

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINE AMARO DA SILVA

**Efeito de materiais bioativos em células-tronco da polpa dentária cultivadas sobre
estímulo pró-inflamatório.**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2024

CAROLINE AMARO DA SILVA

Efeito de materiais bioativos em células-tronco da polpa dentária cultivadas sobre estímulo pró-inflamatório.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Cirurgiã-Dentista.

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leandro e Elisete, todo meu orgulho e admiração. Obrigada por serem meu maior exemplo de força e resistência. Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Só um “processo” nos leva de um lugar para outro. De um nível para outro. À novas descobertas e frustrações. Euforia e ansiedade. Coragem. Vontade de ir, mas também, vontade de ficar. O processo mexe, remexe, aperta, dói, constrói. Deus, obrigada por orquestrar tantas conquistas certas e as dificuldades necessárias, compondo a sinfonia da minha jornada!

O “processo” te mostra quem realmente você é! Te escancara os medos que você nunca assumiu e as fragilidades que você sempre fugiu. Obrigada meu vizinho Gabriel por sempre ser abrigo e em cada caféquinho deixar seu cuidado e força para encarar quem sou e ser forte para continuar. Minha vizinha Fátima, obrigada por me guiar, você sempre será minha maior saudade!

E como é desafiador estar de cara com você! Olhar para dentro de si e ver que nem tudo era, ou é, tão em ordem quanto você imagina. Obrigada tia Daniela por sempre estar na torcida e ser a tia cheia de orgulho da sobrinha que carrega seu jeito expansivo de viver e de encarar com coragem cada novo desafio.

O “processo” te tira da zona de conforto para seu crescimento e você sabe que vale a pena cada esforço. Zéééé, meu primo, obrigada por estar nessa caminhada comigo. Sua resiliência me inspira!

Que bom que nesse “processo” existem boas surpresas, pois assim podemos nos reinventar e não desistirmos de ser uma pessoa melhor a cada dia. Wesley, meu chuzim, obrigada por me apresentar o amor leve. Você me ensina diariamente a me redescobrir e a ser muito mais inteira!

Todos nós temos nosso próprio “processo” e nessa caminhada sempre temos a chance de evoluir e amadurecer. Luanna, minha duplinha da vida, obrigada por ser resistência, riso fácil e a amiga verdadeira que nunca tive. Com toda certeza, você marcou minha história.

O “processo” é sinônimo de aprendizados e desafios. E diante de tantos aprendizados, não poderia deixar de agradecer ao meu orientador, professor Francisco. Obrigada por todo apoio e tantos ensinamentos. O senhor é parte fundamental dessa conquista!

Assim, me permito ser moldada, curada e transformada pelo meu processo. Agradeço a todos os encontros e despedidas. Afinal, depois de qualquer “processo” vivido e vencido chegaremos a um novo lugar, a um novo você!

RESUMO

SILVA, C. A. **Efeito de materiais bioativos em células-tronco da polpa dentária cultivadas sobre estímulo pró-inflamatório.** 2024. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

A neoformação dentinária é um processo coordenado primariamente pelos odontoblastos. Por meio da alteração do micro-ambiente, seja pelos estímulos inflamatórios ou pela ação de materiais bioativos, as células mesenquimais indiferenciadas são capazes de se diferenciar. Todavia os mecanismos epigenéticos envolvidos nos processos de migração, proliferação e diferenciação celular não foram completamente elucidados até o momento. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar mecanismos envolvidos na diferenciação de células-tronco da polpa dentária de camundongos (OD-21) na biomineralização sob o estímulo inflamatório e em contato com materiais bioativos, por meio de métodos que avaliam: i) viabilidade celular, ii) proliferação e migração celular, iii) atividade enzimática de acetiltransferases, e iv) formação de nódulos de mineralização como indicadores de biomineralização. Para simulação de um ambiente pró-inflamatório, as células foram estimuladas com 10 ng/ml de TNF- α recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, MN), durante 7 dias e, a seguir, foram estimuladas com materiais bioativos – BiodentineTM (Bio), MTA Branco, Hidróxido de cálcio p.a. (CA(OH)₂, KetacTM Molar, Beautifil Bulk Restorative (RES) e FiltekTM One Bulk Fill (FILL) – para verificar a citotoxicidade e capacidade de estimular a produção de tecido mineralizado. Os resultados foram analisados pelo Software GraphPad Prism 8.0 (Prism, Chicago, IL, EUA), por meio do teste de análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste de Tukey. O teste de viabilidade celular foi feito com diluições seriadas a partir do extrato inicial dos materiais. Na concentração 1:10 houve diferença entre os estímulos: i) Bio x MTA + TNF, $p=0,0051$; ii) Bio x Ketac + TNF, $p=0,0195$; iii) MTA x MTA + TNF, $p=0,0402$. Na concentração 1:100: i) Bio x RES, $p=0,0416$; ii) Bio x MTA+TNF, $p=0,0038$; iii) Bio x Ketac + TNF, $p=0,0092$; iv) MTA + TNF x FILL + TNF, $p=0,031$. Em ambas as concentrações não houve diferença entre os estímulos e o grupo controle. Para análise da proliferação celular utilizou-se diluição 1:100. Nos grupos sem estímulo de TNF- α houve diferença entre os grupos: i) 12h x 36h, $p=0,0005$; ii) 24h x 36h, $p<0,0001$; iii) 36h x 48h, $p=0,0032$. Nos grupos com estímulo de TNF- α , não foi observada diferença estatística ao se comparar os períodos propostos. Para mensurar a atividade de

histona acetiltransferase foram utilizadas as duas diluições seriadas. Nos grupos sem estímulo de TNF- α , foram observadas diferenças entre: RES x controle, $p=0,022$. Nos grupos com estímulo de TNF- α , foram observadas diferenças entre: i) controle e Ketac + TNF, $p=0,022$; ii) controle e Res + TNF, $p=0,022$; iii) controle e Fill + TNF, $p=0,022$. As células indiferenciadas da polpa dentária de camundongos (OD-21), apresentaram significativa formação de nódulos de mineralização em meio osteogênico, após estímulo com 10ng/mL de TNF- α por 21 dias se comparado com o grupo que não recebeu estímulo com TNF- α . Dessa forma, conclui-se que o estímulo de TNF- α a 10 ng/mL não alterou a viabilidade celular, a proliferação, a acetilação de histonas e a mineralização. Ademais, o uso de biomateriais promoveu viabilidade celular, proliferação celular, acetilação de histonas e formação de nódulos de mineralização.

Palavras-chave: Células-tronco; Polpa dentária; Diferenciação Celular; Biomineralização; Materiais Bioativos.

ABSTRACT

SILVA, C. A. **Effect of bioactive materials applied to dental pulp stem cell cultivated under pro-inflammatory stimulus**. 2024 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Dentin neoformation is a process coordinated primarily by odontoblasts. By altering the microenvironment, either by inflammatory stimuli or by the action of bioactive materials, undifferentiated mesenchymal cells are able to differentiate. However, the epigenetic mechanisms involved in the processes of cell migration, proliferation and differentiation have not been fully elucidated so far. Thus, the aim of this study was to investigate mechanisms involved in the differentiation of stem cells from the dental pulp of mice (OD-21) in biomineralization under inflammatory stimulus and in contact with bioactive materials, through methods that evaluate: i) cell viability, ii) cell proliferation and migration, iii) enzymatic activity of acetyltransferases, and iv) formation of mineralization nodules as indicators of biomineralization. To simulate a pro-inflammatory environment, the cells were stimulated with 10 ng/ml of recombinant human TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 7 days and then stimulated with bioactive materials – BiodentineTM (Bio), MTA White, Calcium Hydroxide p.a. (CA(OH)₂, KetacTM Molar, Beautifil Bulk Restorative (RES) and FiltekTM One Bulk Fill (FILL) – to verify cytotoxicity and ability to stimulate the production of mineralized tissue. The results were analyzed using the GraphPad Prism 8.0 software (Prism, Chicago, IL, USA), using the two-way analysis of variance test (ANOVA), followed by the Tukey test. The cell viability test was performed with serial dilutions from the initial extract of the materials. At the 1:10 concentration, there was a difference between the stimuli: i) Bio x MTA + TNF, $p=0.0051$; ii) Bio x Ketac + TNF, $p=0.0195$; iii) MTA x MTA + TNF, $p=0.0402$. At a concentration of 1:100: i) Bio x RES, $p=0.0416$; ii) Bio x MTA+TNF, $p=0.0038$; iii) Bio x Ketac + TNF, $p=0.0092$; iv) MTA + TNF x FILL + TNF, $p=0.031$. In both concentrations, there was no difference between the stimuli and the control group. Dilution of 1:100 was used to analyze cell proliferation. In the groups without TNF- α stimulus, there was a difference between the groups: i) 12h x 36h, $p=0.0005$; ii) 24h x 36h, $p<0.0001$; iii) 36h x 48h, $p=0.0032$. In the groups with TNF- α stimulus, no statistical difference was observed when comparing the proposed periods. To measure histone acetyltransferase activity, two serial dilutions were used. In the groups without TNF- α stimulus, differences were observed between: RES vs. control, $p=0.022$. In the TNF- α

stimulated groups, differences were observed between: i) control and Ketac + TNF, $p=0.022$; ii) control and Res + TNF, $p=0.022$; iii) control and Fill + TNF, $p=0.022$. The undifferentiated cells of the dental pulp of mice (OD-21) showed significant formation of mineralization nodules in osteogenic medium after stimulation with 10ng/mL of TNF- α for 21 days compared to the group that did not receive stimulation with TNF- α . Thus, it was concluded that TNF stimulation at 10ng/ml did not alter cell viability, proliferation, histone acetylation and mineralization. In addition, the use of biomaterials promoted cell viability, cell proliferation, histone acetylation and formation of mineralization nodules.

Keywords: Stem cells; Dental pulp; Cell Differentiation; Biomineralization; Bioactive Materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – representação gráfica da quantificação do percentual de viabilidade celular obtidos a partir de três medidas em cada um dos estímulos.....	23
Figura 2 – representação gráfica da quantificação do percentual de proliferação celular obtidos a partir de duas medidas em cada um dos estímulos	25
Figura 3 – representação gráfica da quantificação do percentual de acetilação de histona.....	27
Figura 4 – formação de nódulos de mineralização de células da polpa dentária de camundongos (od-21), após 21 dias de estímulo com 10ng/ml de tnf- α	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais.....	18
Tabela 2 – Materiais bioativos, composição e fabricante.....	19
Tabela 3 – Comparação entre os estímulos no ensaio de viabilidade celular na concentração 1:10 e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.	21
Tabela 4 – Comparação entre os estímulos no ensaio de viabilidade celular na concentração 1:100 e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.	22
Tabela 5 – Médias e desvio-padrão do percentual de viabilidade celular obtidos a partir de três medidas em cada um dos estímulos. A, na concentração 1:10 e B, na concentração 1:100	22
Tabela 6 – Comparação entre os estímulos sem e com TNF - α no ensaio de proliferação celular na concentração 1:100 e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.....	24
Tabela 7 – Médias e desvios-padrão do percentual de proliferação celular obtidos a partir de duas medidas em cada um dos estímulos. A, na concentração sem TNF- α e B, com TNF- α	24
Tabela 8 – Comparação entre os estímulos sem e com TNF - α nos ensaios HAT e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.....	26
Tabela 9 – Médias e desvio-padrão do percentual de acetilação de histona.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	14
2. PROPOSIÇÃO	17
2.1 OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	18
3.1. CULTURA DE CÉLULAS	18
3.2. ESTIMULO PRÓ-INFLAMATÓRIO	18
3.3. PREPARO DOS MATERIAIS BIOATIVOS E TESTE POR EXTRAÇÃO.....	19
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.5. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	20
3.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	23
3.7. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE HISTONA ACETILTRANSFERASES (HAT)	25
3.8. FORMAÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO	27
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE	42

1. INTRODUÇÃO

A resposta imuno-inflamatória do tecido pulpar é coordenada primariamente pelos odontoblastos, que detectam a agressão e iniciam a deposição de dentina reacional¹⁻². Em quadros pulpares inflamatórios mais intensos (necrose e/ou apoptose dos odontoblastos), a neoformação dentinária (dentina reparadora) passa a ser realizada por células-tronco presentes no interior da polpa dental, que sofrem diferenciação em células semelhantes a odontoblastos²⁻⁴. As células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco) da polpa dentária apresentam capacidade de autorrenovação, diferenciação, multilinhagem e produção de estruturas mineralizadas, além de propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias⁵⁻⁷.

As células-tronco da polpa dentária foram descritas pela primeira vez por Gronthos e colaboradores, em 2000, que isolaram as células da polpa de terceiro molar humano e compararam com as células-tronco da medula óssea⁸. Essas células apresentaram heterogeneidade, multipotencialidade, capacidade de proliferação e de formação de colônias *in vitro*⁵. Em seguida, também foi descoberta uma rica fonte de células-tronco mesenquimais na polpa de dente decíduo humano^{7,9-11}.

