

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**Análise comparativa dos efeitos biológicos de materiais biocerâmicos em  
células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED)**

BÁRBARA LUÍSA SILVA OLIVEIRA

BAURU

2022

BÁRBARA LUÍSA SILVA OLIVEIRA

**Análise comparativa dos efeitos biológicos de materiais biocerâmicos em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED)**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira Valarelli

**(Versão corrigida)**

BAURU

2022

Oliveira, Bárbara Luísa Silva

Análise comparativa dos efeitos biológicos de materiais biocerâmicos em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED)

/ Bárbara Luísa Silva Oliveira. –Bauru, 2022.

64 p. : il. ; 31 cm

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

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira Valarelli

A versão original desta dissertação 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/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: CAAE 29177820.9.0000.5417

Data: 13/05/2022



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

## FOLHA DE APROVAÇÃO


Dissertação apresentada e defendida por  
**BÁRBARA LUÍSA SILVA OLIVEIRA**  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 23 de março de 2023.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **NÁDIA CAROLINA TEIXEIRA MARQUES**  
UNILAVRAS

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **VIVIEN THIEMY SAKAI**  
UNIFAL

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

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, como todas as outras conquistas, aos meus pais, que sempre incentivaram os meus estudos e buscaram proporcionar o melhor a mim. Obrigada por investirem e acreditarem, sem medir esforços para que eu tivesse os melhores ensinamentos e oportunidades.

À memória de meu irmão, exemplo de dedicação e inspiração para a concretização de todos os meus sonhos.

À Deus, por me guiar até aqui, por me capacitar, pelas oportunidades e pessoas que me permitiu conhecer.

À minha família, aos amigos e a todos aqueles que de alguma forma acompanharam essa trajetória, incentivando sempre a buscar o melhor e sonharam junto comigo.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, em seu infinito amor e misericórdia, se fez presente iluminando meus passos todos os dias nessa caminhada, me conduziu e forneceu saúde e força para superar as dificuldades. Agradeço pelos dons necessários a essa profissão e por todas as minhas conquistas pessoais e profissionais. Nada disso seria possível sem a sua presença para me guiar e capacitar.

**À minha mãe, Anely**, fonte de amor e inspiração, possuidora de uma força e fé admiráveis, intercedeu por mim todos os dias, tornando o meu caminho menos tortuoso. Deixar você não foi fácil, mas foi importante e agora podemos comemorar juntas mais uma conquista! Obrigada por todos os esforços que nunca foram medidos para minha educação e formação profissional, por sempre abdicar a própria vontade, apoiando minhas escolhas e ser meu exemplo de vida. Espero que algum dia eu possa retribuir todo cuidado e sacrifício que fez para que eu conseguisse alcançar meus sonhos. Te amo muito!

**Ao meu pai Geraldo e irmão César**, falta! Esta é a palavra certa. Que falta vocês fazem neste momento. Vocês partiram deixando uma saudade imensa e um vazio sufocante. Partiram antes que esse momento chegasse. Pai, o senhor que se esforçou ao máximo para que pudéssemos ter uma educação de qualidade, no qual não teve oportunidade. A realização deste sonho é reflexo do que você idealizou e me proporcionou há muitos anos atrás, vencemos! Irmão, você que um dia também sonhou em ser Mestre e Doutor, desde criança me inspirou, com sua determinação e inteligência, deixando um legado admirável. Essa conquista também é sua! Obrigada por terem me amado tanto e principalmente por me iluminarem de onde estão, dedico a vocês a alegria desta jornada vitoriosa! Amo vocês!

**Aos familiares**, “família é onde a vida começa e o amor nunca termina”. Obrigada por cuidarem de mim e dar forças para superar a saudade nesses anos que estive longe. De forma especial, as minhas tias maternas, Aparecida e Eliana, pela preocupação, cuidado e carinho.

**Às minhas amigas,** Ana Luísa, Flávia, Júlia, Izabelle, Marina, Mayra e Natália, que apesar da distância física, se fizeram presentes nos momentos precisos e compreenderam minha ausência. Obrigada por me acolherem com tanto carinho em cada reencontro em Minas Gerais, sempre incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

**À minha orientadora, Thais,** que viabilizou a realização deste trabalho com a sua ajuda, disponibilidade e competência. Agradeço o incentivo, amparo, por não medir esforços para ensinar e acolher seus alunos. Obrigada por depositar sua confiança, acreditar em mim e encorajar sempre buscar o meu melhor. Me inspiro em você, que alegria e honra foi ter sido sua orientada.

**Às amigas de Pós Graduação,** compartilhamos alegrias, angústias e muito conhecimento. Agradeço por tornarem a rotina mais leve e pela convivência enriquecedora. Isabela Custódio, Daiane, Bianca Katsumata, Isabela Grizzo, Gabriela, Fabiana, e demais colegas. Obrigada por toda parceria, risadas, por dividirem aulas, seminários, clínicas e tantos momentos desta jornada, vou sempre guardar todas as lembranças com muito carinho. Desejo sucesso a todas e que os nossos laços permaneçam além daqui. Vocês são muito especiais!

**À amiga Ana Beatriz,** “um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”. O mesmo sonho nos uniu. Você foi um dos melhores presentes que ganhei da pós-graduação. Obrigada pela amizade, companheirismo diário e por toda ajuda nessa caminhada. Sou grata por ter dividido o início deste trabalho com você e sei que dará continuidade com excelência. Conte sempre comigo! Te amo!

**À amiga Mayara,** dona de um coração gigante, que se transformou em amiga para a vida, aquela que eu sei que posso contar sempre! Obrigada por todo aprendizado, apoio, ajuda, por incentivar nos momentos de desânimo e compartilhar tantas alegrias. Gratidão por te conhecer nessa vida, por essa amizade boa e rara! Amo você!

**Ao departamento de Odontopediatria,** aos professores, Profa. Dra. Daniela Rios, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Prof. Dr. Natalino Lourenço Neto e Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva. Com quem eu pude aprender tanto, aprender a odontologia da melhor forma, a ser docente, pesquisadora, e ainda

aprendizados que extrapolam o âmbito acadêmico e profissional. Estendo meus agradecimentos às funcionárias Andreia e Lilian, por toda atenção e solicitude. A todos vocês, meu carinho, respeito e gratidão!

**À querida Paula Karine Jorge**, obrigada por sempre estar disposta a acolher, ensinar, por cada palavra de apoio e encorajamento. Mesmo com tantas atribuições, conseguiu ainda me ajudar com os resultados. Meu eterno, muito obrigada!

**Ao grupo de cultura celular**, Prof. Natalino e Mariel, obrigada por toda atenção, colaboração e disponibilidade em ajudar. Agradeço pelos ensinamentos e oportunidade de trabalhar com vocês. Orgulho em fazer parte dessa equipe!

**Ao Centro Integrado de Pesquisas**, nosso querido CIP, onde encontrei pessoas atenciosas e dispostas a ajudar. Rafaela e Marcelo, que contribuíram com conhecimento e auxílio técnico. Obrigada!

**Aos pacientes**, por determinarem minha evolução profissional, e, sobretudo, humana.

**À Faculdade de Odontologia de Bauru e seus funcionários**, pela experiência incrível, por todos que contribuíram para que a minha trajetória pelo Mestrado se tornasse mais leve.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da minha bolsa de Mestrado, possibilitando minha manutenção no Programa e a realização desta pesquisa.

**À banca avaliadora**, agradeço aos professores por aceitarem o convite para participar da banca avaliadora dessa dissertação, e por contribuírem para o enriquecimento da mesma.



*“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.*

***Carl Sagan***

## RESUMO

Esta dissertação teve o propósito de apresentar 2 artigos científicos. ARTIGO 1: O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) frente a exposição a diferentes extratos de materiais biocerâmicos. Os extratos dos cimentos foram preparados a partir da confecção de discos de cimentos, que foram imersos em  $\alpha$ MEM suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 (G1) - Bio-C Repair, Grupo 2 (G2) - MTA Repair HP, Grupo 3 (G3) - TheraCal LC e Grupo 4 (G4) - Biodentine. O grupo controle positivo foi mantido com  $\alpha$ MEM + 10% SFB e o controle negativo com  $\alpha$ MEM + 1% SFB. SHED obtidas por meio de cultura primária ficaram em contato com os extratos dos cimentos por 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi avaliada através do Ensaio MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e o teste repetido três vezes. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e períodos estudados ( $p < 0,000$ ). O grupo 2 (MTA Repair HP) apresentou viabilidade celular superior aos demais grupos experimentais e o controle negativo. Além disso, observou um padrão semelhante de comportamento entre o MTA Repair HP e os grupos controles, com uma diminuição da viabilidade celular de 24h para 48h e um aumento de 48h para 72h. O Bio-C Repair, Biodentine e Theracal LC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados. Conclui-se que as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados apresentaram uma melhor viabilidade em contato com o extrato MTA Repair HP em comparação aos demais materiais biocerâmicos estudados. ARTIGO 2: O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) em contato com extratos de uma bandagem de bioestimulação dentino-pulpar (BBio), MTA Repair HP e Biodentine. As células foram obtidas a partir do biorrepósito de linhagens celulares derivadas da polpa de dentes decíduos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. As amostras foram preparadas e imersas em  $\alpha$ MEM 10% SFB de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 (G1) - Bandagem dentino/pulpar (BBio), e Grupo 2 (G2) - Biodentine e Grupo 3 (G3) - MTA Repair HP. O controle foi realizado com células sem tratamento. O grupo controle positivo (C+) foi mantido com  $\alpha$ MEM +10% SFB e o grupo controle negativo (C-) com  $\alpha$ MEM + 1% SFB. A viabilidade celular foi analisada por meio do Ensaio MTT, em 24, 48 e 72 horas após o contato das SHED com os extratos dos materiais testados. Os

dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos estudados ( $p < 0,000$ ). Na comparação intergrupos, observou-se uma maior viabilidade celular em G3 (MTA Repair HP). De acordo com os resultados apresentados, observou-se que células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos expostas a BBio apresentaram viabilidade celular, até mesmo superior ao Biodentine, concluindo então ser uma alternativa aos materiais de capeamento pulpar disponíveis no mercado.

