

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA

**Efeito biológico de cimentos bioativos em células-troncos de dentes decíduos  
esfoliados humanos**

BAURU

2023

ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA

**Efeito biológico de cimentos bioativos em células-troncos de dentes decíduos  
esfoliados humanos**

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira Valarelli.

**(Versão corrigida)**

BAURU

2023

Silveira, Ana Beatriz Vieira da  
Efeito biológico de cimentos bioativos em células-  
troncos de dentes decíduos esfoliados humanos/ Ana  
Beatriz Vieira da Silveira. -- Bauru, 2023.  
81 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Odontologia  
de Bauru, Universidade de São Paulo, 2023.

Orientador: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira  
Valarelli

A versão original desta dissertação/tese se encontra disponível no  
Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru –  
FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a  
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos  
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Comitê de Ética da FOB-USP  
Protocolo nº CAAE:  
59714322.3.0000.5417  
Data: 16/09/2022



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru  
Assistência Técnica Acadêmica  
Serviço de Pós-Graduação

[

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por  
**ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA**  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 06 de outubro de 2023.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **RAQUEL ASSED BEZERRA SEGATO**  
FORP-USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **JULIANE MARIA GUERREIRO TANOMARU**  
FOAr-UNESP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **MARIA APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO**  
FOB-USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **THAIS MARCHINI DE OLIVEIRA VALARELLI**  
Presidente da Banca  
FOB - USP

**Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação  
FOB-USP



USP  
FACULDADE  
DE  
ODONTOLOGIA  
DE  
BAURU



Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901



[www.posgraduacao.fob.usp.br](http://www.posgraduacao.fob.usp.br)



14 3235-8223



[posgrad@fob.usp.br](mailto:posgrad@fob.usp.br)



[posgraduacaofobusp](https://www.facebook.com/posgraduacaofobusp)



[fobuspoficial](https://www.youtube.com/fobuspoficial)



[@posgradfobusp](https://www.instagram.com/posgradfobusp)



[@FobPos](https://twitter.com/FobPos)

---

---

## **DEDICATÓRIA**

Em memória dos meus avôs Joaquim Aroldo Amoreli Vieira e Sírio José da Silveira. Sei e sinto que estão orgulhosos do quanto me dediquei e cresci neste período. Agradeço todos os dias por ensinarem à nossa família tudo sobre afeto e amor. Saudades da presença física de vocês, mas obrigada pela proteção e força que de alguma maneira conseguem me enviar!

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

**À Deus**, agradeço hoje e sempre por todas as bênçãos que Ele colocou no meu caminho, me dando a oportunidade de chegar até aqui.

**Aos meus pais, Vanja e Homero**, que transformaram o meu sonho no sonho deles também, e assim, acreditaram e apoiaram diariamente, vibrando com cada conquista e me acolhendo em todos os momentos difíceis. Eles que são minha maior fonte de inspiração e admiração pessoal e profissional. É difícil demonstrar em palavras tamanha gratidão por ter vocês. Com todo amor do mundo, essa conquista é nossa!

**Ao meu irmão e sua família**, pelo cuidado e carinho que me dão. Obrigada por serem lar mesmo longe e por me permitirem acompanhar o crescimento do nosso maior presente, o José.

**Às minhas avós, Vânia e Lourdes**, que dedicaram a vida ao ensino. As senhoras são grandes inspirações, obrigada por me passarem valores importantes com toda leveza que só às avós têm.

**À minha prima Tiza**, que teve uma sensibilidade imensa ao enxergar desde o início que o meu lugar era na FOB e com a minha orientadora. Obrigada por me apresentar um mundo de possibilidades!

**Aos familiares**, que sempre confiaram em cada passo meu. Vocês são muito mais do que um dia sonhei, agradeço por cada palavra e gesto de incentivo.

**Ao meu companheiro de jornada, Alan**, que me ouve diariamente com toda paciência do mundo, me motiva e faz com que eu enxergue todo o meu potencial. Obrigada por me mostrar um amor leve e respeitoso, com você tudo fica mais fácil e feliz. Te amo!

**Aos amigos de Minas Gerais**, que mesmo com a distância física se fizeram presentes. Obrigada por me lembrarem de quem eu sou em cada reencontro. Esse momento foi idealizado junto com vocês, gratidão por permanecerem!

**Às amigas da pós-graduação**, minha família de Bauru. Agradeço pelo acolhimento, pelas conversas, risadas e experiências compartilhadas. Só nós sabemos o que é passar por isso e juntas tudo fica melhor!

**À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Marchini de Oliveira Valarelli**, por todo acolhimento e disponibilidade. Obrigada por confiar em mim e por valorizar cada passo sempre com um olhar positivo. Trabalhar com você me faz ter coragem, ser resiliente e enxergar um

---

---

---

---

mundo repleto de possibilidades! Te admiro de todas as formas possíveis e agradeço todos os dias por ter o privilégio de aprender e conviver com a mulher, mãe e profissional iluminada que é.

**Ao time Thais**, em especial Eloá, Bárbara e Mariel por todo apoio e atenção. Trabalhar com mulheres tão fortes e dedicadas é extremamente gratificante. Admiro e tenho orgulho em fazer parte dessa equipe!

**Ao Prof. Dr. Natalino Lourenço-Neto**, que foi essencial para a conclusão desse trabalho, mas acima de tudo foi um dos maiores responsáveis pela minha adaptação nessa nova cidade e vida acadêmica. Obrigada por estar sempre presente, você é um professor exemplar e uma grande inspiração!

**Ao departamento de Odontopediatria**, funcionários e docentes, em especial a Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Profa. Dra. Daniela Rios e Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva, a vocês todo meu respeito e admiração!

**Ao departamento de Bioquímica**, em especial Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, Adriano e Flávia que me auxiliaram com excelência em etapas fundamentais para conclusão dessa pesquisa.

**Ao Thiago Dionísio**, que com um talento único torna os assuntos complexos mais fáceis de serem compreendidos. Obrigada por toda ajuda para o desenvolvimento do trabalho!

**Às minhas orientadoras da graduação, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloísa de Sousa Gomes e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia Carolina Teixeira Marques**, que me fizeram apaixonar pela Odontopediatria, mas acima de tudo pela ciência. Obrigada por me encorajarem a encontrar meu caminho. Serei eternamente grata a vocês!

**À banca avaliadora**, agradeço pelo aceite do convite. O nome de vocês foi pensado com muito carinho e respeito. É uma honra recebê-los!

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2021/08730-4** agradeço pela concessão da bolsa de estudos deste Mestrado.

---

---

---

---

*“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

***Leonardo da Vinci***

---

---



---

---

## RESUMO

Esta dissertação teve o propósito de apresentar três artigos científicos. **Artigo 1:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de extratos de materiais biocerâmicos em diferentes diluições. Foram utilizadas células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED). As amostras foram imersas em  $\alpha$ MEM 10% SFB de acordo com os grupos: Membrana BBio, Bio-C Repair, MTA HP Repair, TheraCal LC e Biodentine. Os métodos utilizados foram MTT e Alamar Blue, em 24, 48 e 72H após o contato com os materiais biocerâmicos nas diluições 1:1 e 1:2. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a três critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que os extratos de Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine na diluição de 1:1 foram mais citotóxicos quando comparados a diluição 1:2 em todos os períodos estudados. Conclui-se que a citotoxicidade do material biocerâmico está relacionada a diluição do extrato utilizado. O MTA HP Repair evidenciou alta biocompatibilidade, pois mesmo na diluição 1:1 foi citocompatível. A Membrana BBio se mostrou como um novo biomaterial promissor. **Artigo 2:** O propósito deste estudo foi analisar os efeitos biológicos de cimentos bioativos em SHED. Amostras de SHED foram obtidas de um Biorrepositório. Os extratos foram preparados na diluição 1:2, sendo: Bio-C Repair (G1), MTA HP Repair (G2) e Biodentine (G3). Testes de viabilidade celular, migração, atividade de fosfatase e nódulos de mineralização foram realizados. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ou Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Observou-se que na viabilidade celular Bio-C Repair e Biodentine apresentaram resultados de superiores ao MTA HP Repair. Na migração celular, em 72H as células tratadas com MTA HP Repair evidenciaram maior fechamento da fenda. Na atividade de fosfatase alcalina, SHED que entraram em contato com o extrato de Bio-C Repair tiveram maior atividade de ALP em 10 dias. O Biodentine apresentou efeito estimulador significativo na formação de nódulos mineralizados. De acordo com os resultados obtidos, o Bio-C Repair, MTA HP Repair e Biodentine destacam propriedades bioativas apropriadas para procedimentos de terapia pulpar vital em dentes decíduos. **Artigo 3:** O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a expressão gênica de SHED para a diferenciação odonto/osteogênica e angiogênica após o contato diferentes materiais biocerâmicos. Os extratos foram divididos em grupos: Membrana dentino/pulpar (BBio) (G1), Bio-C Repair (G2), MTA HP Repair (G3) e Biodentine (G4). Foram realizados testes de Alamar Blue e RT-PCR para os alvos: COL, FGF-2, VEGF, OCN, OPN, DSPP e DMP-1. Os dados foram analisados pelo teste

---

---

---

---

ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que os materiais biocerâmicos mantiveram a viabilidade da SHED, com destaque para Membrana BBio e o Bio-C Repair. O Biodentine apresentou os melhores resultados de expressão de VEGF e FGF-2. A Membrana BBio se destacou na expressão de OCN e OPN. Em relação a DSPP e DMP-1 as células mostraram aumento progressivo da expressão ao longo do tempo para todos os grupos. Conclui-se que todos os materiais testados exibiram bioatividade aceitável. A Membrana BBio apresentou melhor capacidade de diferenciação osteo/odontogênica.

**Palavras-chave:** Células-tronco, biomateriais, terapia pulpar vital.

---

---

---

---

## ABSTRACT

### **Biological effect of bioactive cements on stem cells from human exfoliated deciduous teeth**

This dissertation had the purpose of presenting three scientific articles. Article 1: The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity of extracts of bioceramic materials in different dilutions. Stem cells from exfoliated human deciduous teeth (SHED) were used. The samples were immersed in  $\alpha$ MEM 10% FCS according to the groups: BBio Membrane, Bio-C Repair, MTA HP Repair, TheraCal LC and Biodentine. The methods used were MTT and Alamar Blue, at 24, 48 and 72 hours after contact with the bioceramic materials at 1:1 and 1:2 dilutions. Data were analyzed using the three-way ANOVA test, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The results showed that BBio Membrane, Bio-C Repair and Biodentine extracts in the 1:1 dilution were more cytotoxic when compared to the 1:2 dilution in all studied periods. It is concluded that the cytotoxicity of the bioceramic material is related to the dilution of the extract used. MTA HP Repair showed high biocompatibility, as even at a 1:1 dilution it was cytocompatible. The BBio Membrane proved to be a promising new biomaterial. Article 2: The purpose of this study was to analyze the biological effects of bioactive cements on SHED. SHED samples were obtained from a Biorepository. The extracts were prepared at a 1:2 dilution, as follows: Bio-C Repair (G1), MTA HP Repair (G2) and Biodentine (G3). Cell viability, migration, phosphatase activity and mineralization nodule tests were performed. Data were analyzed using the two-way ANOVA test, followed by the Tukey or Kruskal-Wallis test, followed by the Bonferroni test ( $p < 0.05$ ). It was observed that in cell viability Bio-C Repair and Biodentine presented superior results to MTA HP Repair. In cell migration, in 72H, cells treated with MTA HP Repair showed greater cleft closure. In alkaline phosphatase activity, SHED that came into contact with Bio-C Repair extract had higher ALP activity in 10 days. Biodentine had a significant stimulating effect on the formation of mineralized nodules. According to the results obtained, Bio-C Repair, MTA HP Repair and Biodentine highlight bioactive properties suitable for vital pulp therapy procedures in deciduous teeth. Article 3: The aim of this study was to evaluate the viability and gene expression of SHED for odontogenic/osteogenic and angiogenic differentiation after contact with different bioceramic materials. The extracts were divided into groups: Dentine/pulp membrane (BBio) (G1), Bio-C Repair (G2), MTA HP Repair (G3) and Biodentine (G4). Alamar Blue and RT-PCR tests were performed for the targets: COL, FGF-2, VEGF, OCN, OPN, DSPP and DMP-1. Data were analyzed using the two-way ANOVA test, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The results showed that the bioceramic materials maintained the

---

---

---

---

SHED viability, with emphasis on BBio Membrane and Bio-C Repair. Biodentine showed the best VEGF and FGF-2 expression results. The BBio Membrane stood out in the expression of OCN and OPN. Regarding DSPP and DMP-1, the cells showed a progressive increase in expression over time for all groups. It is concluded that all tested materials exhibited acceptable bioactivity. The BBio Membrane showed better capacity for osteo/odontogenic differentiation.

**Keywords:** Stem cells, biomaterials, vital pulp therapy.

---

---

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### - ARTIGO 1

**Figura 1** - Esquema da preparação e diluição dos extratos.....23

### - ARTIGO 2

**Figura 1** - Comparações entre os dois fatores na viabilidade celular pelo teste MTT....42

**Figura 2** - Fechamento da ferida (%) no teste de Migração Celular.....43

**Figura 3** - Microscopia eletrônica do fechamento da ferida ao longo do tempo. ....44

**Figura 4** - Comparações entre os dois fatores na atividade de fosfatase alcalina.....45

**Figura 5** - Comparações da deposição de cálcio pelo teste de Nódulos de mineralização. ....46

**Figura 6** - Microscopia eletrônica invertida da matriz extracelular mineralizada em SHED após diferenciação osteogênica por 14 dias, evidenciada pela coloração com vermelho S de alizarina. ....47

### - ARTIGO 3

**Figura 1** - Comparações entre os dois fatores na viabilidade celular pelo teste Alamar Blue.....58

---

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

### - ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b>	- Desenho fatorial do estudo.....	21
<b>Tabela 2</b>	- Comparações entre os três fatores na viabilidade celular pelo teste MTT. ...	27
<b>Tabela 3</b>	- Comparações entre os três fatores na viabilidade celular pelo teste Alamar Blue.....	30

### - ARTIGO 3

<b>Tabela 1</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para COL. ....	59
<b>Tabela 2</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para FGF2. ....	59
<b>Tabela 3</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para VEGF.....	60
<b>Tabela 4</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para OCN.....	61
<b>Tabela 5</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para OPN. ....	61
<b>Tabela 6</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para DSPP.....	62
<b>Tabela 7</b>	- Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para DMP-1. ....	62

---

---

---

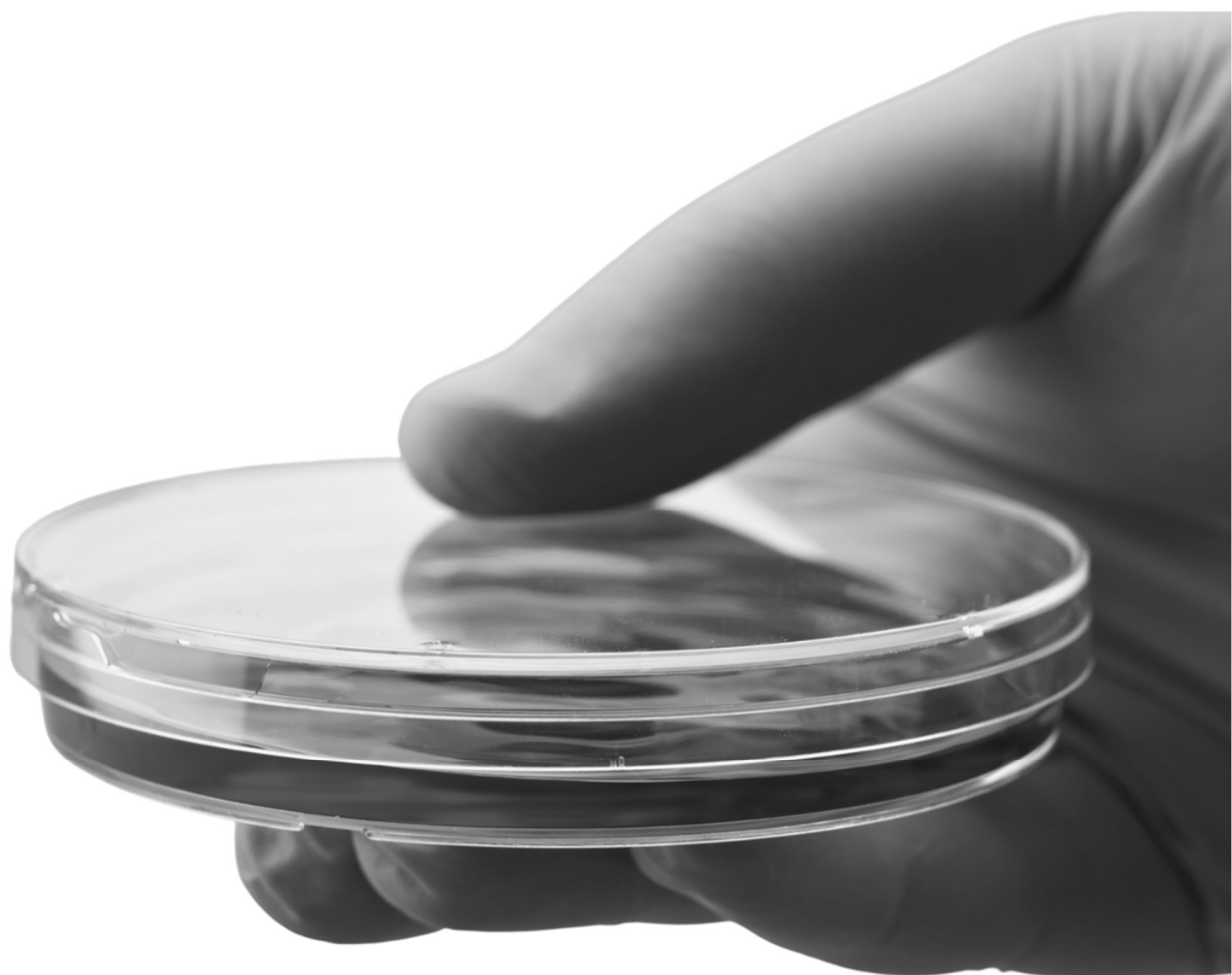
---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>19</b>
2.1	ARTIGO 1 - Citotoxicidade de materiais biocerâmicos submetidos a diferentes diluições em células-troncos de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) .....	19
2.2	ARTIGO 2 - Efeitos biológicos de cimentos bioativos em células troncos de dentes decíduos humanos .....	37
2.3	ARTIGO 3 - Análise da expressão gênica de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados após o contato com materiais biocerâmicos .....	53
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>78</b>

---

---



# *1 Introdução*



## 1 INTRODUÇÃO

Dentes decíduos humanos são fonte de células tronco acessíveis que podem ser isoladas e cultivadas *in vitro*. As células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) formam uma população altamente proliferativa e com variada capacidade de diferenciação. A odontologia minimamente invasiva preconiza tratamentos pulpares vitais, portanto, o entendimento das interações entre as células pulpares e os materiais de capeamento são de suma importância para a engenharia tecidual, auxiliando na seleção do melhor material para o tratamento clínico (ARAÚJO et al., 2018, AHMED et al., 2020; SANZ et al., 2021; JUNG et al., 2020).

A manutenção dos dentes decíduos até sua esfoliação fisiológica é fundamental para garantir a integridade da arcada dentária na dentição permanente. Nesse sentido, a terapia pulpar vital procura aproveitar o potencial reparador do complexo dentino-pulpar, assim, diversos biomateriais tem sido desenvolvidos e utilizados para os procedimentos clínicos na Odontopediatria. Diante disso, espera-se que estes materiais expressem níveis fisiológicos de proliferação, migração, sobrevivência e capacidade de induzir a diferenciação quando colocados em contato direto com o componente celular dos tecidos vitais (SANZ et al., 2020; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021; KUDEN et al., 2022; PARISAY et al., 2022).