As células-tronco da polpa de dentes permanentes ou DPSCs representam menos que 1% da população de células presentes na polpa dentária, mas são capazes de produzir tecido morfológico com características funcionais análogos aos da polpa dentária¹². Requerem um meio indutor e um arcabouço para induzir a formação de osso, cemento e dentina *in vivo*¹³.

As DPSCs foram transplantadas no líquido cefalorraquidiano de ratos que foram induzidas lesões corticais e em análise posterior, essas células expressaram marcadores específicos de neurônios lesionados¹⁴. Também são capazes, *in vitro* e em transplantes *in vivo*, de formar dentina ectópica, impressionando pela sua habilidade de gerar um complexo dentinopulpar, composto por matriz mineralizada, túbulos dentinários alinhados e preenchidos por prolongamentos de odontoblastos – arranjo similar ao encontrado nas estruturas dentárias humanas naturais¹⁵⁻¹⁶.

Durante o processo de diferenciação, a célula-tronco suprarregula ou inibe a expressão de genes específicos de cada linhagem celular. Nesse micro-ambiente participam as modificações epigenéticas, como a compactação ou não da cromatina pela ação de histonas. Para o silenciamento gênico, a ação de histonas desacetilases (HDAC) é crucial, uma vez que são enzimas capazes de remover grupos acetil ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$) do aminoácido lisina em uma histona, permitindo assim o enovelamento do DNA. As histonas acetiltransferases (HAT) são enzimas também envolvidas nesse processo, responsáveis pela acetilação de resíduos

conservados de lisina, por meio da transferência de um grupo acetil da Coenzima A, formando-se ϵ -N-acetil-lisina. Dessa forma, a acetilação das histonas pode resultar tanto na ativação da transcrição como no silenciamento de genes¹⁷. A natureza dinâmica das proteínas associadas à cromatina facilita para que fatores regulatórios tenham acesso a sequências regulatórias e rapidamente ativem programas complexos de expressão gênica específicos de cada linhagem celular¹⁸⁻¹⁹. A epigenética, definida como o estudo de mudanças na função gênica que são herdáveis durante a mitose ou a meiose e que não ocasionam mudança na sequência do DNA²⁰⁻²¹, apresenta uma função-chave nos processos de autorrenovação, manutenção de pluri/ multipotência e especificação de linhagem²²⁻²⁴.

Na clínica odontológica, a síntese de dentina reparadora pode ser obtida por meio dos materiais odontológicos denominados “Bioativos”²⁵. Materiais bioativos são aqueles que apresentam efeito ou atividade biológica, quando colocados em contato com os tecidos. No processo de remineralização da lesão de cárie, representariam aqueles materiais com potencial para incorporar minerais intencional e especificamente ao substrato dentário²⁶. Tradicionalmente, materiais para proteção do complexo dentino-pulpar foram propostos para proteger a polpa dos potenciais efeitos tóxicos dos materiais restauradores. Atualmente, estes materiais são indicados também devido aos efeitos terapêuticos e à capacidade de promover um selamento dos túbulos dentinários, evitando uma possível infiltração de micro-organismos e de seus subprodutos na interface dente e material restaurador²⁷.

Idealmente, um material indicado para proteção pulpar deve apresentar as seguintes propriedades: estimular a formação de dentina reparadora, manter a vitalidade pulpar, ser bactericida ou bacteriostático, aderir à dentina e a outros materiais restauradores, resistir às forças mastigatórias, liberar fluoretos, ser estéril, apresentar radiopacidade e promover selamento marginal hermético. São materiais utilizados para proteção do complexo dentino-pulpar o hidróxido de cálcio, o agregado de trióxido mineral, o cimento de silicato de cálcio, os cimentos de ionômero de vidro e os materiais que utilizam a tecnologia Giomer²⁸⁻³².

1.1 Revisão da literatura

A polpa dentária é um tecido conjuntivo especializado, ricamente vascularizado e innervado, de origem ectomesenquimal. Esse tecido está contido no espaço central de um dente, exercendo funções sensoriais, protetoras, indutoras, formativas e nutritivas³³. A polpa dentária possui capacidade de produzir matriz dentinária em condições fisiológicas e patológicas e, portanto, representa um tecido com potencial reparador amplo em Odontologia³⁴⁻³⁶.

A neoformação dentinária é principalmente coordenada odontoblastos, que são células encarregadas de depositar material mineralizado. Essas células desempenham papel sensorial no interior da polpa dentária, identificando estímulos prejudiciais e sinalizando a ativação da resposta imune de forma localizada³⁷⁻³⁹. Em casos de inflamação severa na polpa dentária, a capacidade dos odontoblastos em criar dentina reacional pode ser interrompida, dessa forma, células-tronco passam a assumir o papel de formação de um novo tecido dentinário. Essas células migram de regiões internas da polpa dental para as áreas afetadas³⁸⁻³⁹. A influência do ambiente local altera o comportamento e a habilidade de diferenciação dessas células-tronco. Quando os odontoblastos sofrem necrose ou apoptose, as células mesenquimais indiferenciadas podem se diferenciar em células similares aos odontoblastos. Essas células recém-diferenciadas passam então a produzir, como resposta a tal mudança, uma matriz de dentina, resultando na formação de dentina reparadora^{4,40-41}.

Um aspecto interessante e peculiar às células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco) da polpa dentária e da região periapical é a sua plasticidade, uma vez que apresentam capacidade de autorrenovação, diferenciação, multilinhagem e produção de estruturas mineralizadas, além de propriedades antiinflamatórias e imunorregulatórias^{6,42-44}. Dessa forma, o tecido pulpar se revela um ambiente com ampla capacidade de reparo, especialmente por apresentar células progenitoras e síntese de moléculas sinalizadoras pró-reparo tecidual, mesmo em sítios inflamados^{8,40}.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma proteína pró-inflamatória gerada por diversas categorias de células, incluindo macrófagos, monócitos, células T, osteoclastos, neutrófilos e fibroblastos⁴⁵⁻⁴⁶. Ele desempenha efeitos notáveis no processo inflamatório incluindo a ativação e migração de linfócitos, bem como o estímulo, diferenciação e morte celular^{41,47-48}. As funções biológicas do TNF- α são diversas, abrangendo desde a defesa contra certos tipos de infecções até atividades terapêuticas no organismo, tais como o estímulo ao sistema imunológico, proteção contra agentes infecciosos, inibição de tumores, regulação do ciclo de sono e contribuição para o desenvolvimento embrionário⁴⁹⁻⁵³. O mecanismo de ação do TNF- α é complexo, pois envolve a ativação de múltiplas vias de sinalização^{45,54}.

Em estudos que empregaram células tronco da polpa dentária (DPSCs), ocorreu a demonstração de que em condições patológicas, pela ação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α), essas células se diferenciam e iniciam a secreção de proteínas da matriz dentinária, como a sialoproteína óssea (Ibsp), sialofosfoproteína dentinária (Dspp) e osteocalcina (Ocn)⁵⁵⁻⁵⁷. Além disso, foi demonstrado um aumento da expressão do TNF- α em lesões periapicais,

demonstrando o seu papel na remodelação, reabsorção e desenvolvimento ósseo, auxiliando a migração e proliferação de células precursoras de osteoclastos⁵⁸.

Materiais bioativos são usados em casos de exposição pulpar – proteção pulpar direta – visando promover uma proteção contra contaminação ou lesões periapicais e também estimular o reparo tecidual⁵⁹. Estes possuem biocompatibilidade, ação antimicrobiana, atividade indutora de mineralização e excelente selamento nas margens⁶⁰⁻⁶². As finalidades da proteção pulpar direta são estimular as células da polpa a formação de tecido mineralizado, promover selamento biológico da área de exposição pulpar e evitar a contaminação por micro-organismos da cavidade bucal⁶³.

Alguns estudos relatam que em dentes cariados ou com defeitos minerais a expressão de TNF- α é aumentada e está associado aos sinais e sintomas clínicos, tudo isso porque em dentes com cáries profundas o tecido dentário irá receber uma grande quantidade de TNF- α , ao qual ativará canais como TRP (TRPA1, TRPV2 e TRPV4) no tecido pulpar e estão envolvidos no processo de manutenção da inflamação e dor⁶⁴⁻⁶⁵. A investigação do efeito desses materiais sobre células-tronco da polpa dentária cultivadas em um ambiente inflamatório pode contribuir para o entendimento de como o reparo com síntese de dentina reparadora ocorre após o uso clínico dos materiais bioativos.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos

O objetivo deste projeto é investigar mecanismos envolvidos na diferenciação de células-tronco da polpa dentária e biomineralização sob estímulo inflamatório e em contato com materiais bioativos, por meio de metodologias que visam a avaliação da (i) viabilidade celular, (ii) proliferação e migração celular, (iii) atividade enzimática de acetiltransferases e (iv) (v) formação de nódulos de mineralização como indicadores de biomineralização.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1. Cultura de células

Para este estudo, foram utilizadas células indiferenciadas da polpa dentária de camundongos (OD-21). O protocolo de trabalho com este tipo celular já foi descrito previamente por nosso grupo de pesquisa^{56,66-68}. As células estavam congeladas em vial acondicionado em nitrogênio líquido (criopreservação) e foram conservadas em solução de congelamento composta por 90% de Soro Fetal Bovino (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, EUA) até início da cultura. Para os experimentos, as células foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células / poço. As células foram mantidas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos overnight, em incubadora à temperatura de 37 °C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

3.2. Estimulo pró-inflamatório

Para os experimentos, as células foram cultivadas em placas de cultura celular de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células / poço. Foram criados cinco grupos experimentais (Tabela 1). Foi utilizado o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) em overnight, na incubadora à temperatura de 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂. Para experimentação as células foram estimuladas com 10 ng / ml de TNF- α recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, MN), dissolvido em DMEM contendo 5% de SFB para simulação de um ambiente pró-inflamatório⁵⁶, durante 7 dias e, a seguir, foram estimuladas com os materiais bioativos.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais.

Grupo	Célula	Estímulos (TNF- α e biomaterias)
1	OD-21	Apenas biomaterias
2	OD-21	TNF- α + biomaterias
3	OD-21	Meio DMEM (controle negativo)
4	OD-21	TNF- α (controle positivo)

Fonte: próprio autor, 2023.

3.3. Preparo dos materiais bioativos e teste por extração

Diferentes concentrações dos materiais bioativos foram utilizados no intuito de verificar a citotoxicidade e capacidade de estimular a produção de tecido biomineralizado. O presente estudo foi realizado em conformidade com as normas da International Organization for Standardization (ISO)⁶⁹ n° 10993-5:2009. Para colocação dos materiais testados (Tabela 2) em contato com as células, foi realizado o método de extração.

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

Os cilindros foram mantidos no fluxo sob luz ultravioleta (UV) para obtenção da presa inicial e eliminação de possíveis contaminações, durante 1 hora. Em seguida, os mesmos foram colocados separadamente em tubos Falcon contendo 5 mL de meio DMEM, os quais foram mantidos em refrigeração durante 72 horas antes do experimento.

O extrato foi filtrado, os cilindros dos materiais descartados e, a partir do extrato inicial dos materiais (1:1), foram obtidas diluições seriadas 1:10 e 1:100 para realização dos experimentos. As soluções 1:1, 1:10 e 1:100 foram armazenadas sob refrigeração até o uso, como descrito previamente^{24,29,70}.

Tabela 2 – Materiais bioativos, composição e fabricante.

Material	Composição de acordo com o fabricante	Fabricante
Biodentine™	<i>Pó:</i> silicato tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro, óxido de zircônio. <i>Líquido:</i> cloreto de cálcio, polímero hidrossolúvel.	Septodont (Saint Maurdes Fosses, França)
MTA Branco	<i>Pó:</i> SiO ₂ , K ₂ O, Al ₂ O ₃ , Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , CaO, Bi ₂ O ₃ , MgO. Resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio. <i>Líquido:</i> água.	Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Brasil)

Hidróxido de cálcio p.a.	<i>Pó:</i> hidróxido de cálcio pró-análise.	Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda (Ibiporã, Brasil)
3M™ Ketac™ Molar Easy Mix	<i>Pó:</i> ácido poliacrílico e óxidos de vidro químico. <i>Líquido:</i> Água, copolímero de ácido acrílico e ácido maleico, ácido tartárico. <i>Base:</i> monômeros compostos por Bis-GMA, UDMA, Bis-MPEPP, TEGDMA.	3M do Brasil (Sumaré, Brasil)
Beautifil Bulk Restorative	<i>Parte inorgânica:</i> partículas de vidro de alumínio flúor-boro-alumínio-silicato, partículas de ionômero de vidro pré-reagidas (S-PRG). <i>Sistema iniciador:</i> canforoquinona.	Shofu Inc. (Kyoto, Japão)
3M™ Filtek™ One Resina Bulk Fill	<i>Parte inorgânica:</i> partículas de sílica não-aglomeradas/não-agregadas, partículas de zirconia e partículas de trifluoreto de itérbio em partículas.	3M do Brasil (Sumaré, Brasil)

Fonte: próprio autor, 2023.