**Palavras-chave:** SHED, Viabilidade Celular, Teste de Materiais Biocompatíveis.

## ABSTRACT

### **Comparative analysis of the biological effects of bioceramic materials on stem cells from exfoliated primary teeth (SHED)**

This dissertation had the purpose of presenting 2 scientific articles. **ARTICLE 1:** The aim of this study was to evaluate the viability of stem cells from exfoliated human deciduous teeth (SHED) against exposure to different extracts of bioceramic materials. The cement extracts were prepared by making cement disks, which were immersed in  $\alpha$ MEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), according to the following experimental groups: Group 1 (G1) - Bio-C Repair, Group 2 (G2) - MTA Repair HP, Group 3 (G3) - TheraCal LC and Group 4 (G4) - Biodentine. The positive control group was maintained with  $\alpha$ MEM + 10% FBS and the negative control with  $\alpha$ MEM + 1% FBS. SHED obtained through primary culture were in contact with the cement extracts for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was assessed using the MTT Assay. The experiments were performed in biological triplicate and the test repeated three times. Data were analyzed using the two-way ANOVA test, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). There was a statistically significant difference between the treatments and periods studied ( $p < 0.000$ ). Group 2 (MTA Repair HP) showed higher cell viability than the other experimental groups and the negative control. Furthermore, a similar pattern of behavior was observed between MTA Repair HP and the control groups, with a decrease in cell viability from 24h to 48h and an increase from 48h to 72h. Bio-C Repair, Biodentine and Theracal LC did not show statistically significant differences between the studied periods. It is concluded that stem cells from exfoliated human deciduous teeth showed better viability in contact with the MTA Repair HP extract compared to the other bioceramic materials studied. **ARTICLE 2:** The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of stem cells from exfoliated human deciduous teeth (SHED) in contact with extracts of a

dentine-pulp biostimulation bandage (BBio), MTA Repair HP and Biodentine. The cells were obtained from the biorepository of cell lines derived from the pulp of deciduous teeth at the Faculty of Dentistry of Bauru, University of São Paulo. The samples were prepared and immersed in  $\alpha$ MEM 10% FCS according to the following experimental groups: Group 1 (G1) - Dentin/pulp bandage (BBio), and Group 2 (G2) - Biodentine and Group 3 (G3) - MTA Repair HP. The control was performed with untreated cells. The positive control group (C+) was maintained with  $\alpha$ MEM +10% FBS and the negative control group (C-) with  $\alpha$ MEM + 1% FBS. Cell viability was analyzed using the MTT assay, at 24, 48 and 72 hours after contact between SHED and the extracts of the tested materials. Data were analyzed using the two-way ANOVA test, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). There was a statistically significant difference between the groups and periods studied ( $p < 0.000$ ). In the intergroup comparison, a greater cell viability was observed in G3 (MTA Repair HP). According to the results presented, it was observed that stem cells from human exfoliated deciduous teeth exposed to BBio demonstrated cell viability, even superior to Biodentine, thus concluding that it is an alternative to pulp capping materials available on the market.

**Keywords:** SHED, Cell Viability, Biocompatible Materials Test.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Layout final das membranas.....	43
-------------------	---------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Principais componentes dos materiais avaliados.....	28
<b>Tabela 2 -</b>	Comparações entre tratamentos e períodos para viabilidade celular .....	31
<b>Tabela 1 -</b>	Comparações intergrupos para viabilidade celular.....	45
<b>Tabela 2 -</b>	Comparações intragrupos para viabilidade celular .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
° C	Grau Celsius
αMEM	Minimum Essential Medium Alpha
Bis-GMA	Metacrilato de Bisfenol A-glicidilo
ANOVA	Análise de Variância
cm <sup>2</sup>	Centímetro ao quadrado
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DMSO	Dimetil Sulfóxido
et al	E outros
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
h	Horas
HEMA	HidroxietilMetacrilato
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ISO	Internacional Standards Organization
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
mg	Miligramas
mm	Milímetros
n °	Número
nm	Nanômetro
PEDGMA	Polietilenoglicol dimetacrilato



PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SHED	Células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados
TEDGMA	Dimetacrilato de Trietileno glicol
UDMA	Uretano-Dimetacrilato

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
2	<b>ARTIGOS</b> .....	
2.1	ARTIGO 1 .....	25
2.2	ARTIGO 2 .....	40
3	<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
	<b>ANEXOS</b> .....	61

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual compreende o estudo celular e molecular de tipos celulares, sinais desencadeadores da diferenciação celular e matrizes apropriadas para conduzir as células para o tecido onde estas serão implantadas (CASAGRANDE et al., 2011; TATULLO et al., 2019). As células-tronco mesenquimais obtidas da polpa dentária têm sido estudadas aliadas a engenharia tecidual (SAKAI et al., 2010; ZHANG et al., 2016). Dentes decíduos humanos são fontes de células-tronco muito acessíveis que podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* facilmente. As células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) formam uma população altamente proliferativa e com variada capacidade de diferenciação incluindo neurônios, osteoblastos, adipócitos, células endoteliais e odontoblastos (ATHANASIADOU et al. 2018; YOUSSEF et al. , 2019). O mecanismo de reparo na terapia pulpar se dá pela migração, proliferação e diferenciação das células-tronco da polpa dentária em odontoblastos, responsáveis pela síntese e secreção de dentina terciária (ARAUJO et al. 2018; GIRAUD, 2019; AHMED et al., 2020; SANZ et al., 2020).

Diferentes materiais são utilizados para os procedimentos clínicos de terapia pulpar em dentes decíduos, incluindo os cimentos biocerâmicos de silicato de cálcio. Os mecanismos vitais da polpa requerem o uso de biomateriais para formar uma camada protetora sobre a polpa vital exposta (PRATI & GANDOLFI 2015; DAHAKE et al., 2020). A esse respeito, o material ideal deve ser capaz de promover a cicatrização pulpar, ser biocompatível, bactericida, além de não interferir o processo de reabsorção radicular fisiológico do dente decíduo (CUADROS-FERNÁNDEZ et al.,2016; BOSSÙ et al., 2020; KUNERT et al., 2022; PARISAY et al., 2022). A biocerâmica, ao ser hidratada, produz diferentes compostos como a hidroxiapatita, que são capazes de induzir resposta regenerativa, ser biocompatível e possuir propriedades antibacterianas devido à presença de nanocristais que impedem a adesão bacteriana (JITARU et at., 2016; SAGHIRI et al., 2017; STRINGHINI JUNIOR et al., 2019; TALABANI et al., 2020). Considerando que esses materiais possuem características desejáveis, parece válido investigar a interação entre os materiais biocerâmicos e células-tronco da polpa dental humana (SANZ et al., 2021).

Estudos prévios avaliaram a citotoxicidade de materiais de terapia pulpar vital em células-tronco da polpa dental humana de dentes permanentes, mas poucos estudos utilizaram de dentes decíduos humanos (COLLADO-GONZALEZ et al., 2017; SANZ et al., 2020).

Ao entrar em contato com os fluídos teciduais, os cimentos à base de silicato de cálcio produzem hidróxido de cálcio, o qual libera íons cálcio essenciais para diferenciação e

proliferação de células produtoras de tecidos duros. É necessário analisar essa complexa interação entre os cimentos à base de silicato de cálcio e células-tronco, as quais podem ser afetadas pelos produtos químicos dos cimentos dentários causando alterações na viabilidade celular e induzindo até mesmo a morte celular (TOMÁS-CATALÁ et al. 2017, 2018). O agregado de trióxido mineral (MTA) tem sido amplamente utilizado devido à sua capacidade de induzir reparo tecidual e estimular a mineralização. É um material bioativo com excelente habilidade de formar apatita e tem alto pH, biocompatibilidade e estimula expressão de proteínas da matriz dentinária. Por suas excelentes propriedades, o MTA é hoje padrão ouro em estudos que comparam as propriedades biológicas de materiais odontológicos (OLIVEIRA et al., 2022). Entretanto, o MTA apresenta algumas desvantagens como potencial de descoloração, alto custo, tempo de presa aumentado, dificuldade de remoção após tempo de presa (ESTELLITA, 2017). Para melhorar o desempenho químico, o uso da nanotecnologia e novas formulações de cimentos à base de silicato de cálcio estão sendo introduzidas no mercado (SAGHIRI et al., 2017; DUARTE et al. 2018; STRINGHINI JUNIOR et al., 2019; TALABANI et al., 2020; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021).

Com o advento da tecnologia e inovação, muitos materiais capeadores estão sendo desenvolvidos e estudados para reparo e regeneração do tecido pulpar (CUADROS-FERNÁNDEZ et al., 2016; HUGAR et al., 2017; KALRA et al., 2017; GOPALAKRISHNAN et al., 2019; EL MELIGY et al., 2019; ZAFAR et al., 2020; KUDEN et al., 2022). Deste modo, a busca por novos biomateriais com propriedades bioativas, biodegradabilidade e atoxicidade é constante (GEMINI-PIPERNI et al., 2014; KALYAN et al., 2019; ZAFAR et al., 2020). Neste cenário, a quitosana, um polímero natural com propriedades hemostáticas, fungicidas e antibacterianas que estimulam a migração e a proliferação celular (CROISIER, JEROME 2013), apresenta propriedades promissoras para o uso na engenharia de tecidos (MUZZARELI et al., 2012; WIECKIEWICZ et al., 2017; AHSAN et al., 2018). Estudos recentes apontam que as características bioquímicas e biofísicas de polímeros e membranas tem um grande potencial de aplicação em diferentes especialidades odontológicas (BALATA et al., 2018; SILVA et al., 2017). Sistemas de administração local de medicamento, contendo um agente antimicrobiano, erradicam a microbiota patogênica ou modulam a resposta inflamatória, diminuindo a destruição tecidual (KALYAN et al., 2019).

Assim, a criação da Bandagem de bioestimulação dentino/pulpar (BBio) vai ao encontro da tendência mundial de desenvolvimento e pesquisa. A expectativa é de que a BBio possa ser amplamente indicada para aplicações de terapia pulpar. Para tanto, após aceitação da

patente (Processo RUSP 2016.1.3286.25.5) junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), torna-se essencial a comprovação do sucesso deste tratamento. Como as pesquisas atuais devem verificar a eficácia dos biomateriais em desenvolvimento, a proposta deste estudo visa abrir novas perspectivas de tratamento para a terapia pulpar, com o uso de novos materiais, possibilitando a manutenção do dente decíduo na boca até a substituição pelo sucessor permanente.

A procura por soluções e materiais ideais para qualquer área de conhecimento dentro da odontologia deve ser direcionada para o conhecimento e indicação de medicamentos e terapias biocompatíveis, visando à ocorrência do processo de reparo e proporcionando regeneração natural e biológica da polpa. O recente progresso no campo científico celular e molecular proporcionou um melhor entendimento sobre as alterações e o comportamento do tecido pulpar durante o processo de reparo tecidual, permitindo avaliar biologicamente as diferentes estratégias de terapia pulpar (MARQUES, 2016). Sendo assim, o diferencial desta pesquisa em comparação aos dados existentes na literatura é a necessidade de entender os efeitos biológicos das novas formulações de cimentos à base de silicato de cálcio sobre células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados, principalmente sobre a contribuição no processo de regeneração tecidual, este estudo poderá trazer contribuições importantes para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na busca de soluções regenerativas.