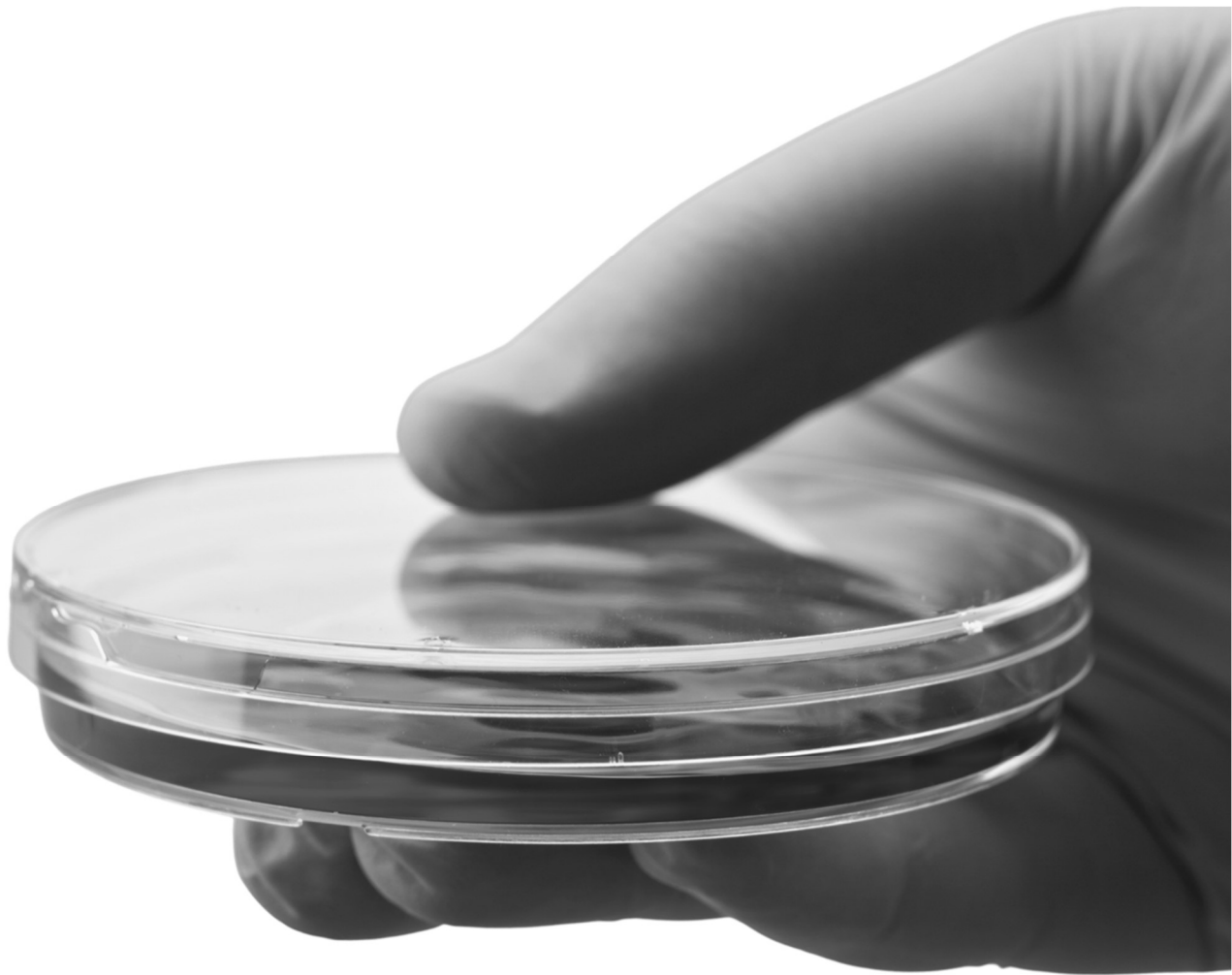
A bioengenharia de tecidos envolve o estudo celular e molecular de diferentes tipos celulares, sinais desencadeadores de diferenciação e estruturas para conduzir as células ao tecido alvo lesionado. Nesse contexto, os cimentos à base de silicato de cálcio são materiais aplicados diretamente na polpa, o que exige que sejam bioativos. Portanto, a avaliação da bioatividade dos materiais capeadores é essencial para evitar o efeito citotóxico dos produtos nas células pulpares, os quais podem muitas vezes levar a morte celular (MANASPON, et al., 2021; SUBHI, et al., 2021).

Diante do exposto, analisar essa complexa interação entre os cimentos à base de silicato de cálcio e as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados foi promissor, pois estas células podem ser afetadas pelos produtos químicos dos cimentos dentários causando alterações na atividade celular e o possibilitando a indução a morte celular, o que gera consequentemente inibição de migração, proliferação e diferenciação das mesmas (TOMÁS-CATALÁ et al., 2018; DUARTE et al. 2018; TALABANI et al., 2020).

---

---

Esse trabalho se diferencia com os encontrados na literatura principalmente por utilizar SHED, permitindo melhor entendimento dos processos de regeneração tecidual por meio de análises biológicas envolvidas nas diferentes estratégias de terapia pulpar. Além de trazer inovação utilizando um biomaterial com características diferentes daqueles encontrados no mercado. Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito biológico de diferentes materiais bioativos em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados na viabilidade celular; migração celular; atividade de fosfatase alcalina; formação dos nódulos de mineralização e expressão gênica de RNAm para COL, FGF-2, VEGF, OCN, OPN, DSPP, DMP-1.



*2 Artigos*

## 2 ARTIGOS

### 2.1 ARTIGO 1 - Citotoxicidade de materiais biocerâmicos submetidos a diferentes diluições em células-troncos de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)

#### **Cytotoxicity of bioceramic materials submitted to different dilutions in stem cells of human exfoliated deciduous teeth (SHED)**

##### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade de extratos de materiais biocerâmicos em diferentes diluições. **Metodologia:** Foram utilizadas células-troncos de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). As amostras foram imersas em  $\alpha$ MEM 10% SFB de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 (G1) – Membrana BBio, Grupo 2 (G2) - Bio-C Repair, Grupo 3 (G3) - MTA Repair HP, Grupo 4 (G4) – TheraCal LC e Grupo 5 (G5) - Biodentine. O grupo controle positivo foi mantido com  $\alpha$ MEM + 10% SFB e o controle negativo com Água Milli-Q. Os métodos para a análise da viabilidade e proliferação celular foram os Ensaio MTT e Alamar Blue, em 24, 48 e 72H após o contato das SHED com os extratos dos materiais biocerâmicos nas diluições 1:1 e 1:2. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a três critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Na diluição 1:1, SHED que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram viabilidade celular estatisticamente maior do que os demais grupos experimentais e o controle negativo, exceto com o TheraCal LC. Porém na diluição 1:2 a Membrana BBio e o Bio-C se destacaram na comparação intra e intergrupo. Os extratos de Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine na diluição de 1:1 foram mais citotóxicos quando comparados a diluição 1:2 em todos os períodos estudados. **Conclusão:** Conclui-se que a citotoxicidade do material biocerâmico está relacionada a diluição do extrato utilizado. O MTA HP Repair evidenciou alta biocompatibilidade, pois mesmo na diluição 1:1 foi citocompatível. Na diluição 1:2, as SHED que entraram em contato com o extrato da Membrana BBio apresentaram alta viabilidade celular quando comparadas os demais cimentos testados, se mostrando como novo biomaterial promissor.

---

---

## INTRODUÇÃO

Dentes decíduos humanos são fonte de células tronco acessíveis que podem ser isoladas e cultivadas *in vitro*. Células-troncos de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) formam uma população altamente proliferativa e com variada capacidade de diferenciação. A odontologia minimamente invasiva preconiza tratamentos pulpares vitais, portanto, o entendimento das interações entre as células pulpares e os materiais de capeamento são de suma importância para a engenharia tecidual, auxiliando na seleção do melhor material para o tratamento clínico (ARAÚJO et al., 2018, AHMED et al., 2020; SANZ et al., 2021; JUNG et al., 2020).

Nesse sentido, vários materiais têm sido desenvolvidos para preservar a vitalidade pulpar, os quais devem ter características ideais de citocompatibilidade para promover a atividade das SHED e conseqüentemente a cicatrização do tecido pulpar. Os materiais à base de silicato de cálcio vêm ganhando espaço na odontologia devido à capacidade de estimulação da reparação tecidual através da deposição de tecido mineralizado (COLLADO-GONZALEZ, et al. 2017; BENNETI, et al. 2019; PEDANO et al., 2020). Assim, a criação da Membrana de bioestimulação dentino/pulpar (BBio) vai ao encontro da tendência mundial de desenvolvimento, inovação e sustentabilidade. A expectativa é de que a BBio possa ser amplamente indicada para aplicações de terapia pulpar.

Para os testes laboratoriais *in vitro* de biomateriais a Organização Internacional de Normalização (ISO) desenvolveu diretrizes com o intuito da padronização e reprodutibilidade dos estudos. Três categorias são fornecidas para o contato celular: extratos, contato direto e contato indireto. Os extratos são mais vantajosos para células aderentes e permitem a exposição celular a diferentes concentrações do produto, simulando a difusão das substâncias em tecidos, principalmente quando aplicados em contato com tecidos irrigados (PAULA, et al. 2021).

A medição da viabilidade celular desempenha papel essencial na seleção de novos materiais, além de fornecer dados iniciais importantes antes da realização de estudos clínicos. Existe uma grande variedade de ensaios para detecção de viabilidade celular, os quais são baseados em diferentes funções celulares. Os ensaios de MTT e Alamar Blue testam a citotoxicidade intrínseca usando diferentes mecanismos. O ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) se baseia em um reagente de coloração redutora e nas atividades da desidrogenase mitocondrial para determinar a viabilidade celular por meio do método colorimétrico. Por outro lado, o ensaio de Alamar Blue (AB) tornou-se o reagente de escolha cada vez mais popular devido ao seu custo-benefício e por ser um ensaio não destrutivo

---

para as células. O mecanismo de ação se dá pela conversão de resazurina em resorufina que ocorre no ambiente redutor celular (DINH, et al. 2023).

Sendo assim, técnicas de cultura celular são úteis para avaliar a biocompatibilidade e bioatividade de diferentes materiais. Diversos estudos quantificaram a citotoxicidade de materiais capeadores em células-tronco de polpa dentária humana de dentes permanentes, porém poucos estudos utilizaram SHED. Apesar de se esperar que as SHED desempenhem um papel fundamental na regeneração, o conhecimento sobre as respostas das SHED aos materiais ainda é limitado (COLLADO-GONZALEZ, et al. 2017; ARAÚJO et al. 2018)

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de extratos de materiais biocerâmicos em diferentes diluições e comparar diferentes testes de viabilidade celular. A hipótese nula adotada foi de que os materiais e as diluições não apresentem diferenças significativas em termos de biocompatibilidade e citotoxicidade.

## METODOLOGIA

### Delineamento Experimental

Este trabalho apresentou o delineamento experimental envolvendo três fatores de estudo:

<b>Tratamentos</b>	G1: Membrana BBio (nº da patente: BR1020170222373)
	G2: Bio-C Repair (Angelus, Londrina, PR, Brasil)
	G3: MTA Repair HP (Angelus, Londrina, PR, Brasil)
	G4: Theracal LC (Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA)
	G5: Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França)
<b>Períodos</b>	24 horas
	48 horas
	72 horas
<b>Diluições</b>	1:1
	1:2

**Tabela 1:** Desenho fatorial do estudo.

### Considerações éticas

Seguindo princípios éticos e jurídicos, a realização do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) sob o número CAAE: 59714322.3.0000.5417.

### **Seleção da amostra**

Foram utilizadas células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos do Biorrepositório da FOB/USP regulamentado pelas diretrizes do CEP e CONEP (CAAE 59714322.3.0000.5417). O responsável pelo paciente foi devidamente informado sobre os riscos e benefícios da pesquisa e autorizou a participação do menor por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O menor também concordou com a participação por meio do Termo de Assentimento.

### **Membrana de Bioestimulação dentino/pulpar (BBio)**

A Membrana Bioestimulação dentino/pulpar (BBio) (Patente - nº: BR1020170222373) é uma membrana multicamada preparada com partes iguais contendo 1,5 g de quitosana (Sigma Aldrich, St. Louis USA), 1,5 g de alginato e 1,5 g de cimento de silicato de cálcio, as proporções utilizadas seguiram estudos prévios (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018; MACHADO et al., 2020; LOURENÇO-NETO et al., 2022). As camadas de cada material foram colocadas individualmente e secas dentro do forno a 30° C durante 15 minutos. Por fim, as membranas híbridas de três camadas foram submetidas a secagem final por 24H e esterilizadas para uso.

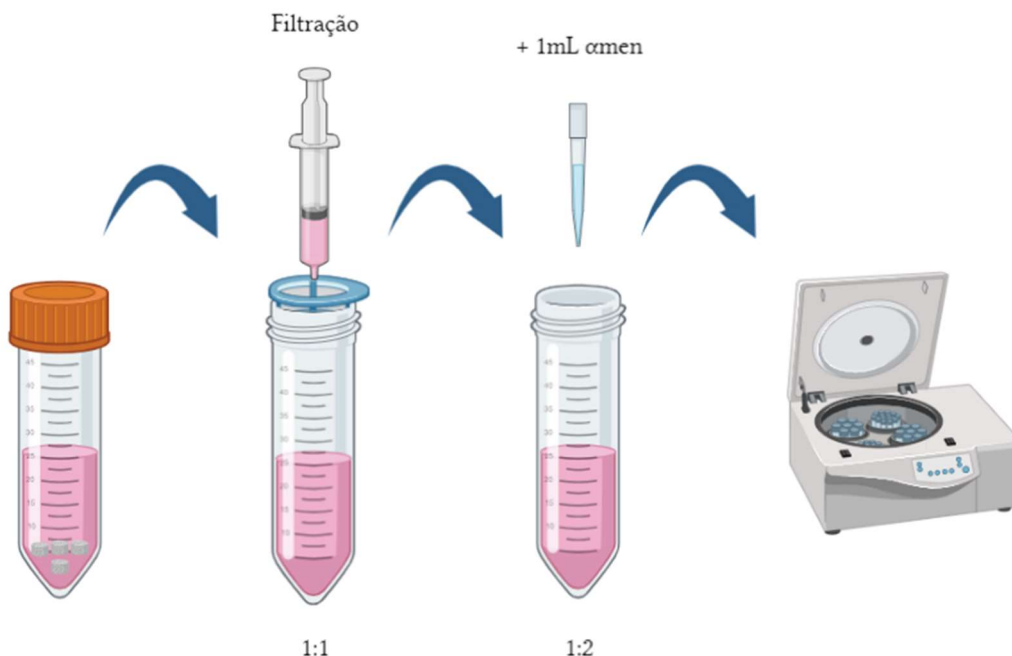
### **Preparo das Amostras e Diluições**

Cada material foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante. O preparo dos extratos foi baseado nas Normas ISO 10993 e em estudos prévios (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2017; CINTRA et al., 2017; BENETTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021). As amostras foram moldadas em tubo de polietileno cilíndrico estéril (diâmetro = 5 mm e altura = 3 mm). Posteriormente, as amostras foram mantidas em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 6H até atingirem a presa ideal. Decorridas 6H, as amostras foram removidas dos moldes e esterilizados por luz ultravioleta durante 1 hora em cabine biológica. Cada amostra foi imersa em 1 mL de meio ( $\alpha$ MEM - Invitrogen, Carlsbad, California) + 10% SFB (FBS - Thermo Fisher Scientific, USA) + Solução antimicótica e antibiótica a 1% (Anti-Anti - Gibco, Grand Island, NY, USA) e incubado por 3 dias a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período o sobrenadante foi coletado e filtrado através de filtro estéril de 0,22  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). O sobrenadante de cada material foi denominado de extrato 1:1 + nome do material. Para obter o extrato diluído 1:2, foi adicionado mais 1 mL de meio  $\alpha$ MEM + 10% SFB os quais foram nomeados de extrato 1:2 + nome do material e posteriormente usados nos ensaios. Lembrando que, antes do uso dos extratos todos foram centrifugados a 4500 rpm por 5 minutos, com a intenção de que todas as

---

---

partículas dos materiais que passaram na filtração fossem depositadas no fundo do tubo (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema da preparação e diluição dos extratos.

### Viabilidade celular: MTT

Medir as mudanças na viabilidade celular é fundamental para avaliar a saúde celular. O MTT é um método preciso, reprodutível e bem definido na literatura para medir a atividade de células vivas por meio da atividade da desidrogenase mitocondrial. O componente chave é 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5- brometo de difenil tetrazólio. Para este ensaio, SHED foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/1 mL de meio por poço) e incubados por 24H em ar umidificado de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para adesão celular. O controle positivo foi mantido com  $\alpha\text{MEM}$  suplementado com 10% SFB e do controle negativo (controle morte) com Água Milli-Q. Ao final dos períodos de incubação (24, 48 e 72H), os sobrenadantes foram descartados, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 110ul de solução de MTT foram adicionados a cada poço, para concentração final de 0,5 mg/ml. As placas foram protegidas de luz direta e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  pelo período de 4H. Decorrido esse período, a solução de MTT foi removida e 200uL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. Após 30 minutos, a absorbância foi medida usando leitor automático de



microplacas (Synergy Mx; BioTek Instruments, EUA), com o software de análise de dados Gen5, em comprimentos de onda correspondente a 570 nm.

### **Viabilidade celular: Alamar Blue**

A saúde celular pode ser monitorada pela detecção de alterações de vários indicadores-chave. A resazurina, o ingrediente ativo do alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, nº DAL1100), é um composto não tóxico, que ao entrar nas células vivas, reduz a resazurina a resorufina. Para a realização do ensaio, todas as instruções do fabricante foram seguidas. As SHED foram semeadas em placas de 96 poços (1 x 10<sup>4</sup> células/1 mL de meio por poço) e incubados por 24H em ar umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para adesão celular. Ao final do período de incubação, as células foram expostas aos extratos de materiais em 24, 48 e 72H. O controle positivo foi mantido com  $\alpha$ MEM suplementado com 10% SFB e do controle negativo (controle morte) com Água Milli-Q. Após cada período de incubação com os extratos, os sobrenadantes foram descartados e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), posteriormente foi adicionado em cada poço 100ul reagente Alamar Blue (1:100). As placas foram protegidas de luz direta incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 1H. A densidade foi medida usando leitor automático de microplacas (Synergy Mx; BioTek Instruments, EUA), com o software de análise de dados Gen5, em comprimentos de onda correspondente a 560-590 nm.

### **Análise estatística**

Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos a análise estatística pelo Software STATISTICA 10.0 (TIBCO Statistica® 14.0.1.25). Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram analisados por ANOVA a três critérios, seguido pelo teste de Tukey (p = 0,05).

## **RESULTADOS**

### **Viabilidade celular: MTT**

Para analisar os efeitos dos extratos dos diferentes materiais biocerâmicos nas taxas de viabilidade e proliferação de SHED, foi realizado o ensaio de MTT. Houve interação estatisticamente significativa entre os 3 fatores: Tratamento X Diluição X Período (p<0,05) (Tabela 2).

Na análise entre os grupos, na diluição 1:1 em 24 e 48H, as células que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram viabilidade celular estatisticamente

---

---

maior do que os demais grupos experimentais e o controle negativo, exceto com o TheraCal LC que apresentou resultados semelhantes ao MTA HP Repair. Os seguintes grupos experimentais não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o controle negativo: Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine, evidenciando baixa viabilidade celular. Em 48H, foi evidente a alta citotoxicidade do Bio-C Repair, que apresenta diferença estatisticamente significativa com os extratos de MTA HP Repair e TheraCal, na qual os últimos apresentaram maior viabilidade celular. Em todos os períodos o Controle Positivo apresentou resultados estatisticamente superiores de viabilidade celular quando comparado com os demais grupos. Em 72H, o MTA HP Repair foi novamente superior a todos os materiais capeadores, exceto ao TheraCal, os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Na análise ao longo do tempo, na diluição 1:1, as células que ficaram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram maior viabilidade celular em 24H quando comparado aos períodos de 48H e 72H. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Na análise entre os grupos, na diluição 1:2 em 24H, SHED que entraram em contato com o extrato de Bio-C Repair apresentaram maior viabilidade celular de maneira estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos experimentais, exceto com o Biodentine. Em 48H, foi possível notar maior citotoxicidade dos grupos MTA HP Repair e TheraCal LC, os quais apresentaram valores inferiores aos demais grupos experimentais de maneira estatisticamente significativa. Ainda em 48H notou-se resultado promissor da Membrana BBio, na qual as células mostraram a maior viabilidade celular no grupo em questão, resultados esses equivalentes ao extrato de Bio-C Repair. Finalmente, em 72H, SHED que entraram em contato com o extrato da Membrana BBio apresentaram maior viabilidade celular quando comparado com os demais grupos experimentais e Controle Negativo. Bio-C Repair e Biodentine apresentaram valores semelhantes entre si, o mesmo ocorreu com MTA HP Repair e TheraCal LC. Em todos os períodos o Controle Positivo apresentou resultados estatisticamente superiores de viabilidade celular quando comparado com os demais grupos. Na análise ao longo do tempo, na diluição 1:2 as células que entraram em contato com a Membrana BBio apresentaram valores mais altos de viabilidade nos períodos de 48H e 72H. Os grupos MTA HP Repair e TheraCal LC foram mais citotóxicos nos períodos de 48H e 72H quando comparados com 24H, onde as células apresentaram declínio de viabilidade celular ao longo tempo. Os tratamentos com Bio-C Repair e Biodentine, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

---

---

Em relação as diluições, os extratos de Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine na diluição de 1:1 foram mais citotóxicos quando comparados a diluição 1:2 em todos os períodos estudados. Por outro lado, os tratamentos MTA HP Repair e TheraCal LC apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as diluições em 48H, na qual a diluição 1:2 foi superior, os resultados dos demais períodos não apresentaram diferenças estatísticas independente da diluição ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Comparações entre os três fatores na viabilidade celular pelo teste MTT.