3.4. Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o Software GraphPad Prism 8.0 (Prism, Chicago, IL, EUA). Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Dados foram expressos como valor médio e desvio padrão.

3.5. Ensaio de viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, as células foram plaqueadas e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ por 12 horas. Após este período, as culturas foram estimuladas com diferentes materiais bioativos para avaliar o potencial mineralizador por 24 horas. A seguir, 10 µL de um sal tetrazólico solúvel em água (MTT; brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio, SigmaAldrich CO., Número de catálogo M2128) suplementado com 150 mL de Roswell Park Memorial 6 Institute (RPMI) 1640 (Gibco) foi adicionado a cada poço e as placas foram protegidas da luz e incubadas a 37 °C, por 3 horas, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade relativa de 95%. Após o

Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 4 – Comparação entre os estímulos no ensaio de viabilidade celular na concentração 1:100 e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.

MTT 1:100	Controle	Bio	MTA	Ca(OH) ₂	Ketac	Res	Fill	Bio + TNF	MTA + TNF	Ca(OH) ₂ + TNF	Ketac + TNF	Res + TNF	Fill + TNF
Controle	-	0,45	>0,999	0,9892	>0,999	0,979	0,998	>0,999	0,5133	>0,999	0,7431	>0,999	0,931
Bio	-	-	0,53	0,9847	0,332	0,042	0,082	0,139	0,0038	0,5133	0,0092	0,3315	0,999
MTA	-	-	-	0,996	>0,999	0,957	0,994	0,999	0,4331	>0,999	0,6633	>0,999	0,963
Ca(OH) ₂	-	-	-	-	0,963	0,418	0,613	0,773	0,0656	0,9951	0,1385	0,9625	>0,999
Ketac	-	-	-	-	-	0,995	0,999	>0,999	0,6468	>0,999	0,8531	>0,999	0,853
Res	-	-	-	-	-	-	>0,999	>0,999	0,9968	0,9625	>0,999	0,9951	0,246
Fill	-	-	-	-	-	-	-	>0,999	0,9716	0,9951	0,998	0,9998	0,403
Bio+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9061	0,9996	0,9847	>0,999	0,563
MTA+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4487	>0,999	0,6468	0,031
Ca(OH) ₂ +TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6797	>0,999	0,957
Ketac+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8531	0,069
Res+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,853
Fill +TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

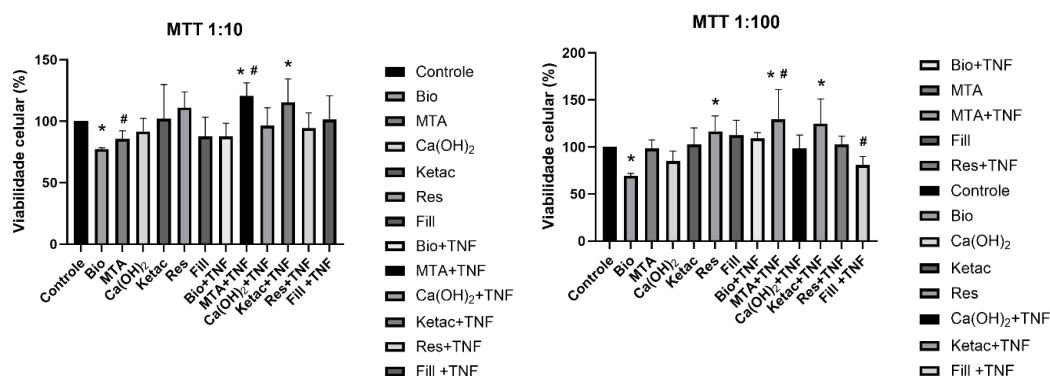
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 5 – Médias e desvio-padrão do percentual de viabilidade celular obtidos a partir de três medidas em cada um dos estímulos. A, na concentração 1:10 e B, na concentração 1:100.

A			B		
1:10			1:100		
Estímulo	Média	Desvio-padrão	Estímulo	Média	Desvio-padrão
Controle	100,00%	0,88%	Controle	100,00%	0,88%
Bio	77,33%	6,79%	Bio	69,43%	2,34%
MTA	85,67%	11,03%	MTA	98,43%	9,65%
Ca(OH) ₂	91,67%	27,87%	Ca(OH) ₂	84,95%	10,52%
Ketac	102,00%	12,92%	Ketac	102,97%	17,73%
Res	111,00%	15,34%	Res	116,26%	16,82%
Fill	87,67%	10,89%	Fill	112,02%	16,08%
Bio+TNF	87,67%	10,35%	Bio+TNF	108,99%	6,54%
MTA+TNF	120,70%	14,39%	MTA+TNF	129,04%	31,60%
Ca(OH) ₂ +TNF	96,33%	19,21%	Ca(OH) ₂ +TNF	98,53%	14,35%
Ketac+TNF	115,30%	12,25%	Ketac+TNF	124,53%	26,41%
Res+TNF	94,33%	19,41%	Res+TNF	102,52%	8,64%
Fill +TNF	101,14%	19,41%	Fill +TNF	80,74%	8,85%

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 1 – Representação gráfica da quantificação do percentual de viabilidade celular obtidos a partir de três medidas em cada um dos estímulos.



A, na concentração 1:10 e B, na concentração 1:100. Nota: símbolos diferentes indicam diferença entre os estímulos marcados.

Fonte: próprio autor, 2023.

3.6. Proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, as células foram plaqueadas e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ por 12 horas. Após este período, as culturas foram estimuladas por 12, 24, 36 e 48 horas. Decorridos estes períodos, o meio foi retirado dos poços e estes lavados com PBS e a placa foi congelada a -70°C. A proliferação celular foi avaliada utilizando um ensaio de fluorescência para detecção de ácidos nucleicos (CyQUANT™ Cell Proliferation Assay Kit; Thermo Fisher Scientific). Neste protocolo foi utilizado um corante que exibe uma fluorescência verde intensa quando ligado aos ácidos nucleicos celulares, permitindo mensurar a quantidade total de DNA. No momento de uso, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e foram adicionados 200 µl de tampão de lise celular e do corante em cada poço. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. A fluorescência foi medida utilizando um fluorímetro com filtros de 480 nm de excitação e 520 nm de emissão (SpectraMax Paradigm).

Para este experimento foi utilizada a diluição 1:100, a partir do extrato inicial dos materiais (1:1). Nos grupos sem estímulo de TNF-α, foi observada diferença estatística ao se comparar os quatro períodos propostos: o período de 12 horas apresentou uma média 58,86% ± 13,43% de proliferação celular significativamente maior se comparado com o período de 36 horas (33,66% ± 12,04%). O valor de p foi

0,0005. Também foi observado diferença entre o período de 24 horas e 36 horas ($62,99\% \pm 13,61\%$ e $33,66\% \pm 12,04\%$, respectivamente; $p < 0,0001$). Além disso notou-se diferença entre o período de 36 horas e 48 horas ($33,66\% \pm 12,04\%$ e $52,49\% \pm 5,52\%$, respectivamente; $p = 0,0032$) (Tabela 6A, Tabela 7A e Figura 3A). Vale ressaltar que nos grupos sem TNF- α , apenas os materiais estimularam a proliferação celular, sendo o efeito mais notável após 24 horas de estímulo. Nos grupos com estímulo de TNF- α , não foi observada diferença estatística ao se comparar os quatro períodos propostos (Tabela 6B e Figura 3B).

Tabela 6 - Comparação entre os estímulos sem e com TNF - α no ensaio de proliferação celular na concentração 1:100 e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.

A					B				
Sem TNF	12h	24h	36h	48h	Com TNF	12h	24h	36h	48h
12h	-	0,5205	0,0005	0,7543	12h	-	0,6095	0,1116	0,4682
24h	-	-	<0,0001	0,1216	24h	-	-	0,6385	0,9947
36h	-	-	-	0,0032	36h	-	-	-	0,7775

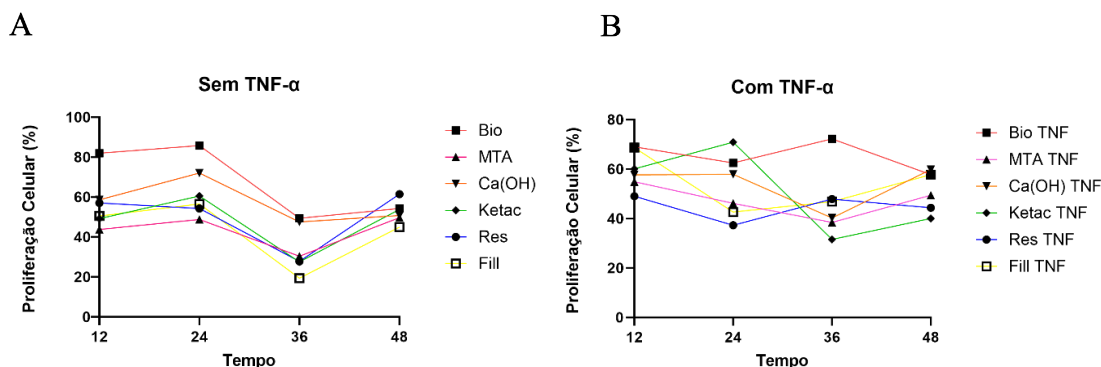
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 7. Médias e desvios-padrão do percentual de proliferação celular obtidos a partir de duas medidas em cada um dos estímulos. A, na concentração sem TNF- α e B, com TNF- α .

A			B		
Sem TNF	Média	Desvio-padrão	Com TNF	Média	Desvio-padrão
12h	58,86%	13,43%	12h	59,90%	7,87%
24h	62,99%	13,61%	24h	52,91%	12,93%
36h	33,66%	12,04%	36h	46,19%	14,08%
48h	52,49%	5,52%	48h	51,54%	8,20%

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 2 – Representação gráfica da quantificação do percentual de proliferação celular obtidos a partir de duas medidas em cada um dos estímulos.



A, grupo sem TNF- α e B, com TNF- α .

Fonte: próprio autor, 2023.

3.7. Quantificação da atividade de histona acetiltransferases (HAT)

Para mensurar a atividade de histona acetiltransferases foi utilizado o HAT activity colorimetric assay kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente, 50 μ g de lisado celular foi diluído em água destilada para um volume final de 40 μ l. Em seguida foi adicionado 68 μ l do reagente assay mix. A solução resultante foi incubada a 37°C por 60 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 400 nm (SpectraMax Paradigm).

Para este experimento foram utilizadas duas diluições seriadas (1:10 e 1:100), a partir do extrato inicial dos materiais (1:1). Entre os valores iniciais de atividade de HAT nos grupos de células tratadas com os biomateriais propostos não houve diferença estatística se comparado com o grupo controle em ambas concentrações (140% \pm 39% e 170% \pm 27%, respectivamente 1:10 e 1:100). Nos grupos sem estímulo de TNF- α , foi observada diferença estatística ao se comparar: RES que apresentou uma média 191,12% \pm 0% de acetilação de histona significativamente maior se comparado ao controle (100% \pm 0%). O valor de p foi 0,022. Além disso notou-se diferença nos grupos com estímulo de TNF- α , sendo esses: controle e Ketac + TNF, controle e Res + TNF, controle e Fill + TNF (100% \pm 0% e 191,12% \pm 0%; p = 0,022 para todas comparações) (Tabela 8, Tabela 9 e Figura 4). O valor médio de 191,12% \pm 0%; p = 0,022 corresponde a leitura máxima do ensaio colorimétrico nas condições realizadas, embora seja de diversos estímulos. Sendo assim, o valor real do ensaio pode ser

superior ao aqui descrito sugerindo um novo estudo para este teste com uma escala de mediação ampliada.

Tabela 8. Comparação entre os estímulos sem e com TNF - α nos ensaios HAT e seus respectivos valores de p calculados pelo teste de Tukey.