## **2. ARTIGOS**

---



## **2. ARTIGOS**

### **2.1 ARTIGO 1**

**Comparação dos efeitos citotóxicos de materiais biocerâmicos em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED)**

**Comparison of the cytotoxic effects of bioceramic materials on stem cells from exfoliated human deciduous teeth (SHED)**

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) frente a exposição a diferentes extratos de materiais biocerâmicos. Os extratos dos cimentos foram preparados a partir da confecção de discos de cimentos, que foram imersos em  $\alpha$ MEM suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 (G1) - Bio-C Repair, Grupo 2 (G2) - MTA Repair HP, Grupo 3 (G3) - TheraCal LC e Grupo 4 (G4) - Biodentine. O grupo controle positivo foi mantido com  $\alpha$ MEM + 10% SFB e o controle negativo com  $\alpha$ MEM + 1% SFB. SHED obtidas por meio de cultura primária ficaram em contato com os extratos dos cimentos por 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi avaliada através do Ensaio MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e o teste repetido três vezes. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e períodos estudados ( $p < 0,000$ ). O grupo 2 (MTA Repair HP) apresentou maior viabilidade celular superior aos demais grupos experimentais e o controle negativo. Além disso, observou um padrão semelhante de comportamento entre o MTA Repair HP e os grupos controles, com uma diminuição da viabilidade celular de 24h para 48h e um aumento de 48h para 72h. O Bio-C Repair, Biodentine e Theracal LC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os períodos estudados. Conclui-se que as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados apresentaram uma melhor viabilidade em contato com o extrato MTA Repair HP em comparação aos demais materiais biocerâmicos estudados.

**Palavras-chave:** SHED, Viabilidade Celular, Teste de Materiais Biocompatíveis.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas com alto potencial de proliferação e autorrenovação, capazes de se diferenciarem em diversos tipos celulares (LEMISCHKA, 2005; ATHANASIADOU et al., 2018). A possibilidade de isolar células-tronco mesenquimais a partir da polpa dentária fez surgir a oportunidade de aplicar as concepções da bioengenharia tecidual para regeneração do tecido pulpar, proporcionando promissoras opções terapêuticas (GRONTHOS et al., 2000; ARAÚJO et al., 2018).

Dentes decíduos humanos são fontes de células-tronco que podem ser isoladas e cultivadas *in vitro*. O mecanismo de reparo na terapia pulpar se dá pela migração, proliferação e diferenciação das células-tronco da polpa dentária em odontoblastos, responsáveis pela síntese e secreção de dentina terciária (ARAÚJO et al., 2018; AHMED et al., 2020).

Diferentes materiais são utilizados para os procedimentos clínicos de terapia pulpar em dentes decíduos, incluindo os cimentos biocerâmicos de silicato de cálcio. Os mecanismos vitais da polpa requerem o uso de biomateriais para formar uma camada protetora sobre a polpa vital exposta (PRATI & GANDOLFI, 2015). A esse respeito, o material ideal deve ser capaz de promover a cicatrização pulpar, ser biocompatível, bactericida, além de não interferir o processo de reabsorção radicular fisiológico do dente decíduo (CUADROS-FERNÁNDEZ et al., 2016; BOSSÛ et al., 2020). Materiais bioindutivos quando colocados em contato direto com a dentina ou polpa lesionada, exibem biocompatibilidade e bioatividade adequadas para cicatrizá-la, induzindo a formação de tecido mineralizado (DAHAKI et al., 2020).

O desenvolvimento de novos materiais buscando as propriedades desejáveis almeja que os tratamentos odontológicos apresentem uma maior longevidade. Sendo assim, o sucesso ou insucesso dos procedimentos odontológicos pode estar associado com a escolha do material utilizado (CAMARGO, 2016). Estudos prévios avaliaram a citotoxicidade de materiais para terapia pulpar vital em células-tronco da polpa dental humana de dentes permanentes, mas poucos estudos utilizaram de dentes decíduos humanos (COLLADO-GONZALEZ et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; ATHANASIADOU et al., 2018). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi comparar e avaliar a citotoxicidade de quatro materiais: Bio-C Repair, MTA Repair HP, Biodentine e Theracal LC em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados. A hipótese nula é que os materiais avaliados não apresentem diferenças significativas em termos de citotoxicidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Delineamento Experimental

Este estudo apresentou um desenho fatorial envolvendo dois fatores de estudo: Tratamento (6 níveis: Bio-C Repair, MTA Repair, Theracal LC, Biodentine, controle negativo, controle positivo) e Períodos (3 níveis: 24, 48, 72 horas).

### Considerações éticas

Seguindo princípios éticos e jurídicos, a realização deste trabalho foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo e foi aprovado sob o número CAAE: 29177820.9.0000.5417. (ANEXO 1).

### Isolamento e Cultura Celular

O termo de consentimento e assentimento livre e esclarecido foi obtido dos responsáveis e participantes, como também o termo de cessão de dentes para usar os dentes decíduos esfoliados das crianças. Resumidamente, a polpa dentária humana foi extirpada dos dentes, com o auxílio de lima endodôntica e cureta, e incubadas em meio de cultura  $\alpha$ MEM (Minimum Essential Medium Alpha, Gibco, Grand Island, NY, USA) 20% SFB (FBS- Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) + Anfotericina B, Gentamicina e Penicilina em estufa a 37<sup>o</sup> C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células obtidas foram semeadas a uma densidade de 1 × 10<sup>4</sup> células cm<sup>2</sup> em frascos de cultura de plástico de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Union City, CA) em meio completo e incubados a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células aderentes foram cultivadas até 80% de subconfluência e foram definidas como passagem zero (P0). Para passagem subsequente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) livre de Ca<sup>2+</sup> /Mg<sup>2+</sup> (Gibco Invitrogen) e separadas por incubação com solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco Invitrogen) por 5 min a 37°C. O meio de cultura foi adicionado para inativar a atividade da tripsina. Finalmente, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> a uma densidade de 1 × 10<sup>4</sup> células cm<sup>2</sup>, objetivando novas expansões e acumular maior quantidade das mesmas para posterior

utilização nos experimentos. A utilização das mesmas nos experimentos ocorreu entre a 4ª e 8ª passagem.

### **Materiais de capeamento pulpar**

Foram analisados quatro materiais bioativos: Bio-C Repair (Angelus, Londrina, PR, Brasil), MTA Repair HP (Angelus, Londrina, PR, Brasil), Theracal LC (Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA) e Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França). A Tabela 1 apresenta a lista dos principais componentes dos materiais avaliados.

**Tabela 1** – Principais componentes dos materiais avaliados.

<b>Material</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Composição</b>
<b>Bio-C Repair</b>	Angelus, Londrina, PR, Brasil	Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão.
<b>MTA Repair HP</b>	Angelus, Londrina, PR, Brasil	Pó: Silicato tricálcico; Silicato dicálcico; Aluminato tricálcico; Óxido de Cálcio; Tunsgato de Cálcio. Líquido: Água e Plastificante.
<b>Theracal LC</b>	Bisco Inc, Schaumburg, IL, EUA	Partículas de silicato tricálcico; Uretano-Dimetacrilato (UDMA); Metacrilato de Bisfenol A-glicidilo (Bis-GMA) e Dimetacrilato de Trietileno glicol (TEDGMA); HidroxietilMetacrilato (HEMA) e Polietilenoglicol dimetacrilato (PEDGMA).
<b>Biodentine</b>	Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França	Pó: Silicato Tricálcico; Óxido de Zircônio; Óxido de Cálcio; Carbonto de Cálcio; Pigmento Amarelo; Pigmento Vermelho; Óxido de Ferro Marrom. Líquido: Cloreto de Cálcio Dihidratado; Areo. Água Purificada.

## **Preparação das Amostras**

A preparação dos meios condicionados foi realizada de acordo com estudos anteriores (COLLADO-GONZÁLEZ et al, 2017; CINTRA et al., 2017; BENETTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021) e com a Norma Internacional ISO 10993. Os materiais foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo de 1 embalagem de MTA Repair (0,17g) e duas gotas do líquido foram espatulados por 40 segundos até obter uma consistência homogênea. Biodentine foi misturado adicionando cinco gotas do líquido na cápsula e agitado no amalgamador a uma velocidade de 4000 rpm por 30 segundos. Bio-C Repair vem pronto para uso e o TheraCal LC é uma fórmula fotopolimerizável, não sendo necessário sua mistura. As amostras foram preparadas em condições assépticas, utilizando dispositivos de borracha estéril (5 mm de diâmetro, 3 mm de altura) e incubados a 37° C por 6 horas para sua configuração completa. Após 6 horas, os discos foram retirados dos moldes e esterilizados por luz ultravioleta por 1 hora em cabine de segurança 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 em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Decorrido este período, os discos foram descartados, os sobrenadantes foram coletados e filtrados através de um filtro estéril de 0,22  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Os sobrenadantes coletados foram referidos como extratos (1:1) e adicionados nas culturas celulares.

## **Ensaio de Viabilidade**

A taxa de viabilidade de SHED cultivadas na presença dos diferentes extratos foi avaliada usando o ensaio MTT (Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio, Sigma-Aldrich). O ensaio de MTT avalia a habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal, 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) de cor amarela e solúvel em água em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas (MOSMANN T., 1983).

SHED foram semeadas em placas de 96 poços (Corning #3595) ( $1 \times 10^4$  células/1 mL de meio por poço) e incubados por 24 horas em uma atmosfera de ar umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para permitir a adesão das células. Ao final do período de incubação, as células foram expostas aos extratos de materiais em 24, 48 e 72 horas. Células cultivadas em meio de

crescimento sem qualquer extrato foram usadas como controle. O controle positivo em  $\alpha$ MEM 10% SFB e controle negativo  $\alpha$ MEM 1% SFB. Após os períodos propostos, o meio de cultura foi removido, as SHED foram lavadas com PBS 1x. Em seguida, um volume de 110  $\mu$ l da solução de MTT (0,5mg/mL) previamente preparada e filtrada, foi adicionada a cada poço, as placas foram cobertas com papel alumínio, sendo mantidas no escuro e incubadas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 h. Decorrido esse período, a solução de MTT foi descartada e 200  $\mu$ l de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foram adicionados a cada poço, por 30 minutos. Em cada ponto de tempo, as soluções foram transferidas para outra placa de 96 poços e a absorbância foi medida usando um 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. Cada condição experimental foi realizada em triplicata e analisada em três experimentos independentes. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de amostras obtidas de três experimentos independentes. Os dados foram submetidos a análises pelo software Statistica versão 10.0. Os resultados dos ensaios de MTT foram analisados empregando ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

O Ensaio MTT revelou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e períodos estudados ( $p < 0,000$ ). Em 24h observou-se diferença estatisticamente significante das células em contato com o extrato MTA Repair HP com relação a todos os outros tratamentos e controle negativo (C-). As células que entraram em contato com o extrato MTA Repair HP apresentaram uma maior viabilidade celular, seguido dos tratamentos Biodentine, Bio-C Repair Theracal LC. O controle positivo (C+) apresentou maior média do que os demais grupos, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), exceto com o MTA Repair HP. O controle negativo (C-) apresentou diferença estatisticamente significante quando comparado com todos os tratamentos estudados (Tabela 2). Em 48h, todos os tratamentos apresentaram um declínio significativo da viabilidade havendo diferença estatisticamente significante entre o MTA Repair HP quando comparado com os demais tratamentos e controle negativo (Tabela 2). Em 72h observou-se um aumento da viabilidade celular, sendo MTA Repair HP > Biodentine > Bio-C Repair > Theracal LC, respectivamente (Tabela 2). Observa-se que o MTA Repair HP, controle negativo e controle positivo apresentaram padrões

semelhantes de comportamento, com uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade entre 24h e 48h e um aumento da viabilidade no período 72h sem diferença estatística com o período 24h (24h>48h; 72h>48h; 24h=72h). A viabilidade celular das SHED com os extratos de Bio-C Repair, Theracal LC e Biodentine não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos estudados (Tabela 2).