TRATAMENTOS	DILUIÇÃO 1:1			DILUIÇÃO 1:2		
	24H (média ± DP)	48H (média ± DP)	72H (média ± DP)	24H (média ± DP)	48H (média ± DP)	72H (média ± DP)
<b>Membrana BBio</b>	0,072 ± 0,023 <sup>acA*</sup>	0,058 ± 0,031 <sup>abcA*</sup>	0,059 ± 0,014 <sup>aA*</sup>	0,268 ± 0,061 <sup>aB*</sup>	0,429 ± 0,069 <sup>aB#</sup>	0,391 ± 0,052 <sup>aB#</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	0,050 ± 0,015 <sup>aA*</sup>	-0,010 ± 0,015 <sup>beA*</sup>	0,054 ± 0,014 <sup>aA*</sup>	0,358 ± 0,030 <sup>bB*</sup>	0,351 ± 0,019 <sup>abB*</sup>	0,296 ± 0,024 <sup>bB*</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	0,213 ± 0,054 <sup>bA*</sup>	0,104 ± 0,013 <sup>acA#</sup>	0,177 ± 0,023 <sup>baA*#</sup>	0,228 ± 0,049 <sup>aA*</sup>	0,214 ± 0,035 <sup>cB*#</sup>	0,138 ± 0,016 <sup>ceA#</sup>
<b>TheraCal LC</b>	0,159 ± 0,062 <sup>bcA*</sup>	0,091 ± 0,025 <sup>cA*</sup>	0,100 ± 0,023 <sup>abA*</sup>	0,239 ± 0,042 <sup>aA*</sup>	0,189 ± 0,038 <sup>cB*#</sup>	0,148 ± 0,016 <sup>cA#</sup>
<b>Biodentine</b>	0,033 ± 0,010 <sup>aA*</sup>	0,011 ± 0,018 <sup>bceA*</sup>	0,059 ± 0,025 <sup>aA*</sup>	0,312 ± 0,073 <sup>abB*</sup>	0,322 ± 0,027 <sup>bB*</sup>	0,257 ± 0,022 <sup>bB*</sup>
<b>Controle Positivo</b>	0,402 ± 0,052 <sup>dA*</sup>	0,441 ± 0,056 <sup>dA*</sup>	0,438 ± 0,051 <sup>cA*</sup>	0,481 ± 0,047 <sup>cA*</sup>	0,577 ± 0,075 <sup>dB#</sup>	0,521 ± 0,088 <sup>dB*#</sup>
<b>Controle Negativo</b>	0,007 ± 0,008 <sup>aA*</sup>	-0,046 ± 0,007 <sup>eA*</sup>	0,104 ± 0,014 <sup>aA#</sup>	0,007 ± 0,026 <sup>dA*</sup>	-0,009 ± 0,006 <sup>eA*</sup>	0,058 ± 0,012 <sup>eA*</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no mesmo período e na mesma diluição. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre as diluições no mesmo período e no mesmo tratamento. Símbolos diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos no mesmo tratamento e na mesma diluição. (ANOVA a três critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

### **Viabilidade celular: Alamar Blue**

Para analisar os efeitos dos extratos dos diferentes materiais biocerâmicos nas taxas de viabilidade e proliferação de SHED, também foi realizado o ensaio de Alamar Blue. Houve interação estatisticamente significativa entre os 3 fatores: Tratamento X Diluição X Período ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Na análise entre os grupos, na diluição 1:1 em 24H, as células que entraram em contato com o extrato de TheraCal LC apresentaram maior viabilidade celular, de forma estatisticamente significativa, quando comparado com os demais grupos experimentais, exceto com MTA HP Repair, o qual apresentou valores semelhantes. Em 48H, as SHED apresentaram melhor viabilidade celular quando em contato com os extratos de MTA HP Repair e TheraCal LC do que com os demais grupos experimentais. Em 72H, destaca-se novamente que células tratadas com MTA HP Repair obtiveram a maior viabilidade celular dentre todos os grupos experimentais, de maneira estatisticamente significativa. Nos três períodos foi relevante a alta citotoxicidade dos seguintes materiais: Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine, os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o controle negativo. Em todos os períodos o Controle Positivo apresentou resultados estatisticamente superiores de viabilidade celular quando comparado com os demais grupos. Na análise ao longo do tempo, na diluição 1:1, as células que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram maior viabilidade celular em 72H quando comparado aos períodos de 24H e 48H. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Na análise entre os grupos, porém na diluição 1:2 em 24H, SHED que entraram em contato com os extratos da Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o Controle Positivo, demonstrando viabilidade celular positiva. Em 48H, as SHED que entraram em contato com a Membrana BBio apresentaram melhores resultados de viabilidade celular quando comparadas com os demais grupos experimentais, exceto com o Bio-C Repair que apresentou resultados semelhantes a Membrana. Ainda em 48H, não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais cimentos biocerâmicos testados. Por fim em 72H, a Membrana BBio e o Bio-C Repair mantiveram o padrão e não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o Controle Positivo. MTA HP Repair, TheraCal LC e Biodentine não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, porém em 72H TheraCal LC e Biodentine não mostraram diferenças estatisticamente significativas com o Controle Negativo, evidenciando sua citotoxicidade. Na análise ao longo do tempo, porém na diluição 1:2 as células que entraram

---

---

em contato com a Membrana BBio e Bio-C Repair apresentaram valores mais altos de viabilidade celular no período de 72H. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Em relação as diluições, os extratos de Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine na diluição de 1:1 foram mais citotóxicos quando comparados a diluição 1:2 em todos os períodos estudados. O MTA HP Repair, em 24H não houve diferença estatisticamente significativa entre as diluições, por outro lado, em 48H e 72H houve diferença estatisticamente significativa, na qual a diluição 1:1 foi superior. O grupo TheraCal LC não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as diluições ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

---

---

**Tabela 3** - Comparações entre os três fatores na viabilidade celular pelo teste Alamar Blue.

TRATAMENTOS	DILUIÇÃO 1:1			DILUIÇÃO 1:2		
	24H (média ± DP)	48H (média ± DP)	72H (média ± DP)	24H (média ± DP)	48H (média ± DP)	72H (média ± DP)
<b>Membrana Bbio</b>	11.346 ± 1.084 <sup>abA*</sup>	11.003 ± 1.900 <sup>Aa*</sup>	11.329 ± 4.824 <sup>acA*</sup>	27.317 ± 4.395 <sup>abB*</sup>	31.112 ± 4.155 <sup>abB*</sup>	52.908 ± 10.078 <sup>abB#</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	450 ± 511 <sup>aA*</sup>	588 ± 491 <sup>aA*</sup>	655 ± 532 <sup>aA*</sup>	27.437 ± 3.057 <sup>aB*</sup>	20.181 ± 14.246 <sup>abB*</sup>	56.808 ± 7.314 <sup>aB#</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	23.233 ± 7.112 <sup>bcA*</sup>	26.569 ± 1.124 <sup>ba*</sup>	45.005 ± 4.103 <sup>ba#</sup>	14.899 ± 3.409 <sup>ca*</sup>	14.598 ± 8.833 <sup>bb*</sup>	21.166 ± 5.272 <sup>bb*</sup>
<b>TheraCal LC</b>	24.355 ± 5.022 <sup>ca*</sup>	23.456 ± 6.078 <sup>ba*</sup>	21.522 ± 2.281 <sup>ca*</sup>	15.378 ± 3.471 <sup>bcA*</sup>	18.166 ± 3.634 <sup>ba*</sup>	13.402 ± 3.936 <sup>bcA*</sup>
<b>Biodentine</b>	575 ± 568 <sup>aA*</sup>	538 ± 185 <sup>aA*</sup>	870 ± 215 <sup>aA*</sup>	19.174 ± 2.473 <sup>acB*</sup>	15.336 ± 11.863 <sup>bb*</sup>	18.267 ± 6.172 <sup>bcB*</sup>
<b>Controle Positivo</b>	37.154 ± 2.002 <sup>da*</sup>	40.210 ± 4.594 <sup>ca*</sup>	78.994 ± 4.687 <sup>da#</sup>	29.245 ± 4.514 <sup>aA*</sup>	35.260 ± 10.310 <sup>aA*</sup>	52.779 ± 2.572 <sup>abB#</sup>
<b>Controle Negativo</b>	242 ± 217 <sup>aA*</sup>	-22 ± 752 <sup>aA*</sup>	5.832 ± 6.888 <sup>aA#</sup>	-545 ± 872 <sup>da*#</sup>	-4.752 ± 2.850 <sup>ca*</sup>	7.296 ± 5.024 <sup>ca#</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos no mesmo período e na mesma diluição. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre as diluições no mesmo período e no mesmo tratamento. Símbolos diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos no mesmo tratamento e na mesma diluição. (ANOVA a três critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A avaliação da citocompatibilidade de um material *in vitro* tem sido utilizada como o primeiro indicador do potencial de aplicação clínica. Portanto, a biocompatibilidade deve ser considerada ao selecionar o material para terapia de polpa vital, estes materiais devem garantir a sobrevivência e proliferação das SHED presentes no tecido pulpar que, em teoria, têm potencial reparador. Os investimentos atuais nesta área são com agentes capeadores dentários a base de cimentos de silicato de cálcio, os quais devem ter propriedades bioativas que por meio da liberação de íons de cálcio e hidróxido, sejam capazes de formar hidroxiapatita, permitindo assim a ligação mineral ao componente inorgânico da dentina (COLLADO-GONZALEZ et al. 2017; GHILOTTI, et al. 2020; PEDANO, et al. 2020; PAULA, et al. 2021).

A literatura evidencia os efeitos de diferentes cimentos biocerâmicos com diversos tipos celulares, porém poucos estudos mostram o comportamento de SHED (BENETTI et al., 2019; SANZ et al., 2021; DAHAKE et al., 2020; GHILOTTI et al., 2020). Além disso, esse é um estudo pioneiro com células-tronco de dentes decíduos que avalia três fatores de estudo ao mesmo tempo: Viabilidade celular X Período X Diluições.

Pedano et al. 2020, mostraram que a viabilidade celular e a bioatividade dos materiais de capeamento pulpar expostos a células de polpa dentária humana diferem entre os materiais testados. O mesmo ocorre no presente estudo, no qual os materiais e as diluições testadas apresentaram viabilidade celular diferentes de maneira estatisticamente significativas, o que leva a rejeição da hipótese nula (PEDANO, et al. 2020).

No presente estudo, os resultados da diluição 1:1 tanto de MTT quanto de Alamar Blue mostraram comportamento semelhante entre o MTA HP Repair e o TheraCal LC, os quais apresentaram melhor citocompatibilidade quando comparado com os demais grupos experimentais. Estes resultados corroboram com o ensaio clínico randomizado, no qual o TheraCal LC exibiu um resultado comparável ao MTA HP Repair como agente de capeamento pulpar direto em primeiros molares decíduos de 46 indivíduos saudáveis com idades entre 5 e 7 anos (ERFANPARAST, et al. 2018; SANZ, et al. 2021). Por outro lado, os extratos Biodentine, Bio-C Repair e Membrana BBio não diluídos induziram a redução significativa da viabilidade celular. Ghilotti et al., em 2020, evidenciaram comportamento semelhante entre Biodentine e Bio-C Repair, resultados que corroboram com nosso estudo. Com a Membrana BBio as comparações ficam mais limitadas por ser um novo biomaterial, mas de acordo com Benetti, et al. 2019 o extrato não diluído do material pode levar à morte celular, ainda mais quando as propriedades do material não são tão conhecidas como no caso da Membrana BBio (BENETTI et al., 2019; GHILOTTI et al., 2020).

---



Estudos anteriores afirmam que dentre todas as categorias de preparo das amostras, os extratos são vantajosos, principalmente em linhagens de células aderentes, afinal não há interferência na adesão celular e oferece boas condições de cultivo. Além da exposição a diferentes concentrações do material, o que se assemelha a diluição que o material sobre *in vivo* quando entra em contato com tecidos irrigados (PAULA et al. 2021). No presente trabalho observou-se que a citotoxicidade do material depende da diluição do extrato, sendo que a maioria dos materiais utilizados diminuiu sua citotoxicidade quando o extrato foi mais diluído (CINTRA, et al. 2017; SEQUEIRA, et al. 2018; BENETTI et al. 2019; PAULA, et al. 2019).

Diante de tais achados, os resultados do presente estudo na diluição 1:2 foram totalmente opostos as concentrações totais dos materiais utilizados. Na diluição 1:2 em ambos os ensaios o Bio-C e a Membrana BBio se destacaram em viabilidade celular, em relação ao Bio-C o mesmo ocorre nos estudos de Ghilotti et al., 2020, que utilizaram células de polpa dentária humana (hDPCS) e concluíram que Bio-C Repair exibiu excelente citocompatibilidade (GHILOTTI et al., 2020). Em relação a Membrana BBio, estudos anteriores afirmam que a quitosana em baixas concentrações, componente utilizado na composição da membrana, é uma opção segura e sem efeitos colaterais para os tecidos humanos, assim, a associação da quitosana e do cimento de silicato de cálcio em membrana de capeamento pulpar (BBio) parece trazer vantagens para aplicação na Odontologia (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018; LOURENÇO-NETO et al., 2022). O estudo prévio com fibroblastos NIH3T3 que utilizou a membrana de quitosana associada a outras drogas, permitiram a viabilidade e proliferação dessa linhagem celular, resultados condizentes com os encontrados no presente estudo, no qual a Membrana BBio na concentração 1:2 mostrou melhores resultados de citocompatibilidade com SHED ao longo do tempo (SILVA et al., 2017).

Ainda na diluição 1:2, os cimentos MTA HP Repair e TheraCal LC apresentaram resultados inferiores de viabilidade celular quando comparado com os demais grupos experimentais, o intrigante é que estes materiais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as diluições em 24H e 72H nos resultados de MTT, enquanto que no teste de Alamar Blue, o MTA HP Repair demonstrou melhores resultados de viabilidade celular na diluição 1:1. De acordo com estudo anteriores, o TheraCal LC é um biomaterial com silicato de cálcio e modificado por resina, o qual apresentou resultados negativos em ensaios de citocompatibilidade e bioatividade quando cultivado com SHED (COLLADO-GONZALEZ, et al. 2017; SANZ, et al. 2021). Isto se justifica por conta do maior efeito inflamatório do material que devido à presença de monômero de resina não polimerizado pode causar toxicidade ao tecido pulpar, diminuindo a liberação de cálcio. Além disso, pelo fato de

---

ser o único material fotopolimerizável no presente estudo, a geração de calor durante a fotopolimerização resulta em reações pulpares desfavoráveis. (MANOJLOVIC et al., 2017; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021; KUNERT et al., 2022).

O Biodentine na diluição 1:1 apresentou viabilidade celular muito baixa ou quase ausente, Sequeira et al. 2018 utilizaram células da papila apical (APCs) de terceiros molares e mostram que extratos de Biodentine não diluídos afetaram significativamente a viabilidade celular em 24, 48 e 72H. Porém ao diluir o material o mesmo mostrou bons resultados em 24H nos testes de viabilidade e proliferação celular, comparáveis com a Membrana BBio e o Bio-C Repair, porém o Biodentine não apresentou evolução ao longo do tempo como os outros dois materiais, resultados semelhantes foram encontrados na literatura (SEQUEIRA, et al. 2018; HASWEH, et al. 2018).

Ensaio *in vitro* com culturas de células têm auxiliado no entendimento de mecanismos envolvidos nas respostas biológicas. Porém, a avaliação da bioatividade não deve envolver apenas a avaliação da citotoxicidade, portanto critérios de avaliação adicionais devem ser utilizados em futuras pesquisas. Afinal, esses materiais devem ser citocompatíveis, mas também bioativos para as células, estimulando a migração, proliferação e diferenciação osteogênica (PIRES et al. 2016; PEDANO, et al. 2020; PAULA, et al. 2021).

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que a citotoxicidade do material biocerâmico está relacionada a diluição do extrato utilizado. O MTA HP Repair evidenciou alta biocompatibilidade, pois mesmo na diluição 1:1 foi citocompatível. Na diluição 1:2, as SHED que entraram em contato com o extrato da Membrana BBio apresentaram alta viabilidade celular quando comparadas os demais cimentos testados, se mostrando como novo biomaterial promissor.

---

---

## REFERÊNCIAS

- AHMED GM, ABOUAUF EA, ABUBAKR N, DÖRFER CE, EL-SAYED KF. Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update. **Stem Cells Int.** 2020;2020:5734539.
- ARAÚJO LB, COSME-SILVA L, FERNANDES AP, DE OLIVEIRA TM, CAVALCANTI B DAS N, GOMES JE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J Appl Oral Sci.** 2018;26:e20160629.
- BENETTI F, QUEIROZ ÍO DE A, COSME-SILVA L, CONTI LC, OLIVEIRA SHP, CINTRA LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. **Braz Dent J.** 2019 Jul 22;30(4):325–32.
- CINTRA LTA, BENETTI F, AZEVEDO QUEIROZ ÍO, ARAÚJO LOPES JM, PENHA OLIVEIRA SH, SIVIERI ARAÚJO G, et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. **J Endod.** 2017 May;43(5):774–8.
- COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, ORTOLANI-SELTENERICH PS, ÁLVAREZ-MURO T, LOZANO A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **Int Endod J.** 2017 Dec;50 Suppl 2:e19–30.
- DAHAKA PT, PANPALIYA NP, KALE YJ, DADPE MV, KENDRE SB, BOGAR C. Response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) to three bioinductive materials - An in vitro experimental study. **Saudi Dent J.** 2020 Jan;32(1):43–51.
- DINH MN, HITOMI M, AL-TURAIHI ZA, SCOTT JG. Alamar Blue assay optimization to minimize drug interference and inter-assay viability. **bioRxiv.** 2023 Mar 19;2023.03.16.532999.
- ERFANPARAST, L.; IRANPARVAR, P.; VAFAEI, A. Direct pulp capping in primary molars using a resin-modified Portland cement-based material (TheraCal) compared to MTA with 12-month follow-up: A randomised clinical trial. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.** 2018, 19, 197–203.
- GHILOTTI J, SANZ JL, LÓPEZ-GARCÍA S, GUERRERO-GIRONÉS J, PECCI-LLORET MP, LOZANO A, et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. **Materials (Basel).** 2020 May 10;13(9):2189.
- HASWEHN, AWIDI A, RAJAB L, HIYASAT A, JAFAR H, ISLAM N, et al. Characterization of the biological effect of Biodentine™ on primary dental pulp stem cells. **Indian J Dent Res.** 2018;29(6):787–93.
- ISO 10993-5 **Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos – Parte 5: Testes para citotoxicidade in vitro.** Genebra, Suíça: International Standards Organization, Genebra, Suíça. 2005.

JUNG Y, YOON JY, DEV PATEL K, MA L, LEE HH, KIM J, LEE JH, SHIN J. Biological Effects of Tricalcium Silicate Nanoparticle-Containing Cement on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Nanomaterials** (Basel). 2020 Jul 14;10(7):1373.

KLOSTER AP, LOURENÇO NETO N, COSTA SA, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MAAM. In Vitro Antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. **Br Dent J**. 2018;29:354-8.

KUNERT M, ROZPEDEK-KAMINSKA W, GALITA G, SAURO S, BOURGI R, HARDAN L, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. **Cells**. 2022 Oct 15;11(20):3238.

LOURENÇO NETO, N, VITOR, LLR, COSTA SA, COSTA SM, CRUVINEL T, OLIVEIRA TM, et al. Physicochemical and biological properties of a biostimulating membrane (BBio) for pulp capping. **Materials Letters** 2022;38: 131186.

MACHADO MAAM, STAFUZZA TC, VITOR LLR, COSTA SA, COSTA SM, NETO NL, et al. Pulp repair response after the use of a dentin-pulp biostimulation membrane (BBio) in primary teeth: study protocol for a randomized clinical trial. **Trials** 2020; 21:874.

MANOJLOVIC D, DRAMIĆANIN MD, MILETIC V, MITIĆ-ĆULAFIĆ D, JOVANOVIĆ B, NIKOLIĆ B. Cytotoxicity and genotoxicity of a low-shrinkage monomer and monoacylphosphine oxide photoinitiator: Comparative analyses of individual toxicity and combination effects in mixtures. **Dent Mater**. 2017 Apr;33(4):454–66.

PAULA A, LARANJO M, MARTO CM, ABRANTES AM, CASALTA-LOPES J, GONÇALVES AC, et al. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot®MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. **Materials** (Basel). 2019 Apr 11;12(7):1184.