HAT	Controle	Bio	MTA	Ca(OH) ₂	Ketac	Res	Fill	Bio + TNF	MTA + TNF	Ca(OH) ₂ + TNF	Ketac + TNF	Res + TNF	Fill + TNF
Controle	-	0,994	0,998	0,898	0,381	0,022	0,860	0,316	0,176	0,999	0,022	0,022	0,022
Bio	-	-	>0,999	>0,999	0,906	0,113	>0,999	0,849	0,631	>0,999	0,113	0,113	0,113
MTA	-	-	-	>0,999	0,860	0,093	1,000	0,792	0,562	>0,999	0,093	0,093	0,093
Ca(OH) ₂	-	-	-	-	0,995	0,250	>0,999	0,986	0,898	1,000	0,250	0,250	0,250
Ketac	-	-	-	-	-	0,754	0,998	>0,999	>0,999	0,849	0,754	0,754	0,754
Res	-	-	-	-	-	-	0,286	0,827	0,963	0,090	>0,999	>0,999	>0,999
Fill	-	-	-	-	-	-	-	0,993	0,929	1,000	0,286	0,286	0,286
Bio+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,999	0,780	0,827	0,827	0,827
MTA+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,548	0,963	0,963	0,963
Ca(OH) ₂ +TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,090	0,090	0,090
Ketac+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,999	>0,999
Res+TNF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>0,999

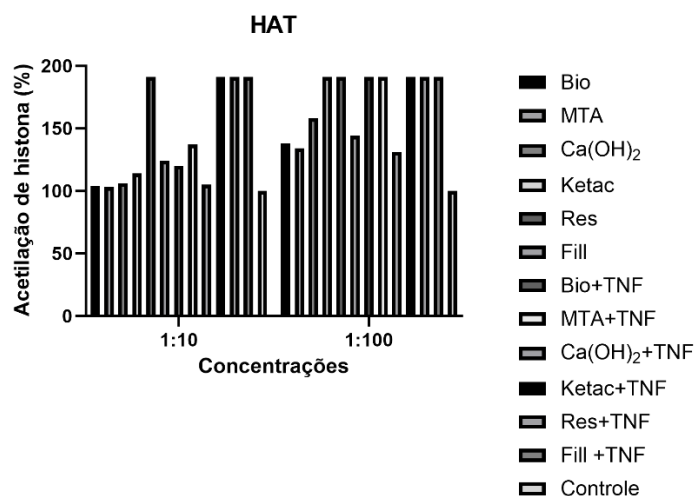
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 9. Médias e desvio-padrão do percentual de acetilação de histona.

Estímulo	Média	Desvio-padrão
Controle	100,00%	0,00%
Bio	120,84%	24,06%
MTA	118,61%	21,68%
Ca(OH) ₂	131,98%	37,39%
Ketac	152,56%	54,52%
Res	191,12%	0,00%
Fill	133,91%	13,96%
Bio+TNF	155,64%	50,18%
MTA+TNF	164,14%	38,16%
Ca(OH) ₂ +TNF	117,79%	18,45%
Ketac+TNF	191,12%	0,00%
Res+TNF	191,12%	0,00%
Fill +TNF	191,12%	0,00%

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 3 – Representação gráfica da quantificação do percentual de acetilação de histona.



Fonte: próprio autor, 2023.

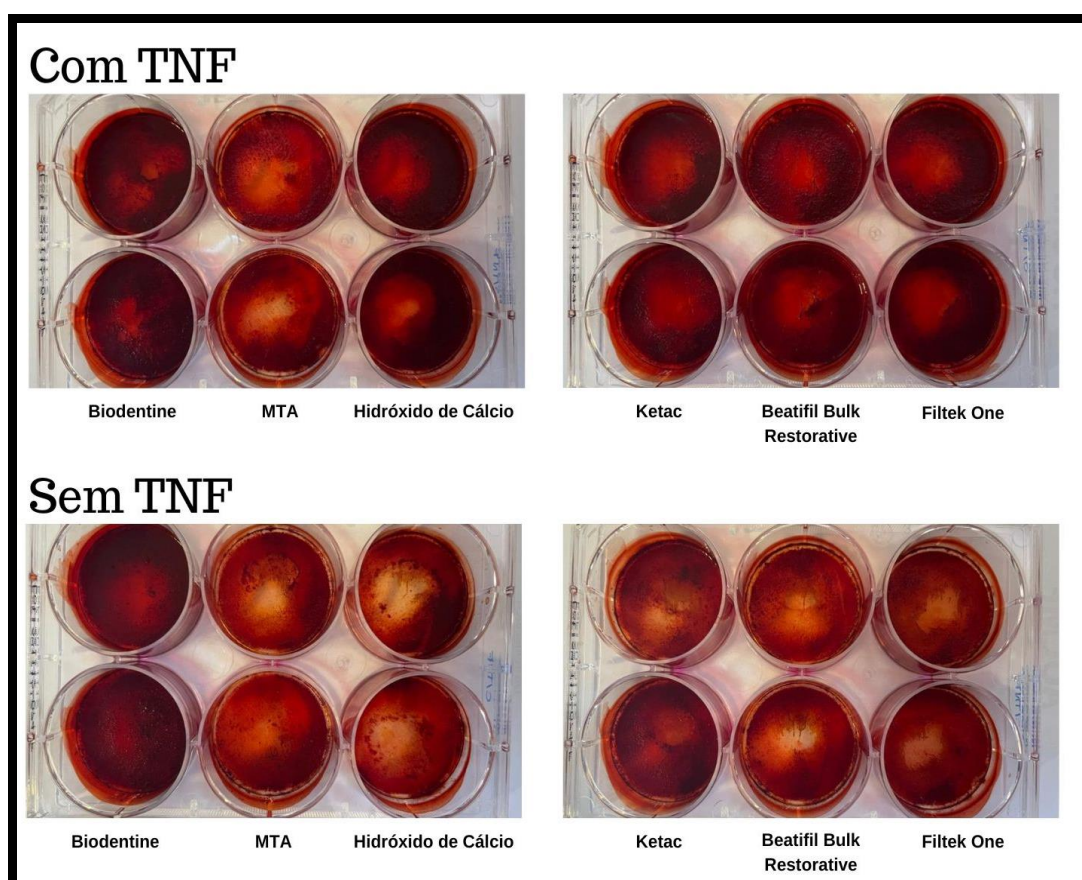
3.8. Formação de nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada cultivando as células por 21 dias em meio que favorece a mineralização da matriz extracelular. Este meio consiste de meio DMEM suplementado com 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma), 50 μ g / ml de ácido ascórbico (Sigma), soro fetal bovino a 1% e antibióticos. As células foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células por poço, em placas de 60 mm. A seguir, o meio de cultura foi removido dos poços e foram adicionados os estímulos. Como controle, os experimentos foram realizados em meio de cultura DMEM regular com a adição das mesmas substâncias descritas para o meio que favorece a mineralização. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de campo claro. A multicamada de células juntamente com os nódulos de mineralização depositados foram corados por Vermelho de Alizarina utilizando protocolos descritos previamente^{56,71}. Sucintamente, as culturas foram fixadas com etanol a 70% por 10 minutos e coradas com uma solução de Vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,0 (Sigma), por 5 minutos à temperatura ambiente. A quantificação do acúmulo de cálcio no meio extracelular foi realizada após a liberação do cálcio ligado ao corante obtido pelo tratamento com 100 mM de cloreto de cetilpiridíneo (Sigma), durante 1 hora, sob constante agitação. A absorbância do corante liberado foi

determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm (SpectraMax Paradigm), e normalizada pelo conteúdo de proteína total na cultura.

As células indiferenciadas da polpa dentária de camundongos (OD-21), apresentaram significativa formação de nódulos de mineralização em meio osteogênico, após estímulo com 10ng/mL de TNF- α por 21 dias se comparado com o grupo que não recebeu estímulo com TNF- α (Figura 5).

Figura 4 – Formação de nódulos de mineralização de células da polpa dentária de camundongos (OD-21), após 21 dias de estímulo com 10ng/mL de TNF- α .



Para visualização dos nódulos, as células foram fixadas e coradas com Vermelho de alizarina.

Fonte: próprio autor, 2023.

4. DISCUSSÃO

Pesquisas que avaliaram as interações entre o material de capeamento e a polpa a ser tratada demonstraram que materiais biocompatíveis são capazes de estimular a diferenciação de células-tronco pulparem em osteoblastos e consequentemente a mineralização⁷²⁻⁷³. Quando ocorre a destruição da camada odontoblástica e o capeamento pulpar é realizado, o complexo dentino-pulpar se regenera através do recrutamento, diferenciação e proliferação de células progenitoras e pela formação de dentina reparadora⁷². Desta forma, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar qual o melhor material a ser utilizado para recobrir o tecido pulpar exposto⁷⁴. Uma vez que, a diferenciação e proliferação das células pulparem podem ser afetadas drasticamente pela interação das células tronco da polpa dentária (DPSCs) com os materiais empregados durante o capeamento pulpar. Foi descrito em um estudo que os materiais bioativos mais utilizados com sucesso no capeamento são: o mineral trióxido agregado (MTA) e o hidróxido de cálcio (Ca (OH)₂)⁷⁵. Atrelado a esses achados, nosso estudo indicou um papel significativo desses materiais quando relacionados aos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular, tendo uma possível relação com processos de mineralização.

Vários estudos *in vitro* demonstraram que a biocompatibilidade do MTA está relacionada a sua baixa de citotoxicidade⁷⁶⁻⁷⁸ e genotoxicidade⁷⁶⁻⁷⁷, ausência de produção de espécies reativas de oxigênio⁷⁷, adesão em células ósseas⁷⁹⁻⁸⁰ e aumento na proliferação celular^{78,81-82}. Recentemente, o MTA foi relacionado com a liberação de prostaglandina E2, evidenciando uma importante relação com o processo de formação da ponte de dentina⁸³⁻⁸⁷. Corroborando para esses achados, neste projeto foi possível observar que o MTA apresentou maior potencial de viabilidade celular quando comparado aos outros materiais bioativos, indicando seu potencial mineralizador. Além disso, em ambiente pró-inflamatório, este também apresentou boa viabilidade destacando seu sucesso como material bioativo devido as características já mencionadas.

Perard et al. (2012)⁸⁸ avaliaram os efeitos biológicos da Biodentine sobre células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) e em células da polpa (OD-21). Além disso, avaliaram os efeitos da Biodentine e do MTA quanto à expressão gênica em cultura celular para os genes envolvidos na diferenciação odontogênica. Os autores utilizaram o ensaio da fosfatase ácida para comparar a biocompatibilidade dos materiais. A

diferenciação celular foi determinada por PCR em tempo real. As células MDPC-23 na presença de MTA tiveram os maiores níveis de viabilidade em relação às mesmas células expostas a Biodentine e ao controle no período de 7 dias. Para as células OD-21, a taxa de proliferação no mesmo período foi significativamente menor quando da presença de MTA e Biodentine em relação ao grupo controle. Concluíram que a Biodentine e MTA podem modificar a proliferação de células pulpares, e que seus efeitos podem variar ao longo do tempo, dependendo da linhagem celular considerada. Deste modo, podemos observar com o estudo descrito que há similaridade entre a Biodentine e MTA sendo tal constatação reforçada neste trabalho ao observar que não houve diferença estatística entre esses materiais em ensaios como o HAT, indicando sua função-chave nos processos de autorrenovação, manutenção de pluri/ multipotência das células estudadas.

Estudos avaliaram a resposta de células humanas da polpa humana após capeamento pulpar direto com cimento a base de Ca(OH)_2 e outros materiais biativos também estudados no atual projeto^{76,89-91}. Assim como nosso estudo, os autores concluíram que, apesar, do reparo e processo de indução da mineralização seja mais lento no Ca(OH)_2 , todos os materiais estudados são capazes de promover com sucesso a biomineralização e uma possível diferenciação celular.

Leyhausen et al. (1998)⁹² tiveram como objetivo determinar e comparar a compatibilidade de cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina, entre eles, foi estudado o Ketac. Os materiais foram manipulados e polimerizados segundo as recomendações do fabricante. Assim, vários extratos de tais materiais foram obtidos em diferentes períodos e incubados com fibroblastos gengivais humanos (FGH) e fibroblastos de ratos (3T3). A viabilidade celular e determinação do DNA foi obtida pela coloração da cultura de células. Os extratos contendo o Ketac não inibiram o crescimento celular nos ensaios realizados, assim como no nosso trabalho. Com base nesses achados, pode-se concluir que embora os cimentos ionoméricos possuam citotoxicidade, o Ketac revelou uma boa biocompatibilidade, sendo capaz de induzir viabilidade e proliferação celular, além de expressar atividades enzimáticas e de biomineralização.

Várias pesquisas avaliaram a citotoxicidade e biocompatibilidade de componentes monoméricos encontradas na composição de resinas compostas sobre cultura celular⁹³⁻⁹⁶. Foram observados que alguns monômeros resinosos - dentre eles BisGMA e TEGDMA – foram responsáveis pela diminuição da síntese de DNA de maneira dose

dependente. Por outro lado, pequenas concentrações de UDMA, BisGMA, TEGDMA e BPA produziram um baixo efeito estimulador sobre linfócitos-T de células da polpa dental. Além disso, fatores como redução da espessura dentinária, a polimerização incompleta e o tempo de exposição prolongado podem contribuir para o aumento significativo da citotoxicidade dos componentes encontradas nas resinas compostas. Neste trabalho, é importante destacar que foram utilizadas resinas compostas as quais em sua composição há partículas de flúor, deste modo, embora na literatura existem vários trabalhos relacionando a citotoxicidade das resinas compostas para linhagens de células, no atual estudo, as resinas compostas testadas apresentaram baixa citotoxicidade as células OD-21, sendo capazes até de induzir uma mineralização bem significativa. Dessa forma, sugere-se um novo estudo para comparar os mecanismos envolvidos na indução de mineralização celular dessas resinas compostas e as demais estudadas na literatura.