**Tabela 2** - Comparações entre tratamentos e períodos para viabilidade celular

Períodos	Tratamentos					
	Bio-C Repair (média ± DP)	MTA Repair HP (média ± DP)	Theracal LC (média ± DP)	Biodentine (média ± DP)	Controle negativo (média ± DP)	Controle positivo (média ± DP)
24 h	0,074 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,366 ± 0,029 <sup>e</sup>	0,078 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,088 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,287 ± 0,016 <sup>d</sup>	0,378 ± 0,041 <sup>e</sup>
48 h	0,098 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,242 ± 0,007 <sup>c</sup>	0,091 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,110 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,197 ± 0,011 <sup>b</sup>	0,264 ± 0,019 <sup>cd</sup>
72 h	0,102 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,351 ± 0,008 <sup>e</sup>	0,095 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,108 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,244 ± 0,012 <sup>cd</sup>	0,355 ± 0,037 <sup>e</sup>

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

## DISCUSSÃO

A biocompatibilidade é uma importante propriedade que deve ser considerada ao selecionar um material para terapia pulpar devido ao seu contato direto com tecidos vitais (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2017; GHILOTTI et al., 2020). Com os avanços na ciência, os materiais bioindutivos atuais apresentam resultados promissores na terapia pulpar de dentes decíduos e permanentes. Estudos prévios demonstraram efeitos de Bio-C Repair, MTA Repair HP, Theracal LC e Biodentine em tecidos de polpa dentária humana isoladamente ou em combinação com outros materiais através de vários tipos de tratamento com taxas de sucesso variáveis (NOWICKA et al., 2013; BENETTI et al., 2019; SANZ et al., 2020; DAHAKE et al., 2020; GHILOTTI et al., 2020). No entanto, quanto ao efeito do contato direto desses materiais em SHED, foram encontrados dados muito limitados.

As técnicas de cultura celular representam uma excelente escolha para analisar a biocompatibilidade de diferentes materiais, para isso estão disponíveis vários métodos quantitativos e qualitativos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade de um biomaterial e os

potenciais efeitos adversos no mecanismo celular (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2017). Testes *in vitro*, como o presente, oferecem uma análise consistente das propriedades biológicas de materiais cultivados em conjunto com populações celulares com os quais entrarão em contato, podendo então prever o comportamento clínico (PEDANO et al., 2020).

Novas formulações de biomateriais estão sendo constantemente introduzidas no mercado para uso clínico. Atualmente, os materiais à base de silicato e fosfato de cálcio estão em maior uso e desenvolvimento, devido à sua capacidade de estimular o reparo tecidual através da deposição de tecido mineralizado. Portanto, vêm sendo avaliados quanto a sua citotoxicidade e bioatividade em cultura de células (ANDRADE, 2016; BENETTI et al., 2019; SANZ et al., 2022).

No presente estudo, os materiais testados apresentaram viabilidade celular significativamente diferente. Enquanto o extrato com MTA Repair HP não apresentou citotoxicidade, de acordo com os controles utilizados, o extrato com TheraCal LC e os outros materiais diminuíram significativamente a viabilidade celular. Assim, a hipótese nula testada neste estudo *in vitro* foi rejeitada. Investigações baseadas em diferentes métodos, como o ensaio de redução de MTT, estão de acordo com o exposto (GHILOTTI et al., 2020; MANASPON et al., 2021; SANZ, 2021).

Nossos resultados mostraram que o MTA HP Repair foi considerado um material biocompatível, pois manteve altas taxas de viabilidade celular, não apresentou citotoxicidade quando comparado ao grupo controle positivo ( $p > 0,05$ ). Esses dados são consistentes com os apresentados em estudos anteriores (ESTELLITA, 2017; CINTRA et al., 2017; NAM et al., 2020; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021) e sugere que o uso de tal material a diversas situações clínicas parece benéfico. A baixa citotoxicidade e a boa biocompatibilidade desse cimento têm sido atribuídas aos seus principais componentes, que também são os principais componentes do tecido dentinário, incluindo silicato tricálcico, óxido de cálcio, óxido, silicato e aluminato tricálcico. (BIN, 2012). As células que entraram em contato com o MTA HP Repair apresentaram diferença estatística em relação aos demais cimentos, desempenhando a melhor ação durante o período de 24 e 72 horas, onde as SHED mostraram os níveis mais altos de viabilidade celular. Estudos anteriores demonstraram que os cimentos de MTA não têm efeitos citotóxicos nas células-tronco da polpa dentária. TOMÁS-CATALÁ e colaboradores (2018) pesquisaram os efeitos do MTA Repair HP em células-tronco da polpa dentária usando o Ensaio MTT e relataram que houve um alto nível de proliferação celular, o que é consistente com os nossos resultados.

Já as SHED que foram expostas ao extrato com Theracal LC mostraram uma redução



significativa na viabilidade celular em comparação com o controle negativo em todos os períodos de tempo. Portanto, se destaca dentre os cimentos avaliados como sendo proporcionalmente o mais citotóxico, onde foi observada uma redução no número de células viáveis no meio de cultura, quando comparado aos outros materiais avaliados e ao grupo controle. Nosso resultado é condizente com estudos anteriores que mencionaram achados semelhantes (BAKHTIAR et al., 2017, ESTELLITA, 2017; NAJI ZIAD ARANDI & TAREK RABI, 2018; ADYĞÜZEL et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021). No geral, a literatura atual indica que o TheraCal LC é inferior aos materiais de MTA e Biodentine, principalmente devido à qualidade inferior da formação da barreira calcária, maior efeito inflamatório, formação da camada odontoblástica menos favorável e menor capacidade de liberação de cálcio. Tais achados foram justificados à presença de monômero de resina, que permaneceu não polimerizado, causando inflamação e toxicidade ao tecido pulpar. Fato este que foi ressaltado em vários estudos (HEBLING et al., 2009; LEE et al., 2015; POGGIO et al., 2015; JEANNEAU et al., 2017; MANOJLOVIC et al., 2017). Além disso, a geração de calor durante a fotopolimerização pode potencialmente induzir reações pulpares desfavoráveis (KUNERT et al., 2022). Em um estudo realizado por CAMILLERI et al., (2014) sobre a liberação de hidróxido de cálcio dos materiais de capeamento pulpar, foi relatado que havia uma relação entre a liberação de hidróxido de cálcio e regeneração do tecido pulpar. Dependendo da hidratação no Theracal LC, foi relatado que não foi produzido hidróxido de cálcio suficiente, portanto, ocorreu uma baixa taxa de liberação de hidróxido de cálcio no material. Outro problema é o pH que pode sofrer alteração após o preparo dos extratos dos materiais. O pH de um material é uma propriedade física essencial e geralmente está relacionado com a resposta pulpar (PAULA et al., 2019). A liberação de íons hidroxila eleva o pH do ambiente circundante e causa irritação do tecido pulpar. Por outro lado, um pH alcalino também cria um ambiente hostil para a sobrevivência e proliferação bacteriana, podendo explicar os resultados de maior citotoxicidade (NAJI ZIAD ARANDI & TAREK RABI, 2018).

Com relação ao Biodentine, este apresentou menor citocompatibilidade quando comparado ao MTA Repair HP e a células não tratadas. Esses resultados corroboram com outros estudos publicados (DAHAKI et al., 2020; GHILOTTI et al., 2020; ZAEN EL-DIN et al., 2020). A literatura relata que a viabilidade celular pode depender significativamente da concentração dos extratos. BENETTI et al. (2019) menciona que a citotoxicidade do material está relacionada a diluição do extrato utilizado, sendo reduzida com extratos menos diluídos. Por conseguinte, o uso da diluição também se justifica porque quando o material está em

contato com o tecido, os compostos são continuamente eliminados pelos fluidos extracelulares e sua concentração diminui progressivamente. Isto posto, concentrações mais altas de Biodentine exercem efeito citotóxico nas células, enquanto concentrações mais baixas podem ser consideradas como ideais para aumentar o potencial regenerativo de SHED (HASWEH et al., 2018) sendo a primeira situação a condição do presente estudo, que utilizou extratos nas concentrações de 1:1, no qual é considerado uma limitação, pois os materiais não foram avaliados em diferentes meios de concentração. SEQUEIRA et al. (2018) analisou células da papila apical aplicando um método alternativo para análise da viabilidade celular e obteve o mesmo achado, onde o meio de extração 100% de Biodentine induziu a morte celular, mostrando que extratos de Biodentine não diluídos afetaram significativamente a viabilidade no período de tempo de 24 h e a mesma tendência também foi observada após 48 ou 72 horas de incubação. Além disso, descreve uma possível explicação, apontando a relação deste material com o aumento da diferenciação de células-tronco. Tal observação é interessante, pois essa propriedade pode confundir resultados dependentes da proliferação celular, e pode apresentar benefícios quanto ao potencial regenerativo do material. Portanto, pesquisas futuras devem ter como objetivo distinguir entre as propriedades bioativas que influenciam a diferenciação, uma vez que estas podem impactar indiretamente na proliferação e, como tal, interferir na maioria das medidas de viabilidade celular. BORTOLUZZI et al. (2015) aponta que todos os cimentos de silicato de cálcio recém-preparados (modificados e livres de resina) são inicialmente citotóxicos, o que pode ser devido à sua alta alcalinidade. Contudo, tal ocorrência não foi observada com o MTA, que já apresentou boa taxa de viabilidade em 24h de avaliação.

De acordo com GHILOTTI et al. (2020), o Bio-C Repair apresenta compatibilidade celular semelhante ao Biodentine. Tal evidência é consistente com o resultado encontrado no presente trabalho. Entretanto, os valores de viabilidade celular do Bio-C Repair foram significativamente inferiores ao MTA Repair HP. Hipotetiza-se que o longo tempo de presa e a alta solubilidade também favorecem a citotoxicidade, pois indicam o aumento da liberação de componentes tóxicos. Alguns biomateriais podem deixar resíduos nos extratos, o que pode influenciar negativamente as culturas de células (PAULA et al., 2021). Além disso, YOUSSEF et al. (2019) justifica em seu estudo que os mecanismos envolvidos quanto à citotoxicidade não são claramente compreendidos, sugerindo que a liberação inicial de íons de cálcio, atividades iônicas, presença de componentes tóxicos ou mudanças de pH podem afetar o comportamento das células, o que pode explicar o diferente efeito citotóxico entre os materiais testados.

As limitações do presente estudo estão relacionadas ao caráter *in vitro* do experimento realizado para atingir o objetivo proposto. Qualquer discrepância entre dados prévios e os resultados mencionados pode ser explicada por diferenças nos procedimentos experimentais, como formulação e diferentes reações bioquímicas geradas de tais materiais, aos métodos de preparação de amostras, extração, a duração da exposição aos materiais testados e células-alvo usadas. Portanto, métodos padronizados devem ser preconizados para permitir a comparação direta entre os estudos.

Este é um estudo *in vitro*, embora represente um método relevante e apropriado para o conhecimento de diferentes propriedades de materiais odontológicos e seus potenciais efeitos nocivos (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2017) tem suas limitações para a extrapolação direta dos resultados para situações clínicas. Portanto, mais testes devem ser realizados para um estudo mais detalhado do potencial citotóxico dos materiais. Dada à diversidade de cimentos endodônticos existentes no mercado, torna-se difícil saber qual a melhor indicação. A escolha correta, entretanto, deve considerar não apenas o comportamento biológico, mas também a avaliação conjunta de outros parâmetros como propriedades antimicrobianas, físicas e químicas. Deste modo, futuros estudos laboratoriais e clínicos são indicados para confirmar ou contradizer os resultados do presente estudo.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados apresentaram uma melhor viabilidade em contato com o MTA Repair HP em comparação com os demais materiais biocerâmicos estudados.

## REFERÊNCIAS

Adıgüzel M, Ahmetoğlu F, Eldeniz AÜ, Tekin MG, Göğebakan B. Comparison of cytotoxic effects of calcium silicate-based materials on human pulp fibroblasts Mehmet. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects 2019;13:241-246

Ahmed GM, Abouauf EA, AbuBakr N, Dörfer CE, El-Sayed KF. Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update. Stem Cells International 2020;2020:1–15.

Andrade, A.S. Biocompatibilidade e bioatividade de cimentos à base de silicato tricálcio: estudo in vitro e in vivo. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, 2016.

Arandi NZ, Rabi T. TheraCal LC: From Biochemical and Bioactive Properties to Clinical Applications. *Int J Dent* 2018;2018:3484653.

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* 2018;26.

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. *Dental Materials* 2018;34:1797–813.

Bakhtiar H, Nekoofar MH, Aminishakib P, Abedi F, Naghi moosavi F, Esnaashari E, et al. Human Pulp Responses to Partial Pulpotomy Treatment with TheraCal as Compared with Biodentine and ProRoot MTA: A Clinical Trial. *J Endod.* 2017;43:1786-1791.

Benetti F, Queiroz ÍOA, 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;30:325-332.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2012;38:495-500.

Bortoluzzi EA, Niu L-N, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei D-D, et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater* 2015; 31:1510-1522.

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. *JCM* 2020;9:838.

Camargo, SEA. Análise de propriedades biológicas de Materiais de interesse na odontologia. 2016. 97 p. Tese (Livre-Docente) - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2016.

Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod* 2014; 40:1846–54.

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, Gomes-Filho JE. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *Journal of Endodontics* 2017;43:774-778.

Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J* 2017;50:e19-30.

Cuadros-Fernández C, Lorente Rodríguez AI, Sáez-Martínez S, García-Binimelis J, About I, Mercadé M. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. *Clin Oral Invest* 2016;20:1639-1645.

Dahake 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;32:43-51.

Estellita, R.S. Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio. 2017. 39 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

Gandolfi MG, Spagnuolo G, Siboni F, Procino A, Riviaccio V, Pelliccioni GA, et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clin Oral Invest* 2015;19:2075-89.

Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials* 2020;13:2189.

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

Hasweh N, Awidi A, Rajab L, Hiyasat A, Jafar H, Islam N, Hasan M, Abuarqoub D. Characterization of the biological effect of Biodentine™ on primary dental pulp stem cells. *Indian J Dent Res.* 2018; 29(6):787-793.

Hebling J., Lessa FCR, Nogueira I., de Carvalho RM, de Costa CAS. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *Am J Dent.* 2009; 22:137-142.

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

Jeanneau C., Laurent P., Rombouts C., Giraud T., About I. Toxicity of light-cured tricalcium silicate to dental pulp. *Journal of Endodontics* 2017; 43:2074-2080.

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;11:3238.

Lee H., Shin Y., Kim S.-O., Lee H.-S., Choi H.-J., Song JS Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. *Journal of Endodontics* 2015; 41:1317-1324.

Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1044:132-8.

Manaspon C., Jongwannasiri C., Chumprasert S., Sa-Ard-Iam N., Mahanonda R., Pavasant P, et al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. *BMC Oral Health* 2021; 21:209.

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. *Dental Materials* 2017;33:454-466.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983; 65: 55-63.

Nam OH, Kim J-H, Choi SC, Kim Y (2020) Time-Dependent Response of Human Deciduous Tooth-Derived Dental Pulp Cells Treated with TheraCal LC: Functional Analysis of Gene Interactions Compared to MTA. *J Clin Med* 2020; 9:531.

Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2013;39:743-747.

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* 2019;12:1184.

Paula AB, Laranjo M, Coelho AS, Abrantes AM, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB et al. Assessing the Cytotoxicity and Cell Response to Biomaterials. *JoVE* 2021:61512.

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*. 2020; 13(12):2670.

Poggio C., Beltrami R., Colombo M., Ceci M., Dagna A, Chiesa M. In vitro antibacterial activity of diferente pulp capping materials. *J Clin Exp Dent* 2015; 7:584–588.

Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials* 2015;31:351-370.

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 Invest* 2021;25:5009-5024.

Sanz, J. L. 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. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 12, p. 3872, 28 nov. 2020.

Sanz, J. L. 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. *Journal of Endodontics*, v. 47, n. 12, p. 1896–1906, 1 dez. 2021.

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; 9:74.

Tomás-Catalá, CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Fornner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics* 2018; 44:126–132.

Youssef, AR. et al. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC oral health*, 2019; 19(1):133.

Zaen El-Din AM, Hamama HH, Abo El-Elaa MA, Grawish ME, Mahmoud SH, Neelakantan P. The effect of four materials on direct pulp capping: An animal study. *Aust Endod J* 2020; 46:249–256.

## **2.2 ARTIGO 2**

### **Biocompatibilidade de uma bandagem dentino-pulpar (BBio), MTA e Biodentine em células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados**

### **Biocompatibility of dentin-pulp bandage (BBio), MTA and Biodentine in stem cells from exfoliated human deciduous teeth**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) em contato com extratos de uma bandagem de bioestimulação dentino-pulpar (BBio), MTA Repair HP e Biodentine. As células foram obtidas a partir do biorrepósito de linhagens celulares derivadas da polpa de dentes decíduos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. As amostras foram preparadas e imersas em  $\alpha$ MEM 10% SFB de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 (G1) - Bandagem dentino/pulpar (BBio), e Grupo 2 (G2) - Biodentine e Grupo 3 (G3) - MTA Repair HP. O controle foi realizado com células sem tratamento. O grupo controle positivo (C+) foi mantido com  $\alpha$ MEM +10% SFB e o grupo controle negativo (C-) com  $\alpha$ MEM + 1% SFB. A viabilidade celular foi analisada por meio do Ensaio MTT, em 24, 48 e 72 horas após o contato das SHED com os extratos dos materiais testados. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos estudados ( $p < 0,000$ ). Na comparação intergrupos, observou-se uma maior viabilidade celular em G3 (MTA Repair HP). De acordo com os resultados apresentados, observou-se que células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos expostas a BBio apresentaram viabilidade celular, até mesmo superior ao Biodentine, concluindo então ser uma alternativa aos materiais de capeamento pulpar disponíveis no mercado.

**Palavras-chave:** SHED, Viabilidade Celular, Teste de Materiais Biocompatíveis.



## INTRODUÇÃO

Biomateriais são constituídos de compostos naturais ou sintéticos, integrados aos sistemas biológicos cuja função é reparar ou substituir células, tecidos e órgãos, contribuindo para o aumento da qualidade de vida do paciente. A biocompatibilidade diz respeito à capacidade de um material exercer sua função, sem provocar quaisquer efeitos adversos, proporcionando uma resposta celular e tecidual favorável (SINHORETI et al., 2013). Deste modo, a busca por novos biomateriais com propriedades bioativas, biodegradabilidade e atoxicidade é constante (GEMINI-PIPERNI et al., 2014; KALYAN et al., 2019; ZAFAR et al., 2020).

À vista disso, amparados por estudos experimentais e clínicos, os pesquisadores buscam desenvolver materiais com propriedades desejáveis para substituição parcial ou total dos tecidos biológicos por circunstância de alguma patologia ou traumatismo, a fim de obter uma reestruturação mais próxima possível da ideal para anatomia e a função da região envolvida (PIRES et al., 2015). Sendo assim, as tendências atuais da bioengenharia tecidual visam substituir as células lesadas ou estimular o seu crescimento através de biomateriais (MACHADO et al., 2020).

No cenário atual a Bandagem dentino-pulpar (BBio) vem de encontro ao desenvolvimento de um novo material com grande potencial para aplicação em diferentes especialidades. Estudos apontam que as características bioquímicas e biofísicas de membranas têm grande potencial de aplicação em diferentes áreas da odontologia. A BBio é uma membrana produzida à base de quitosana, em camada tripla, permitindo a incorporação de diversos materiais (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018; MACHADO et al., 2020; LOURENÇO-NETO et al., 2022). A quitosana é indicada para intervenções mínimas até terapias pulpares, afinal trata-se de um polímero natural, atóxico, biocompatível, biodegradável, antimicrobiano e hemostático com atividade de regeneração tecidual (SOARES et al., 2017). Sua ação está associada ao processo de cicatrização tecidual através da proliferação celular, biomodulação das estruturas de colágeno e também à atividade imunomoduladora que resulta em ação anti-inflamatória. Devido às suas propriedades favoráveis e à capacidade de interagir e estimular as células pulpares, a quitosana tem sido explorada em associação com outros materiais para produzir novos curativos pulpares bioativos. Portanto, a associação de quitosana com um cimento biocerâmico parece oferecer benefícios para a Odontologia, como excelentes propriedades dos materiais envolvidos por fácil manuseio e baixo custo (MACHADO et al., 2020; LOURENÇO-NETO et al., 2022).

O foco da terapia pulpar vital é a regeneração do complexo dentino-pulpar e este é um procedimento praticado com frequência na odontopediatria para manutenção dos dentes decíduos até o momento ideal de sua esfoliação. Desta forma, o material selecionado deve induzir a proliferação de células da polpa. Logo, um material bioativo ideal deve ser capaz de liberar íons cálcio, impulsionar a eletrocondutividade, produzir hidrogênio e formar uma camada entre o material e a dentina com cristais de apatita (MOROTOMI, WASHIO, KITAMURA, 2019; MACHADO et al., 2020).

Sendo assim, a proposta deste estudo é avaliar a citotoxicidade de um novo material de bioestimulação dentino-pulpar em células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos, visando abrir novas perspectivas de tratamento para a terapia pulpar vital em dentes decíduos. A hipótese nula é que o novo material de bioestimulação dentino-pulpar apresentará resultados de viabilidade celular semelhantes ao MTA Repair HP e Biodentine.

## **MATERIAS E MÉTODOS**

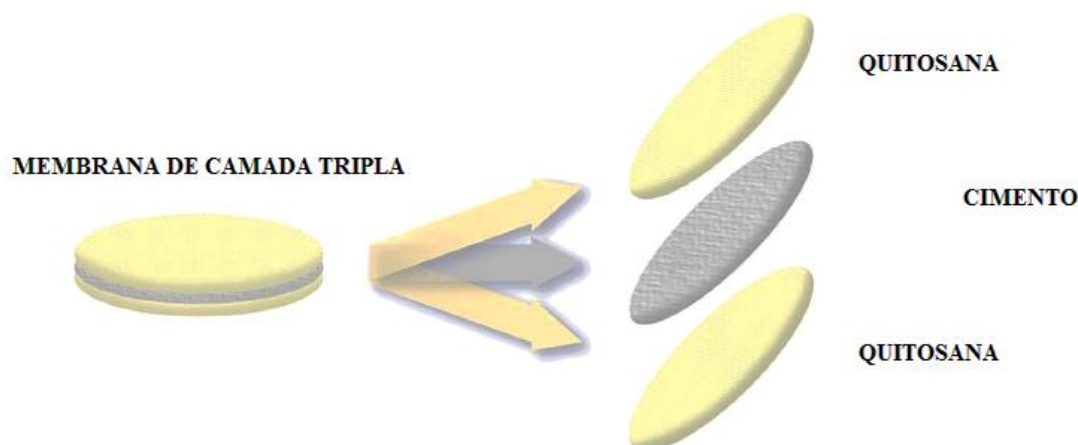
### **Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. (CAAE: 29177820.9.0000.5417) (ANEXO 1).

### **Confecção da Bandagem de Bioestimulação dentino/pulpar (BBio)**

Foi desenvolvido um biomaterial em forma de bandagem de quitosana associada a um cimento à base de silicato de cálcio. Cada unidade de bandagem foi feita em tripla camada (quitosana/cimento/quitosana), com proporções fixas de cada material incorporado, que pode ser observada na figura 1. As proporções utilizadas seguiram estudos prévios (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018; MACHADO et al., 2020). Placas de petri de 60X15 mm foram utilizadas como molde. Cada camada incorporada foi colocada individualmente e secas a 30° C por 15 minutos. Por fim, as placas com as membranas finalizadas foram deixadas por 24 horas em estufa para secagem final. Posteriormente foram recortadas utilizando um perfurador de metal, de furo circular (diâmetro = 5 mm e altura = 3 mm) e esterilizadas por luz ultravioleta por 1 hora em cabine de segurança biológica.

**Figura 1** – Layout final das membranas.



Fonte: Lourenço-Neto et al., 2022.

### Preparação de Amostras

Três biomateriais foram testados no presente estudo: Bandagem dentino-pulpar (BBio), Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França) e MTA Repair HP (Angelus, Londrina, PR, Brasil). A preparação dos extratos foi realizada de acordo com estudos anteriores (COLLADO-GONZÁLEZ et al, 2017; CINTRA et al., 2017; BENETTI et al., 2019; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021) e de acordo com a ISO 10993. As membranas de bioestimulação dentino-pulpar foram previamente preparadas em laboratório e os cimentos foram preparados de acordo com a instrução do fabricante. As amostras foram confeccionadas em condições assépticas, utilizando dispositivos de borracha estéril (diâmetro = 5 mm e altura = 3 mm) e foram mantidos em uma incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C por 6 horas após a mistura para sua configuração completa. Após 6 horas, as amostras foram retiradas dos moldes e esterilizadas por luz ultravioleta por 1 hora em cabine de segurança biológica. Cada amostra foi imerso em 1 mL de  $\alpha$ MEM 10% SFB e incubado em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Após 3 dias, as amostras foram descartadas e os sobrenadantes foram coletados e filtrados através de um filtro estéril de 0,22  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Os sobrenadantes coletados foram referidos como extratos. Os tratamentos avaliados foram: Grupo 1 – Bandagem dentino-pulpar (BBio); Grupo 2 – Biodentine; Grupo 3 – MTA Repair HP; Grupo 4 – Controle Positivo ( $\alpha$ -MEM+10% SFB); Grupo 5 – Controle Negativo ( $\alpha$ -MEM+ 1% SFB), nos respectivos tempos, 24, 48 e 72h.

## Ensaio de Viabilidade Celular

Amostras de células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) derivado da 7ª passagem celular foram cultivadas em  $\alpha$ MEM (Minimum Essential Medium Alpha Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) e 1 % de coquetel antibiótico/antimicótico (Anti-Anti - Gibco, Grand Island, NY, USA) sob condições padrão de cultura de células (37°C, 100% de umidade, 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>). O meio de cultura foi trocado periodicamente até que as células atingissem a subconfluência no frasco de cultura. A viabilidade celular foi analisada por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) nos períodos de 24, 48 e 72h de cultivo, usando SHED cultivadas em meio completo como controle. SHED foram semeadas em placas de 96 poços (Corning #3595) (1 x 10<sup>4</sup> células/1 mL de meio por poço) e incubados por 24 horas em uma atmosfera de ar umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para permitir a fixação das células. Ao final do período de incubação, as células foram expostas aos extratos de materiais por 24, 48 e 72 horas. Os controles foram cultivados em meio sem extratos. O controle positivo em  $\alpha$ MEM 10% SFB e controle negativo  $\alpha$ MEM 1% SFB. Após os períodos propostos, o meio de cultura foi removido, as SHEDs foram lavadas com PBS 1x. Em seguida, 110  $\mu$ l da solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada a cada poço, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 h. Decorrido esse período, a solução de MTT foi descartada e 200  $\mu$ l de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foram adicionados a cada poço, por 30 minutos. Em cada ponto de tempo, as soluções foram transferidas para outra placa de 96 poços e a absorbância foi medida usando um leitor automático de microplacas (Synergy Mx; BioTek Instruments, EUA), em comprimentos de onda correspondente a 570 nm (MOSMANN T., 1983; MAGALHÃES, 2018).

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três vezes. Os dados do ensaio MTT foram analisados usando o software estatístico Statistica versão 10.0. As comparações entre os grupos nos ensaios de quantificação de MTT foram analisadas usando ANOVA a dois critérios seguida de pós-testes de Tukey (p<0,05). Todos os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## RESULTADOS

Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e períodos estudados: 24, 48 e 72h (p<0,05).

Na comparação intergrupos em relação aos grupos experimentais, no período de 24h, a BBio apresentou uma diferença estatisticamente significativa com os demais grupos experimentais, no qual Biodentine mostrou viabilidade celular menor e MTA Repair HP maior viabilidade celular. Em 48h, MTA Repair HP mostrou viabilidade celular estatisticamente significativa maior que a BBio. Por fim, em 72 horas, a BBio evidenciou uma maior viabilidade celular quando comparada ao Biodentine e uma menor ao ser comparada com MTA Repair HP, ambos os resultados foram estatisticamente significativos. O controle positivo (C+) obteve os melhores resultados com relação a todos os tratamentos em todos os períodos avaliados, de forma estatisticamente significativa, exceto com MTA Repair HP (Tabela 1).

**Tabela 1** - Comparações intergrupos para viabilidade celular.

Tratamentos	Períodos		
	24 H	48 H	72 H
<b>BBio</b> (média ± DP)	0,233 ± 0,041 <sup>A</sup>	0,145 ± 0,013 <sup>A</sup>	0,219 ± 0,010 <sup>A</sup>
<b>Biodentine</b> (média ± DP)	0,088 ± 0,004 <sup>B</sup>	0,110 ± 0,007 <sup>A</sup>	0,108 ± 0,004 <sup>B</sup>
<b>MTA Repair HP</b> (média ± DP)	0,366 ± 0,029 <sup>CD</sup>	0,242 ± 0,007 <sup>B</sup>	0,351 ± 0,008 <sup>C</sup>
<b>Controle Negativo (C-)</b> (média ± DP)	0,287 ± 0,016 <sup>AC</sup>	0,197 ± 0,011 <sup>AB</sup>	0,244 ± 0,012 <sup>A</sup>
<b>Controle Positivo (C+)</b> (média ± DP)	0,378 ± 0,041 <sup>D</sup>	0,264 ± 0,019 <sup>B</sup>	0,355 ± 0,037 <sup>C</sup>

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

Na comparação intragrupos, observa-se um declínio estatisticamente significativo da BBio em 48 horas quando comparado aos demais períodos, o mesmo acontece com MTA Repair HP e o Controle positivo (C+). O controle negativo (C-) apresentou a seguinte padrão de viabilidade celular entre os períodos: 24H>72H>48H (Tabela 2).

**Tabela 2** - Comparações intragrupos para viabilidade celular.

Períodos	Tratamentos				
	BBio (média ± DP)	Biodentine (média ± DP)	MTA Repair HP (média ± DP)	Controle Negativo (média ± DP)	Controle Positivo (média ± DP)
24 h	0,233 ± 0,041 <sup>A</sup>	0,088 ± 0,004 <sup>B</sup>	0,366 ± 0,029 <sup>CD</sup>	0,287 ± 0,016 <sup>AC</sup>	0,378 ± 0,04 <sup>D</sup>
48 h	0,145 ± 0,013 <sup>A</sup>	0,110 ± 0,007 <sup>A</sup>	0,242 ± 0,007 <sup>B</sup>	0,197 ± 0,011 <sup>AB</sup>	0,264 ± 0,019 <sup>B</sup>
72 h	0,219 ± 0,010 <sup>A</sup>	0,108 ± 0,004 <sup>B</sup>	0,351 ± 0,008 <sup>C</sup>	0,244 ± 0,012 <sup>A</sup>	0,355 ± 0,037 <sup>C</sup>

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

## DISCUSSÃO

A tecnologia e a inovação são fundamentais para a evolução de biomembranas totalmente compatíveis para os processos regenerativos e cicatriciais dos tecidos. Nesse cenário, a quitosana é um polímero natural que tem vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antimicrobianas e antifúngicas que beneficiam os tecidos duros do dente, sendo uma opção válida, eficaz e segura para procedimentos curativos (LOURENÇO-NETO et al., 2022).

A bioengenharia de tecidos tem o objetivo de substituir as células lesadas e estimular o crescimento do tecido agredido (KALYAN et al., 2019). Diante disso, um material de curativo pulpar à base de quitosana é uma excelente alternativa, pois as concentrações de quitosana usadas para preparar tais membranas são biocompatíveis, seguras e sem efeitos colaterais para os tecidos humanos (SILVA et al., 2017; KLOSTER et al., 2018). Além disso, este é um campo muito analisado na engenharia de tecidos, apresentando resultados positivos de biocompatibilidade em contato com células humanas (AHSAN et al. 2018; SKOSKIEWICZ-MALINOWSKA et al. 2017).

Nesse contexto, os cimentos de silicato de cálcio também vêm ganhando espaço no mercado devido ao seu baixo custo, grande disponibilidade e biocompatibilidade. Desta maneira, a associação de quitosana e cimento de silicato de cálcio em uma membrana de capeamento pulpar (BBio) parece trazer vantagens para aplicação na Odontologia (LOURENÇO-NETO et al., 2022).

Estudos de viabilidade celular com outros tipos de células e membranas de quitosana, demonstraram que membranas de quitosana pura e membranas de quitosana associadas a outras drogas permitiram o crescimento celular (SILVA et al., 2017). Esses resultados concordam com os presentes achados em relação à viabilidade e proliferação celular de membranas de quitosana associadas ao cimento de silicato de cálcio, nos quais as respostas mostraram que a BBio obteve valores de viabilidade celular semelhantes ao Controle negativo e superiores ao Biodentine. Por outro lado, a comparação da BBio com o MTA Repair HP, mostrou uma vantagem do cimento em relação a membrana. Uma hipótese para justificar tal diferença pode ser devido ao pH alcalino observado pela aplicação de membranas contendo cimento, como mencionado por LOURENÇO-NETO et al. (2022).

Estudos anteriores demonstraram que o MTA Repair HP é um material que favorece a viabilidade celular e mantém altos potenciais de biocompatibilidade e biomineralização (CINTRA et al., 2017; NAM et al., 2020; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2021). Esses achados validam os resultados do presente estudo, no qual foi encontrado a capacidade do MTA Repair HP em contribuir com a viabilidade celular, a qual foi significativamente maior quando comparada com o controle negativo e semelhantes ao controle positivo. Em contrapartida, o Biodentine apresentou menor citocompatibilidade quando comparado a células não tratadas e aos outros materiais, resultados consistentes com estudos publicados recentemente (ZAEN EL-DIN et al., 2020; DAHAKE et al., 2020; GHILOTTI et al., 2020).

Ensaio *in vitro* são importantes para orientar os parâmetros que serão aplicados em futuras pesquisas. Nesse contexto, as tendências atuais da bioengenharia de tecidos visam estimular o crescimento do tecido lesado por meio de biomateriais. Assim, estudos futuros devem verificar a eficácia dos biomateriais em diferentes células, visto que o tecido pulpar é rico em diversos tipos celulares além das SHEDs, possibilitando novas descobertas e aplicações. Portanto, estudos com novas metodologias devem ser realizadas para confirmação de tais resultados.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, observou-se que células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos expostas a BBio apresentaram viabilidade celular, até mesmo superior ao Biodentine, concluindo então ser uma alternativa aos materiais de capeamento pulpar disponíveis no mercado.

## REFERÊNCIAS

- Ahsan SM, Thomas M, Reddy KK, Sooraparaju SG, Asthana A, Bhatnagar I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 110: 97–109.
- Benetti, F, De zevedo QIO, Oliveira, PHC et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Brazilian Oral Research* 2019; 33:042.
- Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, Gomes-Filho JE. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *Journal of Endodontics* 2017;43:774-778.
- Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J* 2017;50:e19-30.
- Dahake 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;32:43–51.
- Estellita, R.S. Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio. 2017. 39 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.
- Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KB, Granjeiro JM, de Oliveira RC, et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014;561:88-98.
- Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials* 2020;13:2189.
- ISO 10993-5 (2005) Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos – Parte 5: Testes para citotoxicidade in vitro. Genebra, Suíça: International Standards Organization, Genebra, Suíça.
- Kalyan KSDR, Vinay C, Arunbhupathi, Uloopi KS, Chandrasekhar R, RojaRamya KS. Preclinical Evaluation and Clinical Trial of Chlorhexidine Polymer Scaffold for Vital Pulp Therapy. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 2019; 43: 109-15.
- Kloster AP, Lourenço Neto N, Costa SA da, Oliveira TM, Oliveira RC de, Machado MAAM. In Vitro Antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorexidine gel. *Br Dent J* 2018;29:354–8.
- Lourenço Neto, N, Vitor, LLR, da Costa SA, da 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, 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.



Magalhães, WLE, Thá, EL, Leme, DM. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, Pr: Embrapa, 2018.

Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Japanese Dental Science Review* 2019;55:5–11.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983; 65: 55-63.

Nam OH, Kim J-H, Choi SC, Kim Y (2020) Time-Dependent Response of Human Deciduous Tooth-Derived Dental Pulp Cells Treated with TheraCal LC: Functional Analysis of Gene Interactions Compared to MTA. *J Clin Med* 2020; 9:531.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova* 2015; 38: 957-971.

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 Invest* 2021;25:5009-5024.

Silva M dos S, Neto NL, da Costa SA, da Costa SM, Oliveira TM, Oliveira RC de, 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.

Sinhoreti MAC, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomaterials in Dentistry: current view and future perspectives. *Revista da Associação Paulista de Cirurgioes Dentistas* 2013; 67:256-61.

Skoskiewicz-malinowska K, Kaczmarek U, Malicka B, Walczak K, Zietek M. Application of Chitosan and Propolis in Endodontic Treatment: A Review. *MRMC* 2017;17:410–434.

Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, Basso FG, Huck C, Hebling J, et al. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. *Clin Oral Invest* 2017; 21:2827–2839.

Zaen El-Din AM, Hamama HH, Abo El-Elaa MA, Grawish ME, Mahmoud SH, Neelakantan P. The effect of four materials on direct pulp capping: An animal study. *Aust Endod J* 2020; 46:249–256.

Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. *J Pak Med Assoc.* 2020;70:497-504.

## **3. CONCLUSÕES**

---

### 3. CONCLUSÕES

**ARTIGO 1** - Conclui-se que as células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados apresentaram uma melhor viabilidade em contato com o extrato MTA Repair HP em comparação aos demais materiais biocerâmicos estudados.

**ARTIGO 2** – De acordo com os resultados apresentados, observou-se que as células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos expostas a BBio apresentaram viabilidade celular e é uma alternativa aos materiais de capeamento pulpar disponíveis no mercado.

# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIGÜZEL M. et al. Comparison of cytotoxic effects of calcium silicate-based materials on human pulp fibroblasts Mehmet. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 13, n. 4, p. 241-246, 2019.
- AHMED, G. M. et al. Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 1–15, 25 fev. 2020.
- AHSAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 97–109, abr. 2018.
- ANDRADE, A.S. Biocompatibilidade e bioatividade de cimentos à base de silicato tricálcio: estudo in vitro e in vivo. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, 2016.
- ARANDI N.Z.; RABI T. TheraCal LC: From Biochemical and Bioactive Properties to Clinical Applications. **Int J Dent**, 2018:3484653.
- ARAÚJO, L. B. 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. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, n. 0, 1 fev. 2018.
- ATHANASIADOU, E. et al. Biological interactions of a calcium silicate based cement (Biodentine™) with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. **Dental Materials**, v. 34, n. 12, p. 1797–1813, dez. 2018.
- BAKHTIAR H. et al. Human Pulp Responses to Partial Pulpotomy Treatment with TheraCal as Compared with Biodentine and ProRoot MTA: A Clinical Trial. **J Endod**, v. 43, p. 1786-1791, 2017.
- BALATA, G. F. et al. Formulation of Saudi Propolis into Biodegradable Chitosan Chips for Vital Pulpotomy. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 1, 4 jan. 2018.
- BENETTI, F. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. e042, 2019.
- BIN C.V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.38, p. 495-500, 2012.
- BORTOLUZZI E. A. et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. **Dent Mater**, v. 31, p. 1510-1522, 2015.
- BOSSÙ, M. et al. Different Pulp Dressing Materials for the Pulpotomy of Primary Teeth: A Systematic Review of the Literature. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 838, 19 mar. 2020.

CAMARGO, SEA. Análise de propriedades biológicas de Materiais de interesse na odontologia. 2016. 97 p. Tese (Livre-Docente) - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2016.

CAMILLERI J, LAURENT P, ABOUT I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. **J Endod**, v. 40, p. 1846–54, 2014.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.

CINTRA, L. T. A. et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 5, p. 774–778, maio 2017.

COLLADO-GONZÁLEZ, M. et al. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. e19–e30, dez. 2017.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, abr. 2013.

CUADROS-FERNÁNDEZ, C. et al. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 7, p. 1639–1645, set. 2016.

DAHAKI, P. T. et al. Response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) to three bioinductive materials - An in vitro experimental study. **The Saudi Dental Journal**, v. 32, n. 1, p. 43–51, jan. 2020.

DUARTE, M. A. H. et al. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. suppl 1, 18 out. 2018.

EL MELIGY, O. A. E. S. et al. Biodentine™ versus formocresol pulpotomy technique in primary molars: a 12-month randomized controlled clinical trial. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 3, dez. 2019.

ESTELLITA, R.S. Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio. 2017. 39 p. Dissertação (Mestre em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

GANDOLFI M.G. et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. **Clin Oral Invest**, v. 19, p. 2075–89, 2015.

GEMINI-PIPERNI, S. et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: A closer look at cell–biomaterial interface. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 88–98, nov. 2014.

GHILOTTI J.; SANZ J.L.; LÓPEZ-GARCÍA S. et al. Comparative Surface Morphology, Chemical Composition, and Cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. **Materials**, v. 3, p. 2189, 2020.

GIRAUD, T. et al. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. **Dental Materials**, v. 35, n. 1, p. 24–35, jan. 2019.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Qualitative assessment of published studies on pulpotomy medicaments for primary molar teeth. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 10, n. 2, p. e12389, maio 2019.

GRONTHOS S.; MANKANI M.; BRAHIM J.; ROBEY P.G.; SHI S. POSTNATAL. Human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 13625–30, 2000.

HASWEH N. et al. Characterization of the biological effect of Biodentine™ on primary dental pulp stem cells. **Indian J Dent Res**, v. 29, n.6, p. 787-793, Nov-Dec2018.

HEBLING J.; LESSA F.C.R.; NOGUEIRA I.; DE CARVALHO R.M.; DE COSTA C.A.S. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. **Am J Dent**, v. 22, p.137–142, 2009.

HUGAR, S. M. et al. Comparative Evaluation of Clinical and Radiographic Success of Formocresol, Propolis, Turmeric Gel, and Calcium Hydroxide on Pulpotomized Primary Molars: A Preliminary Study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 18–23, 2017.

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

JEANNEAU C.; LAURENT P.; ROMBOUTS C.; GIRAUD T.; ABOUT I. Toxicity of light-cured tricalcium silicate to dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 43, p. 2074–2080, 2017.

JITARU, S. et al. THE USE OF BIOCERAMICS IN ENDODONTICS - LITERATURE REVIEW. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 89, n. 4, p. 470–473, 28 out. 2016.

KALRA, M. et al. Comparative Evaluation of Fresh Aloe barbadensis Plant Extract and Mineral Trioxide Aggregate as Pulpotomy Agents in Primary Molars: A 12-month Follow-up Study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 106–111, 2017.

KALYAN, K. S. D. R. et al. Preclinical Evaluation and Clinical Trial of Chlorhexidine Polymer Scaffold for Vital Pulp Therapy. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 43, n. 2, p. 109–115, jan. 2019.

KLOSTER A.P.; LOURENÇO NETO N.; COSTA S.A. DA; OLIVEIRA T.M.; OLIVEIRA R.C. DE; MACHADO M.A.A.M. In Vitro Antimicrobial effect of bioadhesive oral membrane with chlorhexidine gel. **Br Dent J**, v. 29, p. 354–8, 2018.

KÜDEN, C.; KARAKAŞ, S. N.; BATMAZ, S. G. Comparative chemical properties, bioactivity, and cytotoxicity of resin-modified calcium silicate-based pulp capping materials on human dental pulp stem cells. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, n. 11, p. 6839–6853, 15 set. 2022.

KUNERT, M. et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3238, 15 out. 2022.

LEE H.; SHIN Y.; KIM S.-O.; LEE H.-S.; CHOI H.-J.; SONG J.S. Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. **Journal of Endodontics**, v. 41, p.1317–1324, 2015.

LEMISCHKA I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1044, p. 132–8, 2005.

LOURENÇO NETO, N.; VITOR, L.L.R.; DA COSTA S.A.; DA COSTA S.M.; CRUVINEL T, OLIVEIRA T.M, et al. Physicochemical and biological properties of a biostimulating membrane (BBio) for pulp capping. **Materials Letters**, v. 38, p. 131186, 2022.

MACHADO M.A.A.M.; STAFUZZA T.C.; VITOR L.L.R.; DA COSTA S.A.; DA COSTA S.M.; NETO N.L. 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**, v. 21, p. 874, 2020.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, Pr: **Embrapa**, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/>

MANASPON C. al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. **BMC Oral Health**, v. 21, p. 209, 2021.

MANOJLOVIC D.; DRAMIĆANIN M.D.; 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. **Dental Materials**, v. 33, p. 454-466, 2017.

MARQUES N.C.T. Influência de diferentes densidades de energia do laser de baixa intensidade em fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos. 2016.(Tese Doutorado) – Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016.

MOROTOMI T.; WASHIO A.; KITAMURA C. Current and future options for dental pulp therapy. **Japanese Dental Science Review**, v. 55, p. 5–11, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 723–739, jul. 2012.

NAM O.H.; KIM J-H.; CHOI S.C.; KIM Y. Time-Dependent Response of Human Deciduous Tooth-Derived Dental Pulp Cells Treated with TheraCal LC: Functional Analysis of Gene Interactions Compared to MTA. **J Clin Med**, v. 9, p. 531, 2020.



NOWICKA A.; LIPSKI M.; PARAFINIUK M.; SPORNIAC-TUTAK K.; LICHOTA D.; KOSIERKIEWICZ A. et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 743-747, 2013.

OLIVEIRA, P. Y. DE et al. The response of Mesenchymal Stem Cells to endodontic materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 33, n. 2, p. 33–43, abr. 2022.

PARISAY, I. et al. Cytotoxicity and induced apoptosis of a new bioceramic cement containing simvastatin on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Dental Research Journal**, v. 19, p. 79, 2022.

PAULA A.; LARANJO M.; MARTO CM.; ABRANTES A.M; CASALTA-LOPES J.; GONÇALVES A.C. et al. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot®MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. **Materials**, v. 12, p. 1184, 2019.

PAULA A.B; LARANJO M.; COELHO A.S; ABRANTES A.M; GONÇALVES A.C; SARMENTO-RIBEIRO A.B. et al. Accessing the Cytotoxicity and Cell Response to Biomaterials. **JoVE**, v. 2021, p. 61512, 2021.

PEDANO, M.S; LI, X; YOSHIHARA K.; LANDUYT, K.V, 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**, v. 13, n. 12, p. 2670, 2020.

POGGIO C.; BELTRAMI R.; COLOMBO M.; CECI M.; DAGNA A.; CHIESA M. In vitro antibacterial activity of diferente pulp capping materials. **J Clin Exp Dent**, v. 7, p. 584–588, 2015.

PRATI, C.; GANDOLFI, M. G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dental Materials**, v. 31, n. 4, p. 351–370, abr. 2015.

RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 8, p. 5009–5024, ago. 2021.

SAGHIRI, M. A. et al. Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents. **Dental Materials Journal**, v. 36, n. 1, p. 8–18, 2017.

SAKAI, V. T. et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 791–796, ago. 2010.

SANZ, J. L. 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. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 12, p. 3872, 28 nov. 2020.

SANZ, J. L. 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. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 12, p. 1896–1906, 1 dez. 2021.

SEQUEIRA D.B; SEABRA C.M.; PALMA P.J.; CARDOSO A.L.; PEÇA J.; SANTOS J.M. Effects of a new bioceramic material on human apical papilla cells. **J Funct Biomater**, v. 9, p. 74, 2018.

SILVA, M. DOS S. 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**, v. 71, p. 498–503, fev. 2017.

SKOSKIEWICZ-MALINOWSKA K.; KACZMAREK U.; MALICKA B.; WALCZAK K.; ZIETEK M. Application of Chitosan and Propolis in Endodontic Treatment: A Review. **MRMC**, v. 17, p. 410–434, 2017.

SOARES D.G.; ROSSETO H.L.; SCHEFFEL D.S.; BASSO F.G.; HUCK C.; HEBLING J. et al. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. **Clin Oral Invest**, v. 21, p. 2827–2839, 2017.

STRINGHINI JUNIOR, E. et al. MTA and biodentine for primary teeth pulpotomy: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 4, p. 1967–1976, abr. 2019.

TALABANI, R. M.; GARIB, B. T.; MASAELI, R. Bioactivity and Physicochemical Properties of Three Calcium Silicate-Based Cements: An In Vitro Study. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–10, 27 maio 2020.

TATULLO, M. et al. Stem Cells-based and Molecular-based Approaches in Regenerative Dentistry: A Topical Review. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 7, p. 607–616, 23 set. 2019.

TOMÁS-CATALÁ, C. J. et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, v. 50 Suppl 2, p. e63–e72, dez. 2017.

TOMÁS-CATALÁ, C. J. et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 1, p. 126–132, jan. 2018.

WIECKIEWICZ, M. et al. Clinical Application of Chitosan in Dental Specialities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 401–409, 2 fev. 2017.

YOUSSEF, A.R. et al. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Endogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. **BMC oral health**, v. 19, n. 1, p. 133, 2 jul. 2019.

ZAEN EL-DIN A.M; HAMAMA H.H.; ABO EL-ELAA M.A.; GRAWISH ME, MAHMOUD S.H.; NEELAKANTAN P. The effect of four materials on direct pulp capping: An animal study. **Aust Endod J**, v. 46, p. 249–256, 2020.

ZAFAR, K.; JAMAL, S.; GHAFUOR, R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. **Journal of the Pakistan Medical Association**, n. 0, p. 1, 2020.

ZHANG, N. et al. Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 95–102, jul. 2016.

# **ANEXOS**

---

## ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEP

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS CIMENTOS DE SILICATO DE CÁLCIO EM CÉLULAS TRONCOS DE DENTES DECÍDUOS

**Pesquisador:** BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 29177820.9.0000.5417

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Bauru

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.407.983

**Apresentação do Projeto:**

Os autores solicitam alterações no projeto original. Alteração de título do projeto de pesquisa em questão para "Análise comparativa dos efeitos biológicos de materiais biocerâmicos em células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED)". Ressalto também que houve alteração nos grupos experimentais inicialmente delineados na metodologia, sendo acrescentados dois grupos (Grupo 4 - TheraCal LC e Grupo 5 - Biodentine) e mais um experimento de viabilidade celular (Alamar Blue). Modificações essas foram motivadas após as considerações da banca no exame de qualificação, tornando assim a pesquisa mais completa e relevante cientificamente.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o efeito biológico de cimentos de silicato de cálcio em células troncos de dentes decíduos esfoliados

**Avaliação dos Riscos e 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

**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: 5.407.983

pertinentes da Faculdade de Odontologia de Bauru caso haja outras necessidades.

Quanto aos riscos O atendimento clínico poderá provocar certo desconforto perfeitamente suportável, principalmente porque ele será realizado por um profissional experiente usando técnicas cirúrgicas e de controle da dor. A remoção (extração) do dente pode apresentar como riscos intercorrências operatórias como sangramento, mordedura de lábio e desconforto ou dor no pós-operatório, porém não provocará malefício.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica

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

Toda documentação entregue de forma correta

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

Recomendo a aprovação do projeto por esse CEP

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A emenda apresentada pelo(a) pesquisador(a) foi considerada APROVADA na reunião ordinária do CEP de 04/05/2022, 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 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
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1638414_E1.pdf	30/03/2022 19:18:37		Aceito
Outros	Questionario_Tecnico_Pesquisador.doc	30/03/2022 19:12:51	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_cessao_dentes.docx	30/03/2022 19:09:36	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	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: 5.407.983

Outros	termo_de_aquiescencia.doc	30/03/2022 19:09:09	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Compromisso_Pesquisador.doc	30/03/2022 19:08:44	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento_Menor.docx	30/03/2022 19:08:26	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor.doc	30/03/2022 19:08:02	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Maior.doc	30/03/2022 18:57:34	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.docx	30/03/2022 18:53:27	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
Outros	Emenda.pdf	30/03/2022 18:49:57	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	30/03/2022 18:46:31	BARBARA LUISA SILVA OLIVEIRA	Aceito
Declaração de concordância	DeclaracaoConcordancia_PatriciaCamarago.pdf	15/10/2021 11:53:37	Juliana Fraga Soares Bombonatti	Aceito
Outros	Relatorio_atividades_desenvolvidas.pdf	18/01/2021 14:58:36	Patrícia B Camargo	Aceito
Outros	Projeto_de_pesquisa_Barbara.docx	18/01/2021 14:58:36	Patrícia B Camargo	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Solicitacao_alteracao_pesquisador_responsavel.pdf	18/01/2021 14:58:36	Patrícia B Camargo	Aceito
Parecer Anterior	cartaresposta_parecer.pdf	18/03/2020 16:27:38	Patrícia B Camargo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido.pdf	18/03/2020 16:14:30	Patrícia B Camargo	Aceito
Outros	checklist.pdf	13/02/2020 22:25:28	Patrícia B Camargo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**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: 5.407.983

BAURU, 13 de Maio 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