PAULA AB, LARANJO M, COELHO AS, ABRANTES AM, GONÇALVES AC, SARMENTO-RIBEIRO AB, et al. Accessing the Cytotoxicity and Cell Response to Biomaterials. **J Vis Exp**. 2021 Jul 8;(173).

PEDANO MS, LI X, YOSHIHARA K, LANDUYT KV, VAN MEERBEEK B. Cytotoxicity and Bioactivity of Dental Pulp-Capping Agents towards Human Tooth-Pulp Cells: A Systematic Review of In-Vitro Studies and Meta-Analysis of Randomized and Controlled Clinical Trials. **Materials** (Basel). 2020 Jun 12;13(12):2670.

PIRES CW, BOTTON G, CADONÁ FC, MACHADO AK, AZZOLIN VF, CRUZ IBM, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **Int Endod J**. agosto de 2016;49(8):737–45.

RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, SANZ JL, LOZANO A, PECCI-LLORET MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. **Clin Oral Investig**. 2021 Aug;25(8):5009–24.

SANZ JL, SOLER-DORIA A, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LOZANO A, et al. Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. **J Endod**. 2021 Dec;47(12):1896–906.

---

SEQUEIRA DB, SEABRA CM, PALMA PJ, CARDOSO AL, PEÇA J, SANTOS JM. Effects of a New Bioceramic Material on Human Apical Papilla Cells. **J Funct Biomater**. 2018 Dec 16;9(4):74.

SILVA, M. S., NETO N. L., COSTA, S. A., COSTA, S.M., OLIVEIRA, T.M., OLIVEIRA, R. C., et al. Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: a new drug delivery system for dentistry. **Materials Science and Engineering C**. 2017; 71:498-503.

---

---

## 2.2 ARTIGO 2 - Efeitos biológicos de cimentos bioativos em células troncos de dentes decíduos humanos

### Biological effects of bioactive cements on stem cells from human deciduous teeth

#### RESUMO

**Objetivo:** avaliar o efeito biológico de cimentos bioativos em células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados humanos (SHED). **Metodologia:** Amostras de SHED foram obtidas de um Biorrepositório. Os extratos dos materiais na diluição 1:2 foram preparados e divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 (G1) - Bio-C Repair, Grupo 2 (G2) - MTA HP Repair, e Grupo 3 (G3) - Biodentine. Testes de viabilidade celular, migração, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e nódulos de mineralização foram realizados. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ou Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Na viabilidade celular Bio-C Repair e Biodentine apresentaram resultados semelhantes e superiores ao MTA HP Repair. Em relação a migração celular, em 72H as células que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram maior fechamento da fenda do que os demais grupos. Na atividade de fosfatase alcalina SHED que entraram em contato com o extrato de Bio-C Repair tiveram maior atividade de ALP em 10 dias. Por outro lado, o Biodentine apresentou efeito estimulador significativo na formação de nódulos mineralizados quando comparado aos demais grupos experimentais. **Conclusão:** De acordo com os resultados obtidos, o Bio-C Repair, MTA HP Repair e Biodentine destacam propriedades bioativas apropriadas para procedimentos de terapia pulpar vital em dentes decíduos.

#### INTRODUÇÃO

A terapia pulpar vital procura aproveitar o potencial reparador do complexo dentino-pulpar, com o objetivo de preservar os dentes decíduos até o momento ideal de sua esfoliação. Para isso, diversos cimentos biocerâmicos a base de silicato de cálcio tem sido desenvolvidos e utilizados para os procedimentos clínicos de terapia pulpar em dentes decíduos. De acordo com a literatura, o material ideal deve ser bioativo e bactericida, além de ser capaz de promover cicatrização pulpar e não interferir no processo de reabsorção radicular fisiológico (AAPD 2018; BOSSÙ et al., 2020). Diante disso, espera-se que estes biomateriais expressem níveis fisiológicos de proliferação, migração e sobrevivência quando colocados em contato direto com

---

o componente celular dos tecidos vitais (SANZ et al., 2020; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021; KUDEN et al., 2022; PARISAY et al., 2022).

Células-troncos de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) são capazes de responder a lesões dentárias por meio da migração, proliferação e diferenciação celular, processos esses que conduzem a síntese e secreção de dentina terciária e contribuem para o sucesso do tratamento de terapia pulpar vital (ARAÚJO et al., 2018; AHMED et al., 2020; SANZ et al., 2020).

Portanto, o estudo da interação entre esses materiais e SHED é de suma importância para o entendimento do processo de regeneração tecidual, bem como para auxiliar na escolha clínica do melhor material disponível no mercado. Existe uma grande quantidade de estudos que avaliaram a bioatividade de materiais de terapia pulpar vital em células-tronco da polpa dental humana de dentes permanentes, mas há poucos relatos de pesquisas que utilizaram SHED (ARAÚJO et al., 2018; TOMÁS-CATALÁ et al. 2018; OMIDI et al., 2020; KIM et al., 2020).

Diante do exposto, analisar essa complexa interação entre os cimentos à base de silicato de cálcio e as SHED foi promissor, pois estas células podem ser afetadas pelos produtos químicos dos cimentos dentários causando alterações na atividade celular e o possibilitando a indução a morte celular, o que gera consequentemente inibição de migração, proliferação e diferenciação das mesmas (TOMÁS-CATALÁ et al., 2018; DUARTE et al. 2018; TALABANI et al., 2020).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito biológico de cimentos biocerâmicos em SHED na viabilidade celular, migração celular, atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização. A hipótese nula adotada foi de que os materiais não apresentassem diferenças significativas em todos os diferentes testes laboratoriais presentes no estudo.

## **METODOLOGIA**

### **Considerações éticas**

Foi concedida a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) sob o número CAAE: 59714322.3.0000.5417.

---

---

### **Seleção da amostra**

Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos do Biorrepositório regulamentado pelas diretrizes do CEP e CONEP foram selecionadas do Biorrepositório da FOB/USP (CAAE 59714322.3.0000.5417). O responsável pelo paciente foi devidamente informado sobre os riscos e benefícios da pesquisa e autorizou a participação do menor por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O menor também concordou com a participação por meio do Termo de Assentimento.

### **Preparo das Amostras e Diluições**

O preparo dos extratos foi baseado nas Normas ISO 10993 e em estudos prévios (COLLADO-GONZÁLEZ et al, 2017; CINTRA et al., 2017; BENETTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021; SISMANOGLU, 2022; OLIVEIRA, et al. 2023). Todos os materiais foram manipulados segundo as instruções do fabricante. As amostras foram moldadas em tubo de polietileno cilíndrico estéril (diâmetro = 5 mm e altura = 3 mm) e mantidas em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por durante 6H. Todas amostras foram esterilizadas por luz ultravioleta e imersas em 1 mL de meio ( $\alpha$ MEM - Invitrogen, Carlsbad, California) + 10% SFB (FBS - Thermo Fisher Scientific, USA) + Solução antimicótica e antibiótica a 1% (Anti-Anti - Gibco, Grand Island, NY, USA). Decorridos 3 dias o sobrenadante foi coletado e filtrado com auxílio de filtro estéril de 0,22  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para obtenção do extrato diluído 1:2, foi adicionado mais 1 mL de meio  $\alpha$ MEM + 10% SFB.

### **Viabilidade celular**

O MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5- brometo de difenil tetrazólio) foi utilizado para medir as mudanças na viabilidade celular de SHED. Para isso,  $1 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubados por 24H a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C para adesão celular. O controle foi mantido com  $\alpha$ MEM suplementado com 10% SFB. Decorridos 24H, 48H e 72H, as SHED foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e então, 110ul de solução de MTT foram adicionados em cada poço. As placas foram protegidas de luz direta e incubadas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> pelo período de 4H. Decorrido esse período, a solução de MTT foi removida e 200uL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foram adicionados a cada poço para solubilização dos cristais. 30 minutos depois, a absorbância foi medida usando o leitor automático de microplacas (Synergy Mx; BioTek Instruments, EUA), com o software de análise de dados Gen5, em comprimentos de onda correspondente a 570 nm (COLLADO-GONZÁLEZ et al, 2017).

---



### **Migração celular**

A migração de células para áreas de maior concentração de agentes quimio-atrativos é necessária para a manutenção homeostática e a regeneração de tecidos que sofreram injúria. Para avaliar o efeito dos diferentes cimentos endodônticos bioativos sobre a migração de SHED, as células foram distribuídas em placas de 12 poços e deixadas em adesão em MEM $\alpha$ +10% FBS até atingir a subconfluência. Após esse período, uma “ferida” foi criada com a ponta de pipeta de 200  $\mu$ l. As células foram lavadas com PBS 2x para remover debris celulares e incubadas com os extratos dos cimentos endodônticos bioativos para avaliar a migração celular. Imagens da área da injúria foram realizadas por meio de microscopia eletrônica em 0, 24h, 48h e 72h após o contato com os extratos. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) (COLLADO-GONZALEZ et al., 2017).

### **Fosfatase Alcalina**

A fosfatase alcalina está envolvida com a fase inicial da biomineralização da matriz dentinária, promovendo a defosforilação das proteínas da matriz celular, resultando em fosfato inorgânico (GOLDBERG, 2011). Para este teste, SHED foram distribuídos em placas de 48 poços numa quantidade de  $2 \times 10^4$  células/poço e deixados para adesão em meio de cultura MEM $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, California) com 10% soro fetal bovino (SFB). Após o período de adesão, o meio de cultura foi trocado pelos extratos com os cimentos endodônticos bioativos em meio osteogênico (MEM $\alpha$  + 10% SFB, suplementado com 50  $\mu$ g/ml de ascorbato de sódio e 10 nmol/l de beta-glicerolfosfato) por mais 7, 10 e 14 dias. Após cada período experimental, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e lisadas com 100  $\mu$ l por poço do tampão de Lise (10 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1% Triton X-100). Para quantificação da proteína total, foi utilizado como substrato o p-nitrofenil fosfato (pNPP). Uma solução tampão (glicina 25 mM [pH 9,4], 2 mM MgCl e 1 mM p-NPP) foi adicionada a a placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi mantida a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, paralizada com 1M de NaOH. A quantificação da proteína total foi obtida pelo método de Bradford, através curva padrão com diferentes concentrações de albumina bovina, desta forma o produto final (p-NPP) foi quantificado em 405 nm. Em seguida, 250 $\mu$ L de reagente de Bradford (Bio-Rad) foram adicionados a todos os poços. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 595 nm após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. Cada amostra foi lida em duplicata e os resultados foram expressos como unidade de nM pNP/min x mg proteína (OLIVEIRA et al., 2017).

---

### **Nódulos de mineralização**

O ensaio colorimétrico de vermelho de alizarina (Sigma Aldrich) foi usado para avaliar a formação do nódulo mineral. Este teste se baseia na quantificação de matriz mineralizada, indicando a diferenciação das SHED em células odontoblasto-like. As células tronco de dentes decíduos esfoliados humanos foram distribuídos em placas de 12 poços numa quantidade de  $1 \times 10^5$  células por poço e deixados para adesão em meio de cultura MEM $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, California) com 10% soro fetal bovino (SFB) até a subconfluência. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado pelos extratos com os cimentos endodônticos bioativos em meio osteogênico (MEM $\alpha$  + 10% SFB, suplementado com 50 ug/ml de ascorbato de sódio e 10 nmol/l de beta-glicerolfosfato). Após 14 dias de cultivo celular, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formalina 10 % (Sigma) por 10 minutos e depois coradas com 500 ul de vermelho de alizarina (40 nm; pH 4.2, Sigma-Aldrich). Após 10 minutos, a solução de alizarina foi aspirada e as células foram lavadas com água deionizada. Os nódulos minerais de cada grupo foram fotografados em microscopia eletrônica invertida (OLIVEIRA et al., 2017).

Após a secagem das placas, foram adicionados 280 $\mu$ L de ácido acético 10% por poço e a placa foi submetida a agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos e aquecido a 85°C por 10 minutos, seguido de choque térmico em gelo por 5 minutos. Posteriormente, 100 $\mu$ L do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para placas de 96 poços e 40 $\mu$ L de hidróxido de amônio a 10% foram adicionados a cada poço para neutralização do ácido. Para a análise quantitativa, a formação dos nódulos minerais foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm (OLIVEIRA et al., 2017).

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise estatística pelo software STATISTICA 10.0 (TIBCO Statistica® 14.0.1.25). Foram realizados testes de ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Bonferroni ( $p=0,05$ ). Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata.

## **RESULTADOS**

### **Viabilidade celular**

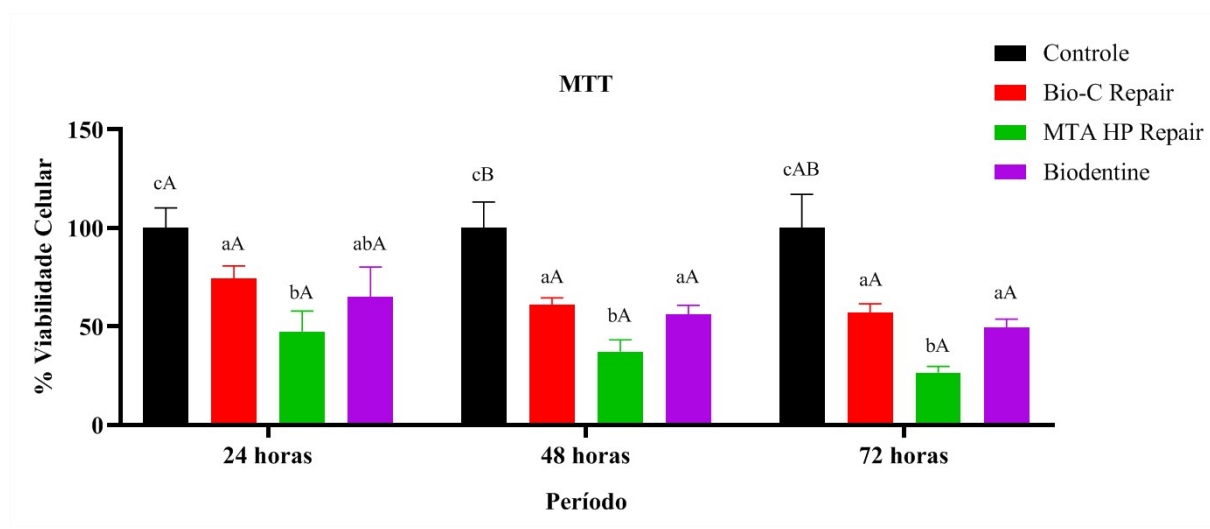
Houve interação estatisticamente significativa entre os dois fatores: Tratamento X Período ( $p<0,05$ ) (Figura 1).

Na comparação intergrupos, em todos os períodos as SHED que entraram em contato com o Bio-C Repair e Biodentine apresentaram resultados de viabilidade celular semelhantes.

---

---

Bio-C Repair foi superior ao MTA HP Repair de forma estatisticamente significativa em todos os tempos estudados. Em 24H, as células que entraram em contato com o extrato Biodentine não apresentaram diferença estatisticamente significativa daquelas que foram cultivadas com o MTA HP Repair em. Por outro lado, em 48 e 72H o Biodentine também foi mais citocompatível do que o MTA HP Repair. Em todos os períodos o grupo controle apresentou resultados estatisticamente superiores de viabilidade celular quando comparado com os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).



Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

**Figura 1** - Comparações entre os dois fatores na viabilidade celular pelo teste MTT.

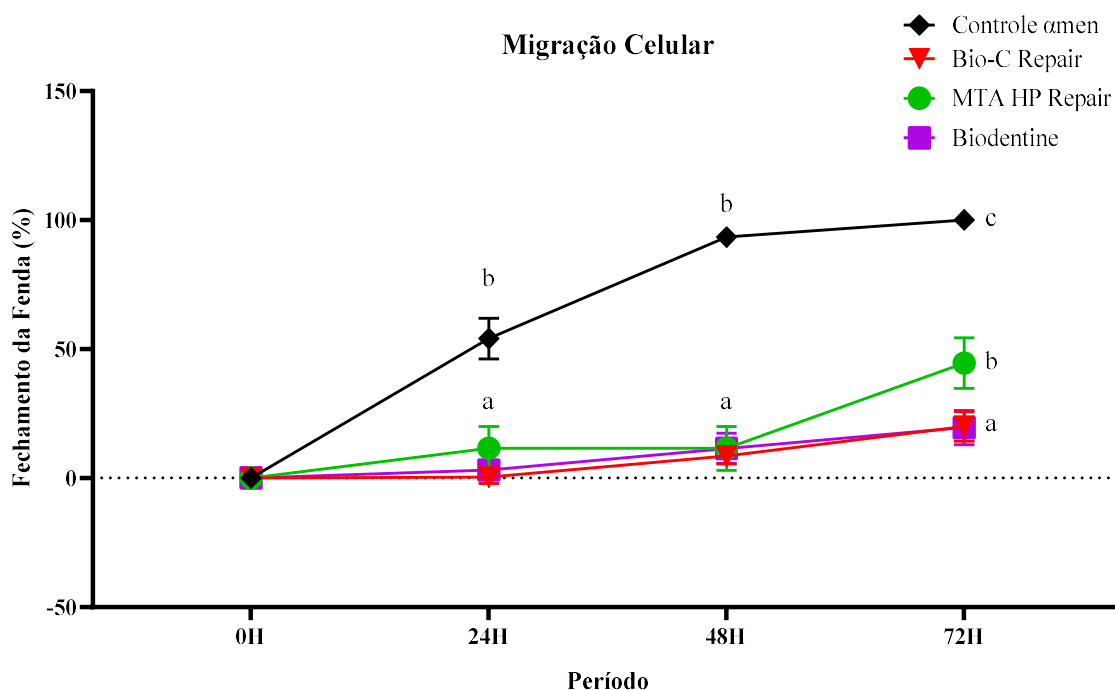
Na análise ao longo do tempo, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular entre os períodos estudados (24, 48 e 72H). O grupo controle apresentou o melhor resultado de viabilidade celular em 48H, o qual foi estatisticamente superior ao período de 24H, mas não apresentou diferença estatisticamente significativa com o período de 72H.

### Migração celular

Na análise intergrupos, em 24 e 48H não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. No período de 72H, as células que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair apresentaram resultados estatisticamente superiores de migração

quando comparado aos outros dois grupos experimentais. Em todos os períodos estudados o grupo controle apresentou resultados estatisticamente superiores do fechamento da ferida ( $p < 0,05$ ) (Figuras 2 e 3).

Na análise intragrupos, SHED que entraram em contato com o MTA HP Repair apresentaram maior porcentagem de fechamento da ferida estatisticamente significativa em 72H, quando comparado com 24 e 48H. SHED com os extratos de Bio-C Repair e Biodentine apresentaram padrões semelhantes de migração celular, os melhores resultados de fechamento da ferida foram em 72H, os quais foram estatisticamente superiores ao período de 24H, mas não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o período de 48H. O grupo controle teve o fechamento total da ferida em 72H ( $p < 0,05$ ) (Figuras 2 e 3).



Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

**Figura 2** - Fechamento da ferida (%) no teste de Migração Celular.

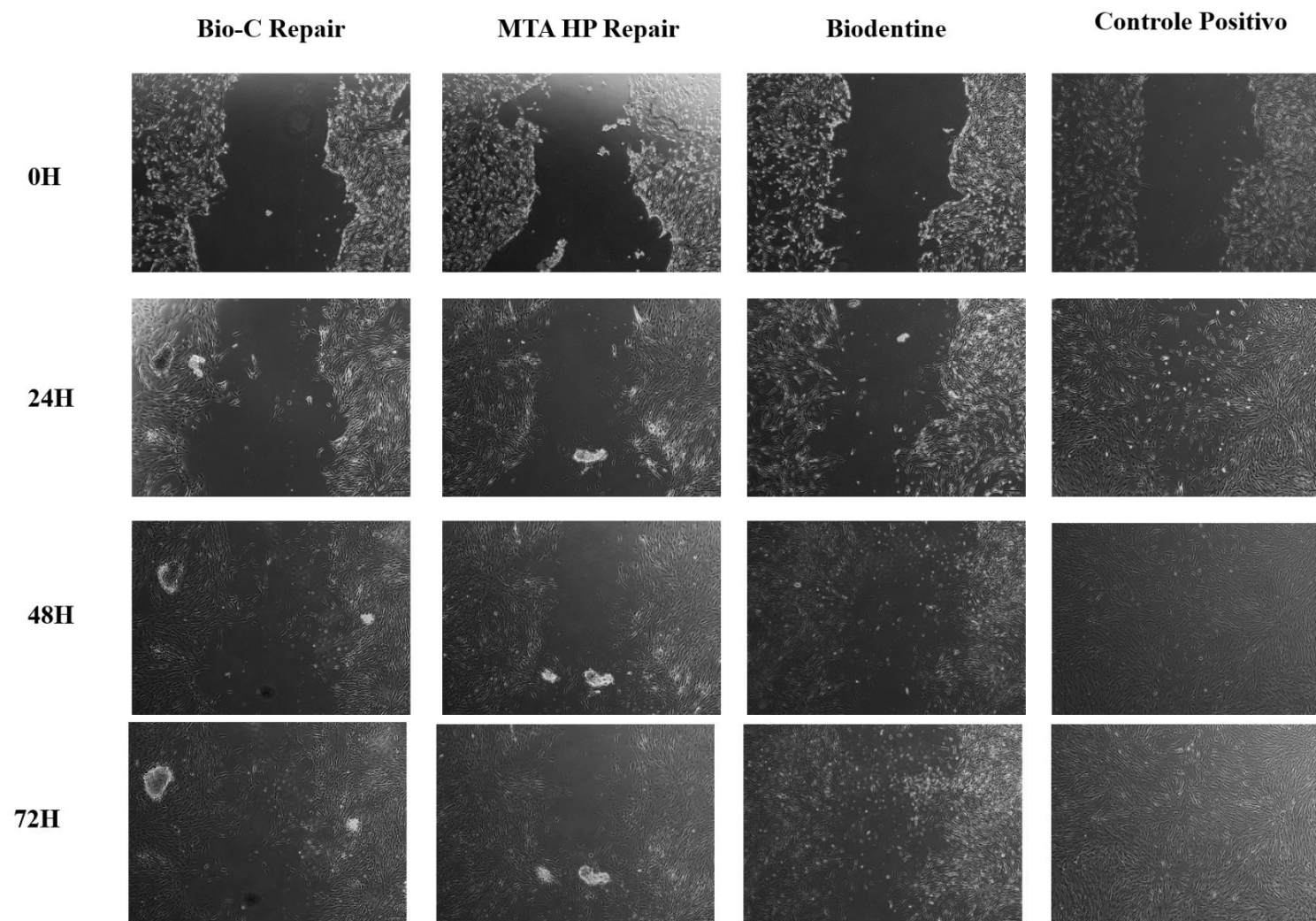
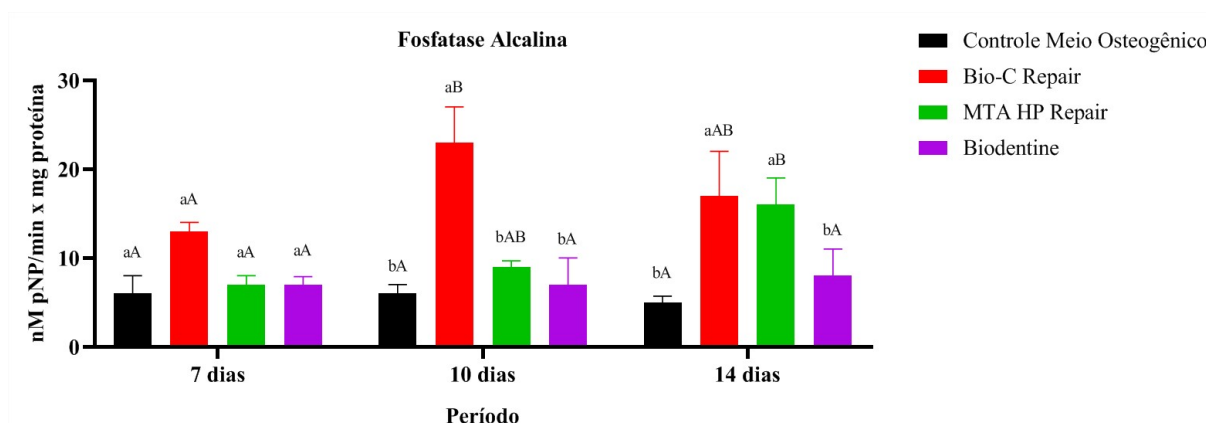


Figura 3 - Microscopia eletrônica do fechamento da ferida ao longo do tempo.

## Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) aumentou nos grupos experimentais quando comparada ao grupo controle com meio osteogênico em todos os tempos. Na comparação intergrupos, no período de 7 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Por outro lado, em 10 dias as células que entraram em contato com o cimento Bio-C Repair apresentaram maior atividade de ALP em comparação aos demais grupos de maneira estatisticamente significativa. Em 14 dias, os grupos Bio-C Repair e MTA HP Repair foram estatisticamente superiores quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

Ao observar a comparação intragrupos, foi possível observar aumento ao longo do tempo do grupo MTA HP Repair (7 dias  $\leq$  10 dias  $\leq$  14 dias). SHED que entraram em contato com o extrato de Bio-C Repair tiveram maior atividade de ALP em 10 dias, apresentando o seguinte padrão de comportamento: 7 dias  $<$  10 dias  $\geq$  14 dias. O grupo controle e o Biodentine não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo (Figura 4).



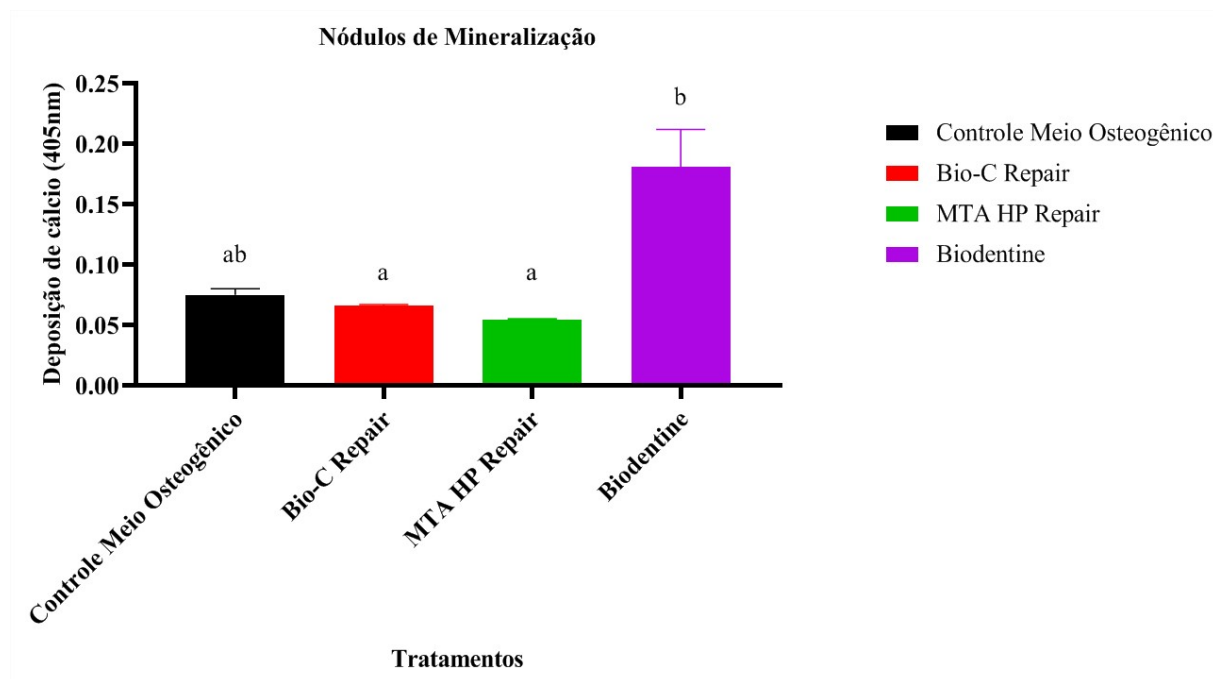
Letras minúsculas diferentes estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

**Figura 4** - Comparações entre os dois fatores na atividade de fosfatase alcalina.

## Nódulos de mineralização

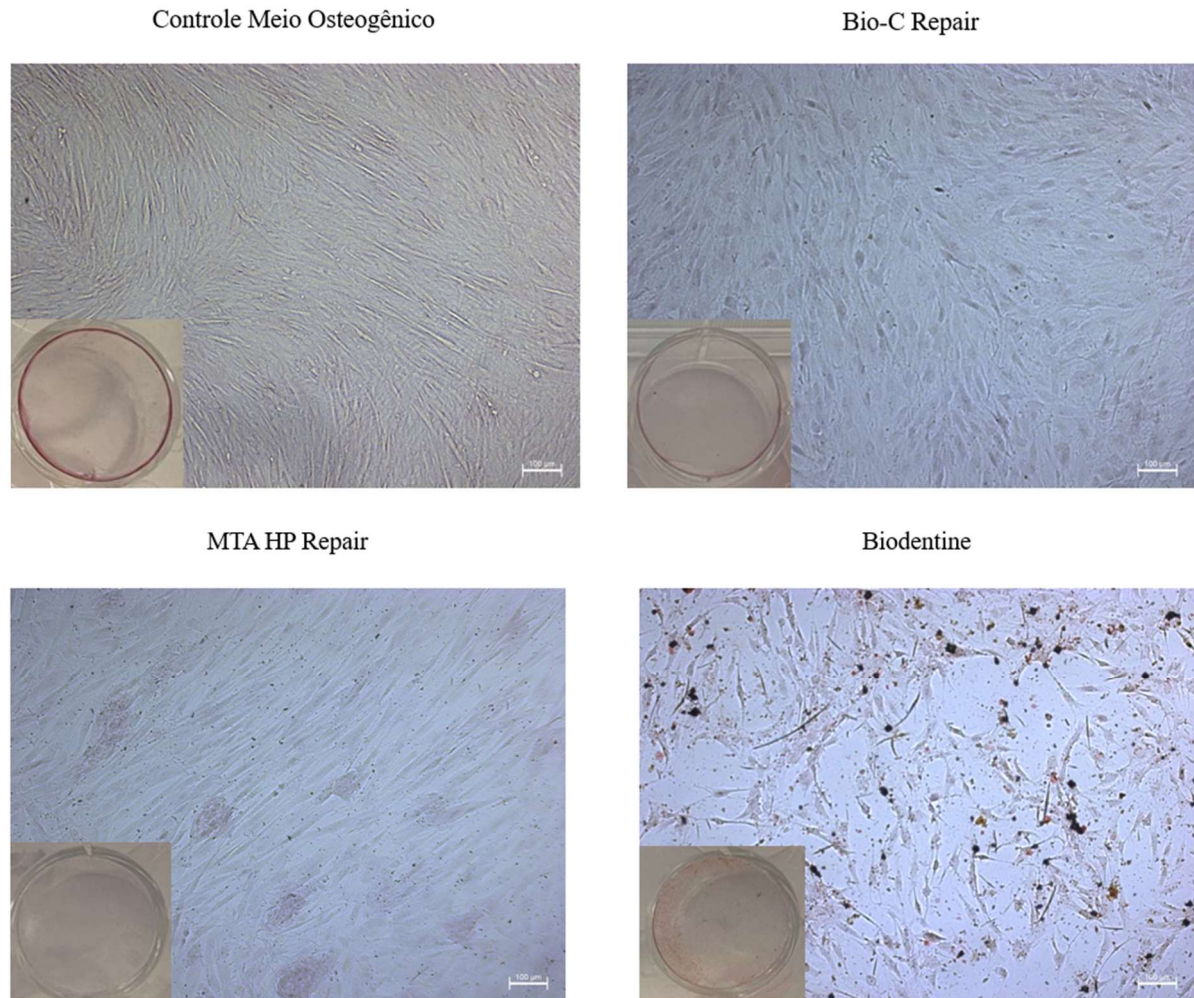
Após 14 dias de exposição celular aos cimentos biocerâmicos com meio osteogênico, o Biodentine teve efeito estimulador significativo na formação de nódulos mineralizados quando comparado aos demais grupos experimentais, porém esse efeito estimulador não apresentou

diferença estatisticamente significativa com o grupo controle. Bio-C Repair e MTA HP Repair apresentaram comportamentos semelhantes em relação a mineralização (Figuras 5 e 6).



Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na análise intergrupos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Bonferroni;  $p < 0,005$ ).

**Figura 5** – Comparações da deposição de cálcio pelo teste de Nódulos de mineralização.



**Figura 6** - Microscopia eletrônica invertida da matriz extracelular mineralizada em SHED após diferenciação osteogênica por 14 dias, evidenciada pela coloração com vermelho S de alizarina.

## DISCUSSÃO

A terapia pulpar vital exige o uso de biomateriais capazes de formar uma camada protetora sobre o tecido pulpar exposto. Portanto, a bioatividade de um material que pode ser comercializado e utilizado clinicamente deve ser conhecida e estudada. Diante disso, os cimentos biocerâmicos devem possuir propriedades biológicas específicas, que garantam o potencial reparador das células-tronco por meio da sobrevivência, proliferação, migração e indução a liberação de íons de cálcio e hidróxido, permitindo assim a ligação mineral ao componente inorgânico da dentina. No entanto, o conhecimento da interação das células-tronco de dentes decíduos com os componentes e mecanismos dos materiais bioativos ainda é limitado e pouco compreendido (COLLADO-GONZALEZ, et al. 2018; ARAUJO, et al. 2018; GHILLOTI, et al. 2020).



Neste estudo, testes *in vitro* relacionados à bioatividade e foram realizados para fornecer maior conhecimento sobre o uso de biomateriais destinados terapia de polpa vital em dentes decíduos. O ensaio baseado em colorimetria utilizado para avaliar a citotoxicidade dos materiais foi o MTT. Os resultados do teste mostraram que nos períodos mais tardios tanto Bio-C Repair quanto o Biodentine apresentaram padrões de citocompatibilidade mais promissores do que o cimento o MTA HP Repair. Estudos anteriores corroboram com o presente resultado, relatando que o Biodentine teve melhor biocompatibilidade celular quando comparado ao MTA (POGGIO et al. 2015; COLLADO-GONZÁLEZ, et al. 2018; DAHAKE et al. 2019). Ghilotti et al., 2020, utilizando células de polpa dentária humana (hDPCS) também evidenciaram que o Bio-C Repair exibiu excelente citocompatibilidade quando comparado com outros cimentos existentes no mercado (GHILOTTI et al., 2020).

A migração celular é importante para manter a homeostase e regeneração dos tecidos afetados. Portanto, os materiais odontológicos devem facilitar a migração de diferentes tipos celulares para reparar e proteger o tecido pulpar. A este respeito, no presente trabalho a migração celular de SHED parece ter sido inibida pelos materiais testados quando comparados ao grupo controle. Porém, dentre os grupos experimentais o melhor desempenho foi das células cultivadas com o extrato de MTA HP Repair. Collado-González, et al. 2018, evidenciaram em seu estudo boa migração celular em 48H, porém o trabalho em questão utilizou extratos na diluição 1:2 e 1:4, evidenciando que a maior diluição apresentou o fechamento da ferida mais rápido. Portanto, o desempenho a nível celular do material depende da diluição do extrato utilizado (PAULA, et al. 2019; COLLADO-GONZÁLEZ, et al. 2018).

A atividade de fosfatase alcalina pode ser considerada um dos marcadores precoces da diferenciação de células-tronco em odontoblastos. A enzima (ALP) é expressa nos estágios iniciais da maturação do odontoblasto/osteoblasto e assim tem papel importante na deposição mineral para permitir a formação de hidroxiapatita. No presente estudo, a atividade de fosfatase alcalina variou de acordo com o cimento utilizado, as células que entraram em contato com o grupo Bio-C Repair e MTA HP Repair apresentaram resultados superiores ao grupo controle e ao Biodentine nos períodos mais tardios, esse resultado pode indicar maior potencial de indução odonto/osteogênica desses materiais. A comparação do teste de atividade de fosfatase alcalina é complexa, até onde sabemos esse é o primeiro estudo que analisa os efeitos desse conjunto de cimentos biocerâmicos na atividade de fosfatase alcalina em células-tronco de dentes decíduos. Sismanoglu e Ercal, em 2022, mediram a atividade de ALP em 1, 3 e 7 dias, utilizando células-tronco mesenquimais (TGSCs), os resultados de 7 dias mostraram que os extratos de Biodentine e NeoMTA Plus produziram nível de atividade de ALP semelhantes, o qual foi maior que os

---

---

controles. Knorr, et al. 2021, utilizaram células-tronco da papila apical (SCAPs) e evidenciou a diminuição da atividade de ALP ao longo do tempo, resultados que contradizem com os encontrados no presente estudo, essas assimetrias entre os estudos podem ser explicadas devido as diferenças experimentais na preparação de meios condicionados, na metodologia de análise do teste e no tipo celular escolhido (KNORR, et al. 2021; SISMANOGLU, 2022).

A coloração de vermelho de alizarina foi utilizada para analisar a mineralização da matriz extracelular. Ficou nítida a baixa deposição de nódulos de mineralização no experimento em geral, porém dentre os grupos experimentais os resultados da deposição de cálcio do Biodentine foram superiores quando comparado aos demais grupos experimentais. Resultados condizentes com o estudo de Collado-González, et al. 2018 que também utilizaram SHED, no qual o Biodentine estimulou a mineralização significativa, o que foi menos pronunciado no caso do MTA Angelus. Outros estudos encontraram resultados semelhantes, como por exemplo Knorr, et al. 2021 que utilizaram células-tronco da papila apical (SCAPs) e evidenciaram também que o Biodentine apresentou maior número de nódulos quando comparado ao MTA Repair HP no período de 7 dias (RODRIGUES, et al. 2017; COLLADO-GONZÁLEZ, et al. 2018; KNORR, et al. 2021).

A heterogeneidade entre os resultados dos testes com os diferentes cimentos bioativos dificulta a escolha do material ideal. Além disso, a falta de estudos avaliando a bioatividade do Bio-C Repair, MTA HP Repair e Biodentine em SHEDs impossibilita a comparação direta dos resultados. A maior parte dos estudos *in vitro* avalia somente as propriedades biológicas dos novos materiais, porém a resposta celular pode depender do uso de cimentos frescos ou que tomaram presa, do contato direto ou indireto com as células, bem como a concentração dos materiais no meio de cultura. Portanto, estudos laboratoriais futuros devem abranger as propriedades físico-químicas dos materiais como radiopacidade, fluidez ou tempo de presa. Além disso, entender os mecanismos envolvidos na indução e diferenciação osteo/odontogênica por meio da liberação de íons cálcio, bem como o entendimento molecular desse processo é de suma importância (SANZ, et al. 2020; RODRIGUEZ-LOZANO, et al. 2022).

---

---

---

---

## CONCLUSÃO

O MTA HP Repair apresentou os melhores resultados de migração celular, enquanto que o Biodentine apresentou maior capacidade de formação de nódulos de mineralização. O Bio-C Repair mostrou resultados promissores de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina. De acordo com os resultados obtidos, o Bio-C Repair, MTA HP Repair e Biodentine destacam propriedades bioativas apropriadas para procedimentos de terapia pulpar vital em dentes decíduos.

## REFERÊNCIAS

ACADEMIC AMERICAN PEDIATRIC DENTISTRY. Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. **Pediatr Dent**. 2018 15;40(6):343-351.

AHMED GM, ABOUAUF EA, ABUBAKR N, DÖRFER CE, EL-SAYED KF. Tissue engineering approaches for enamel, dentin, and pulp regeneration: an update. **Stem Cells Int**. 2020;2020:5734539.

ARAÚJO LB, COSME-SILVA L, FERNANDES AP, OLIVEIRA TM, CAVALCANTI B N, GOMES FILHO JE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J Appl Oral Sci** [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 21 de agosto de 2023];26:e20160629.

BENETTI F, QUEIROZ ÍO A, COSME-SILVA L, CONTI LC, OLIVEIRA SHP, CINTRA LTA. Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. **Braz Dent J** [Internet]. 22 de julho de 2019 [citado 21 de agosto de 2023];30:325–32.

BOSSÙ M, IACULLI F, DI GIORGIO G, SALUCCI A, POLIMENI A, DI CARLO S. Different pulp dressing materials for the pulpotomy of primary teeth: a systematic review of the literature. **J Clin Med**. 19 de março de 2020;9(3):838.

CINTRA LTA, BENETTI F, AZEVEDO QUEIROZ ÍO, ARAÚJO LOPES JM, PENHA DE OLIVEIRA SH, SIVIERI ARAÚJO G, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. **J Endod**. maio de 2017;43(5):774–8.

COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, ORTOLANI-SELTENERICH PS, ÁLVAREZ-MURO T, LOZANO A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **Int Endod J**. [Internet]. dezembro de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];50:e19–30.

DAHAKI PT, PANPALIYA NP, KALE YJ, DADPE MV, KENDRE SB, BOGAR C. Response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (Shed) to three bioinductive materials - An in vitro experimental study. **Saudi Dent J**. janeiro de 2020;32(1):43–51.

---

---

DUARTE MAH, MARCIANO MA, VIVAN RR, TANOMARU FILHO M, TANOMARU JMG, CAMILLERI J. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. **Braz Oral Res.** 18 de outubro de 2018;32(suppl 1):e70.

GHILOTTI J, SANZ JL, LÓPEZ-GARCÍA S, GUERRERO-GIRONÉS J, PECCI-LLORET MP, LOZANO A, et al. Comparative surface morphology, chemical composition, and cytocompatibility of bio-c repair, biodentine, and proroot mta on hdpcs. **Materials** (Basel). 10 de maio de 2020;13(9):2189.

GOLDBERG M, KULKARNI AB, YOUNG M, BOSKEY A. Dentin: structure, composition and mineralization. **Front Biosci** (Elite Ed) [Internet]. 1º de janeiro de 2011 [citado 21 de agosto de 2023];3:711–35.

KIM Y, LEE D, SONG D, KIM HM, KIM SY. Biocompatibility and bioactivity of set direct pulp capping materials on human dental pulp stem cells. **Materials** (Basel). 4 de setembro de 2020;13(18):3925.

KNORR A, MESTIERI LB, PINHEIRO LS, MENDES RA, GONZALEZ HERNANDEZ PA, BARLETTA FB, et al. Cytotoxicity and bioactivity of calcium silicate-based cements in a culture of stem cells from the apical papilla. **Iran Endod J** [Internet]. 2021 [citado 21 de agosto de 2023];16(4):225–31.

KÜDEN C, KARAKAŞ SN, BATMAZ SG. Comparative chemical properties, bioactivity, and cytotoxicity of resin-modified calcium silicate-based pulp capping materials on human dental pulp stem cells. **Clin Oral Investig.** novembro de 2022;26(11):6839–53.

OLIVEIRA FA, MATOS AA, MATSUDA SS, BUZALAF MAR, BAGNATO VS, MACHADO MAAM, et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** [Internet]. 1º de abril de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];169:35–40.

OMIDI S, BAGHERI M, FAZLI M, AHMADIANKIA N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. **Iran J Basic Med Sci** [Internet]. junho de 2020 [citado 21 de agosto de 2023];23(6):768–75.

PARISAY I, QEIDARI A, SABOURI E, KHORAKIAN F, BAGHERI H. Cytotoxicity and induced apoptosis of a new bioceramic cement containing simvastatin on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Dent Res J** (Isfahan). 2022;19:79.

PAULA A, LARANJO M, MARTO CM, ABRANTES AM, CASALTA-LOPES J, GONÇALVES AC, et al. Biodentine™ boosts, whiteproroot®mta increases and life® suppresses odontoblast activity. **Materials** (Basel). 11 de abril de 2019;12(7):1184.

PAULA AB, LARANJO M, COELHO AS, ABRANTES AM, GONÇALVES AC, SARMENTO-RIBEIRO AB, et al. Assessing the cytotoxicity and cell response to biomaterials. **J Vis Exp.** 8 de julho de 2021;(173).

POGGIO C, BELTRAMI R, COLOMBO M, CECI M, DAGNA A, CHIESA M. In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. **J Clin Exp Dent.** dezembro de 2015;7(5):e584-588.

---

RODRIGUES EM, CORNÉLIO ALG, MESTIERI LB, FUENTES ASC, SALLES LP, ROSSA-JUNIOR C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (Mta) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. **Int Endod J** [Internet]. agosto de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];50(8):780–9.

RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, SANZ JL, LOZANO A, PECCI-LLORET MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. **Clin Oral Investig**. agosto de 2021;25(8):5009–24.

SANZ JL, FORNER L, LLENA C, GUERRERO-GIRONÉS J, MELO M, RENGÓ S, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of hydraulic calcium silicate-based cements (Hcscs) on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (Sheds): a systematic review of in vitro studies. **J Clin Med**. 28 de novembro de 2020;9(12):3872.

SISMANOGLU S, ERCAL P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. **Aust Endod J**. abril de 2023;49(1):66–74.

TALABANI RM, GARIB BT, MASAELI R. Bioactivity and physicochemical properties of three calcium silicate-based cements: an in vitro study. **Biomed Res Int**. 2020;2020:9576930.

TOMÁS-CATALÁ CJ, COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, FORNER L, LLENA C, et al. Biocompatibility of new pulp-capping materials neomta plus, mta repair hp, and biodentine on human dental pulp stem cells. **J Endod**. janeiro de 2018;44(1):126–32.

---

---

### 2.3 ARTIGO 3 - Análise da expressão gênica de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados após o contato com materiais biocerâmicos

#### Analysis of the gene expression of stem cells from exfoliated human deciduous teeth after contact with bioceramic materials

##### RESUMO

**Objetivo:** avaliar a viabilidade e a expressão gênica de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) para a diferenciação odonto/osteogênica e angiogênica após o contato diferentes materiais biocerâmicos. **Metodologia:** Amostras de SHED foram obtidas de um Biorrepositório. Os extratos foram preparados na diluição 1:2 e divididos nos seguintes grupos experimentais: Grupo 1 - Membrana dentino/pulpar (BBio), Grupo 2 - Bio-C Repair, Grupo 3 - MTA HP Repair e Grupo 4 - Biodentine. Foram realizados testes de viabilidade celular (Alamar Blue) e avaliação de expressão gênica (RT-PCR) para os seguintes alvos: COL, FGF-2, VEGF, OCN, OPN, DSPP e DMP-1. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Os materiais biocerâmicos mantiveram a viabilidade da SHED, sendo que a Membrana BBio e o Bio-C Repair em 48H e 72H apresentaram resultados equivalentes ao grupo controle. O Biodentine apresentou os melhores resultados de expressão de VEGF e FGF-2. A Membrana BBio se destacou na expressão de OCN e OPN. Em relação a DSPP e DMP-1 as células mostraram aumento progressivo da expressão ao longo do tempo para todos os grupos estudados. **Conclusão:** Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que todos os materiais testados apresentaram bioatividade aceitável. O Biodentine apresentou os melhores resultados de expressão gênica de RNAm para alvos angiogênicos. Todos os materiais biocerâmicos mostraram um aumento progressivo da expressão de DSPP e DMP-1 em SHED. A Membrana BBio obteve melhores resultados na expressão gênica de OCN e OPN, apresentando melhor capacidade de diferenciação osteo/odontogênica.

##### INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos envolve o estudo celular e molecular de diferentes tipos celulares, sinais desencadeadores de diferenciação e estruturas para conduzir as células ao tecido alvo lesionado. Para isso, células-tronco têm sido utilizadas devido à capacidade clonogênica, plasticidade e de diferenciação, sendo assim uma importante ferramenta para a

---

regeneração tecidual. Os dentes decíduos humanos representam uma fonte acessível de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED). Esse tipo celular foi caracterizado na literatura como uma população altamente proliferativa, multipotencial e com capacidade de diferenciação em diversos tipos de células, como células neurais, adipócitos, osteoblastos e odontoblastos. Assim, é de suma importância conhecer os diferentes tipos de materiais bioativos que prometem alcançar os efeitos desejados em terapias pulpares vitais (ATHANASIADOU, et al., 2018; BERGAMO, et al., 2020).

O material de capeamento pulpar ideal deve ser capaz de promover simultaneamente a cicatrização da polpa dentária, a indução de dentina reparadora, além de prevenir a infiltração bacteriana e desencadear mínima inflamação. Os cimentos à base de silicato de cálcio têm sido amplamente desenvolvidos pela indústria e utilizados em terapia pulpar vital, esses materiais são aplicados diretamente na polpa, o que exige que sejam bioativos. Portanto, a avaliação da bioatividade dos materiais capeadores é essencial para evitar o efeito citotóxico dos produtos nas células pulpares, os quais podem muitas vezes levar a morte celular (MANASPON, et al., 2021; SUBHI, et al., 2021).

Como as pesquisas atuais devem verificar a eficácia celular e molecular dos biomateriais em desenvolvimento, este estudo abre novas perspectivas de tratamento para a terapia pulpar em dentes decíduos. (BALATA et al., 2017; SILVA et al., 2017; LOURENÇO-NETO et al., 2022). O entendimento das interações entre os novos materiais biocerâmicos do mercado e o tecido vivo permanece incerto, diante disso, estudos *in vitro* de cultura celular ajudam na seleção do material ideal, o que pode garantir, o sucesso clínico do procedimento (ARAÚJO, et al., 2018; ATHANASIADOU, et al., 2018; SISMANOGLU, ERCAL 2022). A literatura aponta estudos da expressão genética de Células-Tronco de Polpa de Dentes Permanentes Humanos (DPSCs) relacionada aos efeitos biológicos de diversos cimentos. No entanto, a expressão genética de SHED cultivadas em diferentes materiais biocerâmicos precisa ser estudada e analisada detalhadamente (MARU, et al., 2021). Portanto, considerando que a natureza da resposta da SHED com diferentes materiais capeadores não está bem definida, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade e a expressão gênica de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados para a diferenciação odonto/osteogênica e angiogênica após o contato diferentes materiais biocerâmicos. As hipóteses nulas adotadas foram: (1) Não houve diferença na viabilidade de SHED após o contato com diferentes materiais à base de silicato de cálcio. (2) Os materiais testados foram igualmente capazes de induzir o potencial odonto/osteogênico e angiogênico da SHED.

---

## **METODOLOGIA**

### **Considerações éticas**

A realização do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) sob o número CAAE: 59714322.3.0000.5417.

### **Seleção da amostra**

SHED do Biorrepositório da FOB/USP regulamentado pelas diretrizes do CEP e CONEP foram selecionadas (CAAE 59714322.3.0000.5417). O responsável pelo paciente foi devidamente informado sobre os riscos e benefícios da pesquisa e autorizou a participação do menor por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O menor também concordou com a participação por meio do Termo de Assentimento.

### **Membrana de Bioestimulação dentino/pulpar (BBio)**

A Membrana Bioestimulação dentino/pulpar (BBio) (Patente - n<sup>o</sup>: BR1020170222373) é uma membrana multicamada cuja as proporções de cada camada foram baseadas em estudos prévios, sendo: 1,5 g de quitosana (Sigma Aldrich, St. Louis USA), 1,5 g de alginato e 1,5 g de cimento de silicato de cálcio (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018; MACHADO et al., 2020; LOURENÇO-NETO et al., 2022). Cada camada foi seca dentro do forno a 30° C durante 15 minutos. Ao final do processo, foi realizada secagem final por um período de 24H. Após final desse período, os biomateriais foram retirados das placas de petri (60X15mm) com auxílio de pinça, as membranas foram esterilizadas por luz ultravioleta por 1 hora em cabine de segurança biológica.

### **Preparo das Amostras**

Cada material foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante, os extratos foram baseado nas Normas ISO 10993. Os materiais foram preparados na concentração de 1mg/mL MEMa com 10% de soro fetal bovino de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 - Membrana dentino/pulpar (BBio), Grupo 2 - Bio-C Repair, Grupo 3 - MTA HP Repair e Grupo 4 - Biodentine. Todas as amostras foram moldadas em tubo de polietileno cilíndrico estéril (diâmetro = 5 mm e altura = 3 mm). Posteriormente, as mesmas foram mantidas em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 6H até atingirem a presa ideal, cada amostra foi esterilizada por 1 hora em luz ultravioleta. Para preparo dos extratos a amostra foi imersa em 1 mL de meio ( $\alpha$ MEM - Invitrogen, Carlsbad, California) + 10% SFB (FBS - Thermo

---

---



Fisher Scientific, USA) + Solução antimicótica e antibiótica a 1% (Anti-Anti - Gibco, Grand Island, NY, USA) e incubados por 3 dias a 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final desse período, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro estéril de 0,22 mm (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para obtenção do extrato diluído 1:2, foi adicionado mais 1 mL de meio  $\alpha$ MEM + 10% SFB. (COLLADO-GONZÁLEZ et al, 2017; CINTRA et al., 2017; BENETTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021).

### **Viabilidade celular**

O AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, nº DAL1100), é um composto não tóxico, que reduz a resazurina a resorufina. SHED foram plaqueadas em placas de 96 poços (1 x 10<sup>4</sup> células/1 mL de meio por poço) e incubados por 24H em ar umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C a fim de atingir a adesão celular. Após a adesão, essas células foram cultivadas por 24, 48 e 72H com os aos extratos dos materiais biocerâmicos. Decorrido cada período, os sobrenadantes foram descartados e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), foi adicionado em 100ul reagente Alamar Blue por poço (1:100). As placas foram protegidas de luz direta e incubadas por 1 hora a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. A densidade foi medida usando o leitor automático de microplacas (Synergy Mx; BioTek Instruments, EUA), com o software de análise de dados Gen5, em comprimentos de onda correspondente a 560-590 nm. Lembrando que o grupo controle foi mantido com  $\alpha$ MEM suplementado com 10% SFB.

### **Expreção gênica de marcadores celulares (RT-PCR)**

A expressão de RNAm para marcadores celulares foi avaliada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) após o períodos de 3, 6, 12 e 24H. Essa técnica consiste na extração do RNAm total das células após o tratamento realizado utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (LifeTechnologies®, Carlsbad, California, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar e determinar a qualidade do RNAm de cada amostra foi realizada a leitura em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). A fita complementar de DNA (DNAc) foi obtida a partir da transcrição do RNAm utilizando Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA), segundo recomendações do fabricante. Os alvos utilizados foram sintetizados e validados: COL, FGF2, VEGF, OCN, OPN, DSPP e DMP-1, adquiridos da empresa Thermo Fisher Scientific®, sendo utilizados segundo recomendações do kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (LifeTechnologies, Branchburg, NJ, USA). As

---

amostras foram adicionados à uma placa de 384 poços (Applied Biosystems®, USA). Após a confecção dos ensaios a placa foi inserida e lida no aparelho VIIA 7 (Applied Biosystems®, USA). O gene de referência utilizado foi o GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

### **Análise estatística**

Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software STATISTICA 10.0 (TIBCO Statistica® 14.0.1.25). Todos os resultados foram submetidos ao teste ANOVA a dois critérios, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Viabilidade celular**

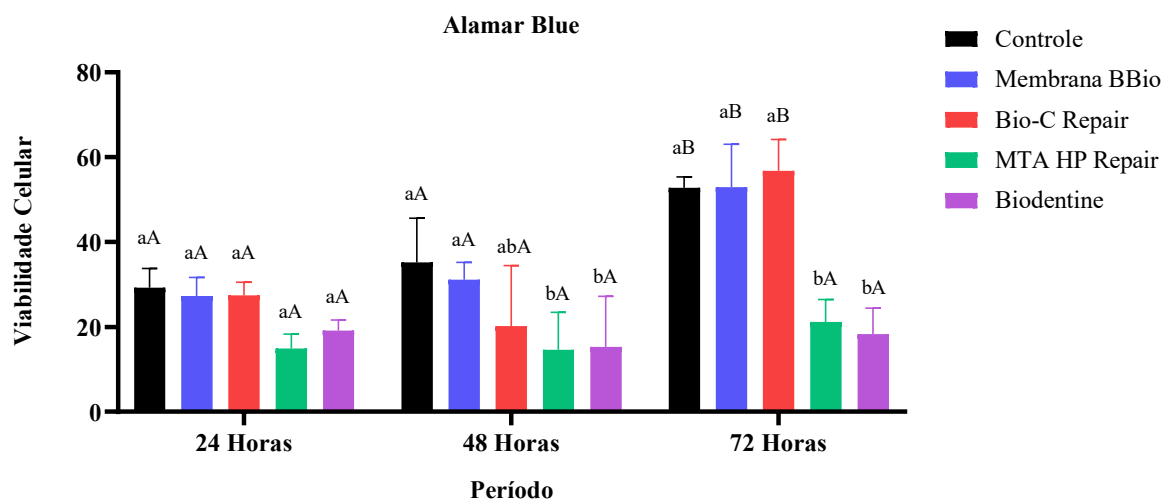
Houve interação estatisticamente significativa entre os dois fatores: Tratamento X Período ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

Na comparação intergrupo, em 24H não houve diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular das SHED que entraram em contato com os tratamentos. Tanto em 48H quanto em 72H, a Membrana BBio e o Bio-C Repair foram mais citocompatíveis do que os grupos MTA HP Repair e Biodentine. Sendo que os dois primeiros obtiveram padrões de viabilidade celular semelhantes ao grupo controle.

Na comparação intragrupo, os grupos Membrana BBio, Bio-C Repair e controle apresentaram maior viabilidade celular em 72H quando comparado aos demais períodos estudados, de maneira estatisticamente significativa. MTA HP Repair e Biodentine não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo.

---

---



Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

**Figura 1** - Comparações entre os dois fatores na viabilidade celular pelo teste Alamar Blue.

### Expreção gênica de marcadores celulares (RT-PCR)

A expressão gênica de RNAm de SHED foi avaliada após o contato com os materiais bioativos para os alvos: COL, FGF2, VEGF, OCN, OPN, DSSP e DMP-1 em 3H, 6H, 12H e 24H. O gene de referência utilizado foi o GAPDH. Houve interação entre os fatores estudados: tratamento X período para os alvos COL, FGF2, VEGF, OCN, OPN. Para os marcadores odontogênicos DSPP e DMP-1 o período influenciou de maneira estatisticamente significativa na expressão gênica.

Em relação a expressão de RNAm de COL, na comparação intergrupos em 3H e 6H não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em 12H os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, a Membrana BBio apresentou menor expressão de COL em comparação com os demais grupos experimentais, porém todos os grupos experimentais foram equivalentes ao grupo controle. Em 24H, as células que entraram em contato com o extrato de MTA HP Repair expressaram maior quantidade de COL quando comparado a todos os outros grupos. Seguido por Bio-C Repair  $\geq$  Controle  $\geq$  Biodentine  $\geq$  Membrana BBio. Na comparação intragrupos, a Membrana BBio e Biodentine evidenciaram queda da expressão de COL ao longo do tempo. As SHED que entraram em contato com o MTA HP Repair apresentaram aumento estatisticamente significativo em 24H quando comparado aos demais períodos. O grupo controle e o Bio-C Repair não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para COL.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	1,009 ± 0,101 <sup>aA</sup>	1,095 ± 0,222 <sup>aA</sup>	0,938 ± 0,173 <sup>abA</sup>	0,991 ± 0,039 <sup>aA</sup>
<b>Membrana BBio</b>	1,126 ± 0,178 <sup>aA</sup>	0,854 ± 0,093 <sup>aAB</sup>	0,542 ± 0,110 <sup>aB</sup>	0,499 ± 0,082 <sup>bB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	1,233 ± 0,031 <sup>aA</sup>	1,149 ± 0,069 <sup>aA</sup>	1,000 ± 0,053 <sup>bA</sup>	1,251 ± 0,040 <sup>aA</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	1,234 ± 0,083 <sup>aA</sup>	1,198 ± 0,132 <sup>aA</sup>	1,016 ± 0,132 <sup>bA</sup>	1,772 ± 0,315 <sup>cB</sup>
<b>Biodentine</b>	1,389 ± 0,111 <sup>aA</sup>	1,072 ± 0,045 <sup>aAB</sup>	0,988 ± 0,009 <sup>abB</sup>	0,712 ± 0,255 <sup>abB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Para FGF2, houve aumento estaticamente significativo das células que foram tratadas com o extrato de Biodentine em 24H, tanto na comparação intergrupo quanto intragrupos. Em relação aos demais tratamentos e períodos, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para FGF2.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	0,975 ± 0,067 <sup>aA</sup>	1,099 ± 0,174 <sup>aA</sup>	0,986 ± 0,117 <sup>aA</sup>	0,983 ± 0,032 <sup>aA</sup>
<b>Membrana BBio</b>	0,429 ± 0,050 <sup>aA</sup>	0,415 ± 0,061 <sup>aA</sup>	0,629 ± 0,101 <sup>aA</sup>	1,463 ± 0,557 <sup>aA</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	0,834 ± 0,080 <sup>aA</sup>	1,160 ± 0,115 <sup>aA</sup>	0,850 ± 0,018 <sup>aA</sup>	0,959 ± 0,051 <sup>aA</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	0,741 ± 0,035 <sup>aA</sup>	0,972 ± 0,104 <sup>aA</sup>	0,724 ± 0,195 <sup>aA</sup>	1,007 ± 0,069 <sup>aA</sup>
<b>Biodentine</b>	1,168 ± 0,159 <sup>aA</sup>	1,788 ± 0,090 <sup>aA</sup>	1,862 ± 0,177 <sup>aA</sup>	6,142 ± 3,574 <sup>bB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

A expressão de RNAm de VEGF, na comparação intergrupo em 3H foi possível notar diferença estatisticamente significativa entre os grupos: Biodentine > Bio-C Repair ≥ MTA HP Repair ≥ Controle ≥ Membrana BBio. Em 6H o grupo tratado com Biodentine novamente obteve melhores resultados, os quais foram estatisticamente superiores aos grupos controle e Membrana BBio. Em 12H, o Biodentine foi novamente superior aos demais grupos de maneira estatisticamente significativa. O mesmo aconteceu em 24H, período que também foi possível notar padrão semelhante de expressão de VEGF dos demais grupos experimentais, onde a

Membrana BBio e o Bio-C Repair foram estatisticamente superiores ao grupo controle. Na comparação intragrupo de VEGF, Bio-C Repair, MTA HP Repair e o grupo controle não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo. Por outro lado, nota-se um aumento da expressão de VEGF ao longo do tempo das SHED que foram tratadas com a Membrana BBio, no qual há diferença estatisticamente significativa no período de 24H. Biodentine apresentou o seguinte padrão de comportamento ao longo do tempo  $24H \geq 3H \geq 12H \geq 6H$  (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para VEGF.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	0,948 ± 0,217 <sup>abA</sup>	0,985 ± 0,047 <sup>aA</sup>	0,851 ± 0,261 <sup>aA</sup>	0,966 ± 0,083 <sup>aA</sup>
<b>Membrana BBio</b>	0,596 ± 0,072 <sup>bA</sup>	0,750 ± 0,241 <sup>aA</sup>	1,054 ± 0,170 <sup>aA</sup>	2,143 ± 0,307 <sup>bbB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	2,236 ± 0,138 <sup>cA</sup>	1,376 ± 0,058 <sup>abA</sup>	2,088 ± 0,249 <sup>bcA</sup>	2,325 ± 0,246 <sup>bA</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	1,778 ± 0,099 <sup>acA</sup>	1,406 ± 0,245 <sup>abA</sup>	1,673 ± 0,247 <sup>abA</sup>	1,470 ± 0,086 <sup>abA</sup>
<b>Biodentine</b>	3,482 ± 0,464 <sup>dAC</sup>	2,294 ± 0,052 <sup>bbB</sup>	2,750 ± 0,268 <sup>cAB</sup>	4,227 ± 1,034 <sup>cC</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Para o alvo OCN, na comparação intergrupos nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 3 e 6H. Em 12H a Membrana BBio foi superior ao Bio-C Repair de maneira estatisticamente significativa, mas a mesma apresentou padrões semelhantes quando comparada aos demais grupos. Por outro lado, em 24H a Membrana BBio e Biodentine mostraram melhores resultados quando comparados aos demais grupos. Na comparação intragrupos, os grupos Bio-C Repair, MTA HP Repair e controle não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados. A Membrana BBio, exibiu em 24H maior expressão de OCN. Biodentine apresentou melhor resultado em 24H e pior em 6H, com diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para OCN.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	1,021 ± 0,076 <sup>aA</sup>	1,037 ± 0,078 <sup>aA</sup>	1,021 ± 0,056 <sup>abA</sup>	1,040 ± 0,080 <sup>aA</sup>
<b>Membrana BBio</b>	0,859 ± 0,112 <sup>aA</sup>	1,266 ± 0,051 <sup>aA</sup>	1,426 ± 0,104 <sup>bA</sup>	2,399 ± 0,675 <sup>bB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	1,044 ± 0,159 <sup>aA</sup>	0,960 ± 0,169 <sup>aA</sup>	0,732 ± 0,044 <sup>aA</sup>	0,823 ± 0,026 <sup>aA</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	1,189 ± 0,210 <sup>aA</sup>	0,870 ± 0,088 <sup>aA</sup>	0,896 ± 0,128 <sup>abA</sup>	0,725 ± 0,081 <sup>aA</sup>
<b>Biodentine</b>	1,123 ± 0,042 <sup>aAB</sup>	0,959 ± 0,115 <sup>aA</sup>	1,086 ± 0,157 <sup>abAB</sup>	1,745 ± 0,571 <sup>bB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Na análise por RT-PCR da expressão de RNAm para OPN, na comparação intergrupos as diferenças estatisticamente significativas apareceram em 24H, onde a Membrana BBio foi estatisticamente superior a todos os grupos, os demais grupos experimentais apresentaram padrões semelhantes de expressão para OPN. Todos os grupos experimentais foram superiores ao grupo controle. Na comparação intragrupos, a Membrana BBio, Bio-C Repair e Biodentine obtiveram em 24H resultados estatisticamente superiores aos demais períodos estudados. MTA HP Repair apresentou aumento da expressão de OPN ao longo tempo: 24H  $\geq$  12H  $\geq$  6H  $\geq$  3H, mas 24H  $\neq$  3H e 6H (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para OPN.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	1,151 ± 0,400 <sup>aA</sup>	1,273 ± 0,573 <sup>aA</sup>	0,962 ± 0,041 <sup>aA</sup>	1,074 ± 0,368 <sup>aA</sup>
<b>Membrana BBio</b>	1,442 ± 0,516 <sup>aA</sup>	2,801 ± 0,686 <sup>aA</sup>	3,054 ± 0,726 <sup>aA</sup>	9,710 ± 2,049 <sup>bB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	1,703 ± 0,646 <sup>aA</sup>	2,411 ± 0,573 <sup>aA</sup>	2,596 ± 0,745 <sup>aA</sup>	5,575 ± 0,889 <sup>cB</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	1,123 ± 0,416 <sup>aA</sup>	1,397 ± 0,703 <sup>aA</sup>	1,948 ± 0,760 <sup>aAB</sup>	4,125 ± 1,488 <sup>cB</sup>
<b>Biodentine</b>	1,481 ± 0,847 <sup>aA</sup>	0,994 ± 0,155 <sup>aA</sup>	1,283 ± 0,385 <sup>aA</sup>	4,512 ± 1,704 <sup>cB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Em relação a expressão de RNAm para o marcador odontogênico, não houve interação entre os fatores estudados, somente o período influenciou na expressão de DSPP. E nessa comparação ao longo do tempo, percebe-se um padrão de comportamento entre todos os

tratamentos, no qual os períodos de 12 e 24H são estatisticamente superiores a 3 e 6H (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para DSPP.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	0,646 ± 0,560 <sup>aA</sup>	1,124 ± 1,191 <sup>aA</sup>	1,093 ± 1,143 <sup>aB</sup>	1,557 ± 1,267 <sup>aB</sup>
<b>Membrana BBio</b>	0,611 ± 0,540 <sup>aA</sup>	1,389 ± 0,584 <sup>aA</sup>	1,972 ± 0,548 <sup>aB</sup>	2,175 ± 0,899 <sup>aB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	0,534 ± 0,926 <sup>aA</sup>	0,492 ± 0,853 <sup>aA</sup>	4,430 ± 0,658 <sup>aB</sup>	2,961 ± 0,762 <sup>aB</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	0,328 ± 0,568 <sup>aA</sup>	0,595 ± 0,649 <sup>aA</sup>	2,938 ± 1,801 <sup>aB</sup>	3,460 ± 1,194 <sup>aB</sup>
<b>Biodentine</b>	0,814 ± 0,819 <sup>aA</sup>	0,253 ± 0,438 <sup>aA</sup>	3,344 ± 0,838 <sup>aB</sup>	3,600 ± 4,376 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para DMP-1 também não mostrou interação entre os fatores. Por tanto, ao longo do tempo é possível notar que a expressão de DMP-1 progride, sendo que há diferença estatisticamente significativa de 12 e 24H quando comparada a 3H. É importante ressaltar que em 12H não houve expressão de DMP-1 no grupo controle, impedindo o cálculo da quantificação relativa do alvo nesse período. Portanto, para efeito de comparação, em 12H o grupo MTA HP Repair, foi adotado como grupo controle (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para DMP-1.

TRATAMENTOS	3 horas (média ± DP)	6 horas (média ± DP)	12 horas (média ± DP)	24 horas (média ± DP)
<b>Controle</b>	0,333 ± 0,577 <sup>aA</sup>	0,333 ± 0,577 <sup>aAB</sup>	-	0,823 ± 0,751 <sup>aB</sup>
<b>Membrana BBio</b>	0,673 ± 0,226 <sup>aA</sup>	1,434 ± 0,375 <sup>aAB</sup>	1,598 ± 1,398 <sup>aB</sup>	1,068 ± 1,177 <sup>aB</sup>
<b>Bio-C Repair</b>	0,000 ± 0,000 <sup>aA</sup>	0,309 ± 0,536 <sup>aAB</sup>	1,562 ± 0,401 <sup>aB</sup>	2,003 ± 0,687 <sup>aB</sup>
<b>MTA HP Repair</b>	0,000 ± 0,000 <sup>aA</sup>	0,390 ± 0,675 <sup>aAB</sup>	0,562 ± 0,511 <sup>aB</sup>	1,855 ± 1,608 <sup>aB</sup>
<b>Biodentine</b>	0,197 ± 0,341 <sup>aA</sup>	0,427 ± 0,740 <sup>aAB</sup>	1,072 ± 0,122 <sup>aB</sup>	0,301 ± 0,521 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação intragrupos (ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Esse é um estudo inédito que utilizou SHED em contato com diferentes materiais capeadores, avaliando a expressão gênica de: COL, FGF-2, VEGF, OCN, OPN, DSSP e DMP-1, permitindo assim a avaliação de marcadores importantes para a diferenciação odontogênica, osteogênica e angiogênica. Diversos materiais de capeamento pulpar têm sido lançados no mercado, porém o mecanismo biológico ligado ao estímulo de reação e regeneração da polpa desses novos materiais ainda permanece desconhecido, principalmente quando envolve SHED. A literatura aponta limitações relacionadas aos tipos celulares testados, a duração e concentração da exposição e formulação dos cimentos, além da falta de estudos que forneçam comparações celulares e moleculares entre os diferentes materiais disponíveis (MANASPON, et al., 2021).

Neste estudo, foi possível observar que o extrato diluído 1:2 de todos os materiais biocerâmicos mantiveram a viabilidade de SHED, com destaque para Membrana BBio e o Bio-C Repair que em 48H e 72H apresentaram resultados equivalentes ao grupo controle ( $\alpha$ MEM + 10% SFB). Araújo, et al. 2018 demonstraram bons resultados de viabilidade celular de SHED cultivadas em extrato com 1 mg/mL de Biodentine, MTA e Hidróxido de cálcio. Ghilotti, et al., 2019, utilizou células da polpa dentária humana (hDPCs) e também encontrou resultados promissores do Bio-C Repair quando comparado ao Biodentine e ao MTA, resultados que corroboram com o presente estudo (ARAÚJO, et al. 2018; GHILOTTI, et al., 2019)

A comparação da expressão gênica com os dados presentes na literatura é complexa e escassa, pois poucos estudos utilizaram SHED em contato com extrato de diferentes materiais biocerâmicos. COL é o marcador de diferenciação precoce de odontoblastos e osteoblastos, no presente estudo os níveis de expressão de COL foram regulados positivamente ( $p < 0,05$ ) em SHED tratadas MTA HP Repair quando comparadas aos demais grupos. Peng, et al. 2011 utilizaram células da polpa dentária humana (hDPCs) e mediram a expressão de COL após o contato das células com o silicato tricálcico (principal componente do MTA e do Biodentine), apresentando resultados positivos desse componente presente nos materiais que foram selecionados para o estudo (PENG, et al., 2011; SUBHI, et al., 2021).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína relacionada ao processo de angiogênese, enquanto que o FGF-2 é o fator de crescimento de fibroblastos. A literatura aponta que ambos são produzidos por diferentes tipos de células e são importantes para avaliar a regeneração pulpar através do suprimento de sangue, fornecimento de oxigênio, bem como o transporte de células-tronco para o tecido lesionado. Os resultados da expressão de VEGF e FGF-2 mostraram uma superioridade das células que entraram em contato com o

---



extrato de Biodentine. Olcay, et al., 2019, avaliaram o potencial angiogênico de diferentes materiais a base de silicato de cálcio, dentre eles o MTA e o Biodentine, em contato com diferentes tipos hDPSCs, células-tronco do ligamento periodontal humano (hPLSCs) e células-tronco germinativas dentárias humanas (hTGSCs)), evidenciando que todos induziram uma liberação semelhante de fatores de crescimento angiogênicos em todos os períodos estudados e nos diferentes tipos de células-tronco (OLCAY, et al., 2019; BERGAMO, et al. 2020; BERGAMO, et al. 2021).

OPN e OCN são marcadores de estágio tardio de diferenciação osteoblástica. Em ambos, a Membrana BBio apresentou resultados promissores ao longo do tempo, destacando-se em 24H. Os resultados de ambos os genes podem ser relacionados ao possível papel da Membrana BBio na indução osteogênica. Maru, et al., 2022, mostraram em seu trabalho que o nível mais alto de expressão de mRNA de OCN foi relatado em SHEDs cultivados em Biodentine ( $2,51 \pm 0,07$ ) e MTA ( $2,58 \pm 0,07$ ) após 24H de incubação, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo no qual as SHED foram cultivadas em extrato de Membrana BBio. Subhi, et al., 2021 traz um ponto importante, nesse trabalho os autores associaram o cimento Portland com a quitosana e concluíram que essa combinação não é tóxica e promove a diferenciação dentinogênica/osteogênica, bem como atividade de mineralização de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados, apresentando uma expressão de OPN e OCN positiva para SHED. O que vai de encontro com os resultados do nosso estudo, pois a membrana BBio é uma associação de cimento de silicato de cálcio com gel de quitosana (SUBHI, et al., 2021; MARU, et al., 2022)

Os odontoblastos são essenciais para a formação de dentina reparadora em um possível dente traumatizado. Para que um material de capeamento pulpar seja considerado bioativo, estimular a diferenciação de células-tronco em odontoblastos torna-se essencial. O DSPP é um marcador específico para o início da diferenciação odontogênica, sendo fundamental para a regulação da formação de cristais e mineralização da matriz dentinária. O DMP-1 desempenha uma função reguladora na organização da matriz de colágeno e também na mineralização da dentina (ARAÚJO et. al., 2018; ATHANASIADOU, et al., 2018). Nossos resultados mostraram que as células tratadas com os diferentes materiais biocerâmicos mostraram um aumento progressivo da expressão de ambos os genes dentinários, atingindo resultados mais altos em 24H. Resultados de estudos anteriores com SHED e hDPSC sugeriram uma vantagem do cimento MTA HP Repair em tais alvos, porém os autores utilizaram tempos mais tardios para realização do RT-PCR (ARAÚJO et. al., 2018; GUNGOR, et al., 2022).

---

---

A bioatividade e diferenciação das células-tronco da polpa dentária é regulada por moléculas sinalizadoras, incluindo fatores de crescimento e seus receptores. É possível que as diferentes respostas de SHED aos materiais testados se dão por conta da modulação e liberação de fatores de crescimento, bem como a ativação das vias de sinalização e transcrição. Embora a avaliação desses fatores estejam presentes nesse trabalho, esses são pontos fundamentais para novas investigações aos diferentes materiais biocerâmicos que têm surgido no mercado (ARAÚJO et. al., 2018).

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que todos os materiais testados apresentaram bioatividade aceitável. O Biodentine apresentou os melhores resultados de expressão gênica de RNAm para alvos angiogênicos. Todos os materiais biocerâmicos mostraram um aumento progressivo da expressão de DSPP e DMP-1 em SHED. A Membrana BBio obteve melhores resultados na expressão gênica de OCN e OPN, apresentando melhor capacidade de diferenciação osteo/odontogênica.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO LB, COSME-SILVA L, FERNANDES AP, OLIVEIRA TM DE, CAVALCANTI B DAS N, GOMES FILHO JE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J Appl Oral Sci**.
- ATHANASIADOU, E; PASCHALIDOU, M; THEOCHARIDOU, A; KONTOUDAKIS, N; ARAPOSTATHIS, K; BAKOPOULOU, A. Biological interactions of a calcium silicate based cement (Biodentine™) with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. **Dent Mater**. 2018 Dec;34(12):1797-1813.
- SISMANOGLU S, ERCAL P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. **Aust Endod J**. abril de 2023;49(1):66–74.
- BERGAMO, M. T.; VITOR, L. L. R.; DIONÍSIO, T. J.; et al. Could the photobiomodulation therapy induce angiogenic growth factors expression from dental pulp cells? **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 8, p. 1751–1758, 2021.
- OLIVEIRA, P.; BERGAMO, M. T.; VITOR, L. L. R.; LOPES, N. M.; et al. Angiogenic protein synthesis after photobiomodulation therapy on SHED: a preliminary study. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 9, p. 1909–1918, 2020.
- MANASPON, C.; JONGWANNASIRI, C.; CHUMPRASERT, S.; et al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 209, 2021.
-

---

---

SUBHI, H.; HUSEIN, A.; MOHAMAD, D.; *et al.* Chitosan-Based Accelerated Portland Cement Promotes Dentinogenic/Osteogenic Differentiation and Mineralization Activity of SHED. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3358, 2021.

BALATA GF, ABDELHADY MI, MAHMOUD GM, MATAR MA, ABD EL-LATIF AN. Formulation of Saudi propolis into biodegradable chitosan chips for vital pulpotomy. **Curr Drug Deliv.** 2017 Jan 25.

SILVA MD, NETO NL, COSTA SA, COSTA SM, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MA. Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 2017;71:498-503.

LOURENÇO NETO, N, VITOR, LLR, COSTA SA, COSTA SM. CRUVINEL T, OLIVEIRA TM, *et al.* Physicochemical and biological properties of a biostimulating membrane (BBio) for pulp capping. **Materials Letters** 2022;38: 131186.

MARU, V.; SHETTY, O.; DIXIT, U.; *et al.* SHED's Response to Various Pulpotomy Materials: Cytotoxicity and Gene Expression Analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 45, n. 6, p. 406–413, 2021.

KLOSTER AP, LOURENÇO NETO N, COSTA SA, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MAAM. In Vitro Antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. **Br Dent J** 2018;29:354–8.

Machado MAAM, Stafuzza TC, Vitor LLR, da Costa SA, da Costa SM, Neto NL, *et al.* Pulp repair response after the use of a dentin-pulp biostimulation membrane (BBio) in primary teeth: study protocol for a randomized clinical trial. **Trials** 2020; 21:874.

COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, ORTOLANI-SELTENERICH PS, ÁLVAREZ-MURO T, LOZANO A, *et al.* Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **Int Endod J.** 2017 Dec;50 Suppl 2:e19–30.

CINTRA LTA, BENETTI F, AZEVEDO QUEIROZ ÍO, ARAÚJO LOPES JM, PENHA DE OLIVEIRA SH, SIVIERI ARAÚJO G, *et al.* Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomaterialization of the New High-plasticity MTA Material. **J Endod.** 2017 May;43(5):774–8.

BENETTI, F., QUEIROZ, ÍO, A., COSME-SILVA, L., CONTI, L. C., OLIVEIRA, S. H. P., CINTRA, L. T. A. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomaterialization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. **Braz Dent J.** 2019 Jul 22;30(4):325–32.

RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, SANZ JL, LOZANO A, PECCI-LLORET MP, *et al.* Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. **Clin Oral Investig.** 2021 Aug;25(8):5009–24.

GHILOTTI J, SANZ JL, LÓPEZ-GARCÍA S, GUERRERO-GIRONÉS J, PECCI-LLORET MP, LOZANO A, *et al.* Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. **Materials (Basel).** 2020 May 10;13(9):2189.

---

---

PENG, W.; LIU, W.; ZHAI, W.; *et al.* Effect of Tricalcium Silicate on the Proliferation and Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1240–1246, 2011.

OLCAY, K.; TAŞLI, P. N.; GÜVEN, E. P.; *et al.* Effect of a novel bioceramic root canal sealer on the angiogenesis-enhancing potential of assorted human odontogenic stem cells compared with principal tricalcium silicate-based cements. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, p. e20190215, 2020.

GUNGOR, As; DURMUS, E; KURT, Bz; *et al.* Effects of Bioactive Pulp-capping Materials on Cell Viability, Differentiation, and Mineralization Behaviors of Human Dental Pulp Stem Cells *In Vitro*. **Operative Dentistry**, v. 48, n. 3, p. 317–328, 2023.

---

---



### ***3 Conclusão***

### 3 CONCLUSÃO

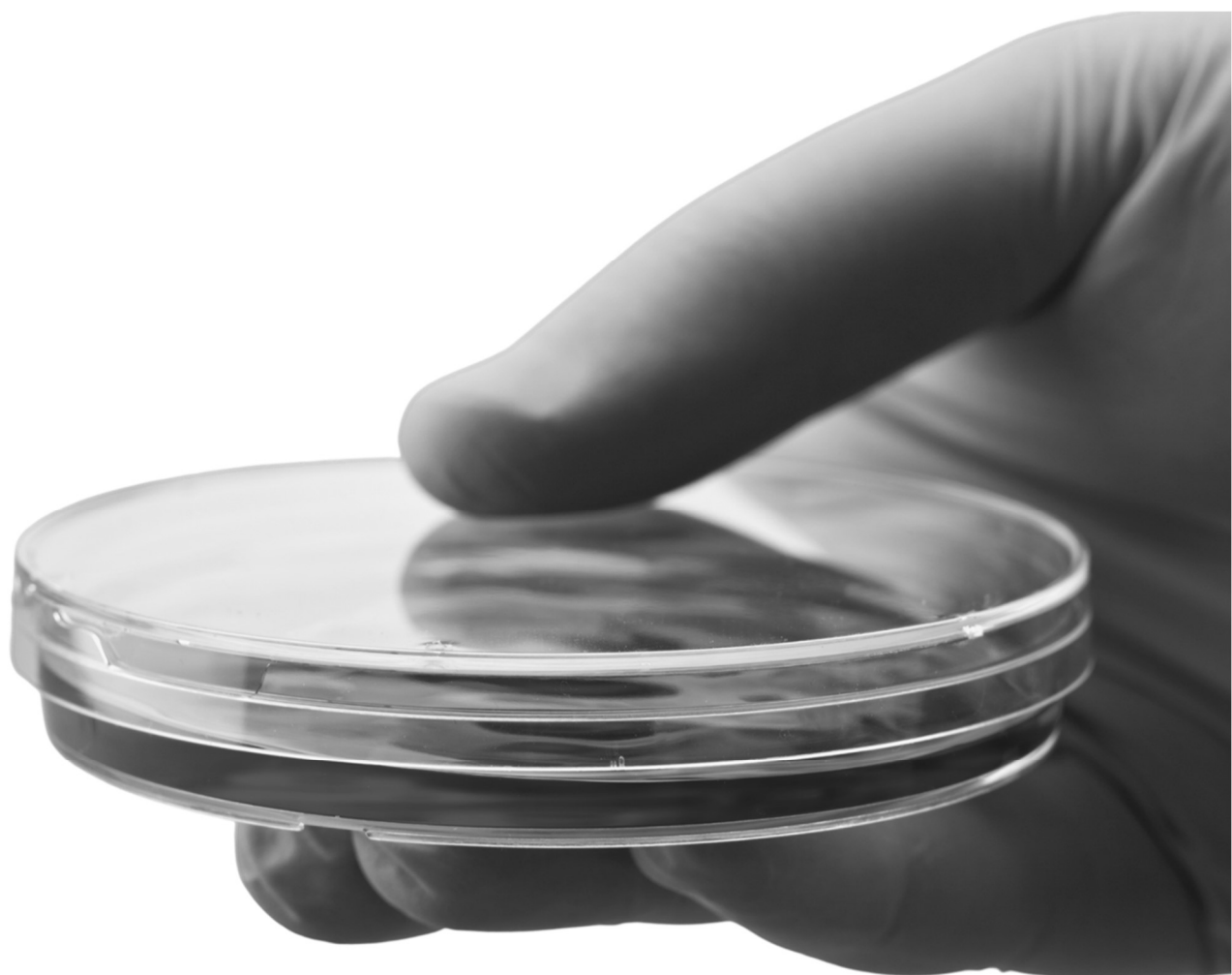
**ARTIGO 1** - Conclui-se que a citotoxicidade do material biocerâmico está relacionada a diluição do extrato utilizado. O MTA HP Repair evidenciou alta biocompatibilidade, pois mesmo na diluição 1:1 foi citocompatível. Na diluição 1:2, as SHED que entraram em contato com o extrato da Membrana BBio apresentaram alta viabilidade celular quando comparadas os demais cimentos testados, se mostrando como novo biomaterial promissor.

**ARTIGO 2** – O MTA HP Repair apresentou os melhores resultados de migração celular, enquanto que o Biodentine apresentou maior capacidade de formação de nódulos de mineralização. O Bio-C Repair mostrou resultados promissores de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina. De acordo com os resultados obtidos, o Bio-C Repair, MTA HP Repair e Biodentine destacam propriedades bioativas apropriadas para procedimentos de terapia pulpar vital em dentes decíduos.

**ARTIGO 3** - Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que todos os materiais testados apresentaram bioatividade aceitável. O Biodentine apresentou os melhores resultados de expressão gênica de RNAm para alvos angiogênicos. Todos os materiais biocerâmicos mostraram um aumento progressivo da expressão de DSPP e DMP-1 em SHED. A Membrana BBio obteve melhores resultados na expressão gênica de OCN e OPN, apresentando melhor capacidade de diferenciação osteo/odontogênica.

---

---



## *Referências*

## REFERÊNCIAS

ACADEMIC AMERICAN PEDIATRIC DENTISTRY. **Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth.** *Pediatr Dent.* 2018 15;40(6):343-351.

AHMED GM, ABOUAUF EA, ABUBAKR N, DÖRFER CE, EL-SAYED KF. Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update. *Stem Cells Int.* 2020;2020:5734539.

ARAÚJO LB, COSME-SILVA L, FERNANDES AP, OLIVEIRA TM DE, CAVALCANTI B DAS N, GOMES FILHO JE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 21 de agosto de 2023];26:e20160629.

ATHANASIADOU, E; PASCHALIDOU, M; THEOCHARIDOU, A; KONTOUDAKIS, N; ARAPOSTATHIS, K; BAKOPOULOU, A. Biological interactions of a calcium silicate based cement (Biodentine™) with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. *Dent Mater.* 2018 Dec;34(12):1797-1813.

BALATA GF, ABDELHADY MI, MAHMOUD GM, MATAR MA, ABD EL-LATIF AN. Formulation of Saudi propolis into biodegradable chitosan chips for vital pulpotomy. *Curr Drug Deliv.* 2017 Jan 25.

BENETTI F, QUEIROZ ÍO DE A, COSME-SILVA L, CONTI LC, OLIVEIRA SHP DE, CINTRA LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready-for-Use Bioceramic Repair Material. *Braz Dent J.* 2019 Jul 22;30(4):325–32.

BERGAMO, M. T.; VITOR, L. L. R.; DIONÍSIO, T. J.; *et al.* Could the photobiomodulation therapy induce angiogenic growth factors expression from dental pulp cells? *Lasers in Medical Science*, v. 36, n. 8, p. 1751–1758, 2021.

BOSSÙ M, IACULLI F, Di GIORGIO G, SALUCCI A, POLIMENI A, Di CARLO S. Different pulp dressing materials for the pulpotomy of primary teeth: a systematic review of the literature. *J Clin Med.* 19 de março de 2020;9(3):838.

CINTRA LTA, BENETTI F, DE AZEVEDO QUEIROZ ÍO, DE ARAÚJO LOPES JM, PENHA DE OLIVEIRA SH, SIVIERI ARAÚJO G, et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *J Endod.* 2017 May;43(5):774-8.

---



COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, ORTOLANI-SELTENERICH PS, ÁLVAREZ-MURO T, LOZANO A, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **Int Endod J**. 2017 Dec;50 Suppl 2:e19–30.

DAHAKI PT, PANPALIYA NP, KALE YJ, DADPE MV, KENDRE SB, BOGAR C. Response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) to three bioinductive materials - An in vitro experimental study. **Saudi Dent J**. 2020 Jan;32(1):43–51.

DINH MN, HITOMI M, AL-TURAIHI ZA, SCOTT JG. Alamar Blue assay optimization to minimize drug interference and inter-assay viability. **bioRxiv**. 2023 Mar 19;2023.03.16.532999.

DUARTE MAH, MARCIANO MA, VIVAN RR, TANOMARU FILHO M, TANOMARU JMG, CAMILLERI J. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. **Braz Oral Res**. 18 de outubro de 2018;32(suppl 1):e70.

ERFANPARAST, L.; IRANPARVAR, P.; VAFAEI, A. Direct pulp capping in primary molars using a resin-modified Portland cement-based material (TheraCal) compared to MTA with 12-month follow-up: A randomised clinical trial. **Eur. Arch. Paediatr. Dent**. 2018, 19, 197–203.

GHILOTTI J, SANZ JL, LÓPEZ-GARCÍA S, GUERRERO-GIRONÉS J, PECCI-LLORET MP, LOZANO A, et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. **Materials (Basel)**. 2020 May 10;13(9):2189.

GOLDBERG M, KULKARNI AB, YOUNG M, BOSKEY A. Dentin: structure, composition and mineralization. **Front Biosci (Elite Ed)** [Internet]. 1º de janeiro de 2011 [citado 21 de agosto de 2023];3:711–35.

GUNGOR, As; DURMUS, E; KURT, Bz; *et al*. Effects of Bioactive Pulp-capping Materials on Cell Viability, Differentiation, and Mineralization Behaviors of Human Dental Pulp Stem Cells *In Vitro*. **Operative Dentistry**, v. 48, n. 3, p. 317–328, 2023.

HASWEHN, AWIDI A, RAJAB L, HIYASAT A, JAFAR H, ISLAM N, et al. Characterization of the biological effect of Biodentine™ on primary dental pulp stem cells. **Indian J Dent Res**. 2018;29(6):787–93.

ISO 10993-5 **Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos – Parte 5: Testes para citotoxicidade in vitro**. Genebra, Suíça: International Standards Organization, Genebra, Suíça. 2005.

---

JUNG Y, YOON JY, DEV PATEL K, MA L, LEE HH, KIM J, LEE JH, SHIN J. Biological Effects of Tricalcium Silicate Nanoparticle-Containing Cement on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Nanomaterials** (Basel). 2020 Jul 14;10(7):1373.

KIM Y, LEE D, SONG D, KIM HM, KIM SY. Biocompatibility and bioactivity of set direct pulp capping materials on human dental pulp stem cells. **Materials** (Basel). 4 de setembro de 2020;13(18):3925.

KLOSTER AP, LOURENÇO NETO N, COSTA SA, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MAAM. In Vitro Antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. **Br Dent J**. 2018;29:354–8.

KNORR A, MESTIERI LB, PINHEIRO LS, MENDES RA, GONZALEZ HERNANDEZ PA, BARLETTA FB, et al. Cytotoxicity and bioactivity of calcium silicate-based cements in a culture of stem cells from the apical papilla. **Iran Endod J** [Internet]. 2021 [citado 21 de agosto de 2023];16(4):225–31.

KÜDEN C, KARAKAŞ SN, BATMAZ SG. Comparative chemical properties, bioactivity, and cytotoxicity of resin-modified calcium silicate-based pulp capping materials on human dental pulp stem cells. **Clin Oral Investig**. novembro de 2022;26(11):6839–53.

KUNERT M, ROZPEDEK-KAMINSKA W, GALITA G, SAURO S, BOURGI R, HARDAN L, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. **Cells**. 2022 Oct 15;11(20):3238.

LOURENÇO NETO, N, VITOR, LLR, COSTA SA, COSTA SM, CRUVINEL T, OLIVEIRA TM, et al. Physicochemical and biological properties of a biostimulating membrane (BBio) for pulp capping. **Materials Letters** 2022;38: 131186.

MACHADO MAAM, STAFUZZA TC, VITOR LLR, COSTA SA, COSTA SM, NETO NL, et al. Pulp repair response after the use of a dentin-pulp biostimulation membrane (BBio) in primary teeth: study protocol for a randomized clinical trial. **Trials** 2020; 21:874.

MANASPON, C.; JONGWANNASIRI, C.; CHUMPRASERT, S.; *et al.* Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 209, 2021.

MANOJLOVIC D, DRAMIĆANIN MD, MILETIC V, MITIĆ-ĆULAFIĆ D, JOVANOVIĆ B, NIKOLIĆ B. Cytotoxicity and genotoxicity of a low-shrinkage monomer and monoacylphosphine oxide photoinitiator: Comparative analyses of individual toxicity and combination effects in mixtures. **Dent Mater**. 2017 Apr;33(4):454–66.

---

MARU, V.; SHETTY, O.; DIXIT, U.; *et al.* SHED's Response to Various Pulpotomy Materials: Cytotoxicity and Gene Expression Analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 45, n. 6, p. 406–413, 2021.

OLCAY, K.; TAŞLI, P. N.; GÜVEN, E. P.; *et al.* Effect of a novel bioceramic root canal sealer on the angiogenesis-enhancing potential of assorted human odontogenic stem cells compared with principal tricalcium silicate-based cements. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, p. e20190215, 2020.

OLIVEIRA FA, MATOS AA, MATSUDA SS, BUZALAF MAR, BAGNATO VS, MACHADO MAAM, *et al.* Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** [Internet]. 1º de abril de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];169:35–40.

BERGAMO, O. P.; VITOR, M.T.; Ribeiro, L. L.; LOPES, N. M.; *et al.* Angiogenic protein synthesis after photobiomodulation therapy on SHED: a preliminary study. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 9, p. 1909–1918, 2020.

OMIDI S, BAGHERI M, FAZLI M, AHMADIANKIA N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. **Iran J Basic Med Sci** [Internet]. junho de 2020 [citado 21 de agosto de 2023];23(6):768–75.

PARISAY I, QEIDARI A, SABOURI E, KHORAKIAN F, BAGHERI H. Cytotoxicity and induced apoptosis of a new bioceramic cement containing simvastatin on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Dent Res J (Isfahan)**. 2022;19:79.

PAULA A, LARANJO M, MARTO CM, ABRANTES AM, CASALTA-LOPES J, GONÇALVES AC, *et al.* Biodentine™ boosts, whiteproroot®mta increases and life® suppresses odontoblast activity. **Materials (Basel)**. 11 de abril de 2019;12(7):1184.

PAULA AB, LARANJO M, COELHO AS, ABRANTES AM, GONÇALVES AC, SARMENTO-RIBEIRO AB, *et al.* Accessing the Cytotoxicity and Cell Response to Biomaterials. **J Vis Exp**. 2021 Jul 8;(173).

PEDANO MS, LI X, YOSHIHARA K, LANDUYT KV, VAN MEERBEEK B. Cytotoxicity and Bioactivity of Dental Pulp-Capping Agents towards Human Tooth-Pulp Cells: A Systematic Review of In-Vitro Studies and Meta-Analysis of Randomized and Controlled Clinical Trials. **Materials (Basel)**. 2020 Jun 12;13(12):2670.

PENG, W.; LIU, W.; ZHAI, W.; *et al.* Effect of Tricalcium Silicate on the Proliferation and Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1240–1246, 2011.

---

PIRES CW, BOTTON G, CADONÁ FC, MACHADO AK, AZZOLIN VF, CRUZ IBM, et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **Int Endod J**. agosto de 2016;49(8):737–45.

POGGIO C, BELTRAMI R, COLOMBO M, CECI M, DAGNA A, CHIESA M. In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. **J Clin Exp Dent**. dezembro de 2015;7(5):e584-588.

RODRIGUES EM, CORNÉLIO ALG, MESTIERI LB, FUENTES ASC, SALLES LP, ROSSA-JUNIOR C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (Mta) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. **Int Endod J** [Internet]. agosto de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];50(8):780–9.

RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, SANZ JL, LOZANO A, PECCI-LLORET MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. **Clin Oral Investig**. 2021 Aug;25(8):5009–24.

SANZ JL, FORNER L, LLENA C, GUERRERO-GIRONÉS J, MELO M, RENGO S, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of hydraulic calcium silicate-based cements (Hcscs) on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (Sheds): a systematic review of in vitro studies. **J Clin Med**. 28 de novembro de 2020;9(12):3872.

SANZ JL, SOLER-DORIA A, LÓPEZ-GARCÍA S, GARCÍA-BERNAL D, RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LOZANO A, et al. Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. **J Endod**. 2021 Dec;47(12):1896–906.

SEQUEIRA DB, SEABRA CM, PALMA PJ, CARDOSO AL, PEÇA J, SANTOS JM. Effects of a New Bioceramic Material on Human Apical Papilla Cells. **J Funct Biomater**. 2018 Dec 16;9(4):74.

SILVA MD, NETO NL, COSTA SA, COSTA SM, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MA. Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2017;71:498-503.

SISMANOGLU S, ERCAL P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. **Aust Endod J**. abril de 2023;49(1):66–74.

SUBHI, H.; HUSEIN, A.; MOHAMAD, D.; *et al.* Chitosan-Based Accelerated Portland Cement Promotes Dentinogenic/Osteogenic Differentiation and Mineralization Activity of SHED. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3358, 2021.

---

TALABANI RM, GARIB BT, MASAELI R. Bioactivity and physicochemical properties of three calcium silicate-based cements: an in vitro study. **Biomed Res Int.** 2020;2020:9576930.

TOMÁS-CATALÁ CJ, COLLADO-GONZÁLEZ M, GARCÍA-BERNAL D, OÑATE-SÁNCHEZ RE, FORNER L, LLENA C, et al. Biocompatibility of new pulp-capping materials neomta plus, mta repair hp, and biodentine on human dental pulp stem cells. **J Endod.** janeiro de 2018;44(1):126–32.



*Anexos*

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** EFEITO BIOLÓGICO DE CIMENTOS BIOATIVOS EM CÉLULAS TRONCOS DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS

**Pesquisador:** ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 59714322.3.0000.5417

**Instituição Proponente:** Universidade de Sao Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.648.902

**Apresentação do Projeto:**

Texto extraído do arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BASICAS\_DO\_PROJETO\_1894435\_pdf", datado em 23/08/2022, item "Resumo"

O propósito desse trabalho será avaliar o efeito biológico de formulações à base de silicato de cálcio em células troncos de dentes decíduos esfoliados. As amostras serão obtidas por meio de cultura primária de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED). O tecido pulpar será removido e armazenado em DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino até atingirem confluência. Os cimentos serão preparados na concentração de 1mg/mL MEMa com 10% de soro fetal bovino de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 - bandagem dentino/pulpar (BBio), Grupo 2 - Bio-C Pulpecto, Grupo 3 - MTA HP Repair. Serão realizados os experimentos de viabilidade celular pelo método do MTT e migração celular. Será realizado o teste da atividade da fosfatase alcalina e o vermelho de alizarina será usado para avaliar a formação do nódulo mineral. A expressão gênica de marcadores odontogênicos será avaliada pelo método RT-PCR e quantificada a produção de DMP-1 e DSPP. Será avaliada a síntese de proteínas e quantificada a produção de DMP-1 e DSPP. Na análise estatística, por tratar-se de medidas quantitativas, o teste de normalidade Shapiro-Wilk será aplicado. Para os dados que apresentarem distribuição normal, a comparação intragrupos e intergrupos será realizada pelo teste análise de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. Para os dados que não apresentarem distribuição normal, a comparação intragrupos será realizada pelo teste de Friedman e a

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA      **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP      **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8358      **Fax:** (14)3235-8356      **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 5.648.902

comparação intergrupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Para todos os testes o nível de significância adotado será de 5%.

**Objetivo da Pesquisa:**

Conteúdo retirado do arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1894435.pdf" de 23/08/2022, item Objetivo primário.

Avaliar o efeito biológico de cimentos bioativos em células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados humanos na viabilidade celular; migração celular; formação dos nódulos de mineralização; expressão gênica de RNAm para DMP-1 e DSPP; e cinética de expressão das proteínas DMP-1 e DSPP.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A p r e s e n t a - s e n e s s e c a m p o , o t e x t o c o n t i d o n o arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1894435.pdf" de 23/08/2022, itens Riscos e Benefícios.

Riscos: A remoção (extração) do dente pode apresentar como riscos intercorrências operatórias como sangramento, mordedura de lábio e desconforto ou dor no pós-operatório, porém caso ocorram, o paciente será assistido pelo profissional que o atendeu.

Benefícios: Os benefícios ao participante da pesquisa, além da exodontia de um dente com indicação clínica ou ortodôntica por um profissional especialista qualificado, também residem na aceleração do tratamento ortodôntico que indicou a exodontia, além de exame clínico completo prévio a exodontia e encaminhamento do paciente para os devidos tratamentos dentro das clínicas pertinentes da Faculdade de Odontologia de

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide campo de Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo de Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Recomendações:**

Vide campo de Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 14/09/2022, via Google Meet, devido à pandemia da COVID-19 e por orientações da CONEP, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br



**USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP**



Continuação do Parecer: 5.648.902

relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Regulamento_Biorrepositorio_Corrigido.pdf	14/09/2022 11:31:22	Juliana Fraga Soares Bombonatti	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1894435.pdf	23/08/2022 23:56:18		Aceito
Outros	Check_listCEP_pdf.pdf	23/08/2022 23:53:41	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito
Outros	Carta_Correcao_Assessoria.pdf	23/08/2022 23:52:51	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento_Menor.pdf	23/08/2022 23:52:37	ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/08/2022 23:52:29	ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA	Aceito
Outros	Termo_cessao_dentes.pdf	23/08/2022 23:52:10	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito
Outros	Regulamento_Biorepositorio.pdf	23/08/2022 23:48:35	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termos_AquiescenciaCIP_ass.pdf	27/05/2022 11:40:25	ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termos_AquiescenciaDPTO.pdf	27/05/2022 11:38:35	ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Compromisso_Pesquisador.pdf	27/05/2022 11:36:24	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	26/05/2022 18:00:56	ANA BEATRIZ VIEIRA DA SILVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/02/2022 16:56:23	ANA BEATRIZ VIEIRA DA	Aceito

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 5.648.902

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BAURU, 16 de Setembro de 2022

---

**Assinado por:**

**Juliana Fraga Soares Bombonatti  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA      **CEP:** 17.012-901

**UF:** SP      **Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3235-8356      **Fax:** (14)3235-8356      **E-mail:** cep@fob.usp.br