Estudos demonstraram que a citocina TNF- α inibiu a atividade de fosfatase alcalina, um mediador de diferenciação odontoblástico e osteogênico, em períodos prolongados⁹⁷⁻⁹⁸. Enquanto que, Paula-Silva et al., 2009a⁵⁶, em um estudo in vitro demonstraram que o TNF- α estimulou as células da polpa dentária em fenótipo odontoblástico. Por outro lado, Lamarque (2022)⁹⁹, observou in vitro que células da polpa dentária estimuladas com TNF- α induziram a biomineralização, e inibiram a diferenciação de pré-osteoblastos, além de que, o TNF- α reduziu a expressão de Runx-2, elemento chave na transcrição associado a diferenciação osteoblástica. Outro estudo in vitro relatou que células-tronco da polpa dentária (DPSC) senescente apresentaram uma maior diferenciação odontoblástica com o TNF- α devido a altos níveis de TNFR1¹⁰⁰. Corroborando com os achados encontrados, em nosso trabalho, observou-se que o estímulo de TNF- α a 10ng/mL não alterou a viabilidade celular, a proliferação, a acetilação de histonas e a mineralização.

5. CONCLUSÕES

Houve viabilidade celular significativa nos grupos com biomateriais em ambiente inflamatório. O uso de biomateriais promoveu proliferação celular independente do estímulo inflamatório. No ensaio HAT, foi possível associar os efeitos dos estímulos aos seus mecanismos epigenéticos. Os resultados demonstraram significativa biocompatibilidade dos materiais nos ensaios propostos, ilustrando que seus efeitos podem contribuir para o entendimento da síntese de dentina reparadora (diferenciação celular) após o uso clínico de materiais bioativos.

REFERÊNCIAS

1. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res*. 2013;92(9):765-72.
2. Farges JC, et al Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.
3. Yalvac ME, et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J*. 2010 Apr;10(2):105-13.
4. Emilia E, Neelakantan P. Biomarkers in the dentin-pulp complex: role in health and disease. *J Clin Pediatr Dent*. 2015 Winter;39(2):94-9.
5. Araujo-Pires AC, et al. Mesenchymal stem cells as active prohealing and immunosuppressive agents in periapical environment: evidence from human and experimental periapical lesions. *J Endod*. 2014;40(10):1560-5.
6. Ding G, Niu J, Wei F. Current understanding of orofacial tissue derived mesenchymal stem cells: an immunological perspective. *Histol Histopathol*. 2015 Mar;30(3):255-65.
7. Silva CN, et al. O tecido da polpa dentária como fonte de células-tronco. *Revista Saúde em Foco* 2019;11:295-308.
8. 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 U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
9. Miura M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.
10. Gancheva MR, Kremer KL, Gronthos S, Koblar SA. Using Dental Pulp Stem Cells for Stroke Therapy. *Front Neurol*. 2019 Apr 29;10:422.
11. Okajcekova T, et al. A Comparative In Vitro Analysis of the Osteogenic Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Using Various Differentiation Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 26;21(7):2280.
12. Xuan K, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med*. 2018.22;10(455):eaaf3227.

13. Piva E, Tarlé SA, Nör JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, Eubanks EJ, Kaigler D. Dental Pulp Tissue Regeneration Using Dental Pulp Stem Cells Isolated and Expanded in Human Serum. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):568-574.
14. Machado CES, et al. Células-tronco de origem dental: características e aplicações na medicina e odontologia. *Rev Odontol. Araçatuba* 2015;36(1):36-40.
15. Araújo AG, Vasconcelos RG, Vasconcelos MG. Células-tronco derivadas da polpa dentária - diferenciação, proliferação e mediadores químicos envolvidos: uma revisão de literatura. *Salusvita* 2020;39(2):435-458.
16. Yoshida S, et al. Insight into the Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapy. *Biology (Basel)*. 2020 Jul 9;9(7):160.
17. Hartwig FP, Moreira GMSG. Epigenética e célulastronco: um novo caminho para a compreensão dos mecanismos de plasticidade, diferenciação e imprinting. *Vittalle, Rio Grande*, 23(1): 37-43, 2011. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/1816>.
18. Efroni S, et al. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 May 8;2(5):437-47.
19. Sorek M, Oweis W, Nissim-Rafinia M, Maman M, Simon S, Hession CC, Adiconis X, Simmons SK, Sanjana NE, Shi X, Lu C, Pan JQ, Xu X, Pouladi MA, Ellerby LM, Zhang F, Levin JZ, Meshorer E. Pluripotent stem cell-derived models of neurological diseases reveal early transcriptional heterogeneity. *Genome Biol*. 2021 Mar 4;22(1):73.
20. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med*. 2009 Sep;27(5):351-7.
21. Harvey AJ, et al Transcriptional differences between rhesus embryonic stem cells generated from in vitro and in vivo derived embryos. *PLoS One*. 2012;7(9):e43239. Hench LL. *Bioceramics. J Am Ceram Soc* 2005;81:1705–1728.
22. Spangenberg L, Shigunov P, Abud AP, Cofré AR, Stimamiglio MA, Kuligovski C, Zych J, Schittini AV, Costa AD, Rebelatto CK, Brofman PR, Goldenberg S, Correa A, Naya H, Dallagiovanna B. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Res*. 2013 Sep;11(2):902-12.
23. Zych J, Spangenberg L, Stimamiglio MA, Abud AP, Shigunov P, Marchini FK, Kuligovski C, Cofré AR, Schittini AV, Aguiar AM, Senegaglia A, Brofman PR,

- Goldenberg S, Dallagiovanna B, Naya H, Correa A. Polysome profiling shows the identity of human adipose-derived stromal/stem cells in detail and clearly distinguishes them from dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2014 Nov 15;23(22):2791-802.
24. Silva LABD, Hidalgo LRDC, de Sousa-Neto MD, Arnez MFM, Barnett F, Hernández PMG, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Cytotoxicity and Inflammatory Mediators Release by Macrophages Exposed to Real Seal XT and Sealapex Xpress. *Braz Dent J.* 2021 Jan-Feb;32(1):48-52.
 25. Kunert M, Lukomska-Szymanska M. Bio-inductive materials in direct and indirect pulp capping-a review article. *Materials (Basel).* 2020;13(5):1204.
 26. Hench L, Polak J. Third Generation biomedical materials. *Science,* 2022;295:1014-1017.
 27. Arandi NZ. Calcium hydroxide liners: a literature review. *Clin Cosmet Investig Dent* 2017;9 67–72.
 28. Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int.* 2010b;87(2):144-57. Pereira M, Oliveira L, Almeida L. Células tronco dentárias. *Revista do CROMG* 2018;17(2):16-25.
 29. Daltoé MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, GatónHernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):596-603.
 30. Queiroz AM, Amaral THA, Mira PS, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Silva LAB. In vivo evaluation of inflammation and matrix metalloproteinase expression in dental pulp induced by luting agents in dogs. *Revista Científica do CRORJ (Rio de Janeiro Dental Journal)* 2019;4(1):61-72.
 31. Queiroz AM, Amaral THA, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Gatón-Hernandez PM, Silva LAB. Luting agents differentially modulate inflammation and matrix metalloproteinases in connective tissue. *Revista Científica do CRO-RJ (Rio de Janeiro Dental Journal)* 2018;3(1):8-15.
 32. Lucisano MP, Pucinelli CM, Carvalho FK, PaulaSilva FWG. Proteção pulpar indireta. In: Silva LAB. Tratamento endodôntico em crianças. Protocolos clínicos em dentes decíduos e permanentes jovens. 1ed.: Manole, 2022;67-82.

33. Glossário de Termos Endodonticos é atualizado regularmente para refletir os avanços na endodontia. A edição atual foi atualizada em março de 2020.
34. Tsukamoto-Tanaka H, et al. Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res.* 2006;325(2):219-229.
35. Zhao C, Hosoya A, Kurita H, et al. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol.* 2007;52(10):945-953.
36. Edanami N, et al. Impact of remnant healthy pulp and apical tissue on outcomes after simulated regenerative endodontic procedure in rat molars. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1):20967.
37. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013 Sep; 92(9):765-72.
38. Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2): 65-71.
39. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S46-51.
40. Chmielewsky F, Jeanneau C, Dejou J, About I. Sources of dentin-pulp regeneration signals and their modulation by the local microenvironment. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S19-25.
41. Xu K, Xiao J, Zheng K, Feng X, Zhang J, Song D, Wang C, Shen X, Zhao X, Wei C, Huang D, Feng G. MiR-21/STAT3 Signal Is Involved in Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Mediated by TNF- α . *Cell Reprogram.* 2018;20(2):107-116.
42. Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.* 2014 Jan;20(1):25-34.
43. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell transplant.* 2011; 20(1):5-14;
44. Mezey É, Nemeth K. Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. *Immunol Lett.* 2015;168(2): 208-14.
45. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000;50(3):184-195.

46. Hirsch V, Wolgin M, Mitronin AV, Kielbassa AM. Inflammatory cytokines in normal and irreversibly inflamed pulps: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017; 82:38-46.
47. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res.* 2002;33(5):482–484.
48. Xu T, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for radiation-induced lung injury. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):18.
49. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* 1991 Jul 22;285(2):199-212.
50. Aggarwal KM, Hibbert A. 1991. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* 24, 3445.
51. Vilcek J, Lee TH. Tumor Necrosis Factor. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(12);7313-7316.
52. Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor during embryonic development. *Anat Embryol* 191,1-10(1995).
53. Kruger JM, et al. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann NY Acad Sci.* 1998;856:148-159.
54. Prso IB, Kocjan W, Simić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, Ferreri S, Karlović IM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:38210.
55. Chen X, et al. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007;1(179):154–61.
56. Paula-Silva FWG, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2009a;88(4):339-44.
57. Suzuki S, et al., Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):221-9.
58. Nikolic N, Jakovljevic A, Carkic J, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Soldatovic I, Andric M, Ivanovic V, Milasin, J. Notch signaling pathway in apical periodontitis: correlation with bone resorption regulators and proinflammatory cytokines. *Journal of endodont.* 2019;45(2):123-128.
59. Associação Brasileira de Odontopediatria. *Terapia Pulpar em Dente Decíduo.* In.: Associação Brasileira de Odontopediatria. *Diretrizes para Procedimentos Clínicos em Odontopediatria.* Rio de Janeiro: Santos; 2020. P.185-202.

60. Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, Siddiqui SS. 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 Jul 2;19(1):133.
61. Yaghoubi S, Matin MM. The effects of mineral trioxide aggregate on osteo/odontogenic potential of mesenchymal stem cells: a comprehensive and systematic literature review. *Biomater Investig Dent*. 2020 Dec 2;7(1):175-185.Y
62. Toida Y, Kawano S, Islam R, Jiale F, Chowdhury AA, Hoshika S, Shimada Y, Tagami J, Yoshiyama M, Inoue S, Carvalho RM, Yoshida Y, Sano H. Pulpal response to mineral trioxide aggregate containing phosphorylated pullulan-based capping material. *Dent Mater J*. 2022 Feb 1;41(1):126-133.
63. Silva LAB. Tratamento Endodôntico em Crianças: Protocolos Clínicos em Dentes Decíduos Permanentes Jovens. Santana da Parnaíba: Editora Manole, 2022.
64. Horst OV, et al. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol*. 2011 Jan 24;12:9.
65. Liu J, et at. Tumor Necrosis Factor- α Regulates the TRPA 1 Expression in Human Odontoblast-Like Cells. *J Pain Res*. 2020 Jul. 6;13:1655-1664.
66. Lorencetti-Silva F, Pereira PAT, Galvão AF, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Prostaglandin E2 Induce Expression of Mineralization Genes by Undifferentiated Dental Pulp Cells. *Braz Dent J*. 2019 Jun;30(3):201-207.
67. Bastos LA, Lorencetti-Silva F, Fontanari C, Arnez MFM, Thomé JPQ, Paula-Silva FWG. Effects of papain-based gel for caries removal on macrophages and dental pulp cells. *Braz Dent J*. 2019 Oct 7;30(5):484-490.
68. Silva FL, de Campos Chaves Lamarque G, de Oliveira FMMPC, Nelson-Filho P, da Silva LAB, Segato RAB, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Leukotriene B4 loaded in microspheres regulate the expression of genes related to odontoblastic differentiation and biomineralization by dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*. 2022 Feb 23;22(1):45.
69. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 2009.
70. Longo DL, Paula-Silva FW, Faccioli LH, GatónHernández PM, Queiroz AM, Silva LA. Cytotoxicity and cytokine expression induced by silorane and

- methacrylate-based composite resins. *J Appl Oral Sci.* 2016 Jul-Aug;24(4):338-43.
71. Paula-Silva FW, et al. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cell in a CEMPI- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(2):144-57.
 72. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):273-80
 73. Graham GM, Thrasher TA, Popovic MR. The effect of random modulation of functional electrical stimulation parameters on muscle fatigue. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2006;14(1):38-45.
 74. Zander HA, Glass RL. The healing of phenolized pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1949;2(6):803-10.
 75. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod.* 2008b;34(9):1057-60.
 76. Bin CV. Efeito de biomateriais no crescimento e funcionalidade de células progenitoras da polpa dentária [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.
 77. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009;42(3):227-37
 78. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod.* 2005;31(5):387-91.
 79. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. *J Endod.* 2006;32(9):872-5.
 80. Zhu Q, Chen G, Huang Y. [The relationship between sensitivity to arsenic trioxide and antioxidative capacity of malignant hematopoietic cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2000;22(5):359-61.
 81. Oviir T, Pagoria D, Ibarra G, Geurtsen W. Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. *J Endod.* 2006;32(3):210-3.

82. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006;39(5):415-22.
83. Minamikawa H, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system. *J Endod*. 2009;35(6):843-6.
84. Torabinejad M, et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*. 1997;23(4):225-8.
85. Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. *Int Endod J*. 2002;35(10):840-7.
86. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod*. 2004;30(2):80-3.
87. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. 2003. *Int Endod J*. 2009;42(5):414-20.
88. Perard M, et al Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;24(6):1527-34.
89. Accorinte MLR, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*. 2008;34(1):1-6.
90. Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem*. 2009;112(5):452-8.
91. Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod*. 2008;34(6):666-70.
92. Leyhausen G, et al. Biocompatibility of various light-curing and onde conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials*. 1998;19:559-641.
93. Hanks CT, Straw SE, Wataha JC. et al. Cytotoxicity effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J. Dent. Res.*, Chicago, v. 70, n. 111, p.1450 – 1455, Nov.1991.

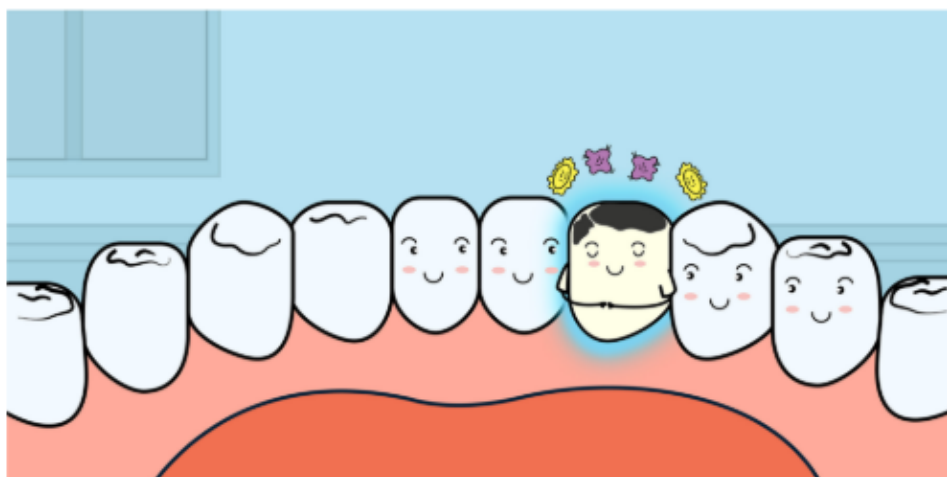
94. Jontell, M.; Hanks, C.T., Bratel, J. et al. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.74, n.5, p. 1162-1167, May 1995.
95. Bouillaguet. S; Wataha. J,C; Hanks, C.T.; et al.. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod.*, Chicago, v.22, n.5, p.244-248, May 1996.
96. MacDougall, M.; Selden, J.K.; Nydegger, J.R. et al. Immortalized mouse odontoblasto cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent.*, San Antônio, v.11, Issue spc., p.11-16, Jan. 1998.
97. Nakayama K, Hirata-Tsuchiya S, Okamoto K, Morotomi T, Jimi E, Kitamura C. The Novel NF κ B Inhibitor, MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug, Suppresses Inflammatory Responses in Odontoblast-Like Cells. *J Cell Biochem.* 2016 Nov;117(11):2552-8.
98. Min KS, Kwon YY, Lee HJ, Lee SK, Kang KH, Lee SK, Kim EC. Effects of proinflammatory cytokines on the expression of mineralization markers and heme oxygenase-1 in human pulp cells. *J Endod.* 2006 Jan;32(1):39-43.
99. Lamarque GCC. Influência do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) na diferenciação e mineralização de células pré-osteoblásticas e da polpa dentária [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022
100. Nozu A, Hamano S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Sugii H, Yoshida S, Mitarai H, Taniguchi S, Wada N, Maeda H. Senescence and odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *J Cell Physiol.* 2018 Jan;234(1):849-859.
101. Silva CA, Almeida-Junior LA, Paula-Silva FWG. Células-tronco dentárias: características e aplicabilidades na bioengenharia tecidual. *Anais do II CONAIS.* Disponível em <https://doity.com.br/media/doity/submissoes/60a13d97-c150-4de2af85-54ad0a883292-trabalho-conais-vfinalpdf.pdf>. Acesso em 14/05/2022.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo publicado na área pesquisada.



HUMAN HEALTH
Published: 25 May 2022
doi: 10.3389/frym.2022.716966



CAN WE HELP TEETH TO REPAIR THEMSELVES?

Caroline Amaro da Silva, Luciano Aparecido de Almeida-Júnior and Francisco Wanderley Garcia Paula-Silva*

Department of Pediatric Clinics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

YOUNG REVIEWER:



JOHNSON
AGE: 13

Dental caries can cause cavities in teeth and can lead to severe pain. Decay is caused by bacteria that thrive on sweets and foods rich in carbohydrates, so they can be seen as the villains that lead to the formation of cavities. To protect themselves against decay, the teeth create a type of hard barrier inside themselves to keep decay out. The formation of this barrier is called tooth repair because the tooth cells rebuild, from within, the walls that were destroyed by decay. Scientists have tried to imitate the creation of this barrier in their laboratories, by using the tooth cells that can form various parts of the tooth. But achieving the entire process of tooth repair in the laboratory is not an easy task. Scientist and dentists still need to learn a great deal!

WHY TO RE-GROW DENTAL TISSUES?

When we see a tooth within a person's mouth, we see only part of the tooth—the rest is inside the bone. The part we see is called the crown and the part that is inside the bone is called the root. Each tooth has

DENTIN

Tissue that surrounds the tooth and has several microscopic tubes.

PULP

Located inside the tooth and responsible for bringing blood, nutrients and sensations (pain, hot, cold, etc.).

Figure 1

Tissues that make up the teeth. The enamel is the protective tooth covering, and it is the hardest structure in the body. The dentin lies just below the enamel; it is made up of many small tunnels that connect the enamel to the pulp. The pulp protects and nourishes the entire tooth. The cementum holds the tooth firmly within the bone.

CAVITIES

Holes made in our teeth by bacteria that cause tooth decay.

TOOTH DECAY

A disease in which bacteria that live in the mouth destroy themselves when we eat too much sweets and do not brush our teeth properly.

TOOTH REGENERATION

When the tooth can recover on its own from an attack, such as cavities.

a different shape, but all teeth have the same tissues and structures. The outermost structure of the tooth is called the enamel, and it acts as a protective covering. Tooth enamel is the hardest substance in the human body! Underneath the enamel there is **dentin**, formed by several tunnels that reach the innermost part of the tooth, which is called the **pulp**. In the pulp, there are blood vessels and nerves. Teeth also have a tissue called cementum, which covers the tooth root and attaches them firmly to the bone (Figure 1). In this article, we will specifically focus on the pulp tissue and dentin and explain how researchers have been studying—and trying to recreate—the process by which these tissues re-grow to protect the tooth when it is damaged.

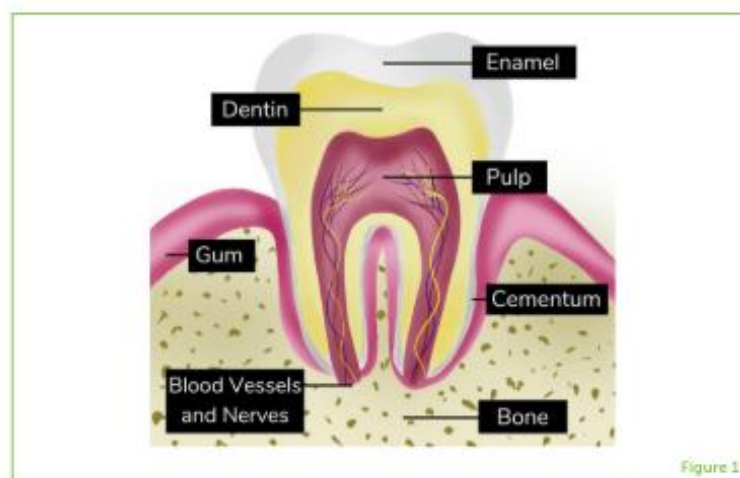


Figure 1

Cavities happen because some of the bacteria that live in the mouth can produce acids that destroy the tissues of teeth. When the cavity is close to the dental pulp, the person might feel pain. The human body is highly intelligent, and when it feels threatened by something, it creates ways to protect itself. This happens in response to **tooth decay**! The teeth try to prevent the decay from reaching and entering into the pulp. The teeth do this by forming an extremely strong barrier inside themselves, made of minerals. This barrier is similar to dentin. As scientists began to study this process, they called it **tooth regeneration**, meaning that it is the tooth's way of building new tissue to protect itself from tooth decay.

DENTIN AND DENTAL PULP REGENERATION

The protective, dentin-like barrier created by teeth to protect themselves from cavities can be seen by dentists when they take X-rays of the teeth (Figure 2). The tooth can also form the barrier *after* the

dentist has removed the decay, because the dentist uses products that help the tooth to rebuild and form new tissue. This treatment protects the tooth. Based on these discoveries, several studies are taking place to help us to better understand how teeth manage to regenerate themselves and how we can use what we discover to treat tooth decay and other diseases of the mouth.

Figure 2

Tooth regeneration seen on an X-ray and under a microscope. The microscopic image on the lower right shows the region where new tissue, similar to dentin, is normally formed to prevent tooth decay from entering the pulp (white arrow). In the X-ray image on the lower left, you can see a tooth that has regenerated to form a barrier against cavities/decay (white arrows).

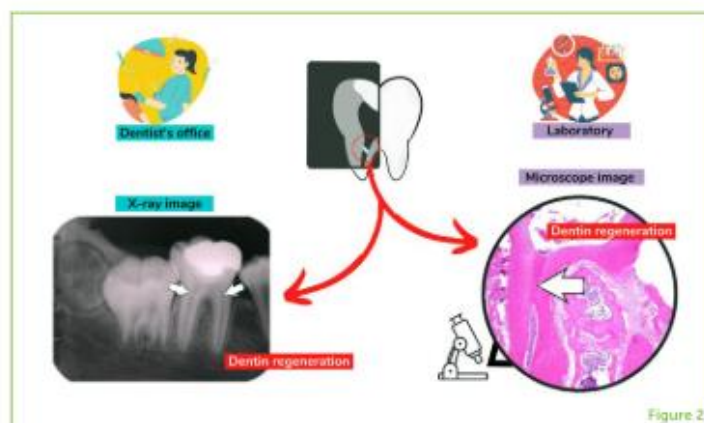


Figure 2

There are millions of bacteria that live right inside the mouth, but they are not present inside the teeth. If people do not brush their teeth, bacteria will feed on the leftover food that sticks to the teeth, and they will produce acid. The acid can eventually pierce the enamel, allowing the bacteria to enter the tooth. This can cause infection and pain.

Researchers have found that, in the pulp of teeth, there are incredibly special cells that can form new tooth parts. These cells are called **stem cells**. Stem cells are also found in other parts of the body, such as the bone marrow and fat tissue. When the teeth are invaded by bacteria, the powers of these pulp stem cells can be activated, to regenerate the teeth [1, 2].

STEM CELLS

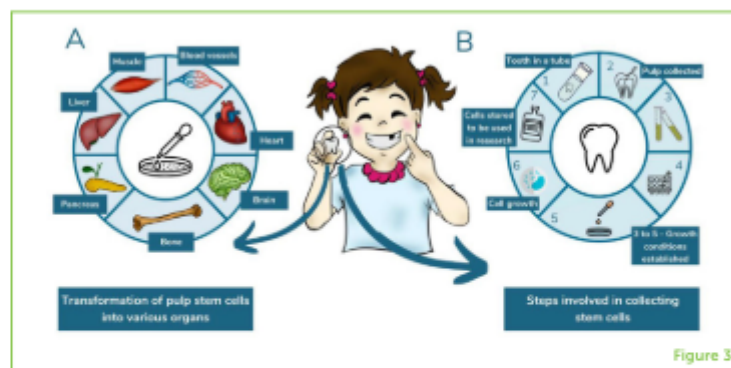
Very special cells with super powers to multiply and transform into several other cells.

HOW ARE STEM CELLS COLLECTED

Dental pulp stem cells can be found in both permanent/adult teeth [2] and baby teeth [3]. Studies investigating stem cells from baby teeth have found that these stem cells can multiply and transform themselves into many other types of cells, such as heart, liver, bone, muscle, and several other types (Figure 3A). It is much easier to collect stem cells from baby teeth than from adult teeth, because baby teeth fall out naturally. Stem cells from adult teeth can also form several cell types.

Figure 3

Children naturally lose their baby teeth as their adult teeth come in. (A) Dental pulp stem cells from baby teeth can be used to produce tissues of various organs of the body. (B) To collect pulp stem cells: (1) the tooth is placed in a tube with a nourishing liquid; (2) the pulp is collected; (3–5) the cells are placed in the conditions needed for growth; (6) pulp stem cells grow; and (7) the pulp stem cells can be stored to be used later in research.

**Figure 3**

When a tooth is donated for the purpose of stem cell collection, it must be placed in a suitable liquid and with the right nutrients, so that the cells inside the tooth do not die. The entire process takes place in a specialized laboratory, where scientists remove the pulp from the tooth and place it in the conditions that will allow it to grow and multiply [2]. Several steps are required to collect pulp stem cells so that they can be used in research (Figure 3B).

Once the stem cells grow and multiply in the laboratory, they can be used in research on tissue regeneration. These studies are called regenerative therapies. **Regenerative therapy** is a new way to re-form structures that have been lost or destroyed, such as the destruction of the tooth tissues by tooth decay [4, 5]. It is important to remember that these therapies are still in the early stages of research, and dentists do not yet perform these procedures in their dental offices.

WHY IS THIS IMPORTANT?

Stem cells inside the tooth can help with the tooth-regeneration process. Repairing teeth is important to prevent you from experiencing toothache and will also help you to eat better, heal from illnesses so that people can live with an excellent quality of life. Also, studies are being conducted so that the transforming power of pulp stem cells can be used not only to regenerate teeth, but also to allow repair the tissues from other organs, such as heart, liver and brain.

FUNDING

This research was partially funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Program for High School Students (PIBIC-EM). Financial research support was obtained from a grant from the São Paulo State Research Foundation (process

REGENERATIVE THERAPY

Techniques that help our body tissues to recover from some type of injury suffered.

2019/00204-1) to FWGPS and a scholarship (2019/02432-1) to LA-J. CS received an undergraduate CNPq fellowship (PIBIC).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the student Geovanna Peçanha Valério (National Council for Scientific and Technological Development fellowship/PIBIC-EM) for her collaboration and careful reading of this manuscript.

REFERENCES

1. Sui, B., Chen, C., Kou, X., Li, B., Xuan, K., Shi, S., et al. 2019. Pulp stem cell-mediated functional pulp regeneration. *J. Dent. Res.* 98:27–35. doi: 10.1177/0022034518808754
2. Paula-Silva, F. W., Ghosh, A., Silva, L. A., and Kapila, Y. L. 2009. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J. Dent. Res.* 88:339–44. doi: 10.1177/0022034509334070
3. Almeida-Junior, L. A., Marques, N. C. T., Prado, M. T. O., Oliveira, T. M., and Sakai, V. T. 2019. Effect of single and multiple doses of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). *Lasers Med. Sci.* 34:1917–24. doi: 10.1007/s10103-019-02836-y
4. Silva, L. A., de Paula e Silva, F. W., Leonardo, M. R., and Assed, S. Pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J. Dent. Child (Chic)*. 74:79–84.
5. Lorencetti-Silva, F., Pereira, P. A. T., Meirelles, A. F. G., Faccioli, L. H., and Paula-Silva, F. W. G. Prostaglandin E2 induces expression of mineralization genes by undifferentiated dental pulp cells. *Braz. Dent. J.* 30:201–7. doi: 10.1590/0103-6440201902542

SUBMITTED: 29 May 2021; **ACCEPTED:** 28 April 2022;

PUBLISHED ONLINE: 25 May 2022.

EDITOR: Kunkai Su, Zhejiang University, China

SCIENCE MENTOR: Renee W. Y. Chan

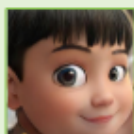
CITATION: Silva CA, Almeida-Júnior LA and Paula-Silva FWG (2022) Can We Help Teeth to Repair Themselves? *Front. Young Minds* 10:716966. doi: 10.3389/frym.2022.716966

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

COPYRIGHT © 2022 Silva, Almeida-Júnior and Paula-Silva. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided

the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

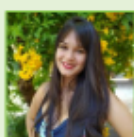
YOUNG REVIEWER



JOHNSON, AGE: 13

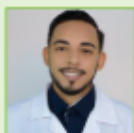
Hi, I am Johnson! I am 13 years old. I like doing coding, playing Minecraft and posting on Youtube. I believe that sharing knowledge online will be the trend of learning and studying. Frontier for Young Minds is the best channel for us to learn actual science. Therefore, I decided to take up the young reviewer role.

AUTHORS



CAROLINE AMARO DA SILVA

Caroline Amaro da Silva is an undergraduate student at the School of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP), University of São Paulo (USP). Caroline loves and admires pediatric dentistry! She participates in several extracurricular activities, and she directs two academic leagues and the National League of Pediatric Dentistry. Caroline's studies and activities remind her how important it is to take care of other people, especially children. In addition, she is interested in scientific advances and follows the work of the Department of Pediatric Clinics at FORP/USP.



LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA-JÚNIOR

Luciano Aparecido de Almeida-Júnior has a D.D.S. and an M.Sc. He is a specialist in orthodontics and is currently a Ph.D. student in pediatric dentistry at the School of Dentistry of Ribeirão Preto at the University of São Paulo. He works in research with cell cultures, pulp stem cells, and the inflammatory response in bone.



FRANCISCO WANDERLEY GARCIA PAULA-SILVA

Francisco Wanderley Garcia Paula-Silva has a D.D.S., an M.Sc., and a Ph.D. He is a full-time professor of pediatric dentistry at the School of Dentistry of Ribeirão Preto at the University of São Paulo. Francisco is the lead investigator of a group that studies the mechanisms involved in dental pulp differentiation under inflammatory conditions. *franciscogarcia@forp.usp.br

APÊNDICE B – Trabalho completo publicado na área pesquisada¹⁰¹.

CÉLULAS-TRONCO DENTÁRIAS: CARACTERÍSTICAS E APLICABILIDADES NA BIOENGENHARIA TECIDUAL

Caroline Amaro da Silva¹, Luciano Aparecido de Almeida-Junior², Francisco

Wanderley Garcia Paula-Silva³

¹Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)/Universidade de São Paulo (USP),

(caroline.amaro.silva@usp.br)

²Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)/Universidade de São Paulo (USP),

(luciano_odontologia@usp.br)

³Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)/Universidade de São Paulo (USP),

(franciscogarcia@usp.br)

Resumo

Introdução: Atualmente, com o avanço da biologia celular, há uma maior variedade de técnicas utilizadas para regeneração/reparo tecidual, destacando-se o uso das células-tronco. **Objetivo:** Realizar uma revisão de literatura sobre as características e aplicações clínicas das células-tronco de origem dentária. **Método:** As bases de dados utilizadas foram Medline (Pubmed), Scientific Eletronic Library Online (SCIELO) e Periódicos CAPES, tendo como critérios de inclusão artigos que utilizaram células-tronco dentária em estudos *in vitro* ou *in vivo*, indexados no período de 2009 a 2021, nos idiomas português e inglês. **Resultados:** Os avanços dos estudos utilizando células-tronco mesenquimais evidenciaram que estas possuem grande capacidade de proliferação, autorrenovação e potencial para se diferenciar em diversas linhagens celulares como osteoblastos, odontoblastos, adipócitos, neurônios e células endoteliais, tornando-se uma alternativa promissora para ampliar as possibilidades terapêuticas frente a órgãos ou tecidos lesados por doenças, traumas ou deformidades congênicas. A Odontologia possui um importante papel na evolução da bioengenharia e inúmeras pesquisas têm isolado essas células em regiões da boca, como as células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), células-tronco de dentes permanentes (DPSC), células-tronco do ligamento periodontal (DPLSC), células-tronco da papila apical dentária (SCAP) e células-tronco do folículo dental (DFPC). Em 2000, Gronthos e colaboradores foram os pioneiros a caracterizar as células-tronco pulpare, comprovando sua similaridade às células-tronco mesenquimais da medula óssea. Além de sua alta taxa proliferativa e possibilidades para a regeneração ou reparo do complexo dentinopulpar em dentes comprometidos, tais células são uma fonte atraente para o tratamento de doenças como o Parkinson, o Alzheimer, a diabetes e o câncer. **Conclusão:** As células-tronco possuem propriedades ótimas de multidiferenciação, devido à facilidade de acesso e obtenção. Acredita-se que, em um futuro não muito distante, o uso dessas células se torne usual. No entanto, até o presente momento, mais estudos ainda são necessários para confirmar sua viabilidade.

Palavras-chave: Células-tronco; Engenharia tecidual; Odontologia.

Área Temática: Inovações e Tecnologias na Biologia Celular.

Modalidade: Trabalho completo.



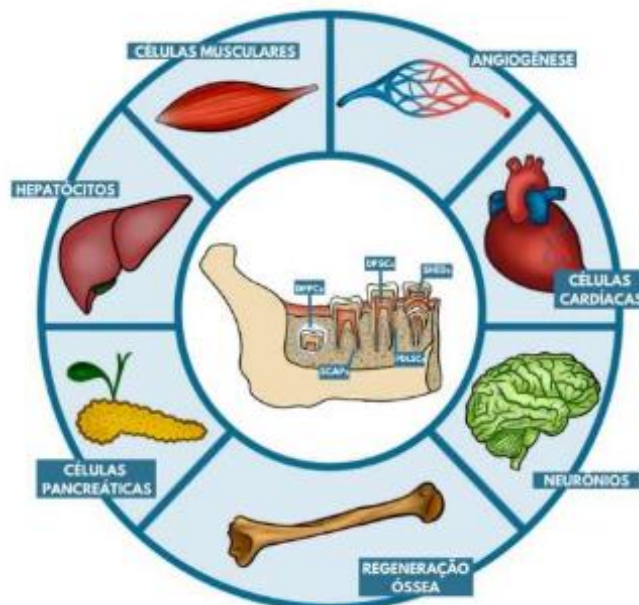
Avanços na biologia molecular e celular vêm contribuindo de forma expressiva para o desenvolvimento da engenharia tecidual (Silva et al., 2019). Nesse cenário, a busca por uma fonte que permita a reparação e/ou regeneração de órgãos e tecidos lesados é crescente (Machado et al., 2015). Como alternativa promissora, as células-tronco estão sendo cada vez mais estudadas e estas se destacam pela sua alta capacidade proliferativa, assim como, potencial de diferenciação em diversos tipos celulares (Pereira et al., 2018).

O termo células-tronco foi proposto, pela primeira vez em 1908, pelo histologista russo, Alexandre Maximov que postulou a existência de células-tronco de origem hematopoiética (Pereira et al., 2018). Atualmente, são definidas como células precursoras indiferenciadas com capacidade de autorrenovação ilimitadas e de produzir pelo menos um tipo celular altamente especializado (Silva et al., 2019). Existem duas categorias de células-tronco: as embrionárias pluripotentes, as quais são encontradas na massa celular do blastocisto e a linhagem de células uni ou multipotentes, que são encontradas em tecidos especializados e diferenciados, como hematopoiético, neural, pele, retina, fígado, medula óssea e dentes (Araújo et al., 2020).

Embora as células-tronco embrionárias possam se diferenciar em todos os tecidos, os métodos para sua obtenção esbarram em dilemas éticos, legais, religiosos, morais e políticos, sendo assim, a utilização de células-tronco mesenquimais é favorável para pesquisas e tratamentos devido a sua promissora característica de reparo e homeostase tecidual (Nascimento; Galvão, 2019). No que tange a Odontologia, inúmeros estudos têm isolado células-tronco mesenquimais da polpa dos dentes decíduos, dentes permanentes, no periodonto e na gengiva (Paula-Silva et al., 2009; Okajcekova et al., 2020). Essas células são altamente proliferativas, apresentam propriedades de multidiferenciação, além de facilidade de obtenção e boa interatividade com biomateriais (Taumaturgo; Vasques; Figueiredo, 2016), sugerindo fortemente suas possíveis aplicações na Odontologia e Medicina regenerativas (Silva et al., 2019).

As células-tronco dentárias representam um grande avanço para a Odontologia, porém a cada nova descoberta, mais questionamentos e desafios aparecem para confirmar sua viabilidade (Pereira et al., 2018). Estudos recentes demonstram que as células indiferenciadas nos tecidos dentários (Figura 1) são uma alternativa promissora devido às terapias biológicas baseadas na regeneração/reparo de órgãos e tecidos lesados por doenças, traumas e deformidades congênitas (Machado et al., 2015; Park; Cha; Park, 2016; Nascimento; Galvão, 2019).

Figura 1. Fontes de células-tronco dentárias.



Desenho esquemático que ilustra as principais fontes de células-tronco dentárias, assim como algumas das principais aplicabilidades clínicas futuras visionadas.

Fonte: Autores, 2021.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre as características e aplicações clínicas das células-tronco de origem dentária.

2 MÉTODO

Realizou-se uma revisão de estudos disponíveis na literatura, publicados no período de 2009 a 2021, por meio de busca bibliográfica nas bases de dados Pubmed, SCIELO e Periódicos CAPES. Para a pesquisa, foram utilizados os seguintes descritores: Células-tronco (Stem cells), Engenharia tecidual (Tissue engineering) e Odontologia (Dentistry). Os cruzamentos entre os descritores foram realizados entre "células-tronco" (stem cells) e um dos outros dois descritores, utilizando o operador booleano "AND".



Como critérios de inclusão, foram adotados artigos nos idiomas inglês e português, artigos que utilizaram células-tronco de origem dentária em estudos *in vitro* ou *in vivo*, revisão de literatura, trabalho de conclusão de curso, dissertação de mestrado e tese de doutorado. Foram observados alguns aspectos para a inclusão dos estudos na revisão, como a significância, a confiabilidade e clareza no detalhamento metodológico das informações apresentadas. Além disso, foi indispensável a disponibilidade integral do texto para sua inclusão no estudo.

Foram excluídos da amostra os trabalhos que não apresentaram relevância sobre o tema abordado e que não utilizaram células-tronco de origem dentária nos experimentos. Dessa forma, após criteriosa filtragem, foram selecionadas 27 referências nesta revisão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células-tronco dentárias constituem uma atraente fonte para a bioengenharia tecidual devido a sua acessibilidade e por serem obtidas de forma minimamente invasiva, podendo ser útil em vários cenários clínicos, pois, são menos propensas a desenvolver tumores quando transplantadas (Pereira et al., 2018).

Estas células representam uma alternativa terapêutica para muitas doenças, como diabetes, anomalias congênitas, injúrias do tecido nervoso, Parkinson, Alzheimer e outras alterações degenerativas, exposições pulpares, defeitos periodontais e a perda do órgão dentário (Nascimento; Galvão, 2019).

Células-tronco da polpa dentária

A polpa dentária apresenta funções importantes para a manutenção de um dente, sendo elas: inervação, formação de dentina, resposta imunológica, suprimentos de nutrientes e oxigênio (Okajcekova et al., 2020). É constituída por um tecido conjuntivo frouxo e dividida em quatro camadas, sendo a terceira composta por células progenitoras com plasticidade e pluripotência (Weiss et al., 2020).

As células-tronco da polpa dentária foram descritas pela primeira vez por Gronthos e colaboradores, em 2000, que isolaram as células da polpa de terceiro molar humano e compararam com as células-tronco da medula óssea (Okajcekova et al., 2020; Pereira et al., 2018). Essas células apresentaram heterogeneidade, multipotencialidade, capacidade de proliferação e de formação de colônias *in vitro* (Pereira et al., 2018). Em seguida, também foi descoberta uma rica fonte de células-tronco mesenquimais na polpa de dente decíduo humano (Pereira et al., 2018; Silva et al., 2019). Estas, por sua vez, também apresentaram capacidade



de proliferação e de diferenciação, além de poderem reparar estruturas dentárias danificadas, induzir regeneração óssea e, possivelmente, tratar tecidos neurais lesados. (Silva et al., 2019; Gancheva et al., 2019; Okajcekova et al., 2020).

As células-tronco da polpa de dentes permanentes ou DPSCs representam menos que 1% da população de células presentes na polpa dentária (Oliveira, 2016). São capazes de produzir tecido morfológico com características funcionais análogos aos da polpa dentária (Xuan et al., 2018). Requerem um meio indutor e um arcabouço para induzir a formação de osso, cimento e dentina *in vivo* (Pereira et al., 2016; Piva et al., 2017).

As DPSCs foram transplantadas no líquido cefalorraquidiano de ratos que foram induzidas lesões corticais e em análise posterior, essas células expressaram marcadores específicos de neurônios lesionados (Machado et al., 2015). Também são capazes, *in vitro* e em transplantes *in vivo*, de formar dentina ectópica, impressionando pela sua habilidade de gerar um complexo dentinopulpar, composto por matriz mineralizada, túbulos dentinários alinhados e preenchidos por prolongamentos de odontoblastos – arranjo similar ao encontrado nas estruturas dentárias humanas naturais (Araújo et al., 2020).

As células-tronco da polpa de dentes deciduos ou SHEDs foram identificadas como uma população de células clonogênicas com alta capacidade proliferativa, capazes de formar osso e dentina (Araújo et al., 2020). Quando comparadas às células-tronco provenientes da medula óssea e da polpa de dentes permanentes, apresentaram maior taxa de proliferação, indicando que possuem habilidade de se diferenciarem em odontoblastos funcionais, condrócitos, adipócitos, células neurais e endoteliais, além de estimularem a osteogênese após transplantação *in vivo* (Pereira et al., 2016). Xuan et al., 2018 usaram dentes permanentes jovens que sofreram trauma como modelo para avaliar se a implantação de SHEDs no interior do canal radicular poderia regenerar o tecido pulpar perdido e concluíram que em 6 e 12 meses após o tratamento, o comprimento da raiz aumentou e o forame apical foi fechado. Também observaram que a implantação dessas células não teve efeitos sobre a resposta imune, função hepática e função renal, após 24 meses do tratamento. Além dessas aplicações, as SHEDs ajudaram a elucidar os mecanismos etiológicos da fissura lábio palatina, sendo utilizadas na bioengenharia dos tecidos alterados nessa patologia (Tanikawa et al., 2020).

Células-tronco da papila apical

O primeiro relato de isolamento de uma população de SCAPs, foi realizado por Sonoyama e colaboradores, em 2006, confirmando que esta estrutura representa uma fonte de células-tronco mesenquimais. (Meneses, 2020). Essas células apresentam heterogenicidade, e



seu perfil molecular apresenta-se dinâmico devido à sua habilidade de expressar diferentes marcadores, dependendo da sua ativação e diferenciação (Meneses, 2020).

As SCAPs apresentam potencial para se diferenciar em osteoblastos, odontoblastos e em outros tipos celulares, como adipócitos e neurônios, semelhantes ao observado em células-tronco pulpares e da medula óssea (Meneses, 2020). Em relato de caso, Chrepa et al., 2017 removeram e processaram a papila apical de um dente com necrose pulpar e rizogênese incompleta para cultura celular e análise imunohistoquímica e observaram que, mesmo sobre condições inflamatórias, as SCAPs mantiveram a sua viabilidade celular e expressaram os mesmos marcadores de células da papila apical provenientes de elementos dentais hígidos.

Sendo assim, um estudo comprovou que as células-tronco da papila dentária têm capacidade de formar dentina primária para a raiz, sendo essa constatação validada quando essas células foram transplantadas em ratos imunocomprometidos em uma matriz apropriada, evidenciando a formação de estrutura semelhante ao complexo dentinopulpar (Pereira et al., 2016).

Células-tronco do ligamento periodontal

As células-tronco do ligamento periodontal ou PDLSCs têm potencial para diferenciação em múltiplas linhagens, sendo capazes de adquirir fenótipo adipogênico, osteogênico e condrogênico *in vivo* (Paula-Silva et al., 2010; Pereira et al., 2016). Podem também regenerar cimento dentário e ligamento periodontal em vários modelos animais (Tatullo et al., 2019). Atualmente as pesquisas com células-tronco do ligamento periodontal estão ganhando crescente popularidade e trazendo novas possibilidades no tratamento de distúrbios relacionados à inflamação e regeneração periodontal (Ma et al., 2019; Hu et al., 2018; Zhu et al., 2018).

Em estudo *in vivo*, foram extraídas e transplantadas células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do ligamento periodontal humano (PDL-MS) para observação da regeneração periodontal. Essas células foram isoladas de dentes de dez pacientes e cultivadas com suplementos osteoindutores por duas semanas em placas de cultura. Em seguida, foram transplantados na superfície de raízes dentárias. Os resultados validaram a segurança e eficácia das PDL-MS em defeitos periodontais graves, reduzindo a profundidade de sondagem e ganhando espaço clínico de inserção. Esses efeitos terapêuticos foram acompanhados por 19 meses e não houve eventos adversos (Onizuka e Iwata, 2019).

Em outro estudo, PDLSCs foram cultivadas e induzidas osteogenicamente e depois semeadas em arcabouço bifásico de fosfato de cálcio (BCP). Os resultados mostraram que tal



Nos últimos anos, o empenho na busca por formas de permitir a reparação tecidual, e até mesmo a formação de novos tecidos e órgãos é crescente. A bioengenharia vem desenvolvendo substitutos biológicos capazes de manter, restaurar ou aprimorar a função de órgãos e/ou tecidos injuriados. Destaca-se nessa nova abordagem o uso de células-tronco e a Odontologia que vem desempenhando papel fundamental para o desenvolvimento dessas terapias. A potencialidade terapêutica das células-tronco dentárias tem sido claramente demonstrada por diversos estudos. Por serem fontes de fácil acesso e obtenção, tais células geram bastante interesse para a Medicina regenerativa.

Caracterizadas pela sua alta capacidade de proliferação e diferenciação em vários tecidos, as células-tronco dentárias conseguem regenerar o complexo dentinopulpar, o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar. Além das aplicações na Odontologia, essas células demonstraram ser uma alternativa promissora no tratamento de doenças degenerativas (doença de Parkinson e doença de Alzheimer), diabetes mellitus, doenças autoimunes e regenerar tecido ósseo e muscular.

ARAÚJO, A. G.; VASCONCELOS, R. G.; VASCONCELOS, M. G. Células-tronco derivadas da polpa dentária - diferenciação, proliferação e mediadores químicos envolvidos: uma revisão de literatura. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 2, p. 435-458, 2020.

CHREPA, V.; PRITCHER, B.; HENRY, M. A.; DIÓGENES, A. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pupal necrosis and apical periodontitis. *J Endo.* v.43, n. 4, p. 561-567, 2017.

GANCHEVA, M. R. et al. Using Dental Pulp Stem Cells for Stroke Therapy. *Frontiers In Neurology*, Lausanne, v. 10, p. 422-439, abr. 2019.

HU, L.; LIU, Y.; WANG, S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis*. v. 24, n. 5, p. 696-705, 2017.

LIU, J. et al. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*, Suíça. v. 8, n. 6, p. 537, 2019.

MA, L. et al. Maintained Properties of Aged Dental Pulp Stem Cells for Superior Periodontal Tissue Regeneration. *Aging and Disease*, Califórnia, v. 10, n. 2, 2019.

MACHADO, C. E. S.; DIOGO, J. F.; GARCIA, V.; FERLIN, C. R.; OLIVEIRA, D. T. N.; PRATA, C. A. Células-tronco de origem dental: características e aplicações na medicina e odontologia. *Rev. Odontol. Araçatuba* (Online), v. 36, n. 1, p. 36-40, 2015.

MATICHESCU, A.; ARDELEAN, L. C.; RUSU, L. C.; CRACIUN, D.; BRATU, E. A.; BABUCE, M.; LERETTER, M. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration-A Review. *Materials* (Basel), v. 1, n. 22, p. 5303, 2020.

MENESES, C. C. B. Papel de Endocanabinoides na modulação de células-tronco de Papila Apical in vitro. 2020. 201 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

NASCIMENTO, F. M.; GALVÃO, L. A. A importância das células - tronco em polpa de dentes decíduos: revisão de literatura. 2019. 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Centro Universitário São Lucas, Porto Velho, 2019.

OKAJCEKOVA, T. et al. A Comparative In Vitro Analysis of the Osteogenic Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Using Various Differentiation Conditions. *International Journal Of Molecular Sciences*, Basileia, v. 21, n. 7, p. 2280, 2020.

OLIVEIRA, N. K. Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ONIZUKA, S.; IWATA, T. Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Periodontal Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, Suíça, v. 20, n. 11, p. 2796, 2019.

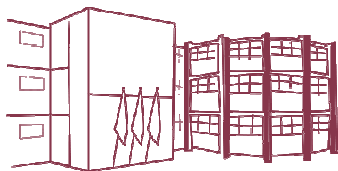
PARK, Y.J.; CHA, S.; PARK, Y. S. Regenerative Applications Using Tooth Derived Stem Cells in Other Than Tooth Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells Int*, v. 2016, Artigo ID 9305986, 2016.

PAULA-SILVA, F. W.; GHOSH, A.; SILVA, L. A.; KAPILA, Y. L. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res*, v. 88, n. 4, p.339-44, 2009.

PAULA-SILVA, F.W.; GHOSH, A.; ARZATE, H.; KAPILA, S.; DA SILVA, L. A.; KAPILA, Y. L. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMPI- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int*, v. 87, n. 2, p. 144-57, 2010.

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, L.; & ALMEIDA, L. (2018). Células tronco dentárias. *REVISTA DO CROMG*, v. 17, n. 2, 2018.

PIVA, E et al. Dental pulp tissue regeneration using dental pulp stem cells isolated and expanded in human serum. *J Endod*, v. 43, n. 4, p. 568-11, 2017.



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 536ª Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP