de 7 dias ou 10 dias, também foi realizado ensaio para visualização da atividade de ALP *in situ*, por marcação pelo método *Fast red* (Majors et al., 1997; Da Silva et al., 2008). O meio de cultura foi removido e os poços, lavados com solução de Hank (Hank's Balanced Salts, Sigma) aquecida a 37 °C. Foi adicionado 1 mL/poço de solução tampão Tris (Sigma) a 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de *Fast red* TR (Sigma), 0,9 mM de naftol-ASM-X-fosfato (Sigma) e 1:9 de dimetilformamida (Merck) e as placas foram mantidas por 30 min em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. A proporção de áreas positivas para *Fast red* foi determinada a partir das imagens macroscópicas das culturas, obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8) e usando o programa Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA), com as imagens submetidas à transformação binária.

3.4.7 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada): em 14 dias, as culturas foram lavadas com solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4 °C por 60 min e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2, à TA por 15 min, lavadas com PBS e água bidestilada, e deixadas secar a TA. Imagens macroscópicas das culturas aos 14 dias foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). A quantificação bioquímica da mineralização foi realizada por método colorimétrico de acordo com Gregory et al. (2004). Após a coloração com o vermelho de Alizarina, foram

adicionados 360 μL de ácido acético a 10% em cada poço, e a placa foi levada ao agitador por 30 min em TA. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *eppendorf*, e então aquecidos a 85 °C por 10 min e, posteriormente, mantido no gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 10.500 rpm por 15 min. Em seguida, 100 μL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para um novo tubo. Então, 40 μL de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados em cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 μL) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (405 nm; μQuant). Em alguns espécimes, após coloração com ARS, foi realizado ensaio de imunolocalização da proteína BSP, conforme descrito no item 3.4.4, e as culturas foram observadas por microscópio de fluorescência Zeiss modelo AxioImager M2 (Carl Zeiss Inc.), acoplado a uma câmara digital AxioCam MRm (Carl Zeiss Inc.).

3.5 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os resultados apresentados são representativos pelo menos dois experimentos distintos, com ensaios realizados em quintuplicata.

4 RESULTADOS

4.1 Culturas primárias osteogênicas derivadas de calvária de ratos

4.1.1 Experimento 1

Para o Experimento 1, os grupos foram definidos como Controle, MTA e CAC+, como descrito no item 3.1.1 de Material e Métodos.

Dissolução dos elementos cálcio, alumínio e fósforo

Após 48 h de exposição, o meio exposto ao CAC+ exibiu as maiores concentrações de cálcio e alumínio e as menores de fósforo, quando comparadas às dos demais grupos (Kruskal-Wallis, $p = 0,007$, $p = 0,015$ e $p < 0,001$; respectivamente). O meio exposto ao MTA mostrou aumento de cálcio e redução de fósforo quando comparado ao Controle ($p = 0,007$ e $p < 0,001$; Figura 1).

Figura 1. Concentração (em ppm) dos elementos cálcio (A), alumínio (B) e fósforo (C) nos meios de cultura Controle e expostos, por 48 h, a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Apoptose celular

Após 24 h, culturas osteogênicas expostas a ambos os cimentos exibiram aumento expressivo da proporção de células apoptose em relação ao Controle, com os maiores valores para o grupo MTA (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 2, Tabela 1).

Apoptose celular

Figura 2. Apoptose celular em culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Morfologia celular

Após 24 h, as células estavam aderidas e espreiadas em todos os grupos, exibindo morfologia poligonal em sua maioria e fibras de estresse do citoesqueleto de actina distribuídas por todo o citoplasma e estendendo-se até os limites celulares (Figura 3A-C). Aspectos morfológicos semelhantes foram observados aos 3 dias (Figura 3D-F), com tendência à redução da densidade celular na área central das lamínulas para os grupos MTA e CAC+. Aos 7 dias, células do grupo Controle arranjavam-se em multicamadas (Figura 3G), enquanto que nos grupos de materiais, especialmente para o MTA, notava-se região central destituída de células (Figura 3, asteriscos em H e I). Essas áreas localizavam-se no centro das lamínulas e coincidiam com a região de maior proximidade com as amostras dos materiais, posicionadas sobre as membranas de Transwell®.

Figura 3. Epifluorescência em 1 (A-C), 3 (D-F) e 7 dias (G-I) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Citoesqueleto de actina marcado em verde e, em azul, núcleos celulares. Asteriscos em H e I indicam área destituída de células, localizada no centro da lamínula e correspondente com região de maior proximidade com as amostras dos cimentos. Barra de escala = 50 μ m (A-C), 100 μ m (D-F) e 200 μ m (G-I).

Viabilidade e proliferação celulares e número total de células

Os resultados do ensaio MTT revelaram aumento da viabilidade celular com a progressão da cultura (ANOVA Two Way, $p < 0,05$; Figura 4). Foram observadas diferenças significantes entre os grupos, sendo que em 1 e 7 dias, Controle > CAC+ > MTA ($p < 0,05$). Particularmente aos 3 dias, os valores de viabilidade observados em culturas expostas ao MTA e CAC+ eram semelhantes entre si e inferiores aos do Controle (ANOVA Two Way, $p < 0,05$; Figura 4, Tabela 1).

Viabilidade celular

Figura 4. Viabilidade celular em 1, 3 e 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Aos 3 dias, a proporção de células em proliferação, marcadas pelo antígeno nuclear Ki-67, foi menor para o MTA quando comparado ao CAC+ e ao Controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) e semelhante entre CAC+ e Controle (Figura 5, Tabela 1).

Índice de proliferação

Figura 5. Índice de proliferação celular aos 3 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Aos 7 dias, não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao número total de células (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 6, Tabela 1), apesar de haver uma tendência à redução da população celular em culturas expostas ao MTA.

Figura 6. Número total de células aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica

A expressão de Runx2 variou entre as culturas dos diferentes grupos em todos os períodos. Aos 4 dias, maior expressão de Runx2 era observada em culturas Controle, enquanto que de 7 a 12 dias, era maior naquelas expostas aos materiais, sendo mais alta em 7 e 12 dias para o grupo CAC+ (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 7A, Tabela 2).

Para os genes OSX, ALP, BSP e OC, em 4 e 7 dias os maiores níveis de expressão foram observados para as culturas Controle. As culturas expostas ao CAC+ mostraram maior expressão desses genes em 7, 10 e 12 dias quando

comparadas àquelas expostas ao MTA (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 7B-D, F, Tabela 2).

A expressão de OPN oscilou entre os grupos nos 4 períodos avaliados, sendo que de 7 a 12 dias menores valores eram detectados para as culturas expostas ao CAC+ em comparação àquelas expostas ao MTA. O pico de expressão de OPN foi observado em culturas Controle em 12 dias (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 7E, Tabela 2).

Figura 7. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D), OPN (E) e OC (F) aos 4, 7, 10 e 12 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Atividade de ALP

Aos 7 dias, observou-se marcação positiva para *Fast red* em todos os grupos. Contudo, as culturas expostas aos materiais exibiam ausência de marcação em área circular localizada no centro das lamínulas e mais próxima aos cimentos, o que era mais evidente para o MTA (Figura 8). Apesar disso, não houve diferenças na proporção de áreas positivas para *Fast red* entre os grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 9, Tabela 1).

Figura 8. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.

Atividade de ALP *in situ*

Figura 9. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas ao MTA ou CAC+. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

A atividade de ALP foi afetada pelo período, sendo os valores de 10 dias superiores aos observados em 7 dias (ANOVA Two Way, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças para os valores de atividade de ALP nos grupos CAC+ e MTA aos 7 dias, sendo ambos inferiores aos observados no grupo Controle ($p < 0,05$). Aos 10 dias, contudo, culturas expostas ao CAC+ exibiam maior atividade de ALP, sendo CAC+ > Controle > MTA ($p < 0,05$; Figura 10, Tabela 1).

Figura 10. Atividade de ALP em 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Imunolocalização de proteínas da matriz extracelular

Aos 7 dias, era mais abundante a marcação para FN em culturas expostas aos cimentos, particularmente para o CAC+ (Figura 11A-C). Nesse grupo, a marcação era predominantemente difusa, enquanto que no Controle e MTA estava restrita a regiões de maior densidade celular (Figura 11C, compare com A e B).

Em geral, as marcações para BSP e OPN nas culturas expostas ao MTA e CAC+ concentravam-se, predominantemente, em áreas periféricas das lamínulas de Thermanox® (Figura 11D-I).

A marcação para BSP nas culturas Controle e expostas ao MTA e CAC+ era, predominantemente, citoplasmática, em região perinuclear, em áreas de multicamadas celulares (Figura 11D-F), de formação posterior de nódulos de matriz mineralizada. Nas culturas expostas ao MTA notava-se a menor quantidade de formações de multicamadas (Figura 11E).

A marcação para OPN era predominantemente citoplasmática, perinuclear, e mais evidente nas culturas expostas ao CAC+ e MTA, quando comparadas às culturas Controle em 7 dias (Figura 11G, compare com H e I).

Figura 11. Epifluorescência aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (Controle; A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de FN (A-C) ou BSP (D-F). Imunomarcacão para OPN em fluorescência verde (G-I). Citoesqueleto de actina marcado em cinza (D-F) e núcleos celulares em fluorescência azul (A-I). Barra de escala = 100 μ m.

Aos 10 dias, as culturas dos diferentes grupos exibiram maior expressão de BSP associada a um aumento das áreas de multicamadas celulares, particularmente observadas nos grupos Controle e CAC+ (Figura 12A-C). Nesse período, o padrão de marcação para OPN foi semelhante ao observado para BSP (Figura 12D-F). Aos 14 dias, foram observados nódulos de matriz mineralizada, corados por ARS, nas culturas Controle e expostas aos cimentos (Figura 12G-I, marcação em vermelho ou laranja, pela sobreposição vermelho/verde), sendo que as células associadas aos nódulos eram também positivas para BSP (Figura 12G-I).

Figura 12. Epifluorescência em 10 (A-F) e 14 dias (G-I) de culturas de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos, crescidas sobre Thermanox® (Controle; A, D, G) e expostas a amostras de MTA (B, E, H) ou CAC+ (C, F, I). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP (A-C) ou marcação por ARS (G-I). Em verde, OPN (D-F) ou BSP (G-I). Núcleos celulares em azul. Barra de escala = 200 μ m.

Formação de matriz mineralizada

Os aspectos macroscópicos da marcação por ARS revelaram área central destituída de nódulos de mineralização para MTA e CAC+ (Figura 13B e C). O padrão de marcação por ARS para Controle e CAC+ foi predominantemente nodular, enquanto que para MTA observava-se, adicionalmente, marcação difusa não associada aos nódulos (Figura 13A e C, compare com B).

Figura 13. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.

Aos 14 dias, a quantificação de ARS revelou maior formação de matriz mineralizada no grupo Controle (ANOVA One Way, $p < 0,05$), não havendo diferenças significantes entre MTA e CAC+ ($p > 0,05$; Figura 14, Tabela 1).

Mineralização

Figura 14. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 1. Comparações múltiplas entre as amostras, pós-teste de Student-Newman-Keuls (para os parâmetros apoptose celular, índice de proliferação, número total de células e atividade de ALP *in situ*) ou Hôlm-Sidak (para os parâmetros viabilidade celular, atividade de ALP e mineralização)

Parâmetro	Período (dias)	Comparações			Valores de <i>p</i>
		Controle x CAC+	Controle x MTA	MTA x CAC+	
Apoptose celular	1	S	S	S	< 0,001
Viabilidade celular	1	S	S	S	< 0,05
	3	S	S	NS	< 0,05
	7	S	S	S	< 0,05
Índice de proliferação	3	NS	S	S	0,011
Número de células	7	NS	NS	NS	0,134
Atividade ALP <i>in situ</i>	7	NS	NS	NS	0,370
Atividade de ALP	7	S	S	NS	< 0,05
	10	S	S	S	< 0,05
Mineralização	14	S	S	NS	< 0,05

S: significante

NS: não significante

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos nos testes de Kruskal-Wallis (para os parâmetros apoptose celular, índice de proliferação, número total de células e atividade de ALP *in situ*) ou ANOVA (para os parâmetros viabilidade celular, atividade de ALP e mineralização).

Tabela 2. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls

Gene	Período (dias)	Comparações			Valores de <i>p</i>
		Controle x CAC+	Controle X MTA	MTA x CAC+	
Runx2	4	S	S	NS	0,005
	7	S	S	S	0,002
	10	S	S	S	0,002
	12	S	S	S	0,002
OSX	4	S	S	S	0,002
	7	S	S	S	0,002
	10	S	S	S	0,002
	12	S	S	S	0,002
ALP	4	S	S	NS	0,006
	7	S	S	S	0,002
	10	S	S	S	0,002
	12	S	S	S	0,002
BSP	4	S	S	S	0,002
	7	S	S	S	0,002
	10	S	S	S	0,002
	12	S	S	S	0,002
OPN	4	S	S	NS	0,009
	7	S	S	S	0,002
	10	S	NS	S	0,005
	12	S	S	S	0,002
OC	4	S	NS	S	0,007
	7	S	S	S	0,002
	10	S	S	S	0,002
	12	S	S	S	0,002

S: significante

NS: não significante

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

4.1.2 Experimento 2

Para o Experimento 2, os grupos foram definidos como Controle, MTA (2-5 dias), CAC+ (2-5 dias), MTA (7-10 dias) e CAC+ (7-10 dias), como descrito no item 3.1.2 de Material e Métodos.

Apoptose e viabilidade celulares e número total de células

Aos 10 dias, uma maior porcentagem de células apoptóticas foi observada no grupo CAC+ (2-5 dias) em relação aos demais grupos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, Figura 15, Tabela 3), não sendo significantes as demais comparações ($p > 0,05$).

Figura 15. Apoptose celular aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Neste mesmo tempo, culturas Controle e expostas ao CAC+ nos diferentes períodos exibiam os maiores valores de viabilidade celular, seguidos por MTA (2-5 dias) e MTA (7-10 dias) (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 16, Tabela 3).

Viabilidade celular

Figura 16. Viabilidade celular aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Em relação ao número total de células, aos 10 dias, culturas expostas ao MTA (7-10 dias) exibiam os menores valores quando comparadas às dos demais grupos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 17), não havendo diferenças significantes para as demais comparações (Tabela 3).

Número total de células

Figura 17. Número total de células aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica

Aos 10 dias, para a maioria dos genes avaliados, com exceção para OPN, os maiores valores de expressão foram observados para o grupo CAC+ (2-5 dias), seguido por MTA (2-5 dias) e CAC+ (7-10 dias), sendo os menores valores observados nos grupos Controle e MTA (7-10 dias). Para OPN, maior expressão foi obtida em culturas expostas ao MTA ($p < 0,05$; Figura 18, Tabela 4).

Expressão gênica

Figura 18. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2, OSX, ALP, BSP, OPN e OC aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Atividade de ALP

Aos 10 dias, apenas as culturas em que a exposição aos cimentos ocorreu entre 2-5 dias exibiam ausência de marcação para *Fast red* em área central do substrato (Figura 19B e C). Nos demais grupos, a atividade de ALP foi uniforme, sendo mais intensa nos grupos expostos entre 7 e 10 dias, em especial o MTA, quando comparados ao Controle (Figura 19D e E, compare com A).

Figura 19. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B e D) ou CAC+ (C e E) em diferentes períodos da cultura. Barra de escala = 3 mm.

A quantificação das áreas *Fast red*-positivas revelou maior atividade de ALP *in situ* em culturas crescidas na presença de MTA (7-10 dias), CAC+ (7-10 dias) e CAC+ (2-5 dias), quando comparadas a culturas Controle e MTA (2-5 dias) (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 20, Tabela 3).

Figura 20. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Bioquimicamente, o grupo MTA (7-10 dias) exibia os maiores valores de atividade de ALP (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), seguido pelos grupos CAC+ (7-10 dias) e Controle, com valores semelhantes entre si ($p > 0,05$). A menor atividade de ALP foi observada para CAC+ (2-5 dias) e MTA (2-5 dias) ($p < 0,05$, Figura 21, Tabela 3).

Atividade de ALP

Figura 21. Atividade de ALP aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Imunolocalização de sialoproteína óssea e formação de matriz mineralizada

Aos 10 dias, a expressão de BSP foi observada em culturas Controle e expostas aos diferentes grupos de MTA e CAC+ (Figura 22 A, C, E, G e I). A marcação ocorria, predominantemente, em áreas de multicamadas celulares, sendo mais extensa e evidente em culturas Controle e expostas ao CAC+ em diferentes períodos (Figura 22A, E e I, compare com C e G). Entre os grupos MTA, observou-se maior expressão de BSP em culturas expostas no período 2-5 dias (Figura 22C, compare com G). Aos 14 dias, foram observadas formações nodulares bem definidas em todos os grupos (Figura 22B, D, F, H e J), embora a dupla marcação ARS/BSP fosse presente apenas em culturas Controle, CAC+ (2-5 dias) e MTA (7-

10 dias) (Figura 22B, F, e H). Culturas expostas ao CAC+ (7-10 dias) apresentavam apenas marcação para BSP (Figura 22J). Não foi observada a marcação para BSP ou ARS em culturas expostas ao MTA (2-5 dias) (Figura 22D).

Figura 22. Epifluorescência aos 10 (A, C, E, G, I) e 14 dias (B, D, F, H, J) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A-B) e expostas a amostras de MTA (C, D, G, H) ou CAC+ (E, F, I, J) pelo período de 2-5 dias (C-F) ou de 7-10 dias (G-J). Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP (A, C, E, G, I) ou marcação para ARS (B, D, F, H, J). Fluorescência verde indica imunolocalização de BSP (B, D, F, H, J). A cor amarela indica sobreposição de BSP com ARS. Núcleos celulares em azul. Barra de escala = 400 μ m (A, C, E, G, I) ou 200 μ m (B, D, F, H, J).

Macroscopicamente, a marcação por ARS revelou área central destituída de nódulos de mineralização em culturas expostas a MTA e CAC+, independentemente do período de exposição (Figura 23B-E). Enquanto o padrão tipicamente nodular era observado em culturas Controle e expostas ao CAC+ (Figura 23A, C e E), uma marcação difusa de ARS, aparentemente não vinculada a formações nodulares, estava presente em ambos os grupos MTA (Figura 23B e D).

Figura 23. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos (B-E). Barra de escala = 3 mm.

A quantificação de ARS mostrou maior formação de matriz mineralizada no Controle, seguido por CAC+ (2-5 dias) e MTA (7-10 dias), com valores semelhantes entre si (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Culturas expostas ao MTA (2-5 dias) e CAC+ (7-10 dias) apresentavam os menores valores de ARS ($p < 0,05$; Figura 24, Tabela 3).

Mineralização

Figura 24. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 3. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Viabilidade celular	Atividade ALP in situ	Atividade ALP	Número de células	Apoptose celular	Mineralização
	10 dias	10 dias	10 dias	10 dias	10 dias	14 dias
Controle x MTA (2-5 dias)	S	NS	S	-	-	S
Controle x CAC+ (2-5 dias)	NS	S	S	NS	S	S
CAC+ (2-5 dias) x MTA (2-5 dias)	S	S	NS	-	S	S
Controle x MTA (7-10 dias)	S	S	S	S	-	S
Controle x CAC+ (7-10 dias)	-	S	NS	-	-	S
MTA (2-5 dias) x MTA (7-10 dias)	S	S	S	S	NS	S
CAC+ (2-5 dias) x CAC+ (7-10 dias)	-	-	S	-	S	S
CAC+ (2-5 dias) x MTA (7-10 dias)	S	NS	S	S	S	NS
CAC+ (7-10 dias) x MTA (2-5 dias)	S	S	S	-	-	NS
CAC+ (7-10 dias) x MTA (7-10 dias)	S	-	S	S	-	S
Valor de p	<i>0,012</i>	<i>0,013</i>	<i>0,004</i>	<i>0,003</i>	<i>0,036</i>	<i>< 0,001</i>

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.**Tabela 4.** Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Runx2	OSX	ALP	BSP	OPN	OC
Controle x MTA (2-5 dias)	S	NS	-	S	S	S
Controle x CAC+ (2-5 dias)	S	S	S	S	S	S
CAC+ (2-5 dias) x MTA (2-5 dias)	S	S	S	S	S	S
Controle x MTA (7-10 dias)	S	-	-	S	S	NS
Controle x CAC+ (7-10 dias)	S	-	-	S	S	NS
MTA (2-5 dias) x MTA (7-10 dias)	S	-	NS	S	S	S
CAC+ (2-5 dias) x CAC+ (7-10 dias)	NS	S	S	NS	NS	S
CAC+ (2-5 dias) x MTA (7-10 dias)	S	S	S	S	S	S
CAC+ (7-10 dias) x MTA (2-5 dias)	NS	-	-	S	S	S
CAC+ (7-10 dias) x MTA (7-10 dias)	S	-	-	S	S	NS
Valor de p	<i>0,001</i>	<i>0,003</i>	<i>0,002</i>	<i>< 0,001</i>	<i>< 0,001</i>	<i>< 0,001</i>

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

4.1.3 Experimento 3

Para o Experimento 3, foram definidos os grupos Controle, CAC+, CAC+Ca, CAC+Bi e CAC+CaBi, como descritos no item 3.1.3 de Material e Métodos.

Por ICP-OES, observou-se maior concentração de cálcio e alumínio nos meios de cultura expostos às amostras de CAC+ em comparação ao Controle, sendo, para o cálcio, CAC+CaBi > CAC+Ca > CAC+ > CAC+Bi > Controle (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$; Figura 25A) e, para o alumínio, CAC+Ca > CAC+CaBi > CAC+ > CAC+Bi > Controle ($p < 0,001$; Figura 25B). Redução significativa de fósforo foi observada nos meios expostos às amostras de CAC+ em comparação ao Controle, sendo Controle > CAC+Bi > CAC+ > CAC+CaBi > CAC+Ca ($p = 0,001$; Figura 25C).

Figura 25. Concentração (em ppm) dos elementos cálcio (A), alumínio (B) e fósforo (C) presente no meio de cultura Controle e exposto, por 48 h, a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Apoptose Celular

Após 24 h, foi observada maior proporção de células apoptóticas para culturas expostas a amostras de CAC+Ca e CAC+Bi, seguidas por CAC+CaBi, CAC+ e Controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 26, Tabela 5).

Figura 26. Apoptose celular em culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Morfologia celular

Em 1 dia, foram observadas células aderidas e espreiadas em todos os grupos (Figura 27A-E), com menor espreiamento para CAC+Ca e CAC+CaBi (Figura 27C e E). Em 3 dias, áreas de confluência celular ocorriam em todos os grupos (Figura 27F-J); contudo, culturas expostas às formulações de CAC+ exibiam menor densidade celular nas regiões centrais do substrato, mais evidente em CAC+, CAC+Bi e CAC+CaBi (Figura 27G, I e J). Aos 7 dias, culturas Controle, CAC+Ca e CAC+CaBi exibiam regiões de multicamadas celulares distribuídas uniformemente pelo substrato (Figura 27K, M e O), enquanto que para CAC+ e CAC+Bi, essas regiões concentravam-se periféricamente, com poucas células no centro da lamínulas, especialmente para CAC+Bi (Figura 27L e N).

Figura 27. Epifluorescência em 1 (A-E), 3 (F-J) e 7 dias (K-O) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A, F, K) e expostas a amostras de CAC+ (B, G, L), CAC+Ca (C, H, M), CA+Bi (D, I, N) ou CAC+CaBi (E, J, O). Fluorescência verde indica marcação para o citoesqueleto de actina e, azul, núcleos celulares. Barra de escala = 100 µm (A-D), 200 µm (F-J) e 800 µm (K-O).

Viabilidade celular

Em 1 dia, os maiores valores de viabilidade celular foram observados para o grupo Controle, seguido por CAC+Ca e CAC+CaBi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), que exibiam valores similares entre si ($p > 0,05$); CAC+ e CAC+Bi apresentaram as menores viabilidades celulares ($p < 0,05$). Em 3 dias, culturas expostas às diferentes composições de CAC+ exibiram viabilidade inferior ao Controle ($p < 0,05$). Entre os grupos de CAC+, não foi observada diferença para os valores obtidos nos grupos

CAC+, CAC+Ca e CAC+CaBi, sendo todos superiores ao CAC+Bi ($p < 0,05$). Em 7 dias, CAC+Bi manteve a menor viabilidade celular em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), não havendo diferenças para as demais comparações (Figura 28, Tabela 5).

Figura 28. Viabilidade celular em 1, 3 e 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores em média $\pm$ desvio padrão.

Atividade de ALP

Em 7 dias, a marcação por *Fast red* mostrou que tanto as culturas Controle quanto aquelas expostas às preparações de CAC+ exibiam atividade de ALP *in situ* (Figura 29A-E). Contudo, enquanto que no Controle as áreas *Fast red*-positivas era distribuídas uniformemente, em culturas expostas aos cimentos notava-se região central destituída de marcação, coincidindo com a maior proximidade das amostras, o que era mais evidente para CAC+ e CAC+Bi (Figura 29, compare A com B-E).

Figura 29. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.

A quantificação das áreas positivas para *Fast red* mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com os valores de CAC+Ca superiores aos dos demais grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 30, Tabela 5).

Figura 30. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Aos 10 dias, bioquimicamente, a atividade de ALP foi maior em culturas Controle e naquelas expostas ao CAC+CaBi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 31), seguidas por CAC+ e CAC+Ca, com valores semelhantes entre si ($p > 0,05$). A menor atividade de ALP foi observada para culturas expostas ao CAC+Bi (Tabela 5).

Figura 31. Atividade de ALP aos 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica

As diferentes preparações de CAC+ afetaram, significativamente, a expressão de marcadores osteoblásticos em 7 e 10 dias (Kruskal-Wallis; Figura 32, Tabela 6), destacando-se a redução na expressão de Runx2 e ALP em comparação ao Controle. Nas comparações entre as preparações de CAC+, notaram-se, em 7 dias, aumento na expressão de Runx2, ALP e BSP nas culturas expostas ao CAC+Ca e CAC+CaBi, e redução na expressão OSX, BSP e OC nas culturas expostas ao CAC+Bi em relação ao CAC+. Em 10 dias, a variação na expressão dos diferentes genes foi ainda maior na comparação entre as culturas, não sendo possível detectar um padrão comum a grupos de genes.

Figura 32. Expressão relativa de RNAm para Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D), OPN (E) e OC (F) aos 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de proteínas da matriz extracelular e formação de matriz mineralizada

Aos 7 dias, células expostas às diferentes preparações de CAC+ exibiam marcação para BSP, com áreas mais extensas para Controle e CAC+CaBi (Figura 33A, D, G, J e M). Aos 10 dias, embora culturas dos diferentes grupos apresentassem áreas positivas para OPN, notou-se marcação mais intensa para Controle, CAC+ e CAC+Ca (Figura 33B, E, H, K e N). Aos 14 dias, culturas Controle e expostas às diferentes preparações de CAC+ exibiam nódulos de mineralização marcados por ARS e BSP-positivos (Figura 33C, F, I, L e O).

Figura 33. Epifluorescência aos 7 (A, D, G, J, M), 10 (B, E, H, K, N) e 14 dias (C, F, I, L, O) de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A-C) e expostas a preparações de CAC+ (D-O). Fluorescência verde indica BSP em 7 e 14 dias, vermelha, OPN em 10 dias ou ARS em 14 dias, e azul, núcleos celulares. Barra de escala = 200 µm.

Formações nodulares ARS-positivas ocorreram em todos os grupos aos 14 dias (Figura 34). Em culturas expostas às preparações de CAC+, essas formações estavam localizadas predominantemente na periferia das lamínulas e eram mais abundantes nos grupos CAC+Ca e CAC+CaBi (Figura 34B-E).

Figura 34. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.

Aos 14 dias, culturas Controle e expostas a CAC+Ca e CAC+CaBi exibiam valores de ARS semelhantes entre si e superiores às expostas a CAC+ e CAC+Bi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 35, Tabela 5).

Figura 35. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre lamínulas de Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 5. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Apoptose celular	Viabilidade Celular			Atividade ALP in situ	Atividade ALP	Mineralização	
	1 dia	1 dia	3 dias	7 dias	7 dias	10 dias	14 dias	
Controle x CAC+	S	S	S	-	-	S	S	
Controle x CAC+Ca	S	S	S	NS	S	S	-	
Controle x CAC+Bi	S	S	S	S	-	S	S	
Controle x CAC+CaBi	S	S	S	-	NS	NS	-	
CAC+ x CAC+Ca	S	S	-	-	S	NS	S	
CAC+ x CAC+Bi	S	NS	S	S	-	S	NS	
CAC+ x CAC+CaBi	S	S	NS	-	-	S	S	
CAC+Ca x CAC+Bi	NS	S	S	S	S	S	S	
CAC+Ca x CAC+CaBi	S	NS	-	-	S	S	NS	
CAC+Bi x CAC+CaBi	S	S	S	S	-	S	S	
Valor de <i>p</i>	0,001	< 0,001		< 0,001	0,003	0,013	< 0,001	0,005

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.**Tabela 6.** Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Runx2		OSX		ALP		BSP		OPN		OC	
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias
Controle x CAC+	S	S	-	S	S	S	S	-	S	S	S	NS
Controle x CAC+Ca	S	S	-	S	NS	S	NS	S	S	S	S	S
Controle x CAC+Bi	S	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	S	S
Controle x CAC+CaBi	S	S	NS	S	-	S	S	NS	S	S	NS	S
CAC+ x CAC+Ca	S	NS	-	NS	S	NS	S	S	S	S	S	S
CAC+ x CAC+Bi	NS	-	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	S
CAC+ x CAC+CaBi	NS	S	-	-	S	-	S	-	S	S	S	S
CAC+Ca x CAC+Bi	S	-	S	S	S	S	S	NS	S	S	S	S
CAC+Ca x CAC+CaBi	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	NS
CAC+Bi x CAC+CaBi	NS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Valor de p	0,002	0,006	0,01	0,014	0,002	< 0,001	< 0,001	0,006	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,008

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

4.2 Cultura de células indiferenciadas da polpa dental de camundongos

4.2.1 Experimento 4

Para o Experimento 4, foram definidos os grupos Controle, MTA e CAC+, como descritos no item 3.1.4 de Material e Métodos.

Apoptose celular

Após 24 h de exposição, não houve diferenças entre grupos para a proporção de células em apoptose (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 36, Tabela 7).

Figura 36. Apoptose celular em culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Morfologia celular

Em 1 dia, foram observadas células aderidas e espreiadas em todos os grupos. Enquanto que no Controle as células eram arredondadas e bem espreiadas, nos grupos de cimentos, e em especial para o CAC+, as células exibiam morfologia poligonal e/ou alongada e um menor espreiamento (Figura 37A-C). Aos 3 dias, as células organizavam-se em agregados distribuídos pelo substrato, persistindo, nos grupos de cimentos, um menor espreiamento celular e o fenótipo fusiforme (Figura

37D-F). Aos 7 dias, notavam-se áreas de multicamadas celulares e de confluência, especialmente para CAC+ (Figura 37G-I). Aspectos morfológicos semelhantes foram observados aos 10 dias, com aumento das áreas de multicamadas celulares (Figura 37J-L). Aos 14 dias, culturas Controle exibiam formações irregulares extensas BSP-positivas, fracamente coradas por ARS (Figura 37M), enquanto que naquelas expostas aos cimentos, a marcação para BSP era menos evidente, concentrada na periferia da lamínula (Figura 37N e O). Apenas para o MTA foi observada área central intensamente corada por ARS (Figura 37N).

Figura 37. Epifluorescência em 1 (A-C), 3 (D-F), 7 (G-I), 10 (J-L) e 14 dias (M-O) de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A, D, G, J, M) e expostas a MTA (B, E, H, K, N) ou CAC+ (C, F, I, L, O). Fluorescência verde para actina (A-L) ou BSP (M-O), vermelha para ARS (M-O) e azul para núcleos celulares. Barra de escala = 50 μ m (A-C), 100 μ m (D-F), 800 μ m (G-I) ou 400 (J-O).

Viabilidade celular

Em 1 dia, foram observados menores valores de viabilidade celular em culturas expostas ao MTA e CAC+ quando comparadas ao Controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Em 3 dias, culturas expostas ao CAC+ exibiam maior viabilidade celular em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Em 7 dias, os maiores valores de viabilidade celular foram obtidos para o MTA, seguido do Controle e CAC+ ($p < 0,05$). Não houve diferenças significantes entre os grupos para os valores de viabilidade celular em 10 dias ($p > 0,05$; Figura 38, Tabela 7).

Figura 38. Viabilidade celular em 1, 3, 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de genes relacionados à diferenciação celular

Aos 7 dias, culturas dos diferentes grupos exibiam valores semelhantes de expressão de Runx2, OSX e ALP (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Culturas expostas ao CAC+ apresentaram reduzida expressão de DMP-1 e BSP ($p < 0,05$; Figura 39, Tabela 8), enquanto que aquelas expostas ao MTA exibiram maior expressão de

DMP-1 em comparação ao Controle ($p < 0,05$); a expressão de BSP foi semelhante entre os grupos Controle e MTA ($p > 0,05$).

Em 10 dias, culturas expostas ao CAC+ exibiram os maiores níveis de expressão de OSX e BSP ($p < 0,05$) e os menores de Runx-2 e DMP-1 quando comparadas às dos demais grupos ($p < 0,05$). Culturas expostas ao MTA apresentaram menor expressão de Runx-2 e ALP e maior expressão de BSP em comparação ao Controle ($p < 0,05$), não sendo significantes as demais comparações ($p > 0,05$; Figura 39, Tabela 8). Não foi observada expressão de DSPP nos dois períodos avaliados.

Figura 39. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D) e DMP-1 (E) aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Atividade de ALP

Aos 7 dias, extensas áreas fortemente marcadas para a atividade de ALP *in situ* foram observadas tanto em culturas Controle quanto naquelas expostas a MTA ou CAC+ (Figura 40A-C).

Figura 40. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.

A quantificação de áreas *Fast red*-positivas não revelou diferenças para os valores observados para Controle, MTA e CAC+ (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 41, Tabela 7).

Atividade de ALP *in situ*

Figura 41. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Bioquimicamente, em 7 dias, uma maior atividade de ALP foi observada no grupo MTA, seguida por Controle e CAC+ (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 42, Tabela 7). Em 10 dias, culturas expostas ao CAC+ exibiam os maiores valores de atividade de ALP em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$; Figura 42, Tabela 7).

Figura 42. Atividade de ALP aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Formação de matriz mineralizada

Aos 14 dias, observou-se, para o Controle, a formação de discretos nódulos de mineralização, ARS-positivos, distribuídos aleatoriamente por todo o substrato. Para as culturas expostas aos cimentos, essa marcação era mais evidente em áreas periféricas do substrato (Figura 43A-C).

Figura 43. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a amostras de MTA (B) ou CAC+ (C). Barra de escala = 3 mm.

A quantificação de ARS revelou menor formação de matriz calcificada em culturas expostas a CAC+ em comparação aos demais grupos (Kruskal-Wallis, $p = 0,05$). Não houve diferenças significantes para as demais comparações ($p > 0,05$; Figura 44, Tabela 7).

Figura 44. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 7. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newmn-Keuls

Parâmetro	Período (dias)	Comparações			Valores de p
		Controle x CAC+	Controle x MTA	MTA x CAC+	
Apoptose celular	1	-	-	-	0,131
	1	S	S	NS	0,021
Viabilidade celular	3	S	NS	S	0,008
	7	S	S	S	< 0,001
	10	-	-	-	0,057
Atividade ALP <i>in situ</i>	7	-	-	-	0,296
Atividade de ALP	7	S	S	S	<0,001
	10	S	S	S	< 0,001
Mineralização	14	S	NS	S	0,005

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newmn-Keuls

Gene	Período (dias)	Comparações			Valores de <i>p</i>
		Controle x CAC+	Controle X MTA	MTA x CAC+	
Runx2	7	-	-	-	0,117
	10	S	S	NS	0,003
OSX	7	-	-	-	0,071
	10	S	NS	S	< 0,001
ALP	7	-	-	-	0,128
	10	NS	S	S	< 0,001
BSP	7	S	NS	S	0,018
	10	S	S	S	< 0,001
DMP-1	7	S	S	S	< 0,001
	10	S	NS	S	0,004

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

4.2.2 Experimento 5

Para o Experimento 5, foram definidos os grupos Controle, CAC+, CAC+Ca, CAC+Bi e CAC+CaBi, como descritos no item 3.1.5 de Material e Métodos.

Apoptose celular

Após 24 h de exposição às diferentes preparações de CAC+, foi verificada maior proporção de células em apoptose para Controle e CAC+CaBi, seguidos por CAC+ e CAC+Bi; os menores valores ocorreram para CAC+Ca (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Figura 45, Tabela 9).

Figura 45. Apoptose celular em culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+ por 24 h. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Morfologia celular

Em 1 dia, embora todos os grupos exibissem células aderidas e espreiadas, foram notados aspectos morfológicos distintos em culturas de células indiferenciadas da polpa (Figura 46A-E). Enquanto nas culturas Controle as células apresentavam-se, predominantemente, mais espreiadas e com morfologia arredondada, as culturas

expostas aos diferentes grupos de CAC+ exibiam morfologia fusiforme/alongada (Figura 46A, compare com B-E). Aos 3 dias, culturas expostas ao CAC+, CAC+Bi e CAC+CaBi exibiam menor espreadimento celular e áreas de confluência (Figura 46F, compare com G, I e J). Aos 7 dias, foi observada confluência das culturas em todos os grupos, com formações de multicamadas celulares (Figura 46K-O). Em culturas expostas ao CAC+Ca e CAC+CaBi, a densidade celular era reduzida na região central do substrato (Figura 46M e O, canto inferior). Aos 14 dias, observava-se marcação mais extensa para BSP nos grupos Controle, CAC+Ca e CAC+CaBi, geralmente adjacentes a áreas de multicamadas, as quais eram ARS-positivas à observação macroscópica, mas destituídas de fluorescência (Figura 46P-T).

Viabilidade celular

Em 1 dia, foram observados valores semelhantes de viabilidade celular para culturas Controle e aquelas crescidas na presença de amostras das diferentes preparações de CAC+ (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 47, Tabela 9). Aos 3 dias, os maiores valores de viabilidade foram observados para CAC+ e CAC+Ca, seguidos por CAC+Bi ($p < 0,05$); Controle e CAC+CaBi apresentavam valores semelhantes entre si e inferiores aos dos demais grupos ($p < 0,05$; Figura 47, Tabela 9). Aos 7 dias, culturas expostas ao CAC+ exibiram a menor viabilidade ($p < 0,05$; Figura 47, Tabela 9). Aos 10 dias, o grupo CAC+CaBi apresentou os maiores valores de viabilidade (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), seguido por Controle e CAC+Bi, semelhantes entre si ($p > 0,05$); como em 7 dias, a menor viabilidade foi também observada para CAC+ ($p < 0,05$; Figura 47, Tabela 9).

Figura 46. Epifluorescência em 1 (A-E), 3 (F-J), 7 (K-O) e 14 dias (P-T) de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A, F, K, P) e expostas a CAC+ (B, G, L, Q), CAC+Ca (C, H, M, R), CA+Bi (D, I, N, S) ou CAC+CaBi (E, J, O, T). Fluorescência verde para actina (A-O) ou BSP (P-T) e azul para núcleos celulares. Barra de escala = 100 μ m (A-E), 800 μ m (F-O) ou 400 μ m (P-T).

Viabilidade celular

Figura 47. Viabilidade celular em 1, 3, 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Atividade de ALP

Aos 7 dias, a marcação por *Fast red* revelou intensa atividade de ALP em todas as culturas avaliadas, especialmente naquelas expostas às diferentes preparações de CAC+. Nos grupos CAC+Ca e CAC+CaBi, era evidente uma área circular, geralmente central, destituída de atividade desta enzima (Figura 48D e F).

Figura 48. Aspectos macroscópicos da marcação por *Fast red* aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.

Apesar dos distintos padrões de marcação, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para a proporção de áreas *Fast red*-positivas em 7 dias (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 49, Tabela 9).

ALP *in situ*

Figura 49. Proporção de áreas *Fast red*-positivas aos 7 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Aos 7 dias, bioquimicamente, culturas expostas ao CAC+Ca e CAC+CaBi exibiram maior atividade de ALP, seguidas por Controle e CAC+Bi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), com os menores valores para CAC+ ($p < 0,05$). Aos 10 dias, a maior atividade de ALP foi observada para CAC+ e CAC+Ca, seguidos por CAC+Bi, Controle e CAC+CaBi ($p < 0,05$; Figura 50, Tabela 9).

Figura 50. Atividade de ALP em 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Expressão de genes relacionados a diferenciação odontoblástica

Aos 7 dias, para todos os genes avaliados, os menores valores de expressão foram obtidos para o CAC+ (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Entre os demais grupos, maior expressão de Runx2 e BSP foi observada em culturas expostas ao CAC+CaBi e CAC+Bi, seguidos por Controle e CAC+Ca (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 51, Tabela 10). A expressão de OSX, ALP e DMP-1 variou pouco entre os grupos, sendo que apenas CAC+Ca exibiu menor expressão de ALP e CAC+Bi, de DMP-1 (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Aos 10 dias, maior expressão de OSX e ALP foram observadas em culturas expostas ao CAC+, não havendo diferenças entre os demais grupos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 51, Tabela 10). Os maiores níveis de Runx2 ocorriam em culturas Controle, enquanto que os de BSP, naquelas expostas ao CAC+ e CAC+Ca. Em relação ao Controle, a expressão de DMP-1 foi superior para CAC+CaBi e CAC+Ca, e inferior para CAC+ e CAC+Bi (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 51, Tabela 10). Não foi observada expressão de DSPP nos dois períodos avaliados.

Figura 51. Expressão relativa de RNAm para os genes Runx2 (A), OSX (B), ALP (C), BSP (D) e DMP-1 (E) aos 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Formação de matriz mineralizada

Aos 14 dias, a marcação por ARS revelou a formação de discretos nódulos de mineralização distribuídos aleatoriamente por todo o substrato para todos os grupos, mais evidentes para Controle, CAC+Ca e CAC+CaBi (Figura 52A, C e E, compare com B e D). As culturas expostas a CAC+Ca e CAC+CaBi apresentavam área central destituída de marcação, enquanto que aquelas expostas a CAC+ e CAC+Bi mostravam fundo azulado uniforme (Figura 52B e D).

Figura 52. Aspectos macroscópicos da marcação por ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® (A) e expostas a preparações de CAC+ (B-E). Barra de escala = 3 mm.

Aos 14 dias, culturas Controle e expostas a CAC+Ca e CAC+CaBi exibiam os maiores valores de extração de ARS, seguidas por CAC+Bi e por CAC+ (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 53, Tabela 9).

Mineralização

Figura 53. Quantificação de ARS aos 14 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a preparações de CAC+. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 9. Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Apoptose celular	Viabilidade Celular				Atividade ALP in situ	Atividade ALP		Mineralização
	1 dia	1 dia	3 dias	7 dias	10 dias	7 dias	7 dias	10 dias	14 dias
Controle x CAC+	S	-	S	S	S	-	S	S	S
Controle x CAC+Ca	S	-	S	-	S	-	S	S	-
Controle x CAC+Bi	S	-	S	-	NS	-	NS	S	S
Controle x CAC+CaBi	NS	-	NS	-	S	-	S	S	NS
CAC+ x CAC+Ca	S	-	NS	S	S	-	S	NS	S
CAC+ x CAC+Bi	NS	-	S	S	S	-	S	S	S
CAC+ x CAC+CaBi	S	-	S	S	S	-	S	S	S
CAC+Ca x CAC+Bi	S	-	S	-	S	-	S	S	S
CAC+Ca x CAC+CaBi	S	-	S	NS	S	-	NS	S	-
CAC+Bi x CAC+CaBi	S	-	S	-	S	-	S	S	S
Valor de p	0,019	0,053	0,004	0,032	0,002	0,106	0,003	0,001	0,003

S: significância estatística

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.**Tabela 10.** Comparações múltiplas entre as amostras pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls

Comparações	Runx2		OSX		ALP		BSP		DMP-1	
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias
Controle x CAC+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Controle x CAC+Ca	S	S	-	S	S	-	NS	S	-	S
Controle x CAC+Bi	S	S	-	S	-	-	S	S	S	S
Controle x CAC+CaBi	S	S	-	S	-	-	S	S	NS	S
CAC+ x CAC+Ca	NS	S	S	S	NS	S	S	NS	S	S
CAC+ x CAC+Bi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAC+ x CAC+CaBi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAC+Ca x CAC+Bi	S	-	-	-	S	-	S	S	S	S
CAC+Ca x CAC+CaBi	S	-	NS	-	S	NS	S	S	-	NS
CAC+Bi x CAC+CaBi	NS	NS	-	NS	NS	-	NS	NS	S	S
Valor de p	0,003	0,003	0,003	< 0,001	0,006	0,011	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001

S: significante

NS: não significante

- : teste não realizado

* Os valores de *p* indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou diferentes aspectos da resposta biológica *in vitro* de células produtoras de matriz mineralizada a preparações de um novo cimento endodôntico à base de aluminato de cálcio. Em culturas de osteoblastos, apesar de a proximidade com as amostras de CAC+ e MTA resultar em morte celular, observaram-se, à distância, proliferação e viabilidade celulares e alteração na expressão de marcadores osteoblásticos, que precederam a mineralização da matriz extracelular. Na comparação entre CAC+ e MTA, aumentos na viabilidade celular, atividade de ALP e na expressão de marcadores de diferenciação foram observados em culturas expostas ao CAC+, o que não se reproduziu no mesmo padrão para células OD-21. Adicionalmente, demonstrou-se que os efeitos destes cimentos sobre parâmetros da osteogênese *in vitro* variaram de acordo com o período de exposição das culturas, sendo mais favoráveis durante sua fase proliferativa. Avaliando modificações de aditivos na formulação original do CAC+, o aumento no conteúdo de CaCl_2 resultou em maior liberação de Ca^{2+} , que correspondeu a maior diferenciação celular e formação de matriz mineralizada em culturas de osteoblastos e de células OD-21, e à redução de efeitos negativos da adição de óxido de bismuto sobre osteoblastos.

In vitro, os efeitos de cimentos endodônticos sobre a atividade celular têm sido estudados em queratinócitos (Oviir et al., 2006), fibroblastos gengivais (Bonson et al., 2004), macrófagos (Pereda et al., 2012), cementoblastos (Hakki et al., 2009), células osteoblásticas (Pérez et al., 2003; Perinpanayagam, 2009), odontoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (Moghaddame-Jafari et al., 2005), presentes nos diferentes tecidos que potencialmente entram em contato com o material. Além

disso, aspectos diferenciais das respostas de tipos celulares específicos frente a um mesmo estímulo têm sido descritas na literatura (Richert et al., 2008; Teixeira et al., 2009). Assim, para avaliar o impacto da exposição ao CAC+ sobre células ósseas, optou-se por um modelo de cultura primária de células osteogênicas, mais sensíveis do que linhagens celulares aos efeitos citotóxicos de cimentos endodônticos (Pérez et al., 2003) e cuja progressão resulta na formação de nódulos de matriz mineralizada semelhantes ao osso imaturo (Bellows et al., 1986; Nanci et al., 1996). Os efeitos do CAC+ foram também avaliados sobre células indiferenciadas da polpa dental, por representarem a população-alvo de procedimentos que visam ao reparo desse tecido. Neste caso, optou-se pela linhagem OD-21, de células mesenquimais indiferenciadas derivadas da papila dental de molares de camundongos, espontaneamente imortalizadas (Hanks et al., 1998) e capazes de promover a síntese e a mineralização da matriz extracelular *in vitro* (Musson et al., 2010; Semeghini et al., 2012; Pérard et al., 2013).

In vivo, os efeitos biológicos de cimentos à base de agregados minerais são decorrentes de sua dissolução superficial, com a liberação de íons que, por difusão pelo meio extracelular, atuam em diferentes tipos de células e de estágios de diferenciação, com potencial impacto no desenvolvimento de fenótipos teciduais específicos (Zhao et al., 2012; Matsumoto et al., 2013). No presente estudo, utilizamos o modelo experimental de exposição de amostras de cimentos às culturas celulares por meio de membranas de Transwell®. Essa estratégia, já utilizada por outros grupos de pesquisa para avaliação da citotoxicidade de cimentos odontológicos (Mantellini et al., 2003; Hernandez et al., 2005; Tani-Ishii et al., 2007; Koulaouzidou et al., 2008; Yasuda et al., 2008; Matsumoto et al. 2013), permite que componentes solúveis dos cimentos sejam liberados para o meio de cultura e se

difundam através da membrana, além de impedir o contato direto das células com as amostras (Yasuda et al., 2008), que inibe a viabilidade e o crescimento celulares (Camilleri et al., 2005; Castro-Raucci et al., 2011). Ainda assim, a maior concentração dos produtos de dissolução iônica dos cimentos próximo às amostras, favorecida pela ausência de circulação do meio de cultura nos intervalos de troca, resultou na ocorrência de área central desprovida de células, aumento da apoptose celular e redução da viabilidade e proliferação celulares durante os primeiros dias de cultura, particularmente para o MTA. Simultaneamente, concentrações iônicas decrescentes devem ter ocorrido com o distanciamento dos limites periféricos das amostras, reduzindo sua citotoxicidade e permitindo o crescimento celular e a expressão do fenótipo osteogênico. Saidon et al. (2003) observaram área de inibição do crescimento celular após a exposição de fibroblastos a preparações frescas de MTA sobre Transwell®, sugerindo que os altos valores de pH nas proximidades do cimento poderiam causar desnaturação de células e proteínas. Ainda, de acordo com Orrenius et al. (2003), níveis substancialmente elevados de cálcio podem ser citotóxicos, ocasionando morte celular por apoptose ou necrose. *In vivo*, a proximidade com o MTA resulta em necrose tecidual superficial após pulpotomia, evento que precede a formação de ponte de dentina (Kuratate et al., 2008). Para o CAC+, a inibição do crescimento celular em áreas adjacentes ao cimento foi observada *in vitro* (Castro-Raucci et al., 2011), mas não se publicaram ainda estudos avaliando *in vivo* os efeitos de sua exposição a tecidos dentais e periodontais.

Nas análises comparativas entre CAC+ e MTA, notaram-se diferenças importantes em alguns parâmetros avaliados, com estímulo à proliferação e diferenciação celulares após exposição ao CAC+. Isso provavelmente está

relacionado à dissolução iônica diferencial de componentes desses materiais, uma vez que maiores concentrações de alumínio e cálcio foram observadas após 48 h de exposição do meio de cultura ao CAC+, enquanto que a exposição ao MTA resultou apenas no aumento, em menor escala, dos níveis de cálcio. Esses resultados vão de encontro aos descritos na literatura (Oliveira et al., 2010; Aguilar, 2012; Oliveira et al., 2013), em que se demonstra que ambos os cimentos apresentam a capacidade de liberar íons Ca^{2+} e OH^- , alcalinizando o meio para valores próximos de 12, mas que para o CAC+, a liberação de Ca^{2+} é menor e o aumento do pH é mais lento e gradual. Essa dinâmica diferencial na liberação de Ca^{2+} e OH^- se deve aos diferentes compostos formados após hidratação dos materiais. Para o MTA, ocorre a formação de 1) hidróxido de cálcio, que se dissocia rapidamente e promove um grande aumento na concentração de Ca^{2+} e do pH do meio (Dammaschke et al., 2005), e 2) gel de silicato de cálcio hidratado (C-S-H), que fornece também Ca^{2+} e OH^- para o meio em taxa mais lenta (Camilleri, 2008). Para o CAC+, a hidratação promove a liberação de Ca^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e OH^- , seguidos pela precipitação de hidróxido de alumínio (AH), insolúvel em água, e hidratos de aluminato de cálcio (C-A-H), cuja decomposição resulta em aumento gradual do pH e das concentrações de Ca^{2+} (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2013). Uma das possíveis explicações para as discrepâncias entre os níveis de cálcio liberados por MTA e CAC+ neste estudo e aqueles descritos na literatura está no fato de a análise ter sido realizada após 48 h e, durante esse período, ter ocorrido a precipitação de camada de fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita pela supersaturação da solução (Tay et al, 2007; Oliveira et al., 2013), que se demonstrou ser maior para o MTA (Oliveira et al., 2013). Dessa forma, o consumo diferencial de cálcio e fósforo explicaria não somente a maior concentração de cálcio no meio exposto ao CAC+, mas também a redução dos

níveis de fósforo do meio de cultura exposto a ambos os cimentos (Camilleri et al., 2011).

Neste contexto, o aumento da viabilidade, proliferação celular e da atividade de ALP observados para o CAC+ poderiam ser atribuídos tanto à exposição das culturas ao cálcio como ao alumínio. Sabe-se que pequenos aumentos na concentração fisiológica extracelular de cálcio exibem efeito estimulador sobre a viabilidade, proliferação, diferenciação e função osteoblásticas (Dvorak et al., 2004; Narita et al., 2010; Beloti, Rosa, 2012). Além disso, o cálcio é considerado o elemento responsável pelos efeitos do MTA na indução ao desenvolvimento de fenótipos de tecidos mineralizados (Matsumoto et al., 2013). Por sua vez, baixas concentrações de alumínio, da ordem de μM , exibem efeito mitogênico (Lau et al., 1993), de aumento de atividade de ALP e da diferenciação de osteoblastos (Bellows et al., 1999). Com efeito, a exposição das culturas ao CAC+ promoveu, comparativamente ao MTA, aumento da expressão de Runx2, OSX, ALP, BSP e OC. A avaliação desses genes é importante para o estudo da osteogênese *in vitro* (Beck, 2003), pois, na medida em que esse processo se desenvolve, as células perdem a capacidade proliferativa e aumentam, sequencialmente, a expressão de marcadores de diferenciação (Aubin et al., 1995). A expressão de Runx2 promove a diferenciação de células mesenquimais em pré-osteoblastos capazes de expressar marcadores iniciais da osteogênese, como a ALP (Aubin et al., 1995; Bellows et al., 1999); a expressão de OSX caracteriza a sua diferenciação em osteoblastos maduros (Nakashima et al., 2002), os quais sintetizam OC e BSP, proteínas não-colágenas da matriz que modulam o processo de mineralização (Ducy et al., 1996; Zhang, 2012). No presente trabalho, embora nos primeiros 7 dias de cultivo tenha sido observado atraso na expressão dos marcadores de diferenciação em culturas

expostas a MTA e CAC+, provavelmente relacionado à alta citotoxicidade inicial desses materiais, a partir do 10º dia, as culturas exibiram aumento significativo de expressão gênica comparativamente ao Controle, com exceção para OPN; níveis mais elevados de fosfato poderiam explicar a maior expressão de OPN nas culturas controles (Beck et al., 2000). Apesar dos efeitos positivos sobre a atividade de ALP e expressão de marcadores osteoblásticos, a exposição aos cimentos não estimulou o evento final da osteogênese, ou seja, formação de nódulos de matriz mineralizada. Tendo em vista que nas condições *in vitro* não há renovação da população celular, estudos *in vivo* serão necessários para se verificar se o estímulo sobre a expressão gênica corresponderia a uma maior neoformação de tecidos mineralizados na região periapical.

Os resultados do presente trabalho também reforçam o conceito de que os efeitos da exposição aos cimentos MTA e CAC+ devem resultar das complexas interações entre as respostas de diferentes tipos celulares e estágios de diferenciação. Na literatura, por exemplo, há estudos que demonstram que, de fato, a proliferação e diferenciação de fenótipos celulares osteoblásticos distintos podem ser afetadas diferentemente frente à exposição a um mesmo estímulo (Schwartz et al., 2000). Com efeito, no experimento 2, foram observadas alterações significativas em parâmetros da osteogênese *in vitro* dependendo do estágio em que as culturas se encontravam no momento da exposição aos cimentos. De modo geral, o estímulo à expressão de marcadores osteoblásticos foi maior pela exposição das culturas durante sua fase proliferativa, sugerindo maior susceptibilidade de células menos diferenciadas aos efeitos promovidos pela dissolução iônica dos cimentos (Matsumoto et al., 2013; Seo et al., 2013), o que resultou no maior potencial osteogênico das culturas expostas ao CAC+, mas não ao MTA. Por outro lado, a

exposição aos cimentos na fase de diferenciação terminal de osteoblastos reduziu substancialmente a formação de nódulos de matriz mineralizada, sobretudo para o MTA, provavelmente pela redução da população de osteoblastos ativos e/ou sua função decorrentes da alta concentração de Ca^{2+} (Oliveira et al., 2010).

Com o objetivo de otimizar a formulação do CAC+ para aplicação clínica, duas modificações na composição do CAC+ foram propostas no presente estudo: a substituição do agente radiopacificador e o aumento do teor de CaCl_2 . Cimentos para aplicação em procedimentos endodônticos devem, necessariamente, apresentar radiopacidade suficiente para permitir sua distinção das estruturas anatômicas periféricas. Aguilar (2012) demonstrou que o óxido de bismuto confere melhor radiopacidade ao CAC+ em comparação ao óxido de zinco, além de melhorar seu efeito antibacteriano. Por outro lado, o aumento do teor de CaCl_2 no CAC+ poderia representar uma alternativa interessante para aumentar a liberação de Ca^{2+} (Bortoluzzi et al., 2006), que tem sido considerado responsável pelos efeitos biológicos positivos do MTA (Matsumoto et al., 2013). Após 48 h de exposição de meio de cultura aos cimentos, foi demonstrado que a adição de CaCl_2 resultou em maior liberação de Ca^{2+} pelas preparações de CAC+, com redução do conteúdo de fósforo no meio de cultura, o que sugere maior precipitação de compostos à base de fosfato de cálcio (Camilleri, 2011). Porém, estas preparações promoveram aumento significativo dos níveis de Al^{3+} no meio, o que deverá ser melhor investigado para se definir se o aumento do teor de CaCl_2 interfere na solubilidade do cimento, ou se a maior liberação de Ca^{2+} promovida por esse aditivo interfere na dinâmica de precipitação de compostos de Al^{3+} , aumentando sua disponibilidade no meio de cultura. Por outro lado, a substituição do óxido de zinco por óxido de bismuto em preparações de CAC+ reduziu a liberação de Al^{3+} para o meio, sendo esse efeito

ainda mais evidente em preparação com maior teor de CaCl_2 . Além disso, incorporação de óxido de bismuto às preparações de CAC+ resultou em efeitos diversos nos níveis de Ca^{2+} , reduzindo sua liberação na formulação original de CAC+ e promovendo um aumento ainda maior dos níveis deste íon em meio exposto à preparação com maior teor de CaCl_2 . Conjuntamente, esses achados sugerem que o bismuto pode interferir nos compostos formados após a hidratação do CAC+ e/ou na dinâmica de precipitação de componentes liberados pelo cimento, visto que este elemento apresenta maior eletronegatividade do que os demais componentes do cimento. No MTA, o óxido de bismuto promove aumento da porosidade e solubilidade do material (Camilleri et al., 2013), reduz a liberação de hidróxido de cálcio (Camilleri, 2011) e se liga ao complexo C-S-H (Camilleri et al., 2004; Camilleri, 2007), sendo retirado do material à medida que esse hidrato sofre dissolução no meio (Camilleri, 2007). Além disso, em cimento Portland, o óxido de bismuto prolonga significativamente o tempo de presa do material e reduz sua resistência à compressão (Coomaraswamy et al., 2007; Hungaro-Duarte et al., 2012; Camilleri et al., 2013). Os efeitos destes aditivos nas propriedades físico-químicas do CAC+ deverão ser considerados nas análises de caracterização desses materiais, que estão, atualmente, em desenvolvimento.

Em culturas primárias osteogênicas, o aumento do conteúdo de CaCl_2 na formulação original de CAC+ promoveu aumento da apoptose celular nas primeiras 24 h. Esses achados podem estar relacionados não apenas ao maior conteúdo de cálcio, mas também ao aumento da concentração de alumínio, que em concentrações na ordem 50 ppm promove estresse oxidativo e morte celular (Li et al., 2012). Contudo, o aumento deste aditivo não ocasionou prejuízo à viabilidade das culturas que, ao final de 7 dias, estavam confluentes e exibiam os maiores

valores de atividade de ALP e de expressão de marcadores osteoblásticos-chave, resultando em maior formação de matriz mineralizada. Por outro lado, a substituição de óxido de zinco por óxido de bismuto na formulação original do CAC+ teve impacto negativo sobre as culturas, reduzindo a viabilidade celular, os níveis de atividade de ALP e a expressão de marcadores osteoblásticos, efeitos que foram atenuados pela adição de maior teor de CaCl_2 . É importante ressaltar que, enquanto o bismuto tem sido relacionado à redução da biocompatibilidade do MTA por inibir proliferação, diferenciação osteoblástica e mineralização da matriz extracelular (Camilleri et al., 2004; Chiang et al., 2013), o zinco, presente na formulação original do CAC+, exibe efeito estimulador sobre a proliferação e diferenciação osteoblásticas (Gurban; Mederle, 2011; Yusa et al., 2011).

A análise dos efeitos do MTA e das diferentes preparações do CAC+ foi estendida a células OD-21. Diferentemente do que foi observado para osteoblastos, a exposição de células OD-21 ao CAC+, comparativamente ao MTA: 1) não afetou a apoptose celular; 2) reduziu a viabilidade das culturas a partir de 7 dias; 3) atrasou a expressão gênica de marcadores da diferenciação e a atividade de ALP, e 4) não favoreceu a formação de matriz mineralizada. Entre os fatores que poderiam explicar essas diferenças estão: 1) a presença de óxido de zinco na composição do CAC+, mas não do MTA, que tem sido relacionada à redução da expressão de genes relacionados à diferenciação odontoblástica, incluindo ALP, em culturas de células derivadas da polpa (Kobayashi et al., 2013; Oh et al., 2013), e 2) a maior liberação de Ca^{2+} das preparações de MTA, com efeitos reconhecidamente estimuladores dos processos de proliferação e diferenciação de células derivadas da polpa (Tada et al., 2010; Takita et al., 2006). Considerando as modificações propostas para os aditivos do CAC+, o aumento do teor de CaCl_2 promoveu os maiores valores de viabilidade

celular, de atividade de ALP, de expressão gênica e de formação de matriz mineralizada. Diferentemente do que se observou para osteoblastos, a substituição do óxido de zinco por óxido de bismuto apresentou efeito positivo sobre a viabilidade celular, atividade de ALP e expressão dos marcadores de diferenciação de células OD-21, sem favorecer, no entanto, a mineralização da matriz extracelular. Em células indiferenciadas da polpa, tem-se demonstrado que o óxido de bismuto estimula a expressão de heme-oxigenase 1 (Min et al., 2007b), a qual exibe efeito antiapoptótico (Fang et al., 2004) e ativa o crescimento e a diferenciação dessas células (Kim et al., 2010). Por fim, os aspectos negativos da resposta de células OD-21 à preparação original de CAC+, associados aos efeitos benéficos das alterações propostas em sua composição sobre células osteogênicas e OD-21, reforçam a importância do contínuo desenvolvimento de formulações de cimentos endodônticos, à semelhança do que ocorre para cimentos à base de aluminato de cálcio (Aminozarbian et al., 2012; Wei et al., 2012), com o intuito de otimizar sua aplicação em procedimentos que visam ao reparo da polpa dental e dos tecidos periapicais. Apesar dos efeitos positivos observados em resposta à exposição de células derivadas dos tecidos pulpar e ósseo a preparações de CAC+, sua validação como novo cimento dependeria, também, dos resultados de ensaios de genotoxicidade e de respostas teciduais *in vivo*. É importante ressaltar que a formulação de CAC+ que proporcionar os melhores efeitos biológicos deverá, também, exibir propriedades físico-químicas e de selamento adequadas para suas aplicações clínicas.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- 1) Comparativamente ao MTA, a formulação original de CAC+ favorece o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*, mas inibe a diferenciação de células OD-21;
- 2) Os efeitos da exposição à formulação original de CAC+ dependem do estágio de diferenciação osteoblástica, sendo mais benéficos sobre células em proliferação, não terminalmente diferenciadas;
- 3) O aumento do teor de CaCl_2 nas preparações de CAC+ resultou em aumento da disponibilização de Ca^{2+} e em efeito estimulador sobre a diferenciação de células osteogênicas e da linhagem OD-21;
- 4) A substituição de óxido de zinco por óxido de bismuto no CAC+ resulta em efeitos antagônicos sobre células osteogênicas (negativos) e OD-21 (positivos), sendo que a associação de óxido de bismuto a um maior teor de CaCl_2 proporciona efeitos positivos para ambas as culturas, potencialmente otimizando algumas propriedades do CAC+ para aplicação em procedimentos endodônticos, como material alternativo ao MTA.

7 REFERÊNCIAS

Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*. 2002 Oct;23(19):4001-10.

Aguilar FG, Garcia LF, Rossetto HL, Pardini LC, Pires-de-Souza FC. Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. *J Endod*. 2011 Jan;37(1):67-71.

Aguilar FG, Roberti Garcia LF, Panzeri Pires-de-Souza FC. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod*. 2012 Mar;38(3):367-71.

Aguilar, FG. Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do pH, liberação de íons cálcio e atividade microbiana [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2012.

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

Aminozarbian MG, Barati M, Salehi I, Mousavi SB. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate and three new endodontic cements: An animal study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Jan;9(1):54-9.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate *J Endod*. 2005 Feb;31(2):101-3.

Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a new endodontic material J Endod. 2008 Aug;34(8):990-3.

Assed A. Odontopediatria: Bases científicas para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta A. Quantitative polymerase chain reaction (PCR): potential applications of poly(A) PCR on samples of limited cell number. Calcif Tissue Int. 1995;56 Suppl 1:S54-6.

Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul;97(15):8352-7.

Beck GR Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. J Cell Biochem. 2003 Oct;90(2):234-43.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int. 1986 Mar;38(3):143-54.

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Aluminum accelerates osteoblastic differentiation but is cytotoxic in long-term rat calvaria cell cultures. Calcif Tissue Int. 1999 Jul;65(1):59-65.

Belobrov I, Parashos P. Treatment of tooth discoloration after the use of white mineral trioxide aggregate. J Endod. 2011 Jul;37(7):1017-20.

Belobrov I, Weis MV, Parashos P. Conservative treatment of a cervical horizontal root fracture and a complicated crown fracture: a case report. Aust Dent J. 2008 Sep;53(3):260-4.

Beloti MM, Rosa AL. Sinalização de cálcio em células ósseas. In: Resende RR, Guatimosim S, Leite MF. Sinalização de cálcio: bioquímica e fisiologia celulares. São Paulo: Savier; 2012. p.356-371.

Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. J Dent Res. 2004 May;83(5):408-13.

Bortoluzzi EA, Araújo GS, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Marginal gingiva discoloration by gray MTA: a case report. J Endod. 2007 Mar;33(3):325-7.

Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. J Endod. 2009 Apr;35(4):550-4.

Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. J Endod. 2006 Sep;32(9):897-900.

Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. Int Endod J. 2005 Nov;38(11):834-42.

Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2004 Oct;37(10):699-704.

Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater*. 2013 May;29(5):580-93.

Camilleri J. Evaluation of the effect of intrinsic material properties and ambient conditions on the dimensional stability of white mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):239-45.

Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007 Jun;40(6):462-70.

Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008 Oct;11(4):141-3.

Castro-Raucci LM, Oliveira IR, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J*. 2011;22(2):99-104.

Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluhak-Heinrich J et al. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem*. 2005 Aug;280(33):29717-27.

Chiang T, Wei C, Ding S. Effects of bismuth oxide on physicochemical properties and osteogenic activity of dicalcium silicate cements. *J Med Biol Eng*. 2013 Mar 5; [epub ahead of print].

Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. J Endod. 2007 Mar;33(3):295-8.

Da Silva RA, Leonardo MR, Da Silva LA, De Castro LM, Rosa AL, De Oliveira PT. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0.4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype *in vitro*. J Endod. 2008 Dec;34(12):1485-9.

Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. Dent Mater. 2005 Aug;21(8):731-8.

Dantas RV, Conde MC, Sarmento HR, Zanchi CH, Tarquinio SB, Ogliari FA, Demarco FF. Novel experimental cements for use on the dentin-pulp complex. Braz Dent J. 2012;23(4):344-50.

De Oliva MA, Maximiano WM, De Castro LM, Da Silva PE JR, Fernandes RR, Ciancaglini P, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. J Histochem Cytochem. 2009 Mar;57(3):265-76.

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 2004 Feb;25(3):403-13.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. J Biomed Mater Res A. 2007 Mar;80(3):554-64.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003 May;51(5):633-41.

Deller-Quinn M, Perinpanayagam H. Osteoblast expression of cytokines is altered on MTA surfaces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Aug;108(2):302-7.

Do Nascimento C, Issa JP, Iyomasa MM, Regalo SC, Siéssere S, Pitol DL et al. Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. *Micron*. 2008 Oct;39(7):868-74.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996 Aug;382(6590):448-52.

Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr;101(14):5140-5.

Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *Int Endod J*. 2003 Jan;36(1):44-8.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*. 1995;6(2):85-90.

Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment Apoptosis. 2004 Jan;9(1):27-35.

Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2013 Feb 26; [Epub ahead of print].

Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R et al. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Nov;87(2):477-86.

Garcia LD, Aguilar FG, Rossetto HL, Sabino MG, Pires-de-Souza FD. Staining susceptibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder) in teeth: a 1-year *in vitro* study. *Dent Traumatol*. 2012 Oct 16; [Epub ahead of print].

Garcia LFR, Aguilar FG, Sabino MG, Rossetto HL, Panzeri Pires de-Souza FC. Mechanical and microstructural characterisation of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *Advances in Applied Ceramics*. 2011 Nov;110(8): 469-475.

Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol*. 2012 Feb;28(1):33-41.

Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am*. 1992 Apr;36(2):357-78.

Glickman GN, Koch KA. 21st-century endodontics. *J Am Dent Assoc*. 2000 Jun;131 Suppl:39S-46S.

Goldberg HA, Hunter GK. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Apr;760:305-8.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004 Jun;329(1):77-84.

Grotra D, Subbarao C V. Bioactive materials used in endodontics. *Recent Research in Science and Technology.* 2012;4(6): 25-27.

Gurban CV, Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(3 Suppl):1113-9.

Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod.* 2009 Apr;35(4):513-9.

Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process *in vitro*. *Eur J Biochem.* 2003 May;270(9):2082-90.

Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998;37(3-4):233-49.

Hashiguchi D, Fukushima H, Yasuda H, Masuda W, Tomikawa M, Morikawa K, et al. Mineral trioxide aggregate inhibits osteoclastic bone resorption. *J Dent Res.* 2011;90(7):912-7.

Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. *Int Endod J.* 2005 Feb;38(2):137-43.

Higueta-Castro N, Gallego-Perez D, Pelaez-Vargas A, García Quiroz F, Posada OM, López LE et al. Hansford DJ. Reinforced Portland cement porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering applications. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2012;100B: 501-07.

Holland R, De Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide or calcium hydroxide. J Endod. 1999 Mar;25(3):161-6.

Hungaro-Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M et al., Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. J Endod. 2012 Mar;38(3):394-7.

Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep;90(18):8562-5.

Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. Anat Rec. 1998 Dec;252(4):554-67.

Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an *in vitro* analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Jul;108(1):140-4.

Katsamakakis S, Slot DE, Van der Sluis LW, Van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. J Clin Periodontol. 2013 Apr;40(4):334-44.

Kim SJ, Min KS, Ryu HW, Lee HJ, Kim EC. The role of heme oxygenase-1 in the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1326-31.

Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno M, Higo Y, Inaba T et al. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology*. 2013 Jan;101(1):43-51.

Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*. 2006 Jun;32(6):569-72.

Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 1998 Aug;24(8):543-7.

Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 1997 Dec;37(3):432-9.

Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci*. 2008 Dec;50(4):397-402.

Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):970-4.

Lau KH, Utrapiromsuk S, Yoo A, Mohan S, Strong DD, Baylink DJ. Mechanism of mitogenic action of aluminum ion on human bone cells: potential involvement of the insulin-like growth factor regulatory system. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Jun;303(2):267-73.

Lee YL, Lee BS, Lin FH, Lin AY, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate Biomaterials. 2004 Feb;25(5):787-93.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Nov;102(5):680-5.

Li X, Han Y, Guan Y, Zhang L, Bai C, Li Y. Aluminum induces osteoblast apoptosis through the oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. Biol Trace Elem Res. 2012 Dec;150(1-3):502-8.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.

Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD et al. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition *in vivo*. Dev Biol. 2007 Mar;303(1):191-201.

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. J Orthop Res. 1997 Jul;15(4):546-57.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. J Dent Res. 2003 Aug;82(8):592-6.

Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys. 2008 May;473(2):98-105.

Matsumoto S, Hayashi M, Suzuki Y, Suzuki N, Maeno M, Ogiso B. Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage. J Endod. 2013 Jan;39(1):68-75.

Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Sep;98(3):376-9.

Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. J Endod. 2007 Nov;33(11):1342-6. B

Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement *in vitro*. J Endod. 2007 Feb;33(2):163-6. A

Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. Biomaterials. 1999 Jan;20(2):167-73.

Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro*. J Endod. 2005 May;31(5):387-91.

Montaser A, Golightly DW. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, New York: VCH Publishers, 1992.

Moretti ABS. Estudo clínico, radiográfico, e microscópico dos efeitos do formocresol de Buckley diluído a 1/5, hidróxido de cálcio PA e agregado de trióxido mineral (MTA) em pulpotomias de dentes decíduos humanos [Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2008.

Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec;52(3):528-33.

Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci*. 2006 Jun;114(3):216-22.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec;65(1-2):55-63.

Musson DS, McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Adrenomedullin is expressed during rodent dental tissue development and promotes cell growth and mineralization. *Biol Cell*. 2010 Jan;102(3):145-57.

Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Ther*. 2002 Jun;9(12):814-8.

Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J*. 2005 Apr;38(4):203-10.

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech*. 1996 Feb;33(2):214-31.

Narita H, Itoh S, Imazato S, Yoshitake F, Ebisu S. An explanation of the mineralization mechanism in osteoblasts induced by calcium hydroxide. *Acta Biomater*. 2010 Feb;6(2):586-90.

Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1428-34.

Obeid M, Saber Sel D, Ismael Ael D, Hassanien E. Mesenchymal Stem Cells Promote Hard-tissue Repair after Direct Pulp Capping *J Endod*. 2013 May;39(5):626-31.

Oh HJ, Lee HK, Park SJ, Cho YS, Bae HS, Cho MI, Park JC. Zinc balance is critical for NF- κ B mediated regulation of odontoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2012 Mar;113(3):877-87.

Oliveira IR, Andrade TL, Jacobovitz M, Pandolfelli VC. Bioactivity of Calcium Aluminate Endodontic Cement. *J Endod*. 2013; [Epub ahead of print].

Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int Endod J*. 2010 Dec;43(12):1069-76.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):552-65.

Oviir T, Pagoria D, Ibarra G, Geurtsen W. Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. *J Endod*. 2006 Mar;32(3):210-3.

Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Jacobovitz M. A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product, Patente registration INPI 0704502-6. 2007 (in Portuguese).

Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1691-5.

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

Pérard M, Le Clerc J, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Mar 21; [Epub ahead of print].

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

Pérez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. *Int Endod J*. 2003 Aug;36(8):564-70.

Perinpanayagam H. Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J Can Dent Assoc*. 2009 Jun;75(5):369-72.

Queiroz AM, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LA. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci.* 2005 Jun;13(2):126-30.

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

Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement on dentin enhances the push-out strength. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):286-91.

Richert L, Vetrone F, Yi JH, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, et al. Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv Mater* 2008 Apr;15:1–5.

Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr;95(4):483-9.

Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):97-100.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22.

Schwartz Fo HO, Novaes AB Jr, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. *In vitro* osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Jun;18(3):333-44.

Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. J Am Dent Assoc. 1999 Jul;130(7):967-75.

Schwartz Z, Carnes DL Jr, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. J Periodontol. 2000 Aug;71(8):1287-96.

Semeghini MS, Fernandes RR, Chimello DT, de Oliveira FS, Bombonato-Prado KF. *In vitro* evaluation of the odontogenic potential of mouse undifferentiated pulp cells. Braz Dent J. 2012;23(4):328-36.

Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells J Endod. 2013 Feb;39(2):242-8.

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells *in vitro* in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol. 1991;36(2):117-28.

Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. J Endod. 1999 Jan;25(1):1-5.

Shahravan A, Jalali SP, Torabi M, Haghdoost AA, Gorjestani H. A histological study of pulp reaction to various water/powder ratios of white mineral trioxide aggregate as pulp-capping material in human teeth: a double-blinded, randomized controlled trial. Int Endod J. 2011 Nov;44(11):1029-33.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sep;32(5):361-9.

Silva EJ, Herrera DR, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J*. 2012 Sep;45(9):815-20.

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J*. 2007 Mar;40(3):186-97.

Subay RK, Ilhan B, Ulukapi H. Mineral trioxide aggregate as a pulpotomy agent in immature teeth: Long-term case report. *Eur J Dent*. 2013 Jan;7(1):133-8.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1165-75.

Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 16;394(4):1093-7.

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

Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. J Endod. 2007 Jul;33(7):836-9.

Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. J Endod. 2007 Nov;33(11):1347-51.

Teixeira LN. Regeneração tecidual guiada: estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário. [Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2009.

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

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

Unal GC, Maden M, Isidan T. Repair of Furcal Iatrogenic Perforation with Mineral Trioxide Aggregate: Two Years Follow-up of Two Cases. Eur J Dent. 2010 Oct;4(4):475-81.

Viola NV; Tanomaru-Filho M, Cerri PS. MTA versus Portland cement: review of literature RSBO. 2011 Oct-Dec;8(4):446-52.

Wang H, Kawashima N, Iwata T, Xu J, Takahashi S, Sugiyama T et al. Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul;398(3):406-12.

Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Messer RL, Mao J et al. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):936-42.

White C Jr, Bryant N. Combined therapy of mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in the treatment of external root resorption and an associated osseous defect. *J Periodontol*. 2002 Dec;73(12):1517-21.

Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2007 Oct;33(10):1235-8.

Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an *in vitro* study. *J Endod*. 2008 Sep;34(9):1057-60.

Yusa K, Yamamoto O, Fukuda M, Koyota S, Koizumi Y, Sugiyama T. *In vitro* prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 26;412(2):273-8.

Zhang C. Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012 Oct 18;44(5):659-65.

Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):215-20.

Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K et al. Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. *Biochem J*. 2007 Jul 1;405(1):69-75.

Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod*. 2000 Jul;26(7):404-6.

8 APÊNDICE

8.1 Integridade do RNA

A integridade do RNA ribossômico (RNAr) obtido das culturas expostas aos diferentes cimentos testados foi verificada previamente aos ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real, pela visualização de duas subunidades ribossômicas características dos eucariotos (18S e 28S).

8.1.1 Experimento 1

Figura 54. Ensaio de integridade de RNAr extraído aos 4, 7, 10 e 12 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+.

8.1.2 Experimento 2

Figura 55. Ensaio de integridade de RNAr extraído aos 10 dias, de culturas de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos, crescidas sobre Thermanox® e expostas a amostras de MTA ou CAC+ em diferentes períodos da cultura.

8.1.3 Experimento 3

Figura 56. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas de células osteogênicas crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+.

8.1.4 Experimento 4

Figura 57. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas de células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a MTA ou CAC+.

8.1.5 Experimento 5

Figura 58. Ensaio de integridade de RNAr extraído em 7 e 10 dias de culturas células indiferenciadas da polpa crescidas sobre Thermanox® e expostas a diferentes preparações de CAC+.

8.2 Estudo preliminar da resposta de culturas osteogênicas ao cimento CAC+

Braz Dent J (2011) 22(2): 99-104

ISSN 0103-6440

Effects of a Novel Calcium Aluminate Cement on the Early Events of the Progression of Osteogenic Cell Cultures

Larissa Moreira Spinola de CASTRO-RAUCCI¹

Ivone Regina de OLIVEIRA²

Lucas Novaes TEIXEIRA¹

Adalberto Luiz ROSA¹

Paulo Tambasco de OLIVEIRA¹

Marcos JACOBVITZ³

¹Ribeirão Preto Dental School, USP - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²UFSCar - Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

³APCD - The São Paulo State Dental Association, São Carlos, SP, Brazil

The present study evaluated the progression of osteogenic cell cultures exposed to a novel calcium aluminate cement (CAC+) in comparison with the gold standard mineral trioxide aggregate (MTA). Cells were enzymatically isolated from newborn rat calvarial bone, plated on glass coverslips containing either CAC+ or a control MTA samples in the center, and grown under standard osteogenic conditions. Over the 10-day culture period, rounding of sample edges was clearly noticed only for MTA group. Although both cements supported osteogenic cell adhesion, spreading, and proliferation, CAC+-exposed cultures showed significantly higher values in terms of total cell number at days 3 and 7, and total protein content and alkaline phosphatase activity at day 10. The present *in vitro* results indicate that the exposure to CAC+ supports a higher differentiation of osteogenic cells compared with the ones exposed to MTA. Further experimental studies should consider CAC+ as a potential alternative to MTA when the repair of mineralized tissues is one of the desired outcomes in endodontic therapy.

Key Words: calcium aluminate cement, mineral trioxide aggregate, cell culture, osteoblast, alkaline phosphatase.

INTRODUCTION

The cellular response to mineral trioxide aggregate (MTA) is already well established in the literature. Several *in vitro* and *in vivo* studies concerning cell and tissue interactions with MTA have demonstrated its biocompatible nature (1-4). Despite that, MTA presents some negative characteristics, such as sandy consistency (poor handling characteristics), poor dispersion, high porosity (5), long setting time, tooth and gingival darkening (6), initial solubility when used as a root-end filling material (7), and high cost. Therefore, changes in formulation/composition of mineral aggregates and development of new branches on this class of materials have been proposed aiming to improve its physical-chemical characteristics (5,8,9).

In this context, Pandolfelli et al. (5) developed a novel calcium aluminate cement composed by Al_2O_3 (68.5 wt%) and CaO (29.5 wt%) plus additives (hereafter referred to as CAC+). Such cement was designed to overcome some negative MTA characteristics by shortening setting time, reducing porosity and pore sizes, improving strength under compressive loads, promoting flow ability and reducing stain ability, while maintaining the satisfactory properties and clinical applications that MTA preparations provide (10).

The physical-chemical properties of CAC+ in comparison with the gold standard MTA have recently been described (11). In addition, the forming chemical-mechanical barrier against bacterial microleakage may attest the possibility for its multipurpose use in Endodontics (12). However, the impact of the exposure

Correspondence: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira / Dr. Marcos Jacobovitz, Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, Avenida do Café, S/N, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Tel: +55-16-3602-3978. Fax: +55-16-3633-0999. e-mail: tambasco@usp.br

of CAC+ to mineralized tissue-forming cells remains to be assessed. Thus, the present *in vitro* study evaluate comparatively the effects of both mineral aggregate cements, MTA and CAC+, on early events of the progression of osteogenic cell cultures.

MATERIAL AND METHODS

MTA and CAC+ Sample Preparation

The mineral aggregates used were: White-MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) and CAC+ (5). Both cement pastes were handled with sterile water in a proportion of 3 parts of powder to one part of bi-distilled water in volume, according to the manufacturer instructions. Then, MTA and CAC samples (4 mm in diameter and 2 mm height) were forged in a silicon mold, and after the final set 21 days later, the samples were detached from it and weighted. The sample mass was approximately 40 mg (39.9 ± 3.7). Then, each sample was glued with a cyanoacrylate gel (Loctite, Henkel Technologies, Diadema, SP, Brazil) to the center of a round glass coverslip, 12 mm in diameter (Fisher Scientific Inc., Suwanee, GA, USA). The ensembles (sample + glass coverslip) were then sterilized by gamma rays (Embrarad, Cotia, SP, Brazil) and placed in 24-well polystyrene plates (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) for cell culture experiments. The effect of cyanoacrylate on cell proliferation/viability was evaluated in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells (ATCC, Manassas, VA, USA) by means of MTT assay (described below).

Cell Isolation and Primary Culture of Osteogenic Cells

Osteogenic cells were isolated by sequential trypsin/collagenase digestion of calvarial bone from newborn (2-4 days) Wistar rats, as previously described (13). All animal procedures were in accordance with the guidelines of the Animal Research Ethics Committee of the University of São Paulo. Cells were plated on glass coverslips with either a MTA or a CAC+ sample at a cell density of 20,000 cells/well. The osteogenic culture medium comprised of Gibco α -Minimum Essential Medium with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 7 mM β -glycerophosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5 μ g/mL ascorbic acid (Sigma), and 50 μ g/mL gentamicin (Invitrogen). The plated cells were grown for periods up to 10 days at 37 °C in a humidified

atmosphere with 5% CO₂. The culture medium was changed every 2-3 days. The progression of cultures was examined by phase contrast microscopy (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Cell Morphology

At days 3 and 7, cells were fixed for 10 min at room temperature (RT) using 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), pH 7.2. After washing in PB, cultures were processed for direct fluorescence labeling (13). Briefly, they were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PB for 10 min and incubated with Alexa Fluor 488 (green fluorescence)-conjugated phalloidin (1:200, Molecular Probes, Invitrogen) for 50 min at RT in a humidified environment, for the detection of actin cytoskeleton and cell periphery. Between each incubation step, the samples were washed in PB (3 x 5 min). Before mounting for microscope observation, samples were briefly washed with dH₂O and cell nuclei stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) for 5 min. After carefully detaching MTA or CAC+ samples, the glass coverslips were placed face down on glass slides and mounted with Vectashield antifade (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The samples were then examined under epifluorescence using a Leica DMLB light microscope (Leica, Bensheim, Germany), with N Plan (X10/0.25, X20/0.40) and HCX PL Fluotar (X40/0.75) objectives, outfitted with a Leica DC 300F digital camera, 1.3 Megapixel CCD. The acquired digital images were processed with Adobe Photoshop software (version 7.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Total Cell Number

Cells grown for periods of 3 and 7 days were enzymatically detached from glass coverslips using 1.3 mg/mL collagenase and 0.25% trypsin solution (Gibco, Invitrogen). Total number of cells/well was determined after Trypan blue (Sigma) staining using a hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA).

Cell Proliferation/Viability

Cell proliferation/viability was evaluated by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay at days 3, 7 and 10 (14). Cells were incubated with 10% MTT (5 mg/mL) in culture

medium at 37 °C for 4 h. The medium was then aspirated from the well, and 1 mL of acid isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was added to each well. The plates were then stirred on a plate shaker for 5 min, and 200 µL of this solution was transferred to a 96-well format using opaque-walled transparent-bottomed plates (Fisher Scientific Inc.). Optical density was read at 570 nm on the plate reader (µQuant; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA), and data were expressed as absorbance.

Total Protein Content and Alkaline Phosphatase Activity

Total protein content was determined at day 10 by using a modification of the Lowry method (13). Briefly, proteins were extracted from each well with 0.1% sodium lauryl sulphate (Sigma) for 30 min and mixed 1:1 with Lowry solution (Sigma) for 20 min at RT. The extract was diluted in Folin and Ciocalteu's phenol reagent (Sigma) for 30 min at RT. Absorbance was measured at 680 nm using a spectrophotometer (Cecil CE3021, Cambridge, UK). The total protein content was calculated from a standard curve and expressed as µg/mL.

Alkaline phosphatase (ALP) activity was assayed in the same lysates used for determining total protein content as the release of thymolphthalein from thymolphthalein monophosphate by using a commercial kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil). Briefly, 50 µL of thymolphthalein monophosphate were mixed with 0.5 mL of 0.3 M diethanolamine buffer, pH

10.1, and left for 2 min at 37 °C. The solution was then added to 50 µL of the lysates obtained from each well for 10 min at 37 °C. For color development, 2 mL of 0.09 M Na₂CO₃ and 0.25 M NaOH were added. After 30 min, absorbance was measured using a spectrophotometer (CE3021) at 590 nm and ALP activity was calculated from a standard curve using thymolphthalein to give a range from 0.012 to 0.4 µmol thymolphthalein/h/mL. Data were expressed as ALP activity normalized for total protein content. Some cultures were also stained with Fast red, as described elsewhere (15), for *in situ* histochemical detection of ALP activity.

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± SD. Comparisons were carried out using either two-way analysis of variance or Student's t-test for two independent samples, where appropriate. The significance level was set at 5%.

RESULTS

Results for total cell number, cell viability, total protein content, and ALP activity of the osteogenic cell cultures under the tested conditions are given on Table 1.

Although MTA and CAC+ samples remained fixed in the central area of the glass coverslips during the whole culture period, CAC+ samples appeared to be more stable than the MTA ones. Importantly, rounding of sample edges was clearly noticed only for MTA group.

At day 3, epifluorescence revealed well-spread, adherent cells for both groups, mostly exhibiting a polygonal shape (Fig. 1A,B). Cells with typical morphologies of migrating cells on two-dimensional substrates and cells undergoing mitosis could also be observed. At day 7, whereas cell confluence occurred for both groups, a larger area with no cells (inhibition zone) could be observed circumjacent to MTA samples (Fig. 1, compare C with D). In addition, a higher cell density was clearly noticed for CAC+ group (Fig. 1, compare F with E). The presence of CAC+ samples supported the differentiation of more Fast red-stained cells and with a higher staining intensity, mostly in areas of initial cell multilayering (Fig. 1, compare H with G).

Table 1. Quantitative analysis (mean ± SD) of total cell number (x10⁴), cell viability (absorbance, 570-650 nm), total protein content (µg/mL), and alkaline phosphatase (ALP) activity (µmol thymolphthalein/h/mg protein) of osteogenic cell cultures grown in the presence of either MTA or CAC+.

Parameters	Time points (days)	MTA	CAC+	Significance level
Total cell number	3	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	p = 0.001
	7	5.5 ± 0.1	7.7 ± 1.6	p = 0.048
Cell viability	3	0.017 ± 0.007	0.024 ± 0.007	p > 0.05
	7	0.107 ± 0.046	0.111 ± 0.025	p > 0.05
	10	0.103 ± 0.042	0.158 ± 0.050	p > 0.05
Total protein content	10	21.5 ± 2.2	36.9 ± 3.6	p = 0.001
ALP activity	10	0 ± 1.9	12.6 ± 3.1	p = 0.001

At 3 and 7 days, the total cell number was significantly higher for cultures exposed to CAC+ (Student's t-test, $p = 0.001$ and $p = 0.048$, respectively) (Fig. 2A). MTT assay showed that cell proliferation/viability was affected by the culture period (3 day < 7 days = 10 days), but not by the experimental group (two-way

ANOVA, $p = 0.001$ and $p = 0.132$, respectively) (Fig. 2B). In addition, exposure to cyanoacrylate only did not affect MC3T3-E1 cell proliferation/viability (not shown). At day 10, total protein content and ALP activity was significantly higher (Student's t-test, $p = 0.001$) for cultures grown in the presence of CAC+ samples (Fig. 3A,B).

Figure 1. Calvaria-derived osteogenic cell cultures grown on glass coverslips in the presence of either MTA (A,C,E,G) or CAC+ (B,D,F,H) samples at days 3 (A,B) and 7 (C-H). At day 3, epifluorescence of actin cytoskeleton labeling (phalloidin labeling, green fluorescence) and DNA stain (DAPI, blue fluorescence) showed well-spread, adherent cells for both groups, mostly exhibiting a polygonal shape (A,B). At day 7, whereas primary cultures reached confluence for both groups, a larger area with no cells could be observed adjacent to the MTA sample (compare C with D); a higher cell density was clearly evident for the CAC+ group (compare F with E). Asterisks indicate sites where the cement samples were located (C-F). *In situ* alkaline phosphatase activity was significantly higher for cultures grown in the presence of CAC+ compared with MTA (compared H with G; G,H: transmitted light; G,H insets: epifluorescence).

DISCUSSION

The present study showed that exposure to CAC+ supports the progression of a higher number of cells with a more differentiated osteoblastic phenotype compared with MTA. Indeed, significantly higher values in terms of total cell number, protein content, and ALP activity were detected for CAC+-exposed cultures. These results were supported by morphologic and histochemical findings.

One possible explanation for the changes observed between CAC+ and MTA-exposed cultures could be related to the differences in terms of calcium hydroxide release from the cement preparations, which has been determined to be lower for CAC+ compared with MTA (5,11). Noteworthy, during the whole culture interval, the edges of CAC+ samples were sharper than the MTA ones, suggesting lower dissolution rate and ultimately lower calcium hydroxide release for CAC+ cement under the culture conditions used. In addition, because of the dissociation of calcium hydroxide in the culture medium, differences in calcium and hydroxyl concentrations between groups should

also take place. Whereas slightly higher extracellular calcium concentration than physiological values has been shown to stimulate osteoblast cell viability, proliferation, differentiation, and function (16), cellular calcium overload can cause cytotoxicity and trigger either apoptotic or necrotic cell death (17). Concerning the hydroxyl ion concentration, its higher levels have been directly correlated with altered extracellular matrix organization, reduced ALP activity, and bone-like nodule formation in osteogenic cell cultures (18).

In the present study, the exposure to CAC+ samples allowed the progression of a higher cell population density with higher ALP activity compared with MTA, as judged by the biochemical measurements and Fast red staining. Although the role of ALP in bone formation is still not fully understood and subjected to controversies, such enzyme has been routinely used as an early marker of osteoblast differentiation (19). During bone matrix mineralization, ALP generates the inorganic phosphate needed for hydroxyapatite crystallization and might also hydrolyze pyrophosphate, a mineralization inhibitor, to facilitate mineral precipitation and growth (20).

The stoichiometric relation between calcia and alumina inherent to calcium aluminate cement preparations, which is the base of CAC+ composition,

Figure 2. Total cell number of calvaria-derived osteogenic cells grown on glass coverslips in the presence of either MTA or CAC+ samples at days 3 and 7 (A). A significantly higher number of cells were detected for CAC+ group. Cell proliferation/viability of calvaria-derived osteogenic cells grown on glass coverslips in the presence of either MTA or CAC+ samples at days 3, 7 and 10 (B). Although cell proliferation/viability was affected by the culture period, no significant differences between MTA and CAC+ were detected. Data are reported as mean $\pm$ SD.

Figure 3. Total protein content (A) and ALP activity (B) of calvaria-derived osteogenic cells grown on glass coverslips in the presence of either MTA or CAC+ samples at day 10. Significantly higher values were detected for cultures grown in the presence of CAC+. Data are reported as mean $\pm$ SD.

renders tailoring of calcium hydroxide leaching as a possible production route. Based on this aspect, different calcium aluminate-based endodontic cement formulations could be designed with various levels of calcium hydroxide release adequate for different potential applications in endodontic therapies, depending on the need for either a more physiological pH (i.e. pulpotomy) or a more alkaline environment (i.e. alkalinity shock for dental trauma approaches).

In conclusion, the present *in vitro* results demonstrated that the exposure of primary osteogenic cell cultures to CAC+ samples could be more suitable for the early differentiation of a higher osteoblastic cell population compared with the cultures exposed to MTA. Therefore, this novel calcium aluminate cement should be considered as an alternative to MTA cement preparations in root canal therapy, especially when mineralized tissue repair and/or regeneration is a desired outcome.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão de cultura de células osteogênicas expostas a um novo cimento de aluminato de cálcio (CAC+) em comparação ao agregado de trióxido mineral (MTA). As células foram obtidas por digestão enzimática de calvária de ratos recém-nascidos, plaqueadas sobre laminulas de vidro contendo em sua área central discos de CAC+ ou MTA e crescidas em condições osteogênicas por até 10 dias. Durante a cultura primária, observou-se o arredondamento das bordas das amostras de cimento apenas para MTA. Embora ambos os cimentos tenham permitido a adesão, o espraio e a proliferação celulares, as culturas crescidas em contato com CAC+ exibiram valores maiores de número total de células em 3 e 7 dias, e de conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina em 10 dias. Os resultados indicam que a exposição ao CAC+ permite o desenvolvimento de uma proporção maior de células em estágios mais avançados da diferenciação osteoblástica, quando comparado ao MTA. Deve-se considerar em futuros estudos experimentais a utilização do CAC+ como um material alternativo ao MTA especialmente quando um dos objetivos do tratamento endodôntico é o de reparação dos tecidos mineralizados da região periapical.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil). Larissa Moreira Spinola de Castro-Raucci is the recipient of a Doctoral scholarship from FAPESP. Lucas Novaes Teixeira was the recipient of a scholarship from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil). The authors thank Roger Rodrigo Fernandes (Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo) for technical assistance and Embrarad for sterilization of cement samples.

REFERENCES

1. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;24:543-547.
2. Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20:167-173.
3. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 2000;26:404-406.
4. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. *J Endod* 2006;32:872-875.
5. Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Jacobovitz M. A composition based on aluminate cement for application in endodontics and the obtained cement product. Patent registration INPI 0704502-6. Assignee: Fundação Universidade Federal de São Carlos, November 29, 2007 (in Portuguese).
6. Jacobovitz M, de Lima RKP. Treatment of inflammatory internal root resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *Int Endod J* 2008;41:905-912.
7. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007;33:1231-1234.
8. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, et al. Mineral trioxide aggregate with or without calcium chloride in pulpotomy. *J Endod* 2008;34:172-175.
9. Camilleri J. Characterization and chemical activity of Portland cement and two experimental cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J* 2008;41:791-799.
10. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
11. Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Int Endod J* 2010;43:1069-1076.
12. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BPFA. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: An "in vitro" analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:140-144.
13. De Oliva MA, Maximiano WM, de Castro LM, da Silva PE Jr, Fernandes RR, Ciancaglini P, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem* 2009;57:265-276.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
15. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 1997;15:546-57.
16. Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5140-5145.
17. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:552-565.
18. Hosoya S, Suzuki H, Yamamoto M, Kobayashi K, Abiko Y. Alkaline phosphatase and type I collagen gene expressions were reduced by hydroxyl radical-treated fibronectin substratum. *Mol Genet Metab* 1998;65:31-34.
19. Karsenty G. Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. *Front Biosci* 1998;3:d834-d837.
20. Bonucci E. Main suggested calcification mechanisms: cells. In: *Biological calcification: normal and pathological processes in the early stages*. Berlin-Heidelberg: Springer 2007:491-506.

Accepted December 22, 2010

9 ANEXO

9.1 Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1063.53.7), intitulado "Efeitos de Diferentes Preparações de Cimento de Aluminato de Cálcio sobre Culturas de Células Osteogênicas e de Células Indiferenciadas da Polpa Dental", de autoria de **Paulo Tambasco de Oliveira**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 18/11/2009.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.1063.53.7), entitled: "Efeitos de Diferentes Preparações de Cimento de Aluminato de Cálcio sobre Culturas de Células Osteogênicas e de Células Indiferenciadas da Polpa Dental", by **Paulo Tambasco de Oliveira** and , is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, November 18, 2009.

Ribeirão Preto, 23 de novembro de 2009.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Paniçsi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro